

Školitelský posudek na práci Kláry Doubnerové: Rešerše ke studiu molekulární fylogeografie mravence *Crematogaster polita* (Hymenoptera: Formicidae)

Diplomová práce Kláry Doubnerové je rešerší pro její magisterskou práci, která se zaměří na studium populací melanéskeho mravence *Crematogaster polita*. Toto téma úzce souvisí s naším výzkumem na PNG, kde je tento druh důležitým prvkem stromové myrmekofauny, a je možné předpokládat jeho významný vliv na formování struktury společenstev hmyzu v korunách. I když si studie klade za cíl řešit v podstatě standardní téma, tj. populační struktura druhu XY, bude unikátní tím, že se zaměřuje na tropický arboreální druh, navíc na několika prostorových škálách. O populační struktuře pralesních mravenců existuje jen několik studií a prakticky žádné o stromových druzích. Výsledky tak mohou být důležitým příspěvkem k objasnění faktorů vedoucích k dominantnímu postavení druhu či procesech populační dynamiky v prostředí tropického lesa.

Práce začala jako ryze praktická, nicméně v závěru minulého roku jsme se přiklonili k rešeršní formě v důsledku dlouhodobějších problémů s izolací DNA. I když se je nakonec podařilo překonat, nebyl by již dostatek času na řádné zpracování dat v požadovaném rozsahu. Z těchto důvodů **se rešerše zaměřila na posouzení metodiky potřebné pro zpracování dat magisterské práce a zhodnocení relevantních studií na mravencích i jiných taxonech**. Jak autorka na str. 6 píše, cílem tedy bylo „podat výčet a zhodnocení přístupů pro studium populací mravenců a identifikaci eventuálních kryptických druhů.“

To se dle mého názoru Kláře povedlo a vypracovala kvalitní přehled molekulárních markerů a zhodnocení jejich použití ve studiích mravenců včetně kritické analýzy nedostatků některých prací a konfrontace protichůdných výsledků. Kapitola o fylogenetických a fylogeografických metodách taky myslím dopadla dobře, zejména s ohledem na to, že autorka s nimi nemá dosud velké praktické zkušenosti.

Z důvodů komplikací s praktickou částí jsme se cíleně zaměřili na rešeršní zpracování problematiky, která bezprostředně souvisí molekulárními analýzami a s následným zpracováním dat. **Biologická zajímavost práce a její širší souvislosti tak ustoupily poněkud do pozadí, nicméně bylo tomu tak na můj popud, neboť kvalitní zpracování by přesáhlo rozsah bakalářské práce** a chtěli jsme se vyhnout povrchním úvodním kapitolám o populační struktuře a dynamice mravenců. Biologická zajímavost bude hlouběji rozpracována v magisterské práci s ohledem na konkrétní výsledky.

Výsledná struktura práce a řazení kapitol mohou být diskutabilní a jsou následkem rozkolísanosti školitele i studenta, které kapitoly nakonec do práce zařadit a v jakém pořadí, aby byla zachována forma rešerše na ucelené téma. Zároveň jsme považovali za nutné alespoň zmínit původní cíle práce i to, že se po celou dobu pracovalo v laboratoři. Malý rozsah či nezařazení kapitol týkajících se praktické laboratorní práce a jejich problémů (ačkoliv některé byly napsány), byl dán právě snahou zachovat práci rešeršní charakter a nepůsobit příliš roztržitým dojmem. Stejně tak záměrně nebyla zařazena analýza prvotních neúspěchů v izolaci DNA, která by dle mého názoru vyžadovala zcela jiné uspořádání a srovnávací typy vzorků aby byla hodnověrná.

Souhlasím, že práce někdy působí kvapným dojmem a závěrečnému vybrušování textu mělo být věnováno více času. Stejně tak se ukazuje, jak je někdy obtížné překládat text z angličtiny tak, aby zněl správně česky. To je ale myslím obecným problémem, který si žádá, aby se během studia psalo pokud možno více esejů. I přes tyto drobné výhrady mám za to, že text je kvalitní a jsem s ním spokojen. Klára se své diplomové práci věnovala velmi intenzivně, a i když to z textu není na první pohled patrné, odvedla velké množství laboratorní práce. Navíc se na sklonku roku začala starat i o praktické zajištění všeho potřebného pro vlastní laboratorní práci, což zvládla také výborně. Musím ocenit, že se nezalekla práce na zadaném tématu a to i přes úvodní problémy, které nemohla příliš ovlivnit.

Celkově jsem s průběhem i výsledkem její bakalářské práce spokojen a doporučuji ji k obhajobě.

M. Janda 29. 5. 2008

Vzhledem k tomu, že řada výtek k práci směřuje hlavně na školitele, považuji za nutné na některé reagovat přímo.

Reakce na výtky oponenta:

1) Špatný sběr a skladování vzorků

Dovolil by si zareagovat na závěrečnou část posudku, ve které oponent zpochybňuje školitelovu přičetnost při zadávání práce i způsob sběru a uchovávání vzorků, kterýžto vidí jako prazdroj všech problémů.

Rád bych zdůraznil, že bez předběžných testů použitelnosti našich vzorků pro DNA analýzy bych si nedovolil tuto bakalářskou práci vůbec zadat a hazardovat tak se studentčíným osudem. Vzorky ze stejných sérií sběrů uchovávaných za stejných podmínek a ve shodném médiu byly od roku 2006 využity nejméně ve třech dalších laboratořích (MCZ Harvard, UC Davis, PARU CB) a vždy s alespoň 50% úspěšností v izolaci a následné sekvenaci DNA. Jedna ze sérií vzorků je např. součástí nedávno publikované fylogeneze rodu *Pheidole* (Moreau 2008, Mol. Phyl. Evol.).

A konečně, při nedávném zpracování 36 Klářiných vzorků v projektu „Barcodes of Life“ byla úspěšnost sekvenace opět okolo 50%, a to zcela standardní izolační metodou na první pokus.

Je velmi pravděpodobné, že nevyrovnaná kvalita fixačního média přispívá k snížené úspěšnosti a výťažnosti izolace. Toho jsme si ovšem byli vědomi od začátku, kdy jsme předběžně kalkulovali s 50% úspěšností, což se při velkém objemu dostupného materiálu zdálo dostatečné.

Chyby vedoucí k prvotním neúspěchům musely tedy vzniknout i jinde. Je pravda, že laboratorní práce není doménou školitele, nicméně k zadání diplomky vedly optimistické vyhlídky ohledně odborného dozoru v molekulární laboratoři KZ, které se v počátcích spíše nevyplnily a k úspěšným izolacím došlo až pod vedením kolegyně z PARU.

Dovolil bych si nesouhlasit s tvrzením, že byla porušena další pravidla při sběru DNA. „Servisně“ jsem sbíral minimálně stovky vzorků pro DNA analýzy z nejrůznějších taxonomických skupin (bez reklamací) a myslím že nějaké povědomí o zásadách mám.

Materiál byl sbírán do čistého, nedenaturovaného třtinového ethanolu o koncentraci 98% (označení „pharmacy grade“). Nižší koncentrace zmíněná ne příliš přesně v práci tj. (70%, stejně jako nesprávné použití termínu „láh“) se vztahovala k odhadu koncentrace média po přidání materiálu (a event. doplnění nového ethanolu), kdy došlo ke zředění. Všechny vzorky byly sbírány a uchovávány v epruvetách se závitem a teflonovým těsněním, které se standardně používají pro dlouhodobé skladování.

Mravenci rozhodně nebyli uchovávaní v epruvetách po jednom, ale obvykle po cca. 5-20 jedincích – v závislosti na velikosti. To je zcela v souladu se postupy při sběru DNA materiálu mravenců (soudě podle literatury i četných diskuzí s kolegy) a obvykle to stačí k zachování požadovaného 15-20ti násobku konzervačního média. Po jednom mravenci do epruvety (jak navrhuje oponent) nesbírá ani na DNA data žádný z myrmekologů, a to z kolegiality vůči ostatním oborům, na které by pak kvůli mravencům těžko zbyly další ependorfky.

Při sběru materiálu opravdu nebyla dodržena všechna pravidla ideálního sběru, zejména díky problémům se získáním dostatečného množství ethanolu molekulární kvality a nedostatku skladovacích prostor pro uložení v chladu. Nicméně pro započítání této práce se tyto nedostatky nejevily jako nepřekonatelný problém zejména po pozitivních zkušenostech z jiných laboratořích či po zkušenostech kolegů používajících stejný ethanol a obdobný protokol sběru (např. J. Hulcr pro kůrovce, který s izolací neměl vážnější problémy).

Závěrem bych rád zmínil, že Klára se dosud zaměřila jen na část vzorků a ze starších sběrů. Naopak materiál z hektarových ploch, který byl již skladován v chladu, je zatím pro její práci k dispozici, stejně

jako čerstvý materiál sesbíraný v r. 2008 do kvalitního laboratorního ethanolu a podle téměř všech nároků
oponenta.

M. Janda