Posudek oponenta na diplomovou práci

☒ oponentský posudek	Jméno posuzovatele: *RNDr. Eduard Kočárek, Ph.D.*
	Datum: *19.9.2009*

Autor:
Markéta Pastuchová

Název práce:
Evoluce karyotypu u pavouků čeledí Atypidae a Pholcidae

Cíle práce
Práce si klade za cíl podrobněji cytogeneticky prozkoumat 6 druhů čeledi Pholcidae, 2 druhy čeledi Atypidae a jeden druh čeledi Sicariidae. Ze zjištěných dat pak autorka vyvozuje obecnější závěry týkající se možné evoluce zkoumaných druhů, popř. skupin pavouků. Zvláštní zřetel je kladen k evoluci jejich pohlavních chromozomů. K práci byly použity nejen klasické cytogenetické metody (tj. studium obarvených chromozomů v různých fázích meiózy), ale také molekulárně cytogenetický aparát (metoda FISH umožňující vizualizaci oblastí organizátorů jadérka).

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO ~~NE~~
Rozsah práce (počet stran): *76*
Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO ~~NE~~
Je uveden seznam zkratek? ~~ANO~~ NE

Literární přehled:
Odpovídá tématu? ANO ~~NE~~
Je napsán srozumitelně? ANO ~~NE~~
Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO ~~NE~~
Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO ~~NE~~

Materiál a metody:
Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO ~~NE~~
Kolik metod bylo použito?
Tři klasické cytogenetické metody (izolace chromozomů s klasickým barvením, C-pruhování, vizualizace oblastí NOR pomocí stříbření) a jedna molekulárně cytogenetická metoda (FISH s nepřímo značenou sondou k lokalizaci rDNA). K provedení FISH autorka sama připravila několik sond a označila je metodou nick-translace. Autorka si rovněž osvojila metody sběru, determinace a chovu pavouků.
Jsou metody srozumitelně popsány? ANO ~~NE~~ *Drobné výhrady uvádím v dalších částech posudku.*

Experimentální část:
Je vysvětlen cíl experimentů? ANO ~~NE~~
Je dokumentace výsledků dostačující? *z větší části* ANO ~~NE~~ - v čem jsou nedostatky?
Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?
ANO ~~NE~~ – co chybí, v čem je nedostačující?
(1) V práci nejde o experimenty v klasickém slova smyslu, ale především o postupy umožňující vizualizaci chromozomů, popř. určitých jejich úseků. Tyto metody jsou ovšem samy o sobě plně dostačující k získání relevantních závěrů. V práci však postrádám bližší dokumentaci týkající se hybridizačních výsledků rDNA sond, připravených z různých druhů

pavouků. Teprve v diskusi se objevuje zmínka, že sonda z Pholcus phalangioides byla pro vznik značného fluorescenčního pozadí při identifikaci rDNA u pholcidů nevhodná (str. 63) a dále, že k vizualizaci oblastí NOR u čeledi Atypidae bylo třeba použít sondu od pavouka rodu Aliatypus, neboť sondy od ostatních pavouků nedávaly dobré výsledky (str. 65). Je škoda, že autorka tyto hybridizační pokusy v práci nejen blíže nedokumentovala, ale že o nich ani nezařadila informace do metodiky, resp. do výsledků (v metodické části čteme pouze vágní tvrzení o tom, že na FISH byly využity sondy ze tří druhů pavouků – viz str. 28).
(2) Je škoda, že v práci byl jen u některých zkoumaných pavouků srovnáván výsledek FISH se sondou na rDNA s výsledkem klasického stříbření, třebaže každá z metod má poněkud odlišnou specifitu. Týká se to zejména druhu Pholcus phalangioides, kde autorka uvádí, že výsledky FISH byly nejasné a lokalizace regionů NOR tudíž velmi obtížná (str. 36). Vzhledem k tomu, že se jedná o druh, který se běžně vyskytuje na území ČR, určitě by nebyla nouze o získání dalšího materiálu, na němž by se dala provést vizualizace NOR, eventuálně odzkoušet upravený hybridizační protokol (viz též dotaz v závěru).

Diskuze:
Je opravdu diskuzí, ~~nejde jen o konstatování vlastních výsledků~~? ANO ~~NE~~
Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO ~~NE~~
Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO ~~NE~~

Závěry (Souhrn) :
Jsou výstižné? ANO ~~NE~~

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):
Formální úroveň práce je slušná, text je přehledně a logicky členěn, takže se v něm čtenář snadno orientuje. Obrazová dokumentace vhodně doplňuje text, většina obrázků meiotických chromozomů a výsledků FISH je (s ohledem na často nesnadné získání materiálu a poměrně malý výtěžek hodnotitelných meiotických figur) velmi zdařilá. Pouze obr. 1 (str. 8) znázorňující možnou fylogenezi pavouků není příliš jasně čitelný.
Za vyhovující pokládám i jazykovou kvalitu, i když jsem v tomto směru nucen vytknout některé anglikanismy, používání laboratorní „hantýrky" (zejména v metodické části) i nepříliš vhodné skloňování některých cizích termínů.
Některé příklady:
(1) Rodový název Drosophila v latinské transkripci nelze ve 2. pádě singuláru skloňovat: „Drosophili" (opakovaně str. 7, str. 63). Pokud nechci používat českého termínu octomilka, mám k dispozici i počeštěný ekvivalent drozofila (2.p. j.č. pak ovšem „drozofily"!)
(2) Stejně tak nelze latinský název Filistata insidiatrix skloňovat „u jednoho druhu Filistaty insidiatrix" (str. 24).
(3) Z formulace na str. 22: „Gen pro 18S RNA je ve fylogenezi vůbec nejpoužívanější ribozomový gen," lze primárně těžko pochopit, že jde o gen nejčastěji používaný ve studiích fylogeneze.
(4) Formulace na str. 23: „Mitochondriální rRNA geny jsou používány hlavně na obratlovcích" je další ukázkou toho, jak kumulace jazykových nepřesností může výrazně snížit srozumitelnost sdělení. Teprve ze smyslu následujícího textu je zřejmé, že autorka míní mitochondriální geny kódující rRNA, jejichž studium lze využít k výzkumu fylogenetických vztahů mezi obratlovci. Podobných nejasných formulací se v subkapitole 2.4.3.1 vyskytuje více.
(5) Výraz „pastérka" (str. 26) lze použít v laboratorní hantýrce, ale ne v odborném textu. Raději: „Pasteurova pipeta".
(6) Výraz NOR je zkratka odvozená z angličtiny (Nucleolar Organizer Region), a proto je velmi problematické její skloňování v podobě „detekce NORů" (str. 27), „tvořící NORy" (str. 28), „lokalizace NORů" (str. 36), „NORy jsou přítomny" (str. 36, 41 a 47), „jeden z NORů" (str. 49), „oblast menšího NORu" (str. 49), „vizualizace NORů" (str. 52),

„o distribuci NORů" (str. 62) atd.
(7) Formulaci „byly zakápnuty 20 µl antifadem" (str. 30) je další ukázkou nepříliš vhodného skloňování. „Antifade" je anglický termín, který lze takto velmi obtížně skloňovat – raději „byly zakápnuty 20 µl roztoku antifade"... přitom by také mělo být uvedeno, jaké složky tento roztok obsahoval nebo alespoň, od které firmy byl zakoupen (což jsem v práci nenašel).
(8) V popisu FISH (str. 30) se objevuje zkratka BSA, aniž by autorka vysvětlila, že jde o bovinní serumalbumin. Časté používání mnoha dalších zkratek bez uvedení jejich vysvětlivek snižuje srozumitelnost textu.
(9) Pozor na občasné překlepy, a to i v odborných termínech; např: „autonomů" místo autozomů (str. 17), „diplodní" místo diploidní (str. 63), „Sachromyces cervisiae" místo Saccharomyces cerevisiae (str. 22), „chromozmy" místo chromozomy (str. 26), „ohnuky coils" místo „ohnuki coils" (str. 43), „Evolution fo multiples" místo Evolution of multiple (str. 72, citace práce J. Krále).
(10) Slovo standardní píšeme na konci s „d" nikoli „t" (str. 57).

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:
Práce doplňuje a rozšiřuje současný stav poznání pavouků a jejich možných fylogenetických vztahů. Autorka jako první určila karyotyp šesti druhů čeledi Pholcidae a doplnila poznatky o karyotypech druhů Atypus piceus a Atypus affinis (čeleď Atypidae). Získaná data kriticky srovnává se staršími i zcela recentními literárními údaji a využívá je k interpretaci možných evolučních vztahů mezi jednotlivými druhy, popř. skupinami. Velmi zajímavá je její teorie o možnosti konverze pohlavní determinace X_1X_2Y na X0 u některých haplogynních pavouků. Jako první z laboratoře cytogenetiky pavoukovců PřFUK úspěšně aplikovala metodu FISH k vizualizaci a dalšímu studiu úseků NOR. U 7 druhů pak mapovala výskyt rDNA na chromozomech a zamýšlela se nad jejich možnou rolí při párování pohlavních chromozomů při meiotickém dělení.
Celkově lze říci, že zadané cíle práce byly beze zbytku splněny. Autorka odvedla nejen dobrou práci v laboratoři, ale dokázala také, že je schopna syntetizovat i kriticky diskutovat informace získané studiem odborné literatury a srovnat tato data s vlastními výsledky. Vytčené nedostatky, které jsem z titulu oponenta povinen uvést, by proto v žádném případě neměly být na překážku nejen přijetí práce, ale také jejímu pozitivnímu hodnocení. Doporučuji proto, aby předložená práce Markéty Pastuchové BYLA PŘIJATA K ÚSPĚŠNÉ OBHAJOBĚ.

Otázky a připomínky oponenta:
(1) Práce postrádá seznam a vysvětlivky zkratek, což poněkud znesnadňuje pochopení textu. Autorka sice většinu zkratek vysvětluje v textu, avšak některé zkratky (např. EtOH, DAPI, BSA, SSC) nejsou vysvětleny vůbec. Uvažme, že diplomové práce by měly sloužit jako jeden z primárních informačních zdrojů dalším diplomantům, pro které budou mnohé zkratky zpočátku špatně srozumitelné.
(2) Část 1 (Úvod) je zčásti koncipována již jako literární rešerše, proto by se větší část údajů hodila spíše do druhé kapitoly (Literárního přehledu). Naopak v úvodu by bylo vhodné uvést, na kterých pracovištích byl výzkum proveden (i když to pak vysvítá z dalšího textu).
(3) Str. 14 dole – Autorka uvádí, že systém XY u A. affinis a Leptonecta infuscata vznikl z X0 přestavbou mezi chromozomem Y a autozomy. Jak se v systému X0 najednou objevil chromozom Y? Jde o překlep (Y místo X) nebo je tím míněno, že chromozom Y v průběhu evoluce vznikl z autozomů a pak mezi ním a autozomy docházelo k přestavbám?
(4) Str. 18 nahoře – „Práce Cokendolphera ... zabývající se chromozomy tří rodů Physocyclus (P. californicus, P. enaulus, P. sp.)" – nemělo by být spíše tří druhů rodu Physocyclus anebo zde „vypadla" jiná informace?
(5) Str. 25 nahoře – tabulka 2 – Pozor na nedostatečnou a nejednotnou geografickou lokalizaci míst sběru. Lokality by měly být jednotně specifikovány podle klíče: název lokality – správní celek (provincie), kde se lokalita nachází – stát (popř. kontinent). Poněkud

zavádějící jsou zejména lokalizace „Jakubčovice nad Odrou Žleby (okr. Kutná Hora)" a „České Budějovice a Žleby (okr. Kutná Hora)".
(6) Str. 26 a 27 – Poněkud zarážející jsou nepřesné údaje o teplotě histologické ploténky při zpracování materiálu a C-pruhování (40 – 42 °C, při C-pruhování byla teplota o 5 – 10 °C nižší). Stejně tak je např. uvedeno, že při C-pruhování byly chromozomy inkubovány 3 – 5 minut v roztoku hydroxidu barnatého. Nemohl tento rozkyv v teplotách, resp. v časech ovlivnit výsledky chromozomových analýz? Nebylo by přece jen vhodné protokoly pro další práci přesněji standardizovat?
(7) Str. 36 – Autorka píše, že chromozomy druhu Pholcus phalangioides podléhaly během protokolu FISH značné destrukci, o čemž vypovídá i obr. 5c. Nebylo tedy možné na nich odzkoušet upravený, méně drastický protokol? Je škoda, že výsledek FISH nebyl právě u tohoto druhu srovnán s výsledkem stříbření. Konečně tyto analýzy byly obě provedeny pouze u jediného ze všech studovaných druhů (viz též moje poznámka výše).
(8) Str. 61 – Autorka pokládá za pravděpodobné, že u skupiny Holocnemines systém X_1X_2Y konvertoval na X0 tak, že došlo nejdříve ke ztrátě chromozomu Y a poté k pericentrické inverzi u jednoho z X-chromozomů kombinované se vzájemnými translokacemi mezi chromozomy X_1 a X_2. Výsledkem byl jediný chromozom X obsahující části materiálu obou původních chromozomů. Lze však namítnout, že ztrátou chromozomu Y, který drží oba chromozomy X v trivalentu, se pravděpodobnost translokace spíše snížila (tím spíše, když víme, že chromozomy X netvoří chiasmata a dochází snadněji k nondisjunkci). Existují (kromě existence druhů se systémem X_1X_20) pro tuto teorii, kterou autorka prezentuje, nějaké jiné (byť třeba jen nepřímé) důkazy?
(9) Str. 63, 65 a 66 – Problematika vizualizace NOR, resp. rDNA pomocí sond od různých druhů pavouků měla být blíže popsána a dokumentována v předchozích dvou kapitolách.
(10) Str. 66 – Autorka píše, že u A. piceus byl nalezen chromozom podobného vzoru a velikosti jako gonozom u A. affinis. Ale o který chromozom se jedná? Jde o jeden z chromozomů 7, které mají, jak píše autorka (viz str. 50), odlišný pruhovací vzor? Tento údaj by v diskusi neměl chybět.
(11) Navzdory výše uvedeným výhradám se domnívám, že uvedené výsledky by (po určitém dopracování) stály za publikaci v odborném periodiku.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

V případě uspokojivé prezentace při obhajobě (včetně zodpovězení otázek) doporučuji práci hodnotit známkou výborně.

☒ výborně ☐ velmi dobře ☐ dobře ☐ nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

RNDr. Eduard KOČÁREK, Ph.D.
19. září 2009