

## **Oponentský posudek na práci Jiřího Macíka "Morfologicko-genetická studie populací mořského plže *Hexaplex trunculus* ze Středozemního moře"**

**Oponent:** Pavel Pech

Práce se skládá vlastně ze dvou částí, a to za prvé morfologickými a genetickými odlišnostmi několika populací, za druhé maskulinizací samic vlivem TBT. Tématika práce je tak poměrně velmi široká (morfologie, molekulární biologie, toxikologie) - na jednu stranu je to klad (protože všechno souvisí se vším), na druhou stranu je na práci vidět určitá roztržitost (které se ale při tak široké tématice je těžko vyhnout). Těžiště práce spočívá zjevně především v morfologické části.

Množství formálních chyb nepřesahuje únosnou míru. Občas se objevují logické chyby z nepozornosti, například pokud by západní hranicí výskytu bylo jižní Portugalsko a východní Kanárské ostrovy, měla by dotčená ostranka areál velmi zvláštní.

### **Dotazy:**

1) Je maskulinizovaná samice zcela vyřazena z rozmnožování, nebo se může rozmnožovat jako samec?

2) Jsou k maskulinizaci náchylná pouze juvenilní stádia samic, nebo k ní může dojít i u dospělé samice?

3) Je něco známo o přenášení TBT potravním řetězcem a jeho působení na obratlovce, případně přímo na člověka? Vzhledem k tomu, že ostranky i jiní mořští měkkýši jsou loveni především právě kvůli potravě, a TBT má být funkčním homologem k důležitým regulačním molekulám obratlovců, očekával bych existenci rozsáhlých studií na toto téma. Tato otázka stojí trochu stranou vzhledem k tématice práce, přesto mi připadá zajímavá.

4) Jaká je aktivní disperzní schopnost *H. trunculus*? V práci je upozorňováno na to, že nemají plovoucí larvu, ale jak daleko může jedinec dolézt? To souvisí se zásadní otázkou - jak je možné, že na některých lokalitách je postižení samic maskulinizací velmi vysoké (až sto procentní), ale silné populace *H. trunculus* zde přesto existují? Taková situace není dlouhodobě možná a napadají mě jen tři možné příčiny: a) množství TBT v dané lokalitě v čase silně kolísá a jeho měření a sběr samic se náhodou "strefuje" do období vysokých koncentrací; b) plodnost samic je maskulinizací snížena méně, než se uvádí; c) disperzní schopnosti druhu jsou tak velké, že ztráta samic (a tím neexistence rozmnožování) je bez obtíží vyrovnána migrací. Jsou k dispozici nějaká demografická data z těchto lokalit? Mohla by leccos osvětlit...

5) Genetické rozdíly mezi studovanými populacemi nebyly nalezeny. Nemohu posoudit, nakolik to může být způsobeno metodickou chybou (nesprávný genetický marker, pouze jeden gen apod.), což je v práci správně diskutováno. Nicméně právě k této části práce mám určité výhrady. Jednak nesouhlasím s tím, že by nízká variabilita mohla být způsobena nízkou disperzní schopností - toto může platit pro variabilitu uvnitř populace, ale z hlediska mezipopulačního by nízká disperzní schopnost měla způsobovat právě variabilitu vysokou. Velmi důležitá je v tomto směru detailní znalost disperzních schopností - už problematika z předchozí otázky naznačuje, že disperzní schopnosti *H. trunculus* nemusí být tak nízké, jak se předpokládá. Zcela opomíjena je otázka rozšíření člověkem - nabízí se, že v oblasti s tak

dlouhou námořní historií musel člověk v rozšíření *H. trunculus* hrát velmi významnou roli, zvláště, když *H. trunculus* je již dlouho intenzivně loven. Právě ostrankový purpur byl důležitým vývozním produktem Féničanů, kteří se Středozemním mořem plavili už nejméně před třemi tisíci lety - a od té doby jak hustota lovní dopravy, tak intenzita lovení ostranek určitě neklesala. Sběrači ostranek si jistě stále pečlivě neočišťovali nástroje a plavidla, nehledě k tomu, že *H. trunculus* mohl být prozíravými obchodníky leckde i cíleně vysazen. Doba širokého rozšíření *H. trunculus* po Středozemním moři by se pak nepohybovala v milionech ani stech tisících letech, ale v pouhých několika málo tisících či spíše stovkách let. Zde by mohla pomoci paleontologie - co je známo o rozšíření *H. trunculus* z fosilních nálezů?

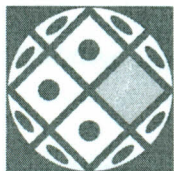
6) Existence ostnů na ulitách ostranek bývá někdy dávana do souvislosti s obranou proti predátorům. Tato otázka je v úvodu jen načata, ale bohužel není dále rozpracována. Jak to predaním tlakem na *H. trunculus* tedy je? Nemůže to být tak, že populace vystavené menšímu predaním tlaku ty ostny proto ztratily?

7) Pokud si dobře vzpomínám, v bakalářské práci byl problém s nerozlišováním věkových kategorií ostranek. Jak je tomu teď?

**Celkové hodnocení:** Předkládanou práci považuji za kvalitní a doporučuji ji k obhajobě.

V Hradci Králové, 17.1.2011

Pavel Pech



**Posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Jiřího Macíka  
„Morfologicko-genetická studie populací mořského plže *Hexaplex trunculus* ze  
Středozemního moře“**

Předložená magisterská práce je zaměřena na morfometrickou a molekulárně-genetickou analýzu devíti populací ostranky purpurové (*Hexaplex trunculus*) ze Středozemního moře (4 v Řecku, 3 v Chorvatsku, 2 ve Francii). Celkem bylo vyšetřeno 464 exemplářů. Morfometrická část práce byla založena na kartézských souřadnicích 25 význačných bodů (landmarků) ve dvourozměrném prostoru a jejich dalším statistickým zpracování splajnovou interpolační metodou TPS. Genetická analýza spočívala v sekvenování úseku 683 pb mitochondriálního genu pro podjednotku 1 cytochrom c oxidázy (COI; získané sekvence byly porovnány s jednou sekvencí *H. trunculus* z Portugalska, stažená z databáze GenBank). Tyto analýzy byly doplněny o stanovení procenta samic postižených vývojem samčích pohlavních orgánů, tzv. imposexem, ke kterému dochází pravděpodobně následkem znečištění moře tributylcínem (TBT). Podíl takto postižených samic byl vysoký, v rozmezí 26-100%. Na základě morfometrické analýzy bylo stanoveno 5 odlišných morfotypů, korelujících se salinitou, zimní teplotou a členitostí reliéfu dna. Genetická analýza neodhalila žádné rozdíly mezi všemi srovnávanými sekvencemi (včetně portugalské sekvence z databáze).

K práci mám následující poznámky:

1. Z hlediska celkového členění je práce poměrně nevyrovnaná. Jde především o silně předimenzovaný a z hlediska dále prezentovaných výsledků i značně zavádějící Úvod, z něhož většinu tvoří problematika imposexu, který ve Výsledcích téměř nefiguruje (7 řádků). Také popis fylogenetických a fylogeografických studií jsou z hlediska cílů práce irelevantní (tím spíš, že pojednávají o jiných druzích), zbytečná je také část „Léky z měkkýšů“, popis metody PCR nebo obr. 1, 2, 32 a 33. Rozbor polymerázové řetězové reakce s informacemi typu „k izolátu DNA musíme přimíchat krátké oligonukleotidové úseky DNA zvané „primer““, „Naposledy se přidá voda.“ nebo „amplifikace předtím vyizolované DNA probíhá v přístroji zvaném „Termocycler““ (tady by asi mělo být „Thermocycler“, autorovi asi uniklo, že v češtině se standardně už řadu let používá termín termocykler nebo jednoduše cykler) – všechny tyto popisy by možná byly na místě před 15 lety, dnes ale působí nepatřičně, tím spíš že v práci naopak chybí některé metodické informace, které jsou pro celou práci důležitější (viz dále).

2. V Metodice postrádám bližší informaci o metodě TPS, např. jaká hodnota škálovacího parametru alfa byla použita (0, 1, jiná hodnota?), byly do následujících analýz zahrnuty i uniformní změny? Co znamená „F-statistika“ (Tab. 4 a 6)? Tento pojem se standardně používá pro tři genetické indexy Wrightovy statistiky ( $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$ ,  $F_{IT}$ ). Pokud se má na mysli výstup z diskriminační analýzy, jsou uvedené tabulky redundantní, stačilo by prezentovat jen tabulky Mahalanobisových vzdáleností (Tab. 5 a 7). Z práce jsem nepochopil, jestli autor prováděl vyšetření pohlaví a výskytu imposexu sám. Příslušné výsledky by bylo lépe prezentovat v kapitole tomu příslušné a ne v Metodice. Dále není jasné, jestli bylo pohlaví určováno i jinak než morfologicky (např. geneticky). Pokud ne, stanovení 95% úspěšnosti určení pohlaví znamená spíš 95% shodu mezi dvěma morfologickými metodami. Navíc vzhledem k 5% chybě (není-li ve skutečnosti vyšší) nejsou zcela spolehlivé i odhady procenta výskytu imposexu. Stanovení podílu

postižených samic pro každý stát postrádá smysl vzhledem k vnitrostátním rozdílům v ekologii mezi lokalitami (především v Chorvatsku).

3. Protože ulita ostranek je velmi zaoblená, existuje potenciálně významný problém zkreslení při digitalizaci landmarků ve 2D. Z textu není patrné, jak byla zajištěna standardnost polohy ulit při focení a opakovatelnost měření (digitalizace). V takovém případě by bylo vhodné uvést chybu měření. Z některých fotografií prezentovaných na konci práce mám dojem, že poloha ulity (resp. orientace obústí) nebyla ve všech případech přesně stejná. Navíc ne všechny digitalizované body jsou pravé landmarky (např. 15, 16), což tento problém může ještě zesílit.

4. Průměrné morfotypy by bylo vhodnější zobrazit pomocí PCA (TPS Relative Warps), protože diskriminační (kanonická) analýza (DFA) morfoprotor deformuje tak, aby meziskupinová variabilita byla maximalizována a vnitroskupinová variabilita minimalizována.

5. Nemám zkušenosti s genetikou plžů, ale laicky se mi zdá, že protože gen COI byl navržen pro rutinní identifikaci *druhů* (tzv. „barcoding“), nemusí být jeho vnitrodruhová proměnlivost pro populační analýzy dostatečná. Jako lepší variantu bych viděl spíš kontrolní oblast, která jakožto nekódující úsek mtDNA bude pravděpodobně variabilnější.

5. K výsledkům:

Str. 49 uprostřed: „O jednotlivých morfotypech lze ... říci, že nejvíce se konsenzuálnímu tvaru podobá morfotyp SoCh.“ ... Protože konsenzuální konfigurace je pouze průměrem všech konfigurací souřadnic landmarků, je ovlivněna počtem ulit z jednotlivých lokalit. Vzhledem k tomu, že vzorky ze Sovlje a Sumartinu (jejichž ulity jsou tvarově velmi podobné) dohromady dávají 200 jedinců (43%), je logické, že budou blízko průměru.

Str. 58, 1. odst.: „Tvar ulit některých morfotypů vykazoval korelaci s charakterem biotopu (obr. 31.)“ ... Z uvedeného obrázku nelze zjistit, jak silná tato korelace je. Vhodnějším postupem by byla vícerozměrná regrese nebo parciální nejmenší čtverce (PLS) mezi souborem ekologických a morfologických proměnných. Přestože jeho výsledek lze předvídat, mohl by se použít i Mantelův test mezi geografickými a morfologickými distancemi.

Str. 58 dole: Použité landmarky neumožňují přesně kvantifikovat délky trnů a tedy i stupeň „trnitosti“; zřejmě proto je mezi středně a silně trnitými ulitami z chorvatských lokalit Sovlje a Sumartin tak malý rozdíl – stejný rozdíl by se dal očekávat i mezi středně trnitými a hladkými ulitami (např. Lefkáda a ostatní řecké nebo všechny francouzské lokality), což ale není. Navíc podle fotografií na konci práce se zdá, že v rámci jednotlivých lokalit existuje v tomto parametru značná morfologická variabilita. Z toho důvodu jsou veškeré úvahy o délce trnů, resp. rozdílech v tomto znaku mezi populačními vzorky, poněkud spekulativní.

Str. 59 uprostřed: jestliže je potenciální vliv imposexu na tvar ulity tak významný, jak autor naznačuje, pak není jasné, proč nebyly analyzovány všechny 3 kategorie samostatně (nebo proč nebyla testována významnost rozdílů mezi nimi).

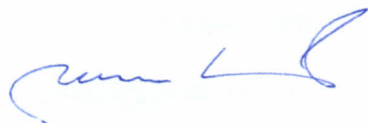
Str. 61 a dál: K příčinám nulové molekulární variability mezi populacemi: absence pelagické larvy a toku genů mezi populacemi by způsobila genetickou uniformitu *uvnitř* jednotlivých populací, ale naopak vysokou divergenci *mezi nimi*; absenci jakékoli substituce mezi populacemi vzdálenými od sebe stovky kilometrů tím nevysvětlíme. Místo navrhovaného bottlenecku (str. 62) by jako možný mechanismus

přicházel v úvahu spíš efekt zakladatele. Museli bychom ale předpokládat kolonizaci Středomoří extrémně malou skupinkou ostranek a následné držení populací na nízkých populačních hustotách – tím bychom ale nevysvětlili rozšíření plžů po celém Mediteránu (geneticky by se rychlá expanze projevila vyššími hodnotami haplotypové diversity a nízkými hodnotami nukleotidové diversity -  $\pi$ , v práci byly ale *obě* hodnoty nízké). Příčiny tak rychlé expanze lze ovšem vysvětlit těžko kromě lidské asistence. Každopádně rychlá expanze z extrémně malé a geneticky homogenní populace by zakonzervovala nulovou variabilitu. Tato expanze by musela být prakticky recentní, nebo následována masivními lokálními bottlenecky, které by (díky absenci mutací v malých populacích) tento stav udržovaly. Alternativní možností by byla silná purifikující selekce na cytochrom c oxidázu 1, ta je ale (vzhledem k využití tohoto genu pro barcoding) méně pravděpodobná.

Toto jsou moje hlavní poznámky či výtky k práci. Nebudu se zabývat drobnými nepřesnostmi (např. že 3 lokality tvoří trojici a ne dvojici – str. 41 nahoře, nebo že pokud druh žije v hloubkách od 1 do 100 m, nemůže být jeho nejvyšší hustota mezi 0,3 a 30 metrů – str. 1). Protože se nemůžu osobně zúčastnit obhajoby, nemám k diplomantovi žádné otázky.

Celkově lze říci, že předložená magisterská diplomová práce Jiřího Macíka je přes uvedené nedostatky kvalitní a přináší řadu zajímavých informací. Jsem rád, že ji můžu doporučit k obhajobě.

V Brně dne 11. 1. 2012



Prof. RNDr. Miloš Macholán, CSc.