



ZÁPIS O OBHAJOBĚ DISERTAČNÍ PRÁCE DSP

Jméno studenta: Ing. Vendula MORAVCOVÁ
Narozen(a): 8. 1. 1991 Č. Budějovice
Studijní program: Ekologie a ochrana prostředí
Studijní obor: Aplikovaná a krajinná ekologie
Forma studia: Prezenční
Školící pracoviště: KGZB, FZT JU

Datum a místo konání zkoušky: 15. 3. 2023, FZT JU

Zkušební termín č.: 1

Název disertační práce:

Studium genetické diverzity kolonií *Pectinatella magnifica* (Leidy, 1851)

Výsledek obhajoby:

Prospěl(a)

Neprospěl(a)

Zkušební komise:

Podpis:

Předseda:	prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.; FZT JU v Č. Budějovicích	
Členové:	doc. RNDr. Zdeněk Adámek, CSc.; VÚRH JU Vodňany (oponent)	
	prof. Ing. Miroslav Dumbrovský, CSc.; VUT Brno, FAST (oponent)	
	doc. Dr. Ing. Pavel Vejtl; ČZU v Praze, FAPPZ (oponent)	
	doc. RNDr. Libor Pechar, CSc.; FZT JU v Č. Budějovicích	
	doc. Ing. Jakub Brom, Ph.D.; FZT JU v Č. Budějovicích	
	prof. RNDr. Hana Čížková, CSc.; FZT JU v Č. Budějovicích	
	doc. Ing. Michael Rost, Ph.D.; FZT JU v Č. Budějovicích	
	doc. Dr. Ing. Jaroslav Salava; VÚRV v Praze	
	doc. Ing. Miloslav Zouhar, Ph.D.; ČZU v Praze, FAPPZ	
Školitel:	prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.; FZT JU v Č. Budějovicích	



OBHAJOBA DISERTAČNÍ PRÁCE DSP PROTOKOL O HLASOVÁNÍ

Jméno studentky: Ing. Vendula MORAVCOVÁ
Narozen(a): 8. 1. 1991 Č. Budějovice
Studijní program: Ekologie a ochrana prostředí
Studijní obor: Aplikovaná a krajinná ekologie
Forma studia: Prezenční

Výsledek hlasování:

Počet členů komise: 10

Počet přítomných členů komise: 9

Počet platných hlasů: 9

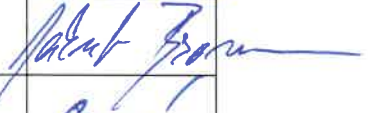
Kladných: 9

Záporných: 1

Počet neplatných hlasů: 0

Zkušební komise:

Podpis:

Předseda:	prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.; FZT JU v Č. Budějovicích	
Členové:	doc. RNDr. Zdeněk Adámek, CSc.; VÚRH JU Vodňany (oponent)	
	prof. Ing. Miroslav Dumbrovský, CSc.; VUT Brno, FAST (oponent)	
	doc. Dr. Ing. Pavel Vejtl; ČZU v Praze, FAPPZ (oponent)	
	doc. RNDr. Libor Pechar, CSc.; FZT JU v Č. Budějovicích	
	doc. Ing. Jakub Brom, Ph.D.; FZT JU v Č. Budějovicích	
	prof. RNDr. Hana Čížková, CSc.; FZT JU v Č. Budějovicích	
	doc. Ing. Michael Rost, Ph.D.; FZT JU v Č. Budějovicích	
	doc. Dr. Ing. Jaroslav Salava; VÚRV v Praze	
	doc. Ing. Miloslav Zouhar, Ph.D.; ČZU v Praze, FAPPZ	



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH **FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ**

Katedra genetiky a biotechnologií

Reakce na otázky oponentů

Studium genetické diverzity kolonií *Pectinatella magnifica*
(Leidy 1851)

Autorka práce: Ing. Vendula Moravcová

Vedoucí práce:

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D

České Budějovice
2023

doc. Ing. Zdeněk Adámek, CSc.

V Úvodu (str. 10) je, byť pouze jednou, nesprávně použit termín invazivní namísto invazní organismus

Tento termín je použit neúmyslně a jedná se o chybu z nepozornosti. Ačkoliv se dle Ústavu pro jazyk Český nejedná o hrubou chybu a v praxi k tomuto zaměňování dochází, je termín invazivní v souvislosti s živočišným druhem užit nesprávně.

Jak rozumět obrázkům statoblastu na Obr. 1.4? Jsou to velmi rozdílné útvary, přičemž levý připomíná statoblast mechovky *Plumatella repens*. Nebo existují dvě morfologicky odlišné formy uváděné autory Barnes et al. (2009). k obrázku je uveden i chybný odkaz na obr. 1.5 a 1.6.

V tomto případě se jedná o statoblasty skupiny Phylactolaemata obecně. Autoři Barnes et al. (2009) se zabývali všemi bezobratlými organismy a tento obrázek lze nalézt v kapitole zabývající se právě skupinou Phylactolaemata, jako ilustrativní vyobrazení morfologických odlišností mezi jednotlivými statoblasty. Během popisu obrázku došlo k opominutí a chybnému popsání této skutečnosti. Chybný odkaz na obrázky 1.5 a 1.6 byl zapříčiněn opakovaným přesouváním a přečíslováváním obrázkových příloh.

Chybné názvy čeledi Chironomidae s použitím kurzívy na vyšší taxonomické úrovni

V tomto případě se jedná o chybu v nastudování pravidel použití kurzívy, kdy jsou v disertační práci kurzívou označeny všechny latinské názvy.

Chybný název rodu *Cryptochironomus* (autorka použila *Cryptobironomus*)

Jedná se o nevědomou chybu („překlep“), ke které došlo během přepisování latinského názvu a nebyla následně opravena.

prof. Ing. Miroslav Dumbrovský, CSc.

V práci není uvedeno (s výjimkou projektu GAČR) na základě, jakých spoluřešených výzkumných úkolů a aktivit přistoupila autorka ke zpracování tématu této práce. Prosím o specifikaci těchto výzkumných aktivit s uvedením, jaký byl podíl autorky na řešení těchto výzkumných úkolů?

Práce byla započata v rámci řešení již zmíněného projektu GAČR P503/12/0337 Invazní mechovka *Pectinatella magnifica* v České republice: její biologie a sekundární metabolity. Kromě tohoto projektu byly výzkumné práce prováděny i v rámci interních projektů GAJU a to GAJU 081/2016/Z: Funkce vody v kulturní krajině v období klimatické změny a GAJU 045/2019/Z: Vliv hospodaření na ekosystémy, funkci krajiny a organismy. Během projektu GAČR byl podíl pouze v rámci terénních prací a odběrů živočišného materiálu, jehož část byla zpracovávána během diplomové a následně i disertační práce. U projektů typu GAJU se pak autorka podílela jako spoluřešitel projektu.

Mohla by být bochnatka americká indikátorem čistoty vod?

Mohla. Vzhledem k potřebě čisté vody nabývajících oligo až mezotrofních hodnot, je bochnatka americká náchylnější na vyšší koncentrace dusíku a fosforu. Jako další je možné jí užívat jako indikátor škodlivých látek v podobě těžkých kovů, což je v současné době testováno maďarskými výzkumníky na koloniích rostoucích v ústí řeky Dunaje.

Mohla by populace bochnatky představovat problém pro funkční objekty vodních nádrží? Jaké invazní riziko bochnatka americká představuje?

Mohla. Pokud by došlo k přichycení na zařízeních typu výpustních zařízení, v případě řízeného upouštění malých vodních nádrží by nebezpečí nenastalo. Při uchycení na česle, stavidla či požeráky by jí tlak proudící vody velmi snadno roztrhal a zbytky kolonie by bez obtíží prošly výpustí pryč. Problém by mohl nastat u bezpečnostních přelivů, kde není tlak vody tak vysoký. Pokud by došlo k nárůstu větších kolonií na hraně přelivu, či na požeráku mimo období řízeného vypouštění nádrže, mohlo by dojít k snížení schopnosti přirozené regulace výšky vodní hladiny. Největší rizikovost invaze tohoto druhu je šíření rybích onemocnění, zejména lososovitých ryb. Tito parazité napadající ledviny používají bochnatku jako meziphostitele a mohou se tak šířit do nových lokalit. Škodlivost vůči původním

druhům mechovek nebyla zatím prokázána, ale ani vyloučena. Jedním z možných způsobů, jak může bochnatka ovlivňovat populace místních mechovek je konkurenční tlak v místě výskytu.

Představuje populace bochnatky riziko či spíše přínos pro kvalitu vody, zejména ve vodárenských nádržích?

Odpověď na tuto otázku je záležitostí dalších výzkumů tohoto organismu. Prozatím není znám žádný negativní vliv na kvalitu vody. Způsob, jakým bochnatka americká ovlivňuje kvalitu vody není podrobně prozkoumán. Je známým jevem, že kolonie bochnatky obývají vody o nižší konduktivitě, avšak jestli je prvotním jevem nízká konduktivita, či je způsobena odčerpáním potřebných iontů koloniemi bochnatek není prozatím možné přesně stanovit. Potenciálním rizikem by mohla být produkce sekundárních metabolitů kolonií, avšak v současné době není znám žádný zdraví škodlivý metabolit tohoto druhu.

Jak velkým rizikovým faktorem je bochnatka pro další vodní organismy v případě rozkladu kolonií, kdy dochází k vysoké spotřebě rozpuštěného kyslíku.

V tomto případě je vysoká závislost na míře osídlení vodní plochy koloniemi bochnatky americké. Pokud by byla vodní plocha výrazně osídlena, například u velmi malých vodních nádrží, a došlo by k náhlému odumření většího množství kolonií, mohl by odběr rozpouštěného kyslíku být tak náhlý a výrazný, že by mohly být další vodní organismy ohroženy na životě. Na základě experimentů s umělou kultivací kolonií odebraných z vodních nádrží bylo zjištěno, že ve fázi rozpadu kolonií je spotřeba kyslíku velmi značná.

Uvnitř kolonií bochnatek v našich vodách lze nalézt i celou řadu druhů mikroskopických řas a sinic. Jaký mají tyto organismy vztah k bochnatce?

Řasy a sinice osidlující vodní prostředí slouží pro zooidy bochnatky americké jako zdroj potravy. Avšak druhy osidlující gelovitou hmotu bochnatek nemají s tímto druhem žádný vyhraněný vztah. Vzhledem ke skutečnosti, že gel bochnatky americké je z 99% tvořen vodou, je pro řasy a sinice vhodným prostředím pro růst. Výraznější osídlení se pak projevuje zejména u straších kolonií, které vlivem stáří neprodukují tak pevný gel jako mladé kolonie a rozvoj řas a sinic je tak výrazně ulehčen.

Jestliže je v analýze AFLP menší klastr reprezentován vzorky kolonií nalezených ve vodách chladnějších než teplotní optimum, co by to mohlo značit pro populaci bochnatky americké?

Mohlo by to značit výskyt mutace, která umožnila bochnatce americké přizpůsobení se chladnějším podmínkám. Vzhledem k přítomnosti vzorku, pocházejícího z oblasti Finska, je pravděpodobné, že tyto kolonie nejsou přítomny jen na území Jihočeského kraje, ale i jinde ve světě. Pak by tato adaptace mohla umožnit šíření druhu i do dalších severských či horských oblastí.

Považuji za vhodné, aby autorka práce stručně charakterizovala, jak své poznatky z řešení dané problematiky využije ve své následující praxi.

Poznatky získané touto prací by bylo vhodné opublikovat v odborné literatuře a podpořit tak další výzkum tohoto opomíjeného organismu. Dále by jistě bylo vhodné více se soustředit, v rámci monitoringu výskytu a rozvoje kolonií, na nástup sezony a teplotní režim vodního prostředí pro stanovení dynamiky růstu. S ohledem na invazní šíření bochnatky americké by současně bylo třeba monitorovat její další šíření, zejména do chráněných oblastí. O získané poznatky bych se dále ráda podělila se studenty v rámci předmětů zaměřených na ochranu vod a v neposlední řadě také s širší veřejností, pro rozšíření povědomí o tomto organismu.

doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

Můžete prosím tyto termíny (gen, genom, genofor) správně definovat? Je znám karyotyp (2n) bochnatky americké?

Gen je jednotka dědičnosti se specifickou biologickou funkcí, která je lokalizována na určitém místě na chromozomu. Jedná se o část DNA nesoucí informaci pro syntézu specifického polypeptidu (strukturní gen) či syntézu RNA. Genom je soubor všech molekul DNA, který je charakteristický pro daný organismus. Genofor je buněčná struktura nesoucí genetickou informaci charakteristická pro prokaryotní organismy. Karyotyp neboli soubor všech chromozomů nacházejících se v buněčném jádře organismu, je v případě druhu *Pectinatella magnifica* $2n=18$.

Je možné na základě současných dostupných informací navrhnout u bochnatky americké markery určené k barcodingu respektive k metabarcodingu?

Barcoding u bochnatky americké nelze provádět s ohledem na její nízkou prostudovanost. U tohoto organismu prozatím nejsou známy mikrosatelitní sekvence, které by barcoding umožňovaly. Metabarcoding bochnatky americké by mohl být pravděpodobně možný za použití druhově specifických primerů.

V literární rešerši používáte zkratky SSR a STMS, které nejsou blíže vysvětleny. Co tyto zkratky znamenají a jaké jsou mezi těmito markery rozdíly? Co je příčinou mnohotného alelismu, který se SSR markerů vyskytuje?

Marker SSR neboli simple sequence repeat je marker využívající analýzu vysoce polymorfních mikrosatelitních oblastí. Mnohotný alelismus mikrosatelitních oblastí je způsoben přítomností i více než deseti alel v každém lokusu.

Technika STMS (Sequence tagged microsatellite site) je modifikace markeru SSR s použitím dodatečně značeného primeru.

Skutečně jsou všechny techniky gelové elektroforézy následně exponovány pod UV světlem a produkt separace je vizualizován?

Vizualizace pod UV světlem není vždy použitelná. Technika zobrazení produktu závisí na použité technice značení fragmentů DNA. V případě užití etidium bromide je použito UV záření, pokud jsou fragmenty obarveny například barvivem SYBR green

nebo SYBR safe lze UV záření nahradit použitím transluminátoru pracujícím na bázi modrého LED světla.

Můžete prosím vysvětlit pro mne nejasné tvrzení, že použití speciálně označeného strojově čitelného primeru, který rovnou vyhodnocuje získaný produkt a převádí výsledky elektroforézy do digitální podoby?

Pro potřeby analýzy AFLP byl použit primer s fluorescenčním značením. Takto označený produkt bylo následně možné podrobit fragmentační analýze pomocí kapilární elektroforézy. Fluorescenční značení umožňuje sekvenačnímu přístroji zaznamenat přítomnost fluorescenčního signálu na dané pozici produktu. Zaznamenaný signál lze převést do grafické podoby v podobě tzv. píku, jehož velikost odpovídá síle zaznamenaného signálu. Na základě těchto výsledků je následně možné manuálně sestavit binární matici reprezentující produkt fragmentační analýzy.

Můžete prosím uvést alespoň některé konkrétní a aktuální aplikace molekulárně genetických metod, které byly u mechovek u nás a ve světě provedeny?

Genetické studie týkající se přímo bochnatky americké se týkají především fylogenetických studií, např. Orr et al., 2022 Paleozoic origins of cheilostome bryozoans and their parental care inferred by a new genome-skimmed phylogeny nebo Saadi, et al., 2022 Phylogenomics reveals deep relationships and diversification within phylactolaemate bryozoans. Proceedings of the Royal Society. Většina studií tohoto organismu využívá znalost mitochondriálního genomu, zvláště pak genu pro cytochrom oxidázu I. Ze skupiny *Bryozoa* je nejvíce prostudována *Crystatella mucedo*, u níž probíhají nejen fylogenetické studie, ale i studie na stanovení genetické variability a diverzity jednotlivých světových populací, např. Kutymov et al. 2021 Mitochondrial gene order of the freshwater bryozoan *Crystatella mucedo* retains ancestral lophotrochozoan features.

Jaký byl důvod amplifikace části genu pro 28S rRNA? Jednalo se o marker integrity respektive vysokomolekularity izolované DNA? Jak byl potom velký amplikon? Proč byl pro elektroforetickou separaci použit 3% agarózový gel?

Pro tyto analýzy jste použila Vámi navržený primerový pár? Jak jste při navrhování primerů postupovala?

Tímto důvodem byla dostupnost sekvence pro sestavení primeru pro druhově specifickou sekvenci pro gen 28S rRNA bochnatky americké a to v databázi GenBank. Velikost amplifikovaného fragmentu odpovídá 398bp. Pro sestavení tohoto primeru byl použit software Primer3.

Název primeru	Sekvence (5' - 3')	GenBank
28S – F	CTTTTCAGCCAAGCACATGA	FJ409576.1
28S – R	AAACCTCGCGTAGAGCAAAA	FJ196151.1

Vzhledem k tomu, že bylo potřebné stanovit přítomnost či nepřítomnost amplifikovaného fragmentu byl zvolen 3% agarózový gel, protože má poměrně dobré separační schopnosti, ale pro úspěšný průběh gelové elektroforézy není potřebný čas delší než 1,5 hodiny.

Doktorandce proto doporučuji, aby do práce vložila errata, kde bude řádně citovat původní literární pramen, kde byla použita shodná varianta AFLP. Mám na mysli informace o sekvencích použitých preselektivních a selektivních primerů a adapterů. Dále doporučuji do errata zahrnout i informace o tom, jaká fluorescenční barviva byla použita pro označení jednotlivých primerů. Standardně jsou pomocí kapilární elektroforézy separovány čtyři různé produktové směsi lišící se právě fluorescenčním barvivem. Pokud byl tento postup použit i při řešení doktorské práce, je nutné uvést, jakým způsobem byly jednotlivé produkty míchány a ředěny. Informace, že cílové fragmenty budou následně vyhodnoceny pomocí fragmentační analýzy, je zcela nedostatečná. Do errata je nutné uvést konkrétní typ genetického analyzátoru a jeho výrobce. Současně je nezbytné uvést délku kapiláry a použitý polymer a podmínky nástřiku a vlastní separace.

Jako základ pro analýzy AFLP byla použita publikace AFLP: a new technique for DNA fingerprinting autora Vos et al., 2009. Na základě této publikace byly zvoleny i adaptory, preselektivní i selektivní primery.

Adaptor EcoRI

5' CTCGTAGACTGCGTACC 3'

3' CATCTGACGCATGGTTAA 5'

Adaptor MseI

5' GACGATGAGTCCTGAG 3'

3' TACTCAGGACTCAT 5'

Pro potřeby selekce byly zvoleny primery, které odpovídají svým párováním zvoleným adaptorům.

EcoRI 5' GACTGCCGACCAATTCACG 3'

MseI 5' GATGAGTCCTGAGTAAAGT 3'

Analyzované vzorky byly umístěny do standardní 96 jamkové destičky s opakováním pro každý vzorek. Fragmentační analýza byla zpracovávána v autorizované laboratoři na analyzátoru ABI 3500 společnosti Life Technologies. K označení produktu analýzy AFLP byl použit fluorescenční standard GeneScan™ 500 LIZ® společnosti Life Technologies a takto značený produkt byl zpracován pomocí fragmentační analýzy. Jako polymer posloužil univerzální polymer POP 7 na kapiláře o délce 50 cm. Nastavení kapilární elektroforézy odpovídalo doporučení výrobce, uvedenému v uživatelské příručce.

Na doktorandku mám zcela stejný požadavek jako u metody AFLP. Předpokládám, že použité primery nebyly navrženy Vámi. Formou errata doplňte prosím informace o tom, jaké byly sekvence použitých primerů včetně odkazu na primární literární zdroj, kde byly tyto markery popsány.

Vzhledem k faktu, že analýza ISSR byla zvolena jako experimentální pro studie genetické diverzity bochnatky americké, pro níž nejsou v odborné literatuře dostupné doporučené postupy ani techniky, byly zvoleny takové primery, které byly na pracovišti volně k dispozici a dle zkušenosti a doporučení školitele poskytovaly kvalitní výsledky u široké škály organismů. S ohledem na nízké prostudování tohoto organismu a náhodnost výběru vhodného primeru nebylo hospodárné pořizovat nové primerové kombinace, které by nebylo potenciálně možné využít k dalším výzkumům. Primerové kombinace byly získány v databázi University of British Columbia (UBC).

UBC 810 GAGAGAGAGAGAGAGAT

UBC 825 ATATATATATATATATT

UBC 881 GGGTGGGGTGGGGTG

UBC 890 GTG GTG TGT GTG TGT GT

Žádám proto doktorandku o vysvětlení, proč v metodické části práce uvedla nepravdivé informace o statistických analýzách ISSR dat, které z důvodů nefunkčnosti metody nebyly nikdy realizovány.

Vzhledem k tomu, že metodika disertační práce byla zpracovávána před realizací experimentu, bylo v ní uvedeno, jaké úkony budou probíhat v rámci jednotlivých procesů a jak budou jednotlivé analýzy vyhodnocovány. Ačkoliv výsledky analýzy ISSR byly neuspokojivé, část popisující potenciální vyhodnocení výsledků této analýzy zůstala opominuta a ponechána na místě.

Skutečně se domníváte, že pouhou přítomností amplikonu jednoznačně detekujete druhovou příslušnost? Jakým způsobem jste ověřila, že použitý primerový pár amplifikuje pouze u bochnatky americké? Geny pro rRNA jsou relativně konzervativní a je teoreticky možné, že primery mohou nasedat na templátovou DNA příbuzných druhů. Této skutečnosti je využíváno při navrhování univerzálních primerových párů pro amplifikaci ITS regionů. Byla ověřena druhová specifita amplikonů sekvenováním?

Druhová přítomnost získaných výsledků nebyla ověřena, a to žádnou jinou technikou. Vzhledem k druhově specifické sekvenci pro gen 28S rRNA a převažujícímu užití statoblastů pouze v několika málo případech i zooidů, které byly odebrány přímo z kolonie, nebylo počítáno s rizikem, že by rRNA detekovala příbuzný druh.

V práci uvádíte, že tímto testem vyloučíte kontaminaci izolované DNA například DNA sinic nebo DNA pocházející ze zbytků potravy. Použité primery by tudíž musely nasedat i na DNA sinic (prokaryota). Je to možné? Nachází se u prokaryot gen pro 28S rRNA?

Ačkoliv se v prokaryotních buňkách rRNA nachází, varianta 28S rRNA mezi nimi není. Z tohoto důvodu není možné, aby došlo k nasednutí primeru pro 28S rRNA na DNA sinic. Avšak v případě použití zooidů by bylo možné, aby trávicí trakt jedinců obsahoval zbytky potravy pocházející z eukaryotních druhů, např. rozsivek. Z tohoto důvodu je v odborné literatuře doporučováno nechat odebrané jedince před izolací DNA vyhladovět.

Můžete prosím vysvětlit některá Vaše tvrzení publikované ve výsledkové části? Na obrázku 4.19 a v textu pod ním prezentuje výsledek agarózové elektroforézy produktů selektivní amplifikace. Jsou vyznačeny polymorfní produkty. Obdobný elektroforeogram je prezentován i v příloze práce. V metodice uvádíte, že agarózová elektroforéza byla použita pouze pro kontrolu amplifikace. Překvapil mě však Váš následující komentář, kde hovoříte o ručním odečítání přítomnosti „bandů“, o přexponování snímků v případě nejasné viditelnosti a o použití polyakrylamidového gelu s lepší separační schopností. Tyto postupy však vůbec nekorespondují s metodikou disertační práce. Nechápu, proč odečítáte polymorfní AFLP „bandy“ z agarózových gelů, které jsou pro detekci AFLP polymorfismů zcela nevhodné. Metoda PAGE není v metodice vůbec zmíněna. Můžete prosím vysvětlit, jaký je skutečný původ AFLP dat, která jste následně hodnotila?

Data AFLP použitá pro zpracování disertační práce byla vyhodnocena pomocí kapilární elektroforézy, avšak gelová elektroforéza byla používána pro průběžnou kontrolu výsledků. V případě neuspokojivého výsledku gelové elektroforézy byla analýza AFLP na daných vzorcích opakována. K analýze kapilární elektroforézy bylo přikročeno pouze u těch vzorků, které úspěšně prošly testováním na agarózovém gelu za účelem úspory finančních prostředků potřebných pro fragmentační analýzu.

Doktorandky bych se rád zeptal, proč zjišťuji tak velký nesoulad mezi kvalitní vědeckou publikací a vlastní doktorskou disertační prací? Proč jste získané data neanalyzovala obdobným způsobem? Publikace byla jistě podrobena náročnému oponentnímu řízení a její akceptování časopisem muselo být pro Vás jasným signálem, že použitá analýza dat je zcela korektní.

Hlavní příčinou rozporů mezi publikací a disertační prací spočívá především v konkrétním zaměření. Zatímco studie provedené za účelem zpracování publikace byly zaměřeny pouze na genetickou část, disertační práce balancuje na hraně mezi genetikou a ekologií, přičemž ekologická část, s ohledem na studovaný doktorský obor, převažuje. Vzhledem k objemu zpracovávaného materiálu a širšímu zaměření disertační práce bylo přistoupeno k využití metod, běžně používaných v prostředí Jihočeské univerzity, disponující celouniverzitní licenci.

Od mladého vědce se však očekává, že se bude pokoušet hledat vhodné řešení formou optimalizačních experimentů a pokusí se tak o fungování dané metody. ISSR markery nepatří mezi nejnákladnější metody analýzy a nabízí se zde řada faktorů, u kterých by se dal ověřit jejich efekt na funkčnost metody – například ověřit variabilní koncentrace komponent PCR, zvolit jiný amplifikační kit či polymerázu, pokusit se přidat různé enhancery do reakce, ověřit vliv teplotní a časového profilu či použít nově syntetizované primery. Pokusila jste se nějakým způsobem „rozchodit“ metodu ISSR nebo jste jí po prvních nezdarech zavrhla?

Pro analýzu ISSR byla snaha nalézt vhodnou cestu, což byla i příčina prodloužení studia za účelem získání času na hledání vhodné alternativy. Mezi tyto varianty lze zařadit opakované přečišťování DNA za účelem získat co nejkvalitnější genetický materiál, opakované izolace DNA ze statoblastů odpovídajícím zjištěnému věkovému optimu s následným dočištěním, použití čerstvě nasyntetizovaných primerů, různé ředění amplifikačního mixu, použití samotné polymerázy o vyšším objemu v amplifikačním mixu i komerčně nabízeného Master Mixu, a v neposlední řadě pro všechny tyto varianty byl při nastavení PCR reakce použit teplotní gradient pro hledání nejvhodnější teploty nasedání primeru na vlákno DNA. K ukončení snahy o najetí řešení této problematiky bylo přikročeno až po vyčerpání zásob statoblastů o vhodném stáří, které by byly zdrojem dostatečného množství kvalitní DNA, tedy statoblastů o stáří jednoho až dvou let.

Zápis o Obhajobě dizertační práce Ing. Venduly Moravcové

Název práce: Studium genetické diverzity kolonií *Pectinatella magnifica* (Leidy, 1851)

Čas konání: 15.3.2023, 13:30

Místo konání: pavilon ZR, zasedací místnost Katedry genetiky a biotechnologií

Předseda komise: prof. Čítek

Oponenti: doc. Adámek – on-line
prof. Dumbrovský
doc. Vejl

Členové komise: doc. Pechar
doc. Brom
prof. Čížková
doc. Rost
doc. Salava
doc. Zouhar

Školitel: prof. Čurn

Zahájení: prof. Čítek představil zkušební komisi a disertantku, CV, publikace, granty, pracovní zkušenosti

Prezentace výsledků: Ing. Moravcová prezentovala výsledky své disertační práce.

Posudky oponentů:

prof. Adámek – Pozitivně ohodnotil výstup při prezentaci výsledků. Seznámil přítomné se svým oponentským posudkem.

prof. Dumbrovský – Pozitivně ohodnotil představenou prezentaci. Seznámil přítomné se svým oponentským posudkem.

doc. Vejl – Pozitivně ohodnotil zvolené a aktuální téma. Seznámil přítomné se svým oponentským posudkem.

Odpovědi na posudky oponentů:

Otázky oponentů byly zodpovězeny, vypracované odpovědi na otázky oponentů jsou přiloženy k materiálům z obhajoby, další dotazy oponentů zazněly ve vědecké rozpravě.

Vědecká rozprava:

prof. Čížková

- Dotaz ke sběru vzorků, jakým způsobem se autorka podílela na sběru vzorků.
- Co způsobilo sezónní posun, byly měřeny parametry vody?
- Jaké parametry vody by měly být měřeny?
- Do jaké kategorie salinity se řadí rybníky, čím by se salinita měřila?
- Nevhodnost plánování náhodných odběrů.

doc. Brom

- Jaká je sušina bochnatky.
- Kdo odebíral vzorky z ostatních zemí světa.
- Jakým způsobem byla použita clusterová analýza?
- Jak korespondují clustery s distribucí bochnatky v Evropě.
- Došlo k navázání spolupráce?
- Jaký má vliv vegetační zóna vody na šíření bochnatky.

doc. Vejl

- Jakým způsobem se rozšířila bochnatka do Evropy, vliv slané vody.
- Existují i jiné druhy, které by mohly být odolnější vůči teplotám. Nejedná se o různé druhy?
- Může být metoda AFLP ovlivněna epigenetikou?
- Proč byl řešen vliv teploty uskladnění.
- Je původ kolonií jeden jedinec, nebo se jedná o víc jedinců.

doc. Pechar

- Jsou výsledky na stejných lokalitách, ale odebraných v jiném roce shodné, nebo se mohou lišit.

doc. Vejl

- Byly lokality oddělené, nebo se jednalo o kaskádu rybníků. Může to ovlivnit strukturu populace.
- Byl vidět vliv oddělených lokalit v clusterování?

prof. Čítek

- Je známo více o genomu bochnatky?

Do další rozpravy ohledně statistického zpracování se zapojil dále doc. Rost, prof. Čítek, doc. Salava a doc. Brom.

Ing. Moravcová zodpověděla na všechny dotazy, členové komise i oponenti vyslovili souhlas s úrovní odpovědí.

Zhodnocení průběhu obhajoby:

Předseda komise prof. Čítek zhodnotil průběh obhajoby a vyhlásil výsledky hlasování. Ing. Moravcová **obhájila** předloženou disertační práci.

Zápis provedl:

Ing. Eva Jozová, Ph.D.