

RNDr. Petr Nguyen, Ph.D.

Přírodovědecká fakulta JU

Branišovská 1760, 37005 České Budějovice

Věc: Oponentský posudek na diplomovou práci

Diplomová práce Bc. Matěje Kotze se zabývá karyotypovou evolucí u pavouků čeledí Araneidae a Mimetidae s cílem testovat hypotézu o možné roli celogenomových duplikací ve změnách jejich chromozomových počtů. Autor provedl u vybraných druhů pavouků klasickou i molekulárně cytogenetickou analýzu a stanovil velikost jejich genomu pomocí průtokové cytometrie.

Práce je standardně členěná. Literární přehled je poměrně dobře strukturován a uvádí čtenáře do biologie, systematiky a cytogenetiky studovaných pavouků. Text je vhodně doplněn převzatými fylogenetickými stromy, které by však mohly být detailněji popsány. Obr. 3 má nízké rozlišení.

Studované druhy jsou uvedeny v Tab. 1 v kapitole Materiál a metodika. Zde bych chtěl jen poznamenat, že popisek by měl být nad tabulkou a vysvětlivky pod tabulkou. Dále by mě zajímaly počty analyzovaných jedinců obou pohlaví a zda blíže neurčené druhy označené „sp.“ odkazují na materiál dosud neurčený nebo na druhy dosud nepopsané. Zahrnutí exotického materiálu reprezentovaného několika málo jedinci do studie považuji za problematické. Stejně tak použití DNA *Gandanameno* sp. pro konstrukci 18S rDNA sondy. Pro tento materiál by měla být uvedena alespoň sekvence *COI* uložená ve veřejných databázích a sonda by měla být osekvenována. Použitá metodika popsána poměrně obsáhle a dala by se zkrátit odkazem na manuály výrobců v případě komerčních souprav nebo citací v případě fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Použitý fyziologický roztok byl Lockwoodem připraven pro zavíječe *Ephestia kuehniella*, nikoli „Ephesitu“. Pokud chce autor uvádět použité zvětšení, měl by uvést celkové zvětšení mikroskopu, nikoli jen objektivu. Složení PCR reakcí je dle mého zbytečně uvedeno formou tabulek, co je však důležité, v těchto chybí koncentrace reagensů. Zde i v následujícím textu (např. pracovní roztok Rnazy A) bych preferoval finální koncentrace. Zajímalo by mě složení „Fluormixu“ z Tab. 4. Kap. 4.6.1.3 věnovaná sekvenaci obsahuje i získané sekvence a jejich analýzu, které by měly být ve výsledcích. Autor také uvádí, že amplikony byly sekvenovány na „MiSeq Illumina“. Skutečně? Jaký je princip a výhody Illumina sekvenování? V popisu výpočtu C-hodnoty postrádám „naměřenou hodnotu“ použitého rostlinného standardu. Co se tedy průtokovou cytometrií měřilo? Autor zmiňuje použití technických replik ze stejného jedince, byly použity i biologické repliky?

Výsledky jsou členěné na klasickou cytogenetickou analýzu, molekulární analýzu a průtokovou cytometrii. Zvláště molekulárně cytogenetická analýza je poměrně stručně komentovaná (v některých případech jen jednou větou). Proto myslím, že by bylo lepší cytogenetickou a molekulární analýzu sloučit a prezentovat všechny poznatky získané pro daný druh společně. Výsledky jsou doložené obsáhlou obrazovou dokumentací. Zde bych jen poznamenal, že obrázky by měly být řazeny a číslovány

tak jak se objevují v textu. Začít tedy výsledky odkazem na Obr. 29 z další kapitoly čtenáře nepotěší. Z neznámého důvodu je na obrázky v obrazových tabulích v textu odkazováno neobvyklým formátem. Jako příklad lze uvést „Obrázek 6, fig. B“ (tedy Obr. 6B), na který chybí odkaz v textu. Kvalita výsledků C-pruhování je tak špatná a tyto natolik neinformativní, že bych je do práce snad ani nezařazoval. K výsledkům cytogenetické analýzy mám několik otázek. Nejsem odborník na pavoučí nebo obecně monocentrické chromozomy, ale ukazuje šipka na Obr. 7C skutečně pohlavní chromozomy? V některých případech, např. *Singa* sp. na Obr. 11, nejsou jednotlivé pohlavní chromozomy rozlišitelné a jsou ukázány jako „sex vesicles“. Na základě čeho a jak věrohodně je tedy určena konstituce pohlavních chromozomů X_1X_2O ? Má smysl měřit X chromozomy v konstitucích s více než 2 X chromozomy, když jsou si menší X chromozomy velikostně podobné? U *Araneus uyemurai* a *A. ventricosus* byly identifikovány tři pohlavní chromozomy X, které spolu „párují“. Mohlo by jít o konstituce XY_1Y_2 nebo X_1X_2Y ? Jsou k dispozici samičí karyotypy k ověření těchto konstitucí? Také u *Mimetus* sp. JAR bych na Obr. 27A místo sedmi různých pohlavních chromozomů X viděl tři chromozomální páry a jeden chromozom X. I 18S rDNA FISH u tohoto druhu dle Obr. 43, zdá se, značí v rámci „pohlavních chromozomů“ chromozomální pár. A skutečně lze z např. z Obr. 26B a 27C vyvodit morfologie chromozomů?

Diskuse se dobře čte a je poměrně podrobná. Autor se zabývá různými mechanismy, které by mohly být zodpovědné za skokové zvýšení počtu chromozomů při zachování jejich akrocentrické morfologie. Vysvětlením jsou, vedle polyploidie, komplexní přestavby zahrnující inverze a rozpady. Mohly by u pavouků vznikat metacentrické chromozomy vznikem neocentromer? Jediné, co mi v diskusi chybí je zhodnocení použitelnosti molekulárních markerů pro testování polyploidie. Distribuce klastrů 18S rDNA je obecně značně proměnlivá, geny pro 5S rDNA se často připojují k jiným genovým rodinám, snRNA se těžko detekují, patrně pro malý počet opakování. Neuvažoval autor o detekci histonových genů? Např. u motýlů je lokus histonových genů velmi konzervativní.

Trochu mě mrzí, že je hlavní výsledek práce, tedy že velikost genomu u studovaných čeledí nesouvisí s nárůstem počtu chromozomů, v závěru práce a abstraktu shozen tvrzením, že „je zřejmé, že (polyploidie) sehrála roli v evoluci“ pavouků.

Po formální stránce lze práci vytknout používání anglických výrazů („loci“, „sex vesicle“, „aging“) a nekonzistentní používání zkratk (např. 18S a 18s, rDNA a rRNA). Práce obsahuje standardní množství překlepů a poměrně málo gramatických chyb.

Závěrem mohu konstatovat, že se mi práce líbila. Autor získal originální výsledky a splnil vytyčené cíle. Přes výše uvedené výtky dle mého práce jednoznačně splňuje požadavky na kvalifikační práce tohoto typu a doporučuji ji k obhajobě.