



Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci

Molecular identification of purebredness and kinship of the Philippine crocodile (*Crocodylus mindorensis*) and Cuban crocodile (*C. rhombifer*) for *ex situ* conservation management

Autorka: Ing. Helena Straková

Oponent: Doc. Mgr. et Mgr. Josef Bryja, PhD.

Diplomovou práci ing. Heleny Strakové jsem měl možnost vidět již v její předchozí verzi v loňském roce, kdy jsem z ní nebyl úplně nadšený, což možná bylo jedním z důvodů, proč byla její obhajoba o nějakou dobu odložena. Přestože i aktuální verze má podle mého názoru řadu nedostatků, tak je její kvalita výrazně lepší než verze předchozí. Hlavním cílem práce bylo stanovit "genetic purity or purebredness" (genetickou čistotu? - mimochodem tyto vědecky málo přesné termíny jsou v práci dosti nadužívány) dvou druhů ohrožených krokodýlů. Oba druhy, *C. mindorensis* a *C. rhombifer*, vytvářejí v přírodě hybridy s jinými druhy krokodýlů (a hybridy asi mohou být plodní, ačkoliv se to nikde v diplomové práci explicitně neříká), což je interpretováno v úvodu práce jako negativní důsledek působení člověka, konkrétně změn v dostupných biotopech, kdy se k sobě dostávají druhy, které se dříve nepotkávaly. Tato "nepřirozená" hybridizace pak může vést k narušení lokálních adaptací, outbreední depresi a dalším negativním dopadům na ohrožené populace. K případným reintrodukcím by pak měli být používáni jedinci z původního genofondu. Potvrzení či vyvrácení hybridního původu jedinců z Krokodýlí ZOO Protivín mělo být hlavním přínosem této diplomky.

Přestože studentka asi dělala vše, co mohla, tak tohoto cíle se z několika důvodů dosáhnout úplně nepodařilo. (1) Z přírodních populací existují sekvence mtDNA, které jsou uloženy v databázi GenBank, a se kterými byla porovnávána mtDNA studovaných jedinců (tj. jejich matrilineální původ). Ke stanovení hybridů je však potřeba analyzovat jaderné znaky. Studentka tedy správně osekvenovala i dva jaderné geny (jejichž sekvence jsou u studovaných druhů rovněž dostupné) a zgenotypovala řadu mikrosatelitových znaků. Bohužel analyzované sekvence jaderných genů *LDHA* a *C-mos* neumožňují odlišit *C. mindorensis* a *C. novaeguineae* (tj. nejpravděpodobnější kandidát na hybridizaci; viz Tab. 2 a 3), přestože autorka tvrdí na str. 26 a 33 opak. Pro mikrosatelity zase nebyly k dispozici adekvátní data z volně žijících populací, které by na základě analýzy "čistých" populací umožnily populačně-genetickou analýzu a identifikaci hybridů (např. v klasickém programu STRUCTURE, případně řadou jiných přístupů, např. NewHybrids). (2) U *C. mindorensis* zahrnoval analyzovaný materiál dva jedince (G a H) s náznaky hybridního fenotypu (Tab. 1 a jinde), kde by byla genetická analýza velmi důležitá. Nicméně zrovna u těchto dvou jedinců byla kvalita DNA asi velmi nízká a nepodařilo se amplifikovat mikrosatelitové markery. Na základě sekvencí jaderných genů se zdá, že se nejedná o *C. porosus* (nebo hybridy s tímto druhem), nicméně k vyloučení hybridizace s *C. novaeguineae* (což je pravděpodobné na základě fenotypu; viz str. 33) to rozhodně nestačí; viz výše. U kubánských krokodýlů *C. rhombifer* pak autorka na několika místech tvrdí, že rozhodně nejsou hybridy a dokonce jsou dobře známy jejich vzájemné příbuzenské vztahy. Není mně proto jasné, jaký byl skutečný důvod genetické analýzy těchto jedinců.

V práci je řada dalších nedostatků (některé shodné s těmi, které jsem kritizoval loni), které se pokusím charakterizovat níže (významnější připomínky jsou uvedeny tučně):

str. 3, 1. odst. - píše se zde o hybridních zónách - jsou skutečně prokázány v přírodních populacích? A pokud ano, tak ví se, o jaký typ hybridní zóny se jedná? Jsou hybridy plodní? Protože se jedná o problematiku úzce spojenou s tématem diplomky, tak bych zde čekal více informací. Těch jsem se nedočkal ani v kapitole 1.3, která je přímo věnována hybridizaci.

str. 8, posl. odst. - molekulární a fylogenetické přístupy rozhodně nemohou vyřešit všechny problémy, které komplikují ochranu krokodýlů - zcela identickou výtku jsem měl i před rokem a přesto nebyla věta opravena

str. 13, posl. odstavec a jinde v práci, např. str. 34-36 - zde je uvedeno, že známá příbuznost u šesti jedinců *C. rhombifer* může být použita k testování věrohodnosti výstupů programu ML-Relate. Závěrem této analýzy pak je, že ML-Relate dobře neodhalil příbuzenské vztahy. To je však docela zásadní nepochopení základů této analýzy. Pokud se člověk podívá na genotypy v Tabulce 5, tak je zřejmé, že buď se stala někde při genotypizacích chyba nebo ta studovaná zvířata nejsou tak příbuzná, jak autorka tvrdí (nebo J.G. Mendel někde udělal chybu a funguje to všechno jinak, nicméně likelihood této možnosti je velmi nízké). Na řadě lokusů totiž neodpovídají genotypy rodičů a potomků mendelovské genetiky. Na části znaků by se to dalo vysvětlit vysokou frekvencí nulových alel (což by bylo docela pravděpodobné u cross-amplifikací), nicméně např. u Cj16, Cj104 nebo CUJ131 se u potomků vyskytují alely, které u uváděných rodičů amplifikovány nebyly. Stejnou chybu jsem vytýkal již v loňské verzi diplomky, ale ani v recentní verzi jsem nenašel vysvětlení těchto neshod. Je pak zcela zřejmé, že pokud je v genotypizacích chyba (nebo krokodýli nejsou rodiče a potomci), tak ML-Relate nemá šanci příbuzenský vztah odhalit (a není to chyba programu).

str. 16-17 - celkem by se hodila tabulka, kde by byly popsány uvedeny typy fluorescenčních značek a finální koncentrace jednotlivých primerů v použitých multiplexech

str. 18 a jinde - dvě mitochondriální sekvence (cyt b, D-loop) by bylo vhodné sloučit a analyzovat konkatenovaný alignment; přece jenom celá mtDNA je vlastně jediný lokus.

str. 19 - první odstavec v kapitole 4. Results je trochu zmatečný, naopak chybí jasná informace o tom, kolik jakých vzorků bylo ve finálních analýzách použito (třeba ve formě nějaké tabulky)

str. 20 - odkazy na obrázky nejdou v řadě po sobě a vůbec celý popis fylogenetických stromů je značně nepřehledný; navíc jsou promíchány jasné "Results" s informacemi, které by měly patřit do "Discussion"

str. 26 - Tab. 2 a 3 - nemá smysl srovnávat všech pět druhů dohromady, ale pouze 3 vs. 2 (tj. ty, které se mohou potenciálně křížit). Např. u *C. rhombifer* vs. *C. acutus* je informativní pouze jeden SNP u LDHA, ostatní je zbytečné uvádět.

str. 26 - mikrosatelity. Co to znamená "potentially diagnostic"? Znamená to, že se délka alel ("size range") nepřekrývá mezi potencionálně hybridizujícími druhy? Pak by ovšem bylo potřeba uvést předpokládané délky alel i pro ty další druhy (nejen pro *C. mindorensis* a *C. rhombifer*). Navíc vzhledem k vysoké mutační rychlosti mikrosatelitů není absolutní délka alel příliš vhodným kritériem k rozlišování druhů (jak jsem uvedl již výše, daleko lepší jsou analýzy založené na frekvencích alel, ale pro ty by musely být k dispozici relevantní data z volně žijících populací obou druhů, což samozřejmě nebylo možné).

všechny Tabs - svíslé čáry se ve vědeckém textu nedělají

str. 34, 2. odst. - není mně jasné, proč je ten odstavec v kapitole "Nuclear DNA markers"

Závěr:

Studentka se během přípravy své diplomové práce zcela jistě naučila řadu laboratorních technik, stejně jako analýz získaných dat, v konečné interpretaci výsledků jsou však ještě mezery. I přes výše uvedené výtky je tato verze diplomové práce výrazně lepší ta, kterou jsem měl možnost vidět v loňském roce. Pozitivně rovněž oceňuji, že se rozhodla ji psát v angličtině, což může být důležité při dalších krocích v záchraně studovaných krokodýlů (po odstranění evidentních chyb mohou být obdobné metody použity např. v dalších zahraničních chovech těchto ohrožených plazů). I přes zjevné nedostatky práci **doporučuji k obhajobě** na PŘF JU v Českých Budějovicích a osobně si přeji, aby genetická data skutečně pomohla k záchraně studovaných druhů.

Ve Studenci 19.5.2014

Josef Bryja



Posudek magisterské práce Ing. Heleny Strakové „Molecular identification of purebredness and kinship of the Philippine crocodile (*Crocodylus mindorensis*) and Cuban crocodile (*Crocodylus rhombifer*) for ex situ conservation management“

Vypracoval Mgr. Oldřich Říčan, Ph.D.

Práce je sepsána v slušnou a celkem čtivou angličtinou, s malým množstvím překlepů či gramatických nesrovnalostí.

Úvod je zdařilý, čtivý, informativní a elegantně a celkem rychle se dostává k jádru studie a neobsahuje tak časté obecné písemnictví.

Metody jsou vcelku dostatečně popsány.

Zpracování výsledků je horší kvality. Především dost často chybí odkazy na konkrétní obrázky, výsledky některých analýz (obrázky) jsou jak v hlavním textu (výřezy) tak v Apendixu (celé), ale některé jsou ale jen v Apendixu (D-Loop *C. rhombifer*, C-mos *C. rhombifer*), ty velké stromy v Apendixu jsou nečitelné (měly být rozděleny na více stránek),

Diskuse je opět kapitolou v pořádku až na malé nedostatky (viz níže).

Otázky a komentáře:

Proč bylo analyzováno jen 7 jedinců z celkem 45 chovaných *C. rhombifer*, když těch 45 jedinců představuje skoro polovinu všech kubánských krokodýlů v zajetí? Práce je tak vlastně pouze o tom druhém druhu.

Proč v obrázku analýzy C-mos chybí studování jedinci *C. rhombifer*?

V obr. 5 (cytb *C. rhombifer*) nejsou označeny skupiny alfa a beta.

Není pravda, že klád *C. mindorensis* v C-mos je parafyletický (klád nikdy není parafyletický; stejná formulace ještě jednou ve výsledcích). Na obrázku žádná parafylie není. Klád ve kterém je *C. mindorensis* zahrnuje i *C. novaeguinae* a ten klád nemá žádnou vnitřní strukturu a marker tak druhu nerozlišuje.

No a pak je tu ten problém s mikrosatelitní analýzou *C. rhombifer* (potažmo obou druhů?). Vysvětlení, že výtěry za to můžou (kontaminace je možná) ale není jediná jak se tváří diskuse. Druhá možnost je, že to nejsou rodiče-potomci (jak je tahle informace od chovatele věrohodná?), třetí možnost je, že je mikrosatelitová analýza v nějakém kroku fatálně špatně (což není možné poznat ani z analýzy druhého druhu). Vybrat mezi možnostmi pro oponenta bez toho vidět mikrosatelitová data není možné.

Chybí mi u těch mikrosatelitních analýz nějaká další charakteristika výsledků, ideálně v tabulce která by obsahovala Alele range (ta je jako jediná uvedená ve stávajících výsledcích), potom příslušnost k setu multiplexu, počet alel, frekvenci nulových alel (ta by nám pohla pomoci s předchozím bodem), a potom očekávanou a pozorovanou heterozygotnost.

Práci navrhuji hodnotit stupněm velmi dobře.

21. května 2014

Mgr. Oldřich Říčan, Ph.D.



