**Posudek na disertační práci Mgr. Evy Seifertové „Genetické mapování u rodu *Xenopus*."**

Bez nadsázky lze říci, že cytogenetika nehumánních objektů má v české (a pochopitelně též slovenské) biologii dlouhou tradici, dělnou přítomnost a jistě i nadějnou budoucnost. Předložený disertační spis je proto dalším kaménkem do cytogenetické mozaiky současné biologie s významnou extenzí do genomiky obojživelníků a evoluční biologie obecně. Z tohoto hlediska je tedy předložený spis vysoce aktuální příspěvek k tomuto malému sice rozsahem, nicméně neobyčejně důležitému oboru. Přitom dnešní cytogenetika se dělí do dvou, dle mého názoru, hlavních vývojových linií: i) comparativní a deskriptivní cytogenetika nehumáních objektů (co naplat, poměry cytogenetické známe jen u malého zlomku existující organismální diversity, tudíž se jedná o pracnou, nevděčnou, pachtivou a na čas náročnou otročinu) a ii) „hornictví" genomů, tedy výpravy do hlouby genomů. Není pochyb, že předložená práce náleží ke druhému směru. Práce má na poměry u nás panující poněkud nezvyklou formu, chvalitebně zamýšlí být skutečným disertačním spisem a nikoliv chabě komentovaný soubor prací již publikovaných v primární odborné literatuře. Toto pochvalné konstatování má obecnější rozměr otázky – jak vlastně mají vypadat disertační práce? Dnes je standardem téměř všude soubor publikovaných prací a „uvaří" se k tomu více nebo méně podařený úvod (jako jsem tomu byl svědkem na slovutném učilišti Karlově před časem, kde úvodní část byla rozsahem stejně dlouhé jako Poděkování, jen s tím rozdílem, že úvod byl psán s řádkováním 2, zatímco poděkování s řádkováním 1.5!). V jedné rovině je to v pořádku, disertant se vyučuje na vědce a publikace zahrnuté v disertaci dokazuje, že zvládl řemeslo, na straně druhé výchova vědce (nebo jemu na roveň postaveného vzdělání) není jen produkce publikací (jak se dnes s dovolením fedruje na univerzitách, protože to školám vyhovuje, ježto jim nabíhají body). O tomto tvrzení jsem s mdlobnou jistotou přesvědčen - disertace by měla prokázat schopnost disertanta formulovat problém, srovnat a precizovat myšlenky a také prokázat kultivované užívání rodného jazyka. Říká se tomu vzdělání, což není jen suma dovedností a znalostí, prosím! Nuže, když jsem byl sdělil své stanovisko k této věci, přikročím k předložené habilitaci. Práce je založena na čtyřech primárních (čili publikovaných v časopisech honosícím se indikátorem IF databáze WoS společnosti Tomson Reuters) publikacích ve velmi kvalitních časopisech oboru s velmi přísným (jak osobně vím) recenzním řízením; u jedné práce je uchazečka prvním autorem, v ostatních členem autorského kolektivu. Tato okolnost samozřejmě není chybou, neb v těchto genomicky orientovaných naukách je obvyklým publikovat ve víceautorských kolektivech. Skutečnost, že disertačních spis je založen na zmíněných publikacích, tedy již jednou řádně oponovaných, samozřejmě velmi omezuje možnosti oponenta. Je to však na druhé straně výzvou, aby si smlsnul na doprovodném komentáři a formálních stránkách disertačního spisu, tedy na záležitostech vesměs podružných. To potom umožňuje oponentovi, aby svoji odbornou ignoranci týkající se tématu disertace zahalil závějí dlouhých a rozvinutých vět bohatě okořeněných rozvinutými vlastními i nevlastními přívlastky. Což v následujících řádkách činím formou stručně komentovaného seznamu.

Abstrakt v češtině a angličtině nejsou ekvivalentními mutacemi téhož textu. Proč?
Seznam zkratek je vysoce žádoucí. Naproti tomu některá jejich vysvětlení jsou jen v angličtině, některé jen v češtině a některé v obou jazycích. Navíc jejich užití v dalším textu je však nejednotné, někde se uvádí plný název + zkratka, někde jen (tj. žádoucím způsobem) zkratka, jinde opět plný název, přestože je obsažen v seznamu zkratek. Je zřejmé,že seznam zkratek nebyl konfrontován s textem.
Text obecně obsahuje celou řadu nepřesností, laboratorního slangu a formulačních, řekněme to mírně, neobratností, např.:
Str. 3. Objekt studia se jmenuje česky drápatka tropická a proto by to mělo být na prvním místě užití uvedeno. Další věta obsahuje gramatickou chybu – je-li předmětem studia

drápatka, potom nebyl osekvenován jeho genom, ale její genom. 3. Odstavec – velkou výhodou xenopího modelu – je typicky laboratorní slang. Správně je model drápatka. Na konci téže věty musí být.. stádiu emryonálního vývoje. Kapitola 1.2. Taxonomie prozrazuje, že autorka si není vědoma významu tohoto termínu (ač jistě je její primárně zaměření jiné, to je samozřejmé, nezbavuje však povinnosti užívat termíny přesně). Termíny systematika, taxonomie (a nomenklatura) se liší objektem studia. Zatímco systematika se zabývá diverzitou současných i vyhynulých organismů, objektem studi taxonomie je systematika. Zde se často chybuje. Literární odkaz (str. 9) Poinar a Cannatella (1988) je záhadný, neboť je užit pro doložení příbuznosti diskutovaných taxonů drápatek, drápateček a pip, ale není nic než komentář k jinému paleontologickému článku. Proč byl použit? Na konci téhož odstavce je použit termín Drápatka tropická s velkým písmenem na D. Proč? To není přece český úzus! Z dalšího odstavceje zřejmé, že autorka nemá zřejmě úplně jasno mezi biologickou a evoluční polyploidií, připojuji citát z učebnice vydané minulý rok:

**Co je to polyplodie – evoluční vs. biologická ploidie**

Snad největší nedorozumění spojené s termínem polyploidie je nerozlišování mezi biologickou a evoluční úrovní ploidních stupňů; v tomto smyslu je termín polyploidie svým způsobem homonymem označujícím dvě různé věci. Přes početné výjimky (bezobratlí), naprostá většina živočichů (Metazoa) má duplikovanou sádku chromozomů, tedy 2n, jsou ***biologicky diploidní***. Tato situace se evolučně vyvinula spolu s mechanizmem pohlavního rozmnožování. Vývoj jejich gamet (gametogeneze) pro pohlavní rozmnožování se pak uskutečňuje pomocí meiotického buněčného dělení (meiózy) zahrnující dvě následná jaderná dělení, ale pouze jeden cyklus replikace DNA, což umožňuje segregaci jedné kopie každého homologního chromozomu do každé nové gamety. Přítomnost jedné sady chromozomů v gametě (***haploidie***, 1n) a pohlavní rozmnožování zajišťují znovunastolení diploidního stavu celého nového organizmu v každé generaci. V tomto smyslu každý organizmus, který vykazuje takovéto ***diploidní/ haploidní cykly*** přes každou generaci, je biologicky diploidní a to bez ohledu na počet chromozomů/ obsah DNA v jádře. Jinými slovy bez ohledu na evolučně ploidní stav genomu. ***Polyploidie*** je potom multiplikace (zmnožení, znásobení) celé chromozomové sádky (tj. např. n, 2n, 3n…) nad normální haploidní či diploidní sádku chromozomů. Dále je nutné si uvědomit, že **polyploidie vzniká jako vedlejší efekt** jiných procesů biotických i abiotických, případně i v jejich kombinaci. Takovýmito příčinami jsou zejména hybridizační události (zejména mezidruhová hybridizace určitého typu), přestárnutí gamet, fyzikální, zejména teplotní vlivy atd. Takové spontánní polyploidizační události, ať již způsobené jakkoliv, nebo přesněji výsledky těchto událostí, se za určitých podmínek mohou fixovat v evoluci a mít potom za následek vznik taxonů (tj. druhů, rodů, linií, čeledí atd.), které jsou **evolučně polyploidního původu**, byť se u nich vyskytoval dříve zmíněný **diploidní/haploidní cyklus** u každé generace a dotyčný organizmus byl tak **biologicky diploidní**. V tomto smyslu je tedy termín **evoluční polyploidie smysluplným jen ve fylogenetickém smyslu**, např. abychom mohli konstatovat, že genom kapra obecného je evolučně tetraploidního původu (2n = 100), musíme mít údaje o tom, že existuje řada druhů jiných kaprovitých ryb, jejichž genom je evolučně diploidní (2n = 48–50).

Správně by tedy mělo být evolučně diploidní, evolučně alotetraploidní, atd. Tato výtka se vztahuje k více místům textu. Skutečnost, že autorka taky dosti nepřesně formuluje ukazuje užití adjektiva nižší pro generační interval.Ten nemůže být nižší, ale kratší být může! Rovněž takovými neobratnostmi text oplývá i jinde.

Str. 9 Názvosloví chromozómů. Překvapila mě formulace „…nekonvenčním srovnání *p* a *q* ramen“ (i když správně by bylo <u>délky</u> *p* a *q* ramen), vždyť od dřevních dob novověké cytogenetiky se užívá systém dle Levana a kol (1964) (Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52*:* 201–220. doi: 10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x.), který je právě založen na poměru délky *p* a *q* ramen! Také se táži proč je systém užitý v práci Khoka a kol.(2009) více „tradičnější“ (když odhlédnu od té gramaticky nesmyslné kumulace stupňování adjektiva, jedná se o pleonasmus, v tomto případě z angličtiny)? Rovněž je mi záhadou termín „více metacentrický chromozóm“.Vyrostl jsem a stojím v té víře, že chromozóm má různou polohu centromery. Jak to tedy je?

Str. 10. Zde se vyskytuje formulace „…v sex určující oblasti“ a užívám jí jako odstrašující příklad anglismů, které se vyskytují hojně v textu, nebudu je dále komentovat, ale považuji za nezbytné na to upozornit a opakuji znova své přesvědčení – učenec ze slavné stolice Karlovy by měl být nadán kultivovaným uživáním rodného jazyka, i odborného! V čem se například výše uvedená nehoráznost liší od věty „Jedu Mercedes autem přes Vltava řeku do Oů Tů Arény“? Dalším přikladem nepřesné formulace je 2. věta 2. Odstavce. Zde se píše, že „*X*.

*tropicalis* nicméně tento gen postrádá“. To samozřejmě není pravda, termín *X. tropicalis* označuje druh, tedy kategorii označující reálnou entitu, („..jež mohou být objeveny a popsány s větší či menší mírou úspěchu v závislosti na užitých technikách, ať už je můžeme nalézt nebo ne, pojmenování takových entit je hypotéza, že pojmenována jednotka odpovídá skutečné entitě v realitě“) ta gen mít nemůže. Jak jinak by kritizovaná věta zněla kdyby začínala „Genom *X. tropicalis* nicméně tento gen postrádá“. K části 1.2.2.1. viz o polyploidii výše. Také zde je zřejmé, že autorka ne úplně přesně formuluje.
Str 11 část Určení pohlaví. Věta „….co se podrod *Xenopus* oddělil od poddruhu *Silurana*,…“. Zde se přiznám, že jsem zmaten, pokud se jedná o překlep, tak bych to chápal. Ale pokud ne, tak bych porosil o vysvětlení. Na téže straně, věta úplně dole ukazuje, že autorka pravděpodobně nezná přesný význam adjektiva zevrubný. Zmiňované mapy genomů nemohou být zároveň zevrubné a zároveň mít velké vzdálenosti jednotlivých markerů.
Str. 12 Věta na konci druhého odstavci „U druhu *Medaka* byl…“ je nepřípustné zkrácení, jméno medaka je vyhraženo druhu *Oryzias latipes*, česky halančík rýžovištní. První věta dalšího odstavce – termín alotetraploidita se mi zdá, mírně řečeno, jako formulační zvěrstvo. Podobně na str. 13 termín „gynogenetické křížení“.
Str 14. Věta „ Značnou výhodou této techniky je i skutečnost, že není nutná znalost sekvencí studovaných organismů“ je záhadou, jak může mít organismus sekvence? Ale genom je ovšem obsahovat může, to je dokázané. Zase příklad ledabylé formulace.
Str. 15. V prvním odstavci je užita zkratka bp, ale není uvedena v seznamu zkratek. Ač je obecně známá, má to tak ale být?
Str. 18. První věta 4. Odstavce obsahuje opravdový skvost „…které poskytuje technologie od Pacific Biosciencu“. To přece nemůže být myšleno vážně! Já nevím, jsem pravda po složité oční operaci, ale teď už vidím dobře a navíc jsem si to nechal potvrdit od více kolegů, že dobře vidím skloňovat slovo Bioscience. Nebo je to snad rumunsky?
Str. 21. 1.4.1. Mikrodisekce. Co to je „buněčný kompartment“? Nemáme český ekvivalent? A hned dále v dalším oddíle Laserová mikrodisekce se vyskytuje další perla „…světelná mikroskopie s paprskovým laserem“. Nejsa vzdělán ve fyzice, táži se, zda může existovat nějaký laser bez paprsků, třeba mi něco uniklo, dnešní pokrok technologie je obrovský.
Str. 22. Také zde se objevuje několik zajímavých tvrzení. Tak například se dovíme, že „Chromozómy jsou barveny chromozomálně-specifickým fluorochromem…“ (odhlédneme-li od anglismu jako, řekněme, Brno). Myslí se tím bázově nespecifický fluorchróm, který rovnoměrně barví všechnu DNA?
**Shrnutí.** Bez ohledu na výše zmíněné textové poklesky (z nichž doufám je autorka patřičně zdrcena) je **Literární úvod** žádoucím způsobem hutně formulován, obsahuje všechny důležité skutečnosti týkajích se charakterizace modelu drápatek, jejich cytogenetické a genomické charakteristiky, včetně určení pohlaví, dále se zmiňuje o vazebném i fyzickém genetickém mapování u drápatek, krátce charakterizuje metody in situ hybridizace sond připravených z různých úseků DNA, ale zejména se zabývá různými metodami sekvenování a zpracování výstupních dat. Poté se podrobně zabývá genomem svého modelu a dále metodami amplifikace genomu vyřezaných chromozómů nebo jejich částí, včetně rozboru vhodnosti či nevhodnosti těchto metod. Úvod končí stručným vhledem do bioinformatiky a příslušných programů zpracování genomických dat. Z dikce celé této části je zřejmé, že hlavním tématem autorky jsou výše uvedené metody a postupy. Celkově je zřejmé, že autorka všechny tyto bezpochyby náročné postupy zvládla, je s nimi dobře obeznámená a dovede je užívat při vlastní práci, o čemž samozřejmě svědčí publikované práce zařazené do disertace.
**Shrnutí výsledků a diskuse.** Rovněž zde se naléza větší množství formulačních neobratností, z nichž upozorním jen na některé.
Str. 66. Věta „…byl zjišťován výskyt jednotlivých polymorfií“ budí dojem, že existuje termín polymorfie a nikoliv polymorfismus. Rád bych se vé věci pouči. Jak to je? Na konci téže strányky se vyskytuje slangový výraz „… v šesti různých mitózách“. Nemělo být – chromozómů 6 buněk mitotického dělení?

Str. 73. Citace Anderson et al. (2012) není v Seznamu použité literatury, ale v Autoreferátu je uvedena. Navíc je formálně napsána jako (Anderson et al. 2012), ale obecný úzus je jako na začátku této věty.

**Shrnutí.** V obecné rovině vítám tuto část disertačního spisu zejména proto, že diskutuje a ukazuje na řadu problémů, se kterými se autorka při práci setkala. Ukazuje také na další směry vývoje cytogenomiky modelu drápatky. Dle mých zkušeností, takovéto kritické zhodnocení vlastní práce nebývá součástí disertací, nicméně poznání (a přiznání si) slabých, nevyřešených, či chybějících míst své práce je ústředním kritickým bodem skutečné vědy. Takových míst bylo v diskusi označeno mnoho a oceňuji tuto kritickou analýzu a vytyčení dalšího směru bádání. Souhlasím více než silně také se závěrem, kde se říká, že nově vypracované cytogenomické techniky (rozumí se mikrodisekce chromozómůnebo jejich částí a jejich následné sekvenování a bioinformatické zpracování dat) je možné použít i u dalších modelových organismů. Já k tomu dodávám: i u nemodelových organismů. Rychlý vývoj těchto technik a jejich zlevňování totiž smazává hranici mezi těmito kategoriemi organismů. Jako příklad aktuálnosti tohoto disertačního spisu uvádím, že jakmile jsem spis ponechalna svém pracovním stole nestřežen, byl mi uzmut studenty naší laboratoře a pečlivě prostudován a kladně komentován. Myslím, že k tomu není dále co dodat.

Souhrnně je možno říci, a na základě vlastní zkušenosti z cytogenetické analýzy nelehkých objektů odvodit následující. Cytogenetika je věda, jejíž rozvoj obvykle závisel, a jak je vidět zde, závisí spíše na trpělivém zdokonalování metodických postupů než na oslnivých myšlenkových koncepcích. Metodický pokrok se odehrával především v oblasti humánní cytogenetiky a odtud byly postupy aplikovány do práce s jinými skupinami. Přitom již dlouho je zřejmé, že čím je organismus fylogeneticky vzdálenější lidem, tím obtížněji se hledají cytogenetické metody studia těchto organismů. Dovedu si proto představit technické problémy, jež jistě provázely disertantku během její práce a předložený spis je dokladem, že její snažení bylo více než úspěšné. Po formální stránce spis však vykazuje známky chvatu a asi by važadoval trochu pečlivější zpracování, počet překlepů jsem nalezl standardní a tyto nepovažuji za důstojné komentovat (i když u některých obvzláště půvabných mě svrběl prst, kterým datluji na klávesnici).

Závěrem mohu s radostí konstatovat, že dle mého soudu práce splňuje požadavky na udělení vědecko-akademické hodnosti philosophiae doctor a proto doporučuji můj skromný názor příslušné komisi k dalšímu řízení.

Petr Ráb V Liběchově 19. 5. 2014