



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  
č. účtu: 6063942/0800, Česká spořitelna Č. Budějovice  
www.entu.cas.cz | e-mail: entu@entu.cas.cz

## OPONENTSKÝ POSUDEK na diplomovou práci Bc. Ondřeje Smolíka

### Studium chromozomální evoluce u *Xenopus mello tropicalis*

Předložená diplomová práce se zabývá srovnávací analýzou karyotypů diploidní drápatky *Xenopus tropicalis* a tetraploidní *X. mello tropicalis*. Autor na základě morfometrické analýzy a laserové mikrodisekce získal materiál z jednotlivých chromosomů *X. tropicalis* a připravil z nich barvicí (tzv. "paintingové") sondy, které po nezbytné optimalizaci protokolu pro fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH) úspěšně použil k identifikaci příslušných chromosomů v komplementu *X. tropicalis* a odpovídajících chromosomálních kvartetů v karyotypu *X. mello tropicalis*. Třešničkou na dortu jsou pak výsledky hybridizačních experimentů se sondou připravenou z chromosomu 9 *X. tropicalis*, která v komplementu *X. mello tropicalis* označila vedle příslušného chromosomálního kvartetu také segment krátkého ramene chromosomu 2b.

Práce neobsahuje mnoho gramatických chyb. Bohužel však trpí špatným používáním termínů (např. analogy bazí místo hapteny/fluorochromy značených nukleotidů; genetické mapování místo fyzického mapování genů) a používáním podivných novotvarů (např. kompenzace dóze genů; specializační varianty (FISH); vizualizované sítě příbuzností; mapa příbuznosti vybraných genů) a formulací („...pozůstalá frakce RNA...; ("montovací" medium bylo) převrstveno krycím sklem ... a izolováno lakem; roztok byl převeden do formy a po zasazení hřebenu ponechán ke ztuhnutí; ...spotřeba S1 nukleázy ... byla směrodatná pro upuštění od jejího užití ve FISH"). Práci nepovažuji za čtivou a její autor, zdá se, postrádá cit pro český jazyk.

Také členění práce je pro mě dosti nezvyklé. Práce začíná krátkým Úvodem, který ve třech odstavcích seznamuje čtenáře s předmětem studia a motivací práce. Informace předložené v této části nejsou podloženy citacemi. Ačkoliv Úvod naznačuje, že se práce bude zabývat mechanismy vzniku polyploidie u drápatků rodu *Xenopus*, následující Cíle práce jsou víceméně metodické a neříkají, jakou biologickou otázku práce řeší.

Následuje encyklopedický Literární přehled, který čtenáři poskytuje základní informace o polyploidizaci, drápatkách rodu *Xenopus*, cytogenetických metodách a vybraných studiích karyotypové evoluce u nižších obratlovců. Literární přehled připomíná spíše výpisky z jednotlivých prací než kritické zhodnocení stavu poznání. To je nejvíce patrné v kapitole 3.4 zahrnující vybrané studie evoluce karyotypů. Například není jasné, jaký mají studie Da Silva a kol. 2016 a Silva a kol. 2016 vztah k předložené diplomové práci a výběr studií se tak zdá být náhodný. I když jde o vybrané práce, očekával bych, vzhledem k tomu, že je práce zaměřena na žáby, detailnější zpracování více než jedné studie zabývajících se

srovnávacím mapováním u žab (např. Brelsford a kol. 2013, *Evolution* 67: 2434–2440 nebo Dufresnes a kol. 2015 *Mol. Biol. Evol.* 32:2328–2337).

K této části mám několik dotazů. V kapitole 3.2 autor uvádí, že druhy ze skupiny Silurana mají podobné karyotypy. Na základě toho formuluje hypotézu „o extrémně blízké příbuznosti diploidních předků těchto tří druhů, kdy je možné v případě jejich evoluce připustit i mnohem méně předpokládanou autopolyploidii“. Dle obrázku 3 mají však tetraploidní druhy této skupiny společného předka. Navíc, pokud jsou si druhy blíže příbuzné, jak lze odlišit auto- a allopolyploidii? V kapitole 3.4 autor tvrdí, že počet a poloha rDNA klastrů může sloužit jako druhově specifický znak. Je skutečně znak variabilní i mezi populacemi možné použít k rozlišení dvou druhů? Jaka je lokalizace studovaných rDNA klastrů u druhů rodu *Astyanax* a jak může jejich amplifikace přispět ke speciaci? Autor dále uvádí, že k translokaci pozorované mezi *X. tropicalis* a *X. laevis* došlo během dvou nezávislých polyploidizačních událostí a to u dvou různých předků. Pokud je *X. laevis* tetraploid, jak u něho mohlo dojít ke dvěma polyploidizačním událostem?

Kapitola Materiál a metody velmi detailně popisuje provedené experimenty. Složení roztoků a enzymatických reakcí však často není uvedeno ve finálních koncentracích (viz např. Použité roztoky), ale tabulkách s objemy jednotlivých složek postrádajících řádné popisky. Některé informace jsou také v textu zbytečně dvakrát, např. etanolová precipitace DNA z kapitoly 4.4.5 je již zahrnuta v kapitole 4.3.2.5. Kapitoly 4.6.1 a 4.6.2 popisující dvě varianty FISH jsou v podstatě identické. Mnohé metodické přístupy byly již dříve publikovány, citace však v textu ve většině případů chybí.

Výsledky jsou zpracovány ve dvou tabulkách a čtyřech obrazových tabulích. Tabulka 1 obsahuje výsledky měření 33 metafázních figur a ačkoliv je k ní v textu odkazováno jako ke „statistice z měření“, uvádí pouze průměrné hodnoty bez jakékoli míry variability naměřených dat. Přestože autor upozorňuje na „výraznou odchylku“ u chromosomu 2b, zdá se, že rozdíly mezi *X. epitropicalis* a *X. mellotropicalis* nebyly statisticky srovnány a není tedy zřejmé, zda je odchylka statisticky signifikantní. Na Obrázku 7, který shrnuje výsledky optimalizace FISH, by bylo lepší prezentovat výsledky hybridizací se stejnou sondou, které by umožnily přímé porovnání jednotlivých optimalizací. Celkově však musím obrázky v celé práci pochválit. Převzaté obrázky prezentované v jiných kapitolách byly opatřeny českými popisky a vhodně doplňují text. Výsledky jsou pak jasně dokumentovány na dobře připravených obrazových tabulích a srozumitelně popsány.

V Diskuzi se autor zabývá optimalizací použitých FISH variant, diskutuje karyotypovou evoluci u *X. mellotropicalis* a velmi stručně nastiňuje další směřování projektu. V první části Diskuze autor dochází k závěru, že je za vysoké pozadí při hybridizacích s kompetitorovou DNA izolovanou standardní fenol-chloroformovou extrakcí zodpovědná kontaminace RNA, která hybridizovala s kompetitorem a tím snižovala jeho efektivní koncentraci. Celková RNA je však z velké části tvořena rRNA a jen její malé procento tvoří mRNA, která navíc hybridizuje jen k unikátní frakci genomu. Navíc, jak autor přiznává, inkubace kompetitorové

DNA s RNázou nevedla ke zlepšení výsledků. Zjišťoval autor čistotu izolované gDNA? Nemůže být rozdíl ve výsledcích dán např. kontaminací proteiny vázanými na DNA?

V druhé části diskuse autor interpretuje signál sondy připravené z chromosomu 9 *X. tropicalis* na chromosomu 2b *X. mellotropicalis* jako nerekiprokou translokaci, ke které muselo dojít u diploidního předka, a která tak potvrzuje allotetraploidii u *X. mellotropicalis*. Morfometrická analýza skutečně naznačuje, že se chromosom 2b *X. mellotropicalis* zvětšil. Zároveň se však nezdá, že by se chromosom 9a zmenšil, neboť poměr ramen tohoto chromosomu je u obou druhů drápatek stejný. Alternativním vysvětlením tedy může být inserce repetitivní sekvence do pericentromerické oblasti chromosomu 2b a její následná expanze v rámci ustavení částečné strukturní heterogenity mezi homeologními chromosomálními páry zmiňované v kapitole 3.1.3. Také dle mého názoru není možné na základě analýzy dvou druhů vyloučit, že k pozorované chromosomální mutaci došlo až po tetraploidizaci. Výsledky FISH ukazují, že se homeologní chromosomální páry v kvartetech liší, což potvrzuje, že páry tvoří v meióze bivalenty a k fixaci nově vzniklé chromosomální mutace by tak došlo pouze na jednom páru z kvartetu. Který ze scénářů je pravděpodobnější může rozhodnout pouze analýza dalšího druhu, např. *X. epitropicalis*, navrhaná autorem v závěru diskuse. Zvážil autor výše uvedené alternativy?

I přes veškerou kritiku musím konstatovat, že předložená práce s úspěchem řeší zajímavé téma a přináší originální výsledky. Autor využil moderní a metodicky poměrně náročné molekulárně cytogenetické přístupy a odvedl velké množství experimentální práce. Doufám, že výše zmíněné připomínky k výsledkům i interpretaci dat pomohou zlepšit připravovaný manuskript, který je přílohou této práce a přeji celému autorskému kolektivu jeho úspěšné a rychlé publikování.

V Levíně dne 10. 9. 2016

RNDr. Petr Nguyen, Ph.D.