

OPONENTSKÝ POSUDEK

disertační práce Ing. Venduly Moravcové
„Studium genetické diverzity kolonií *Pectinatella magnifica*“

Oponent:

prof. Ing. Miroslav Dumbrovský, CSc.

VUT v Brně, Fakulta stavební

Ústav vodního hospodářství krajiny

602 00 Brno, Žižkova 17

tel.: +420541147771 ;

e-mail: dumbrovsky.m@fce.vutbr.cz

V lednu 2023 jsem byl děkanem fakulty zemědělské a technologické JČU v Českých Budějovicích, doc. RNDr. Petrem Bartošem, PhD., stanoven oponentem disertační práce Ing. Venduly Moravcové na téma: „Studium genetické diverzity kolonií *Pectinatella magnifica*“.

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

Na základě prostudování disertační práce předkládám její posouzení.

Disertační práce (dále DP), která je zpracovaná na 186 stranách v 7 kapitolách, přináší nové informace a poznatky z problematiky, kterou je Studium genetické diverzity kolonií *Pectinatella magnifica*“. DP navazuje na řešený projekt GAČR P503/12/0337 Invazní mechovka *Pectinatella magnifica* v České republice: její biologie a sekundární metabolity.

Hlavním cílem práce bylo stanovit genetickou diverzitu kolonií *Pectinatella magnifica* na území České republiky. Kromě hlavního cíle, byly stanoveny cíle vedlejší, a to monitoring průběžného stavu kolonií mechovky na vodních nádržích, stanovení vlivu délky skladování odebraných vzorků na množství a kvalitu DNA a stanovení vlivu mrazu na množství a kvalitu DNA u studovaných vzorků.

Výběr této problematiky vychází z aktuální potřeby jejich řešení na základě požadavků praxe a přirozeně i z výsledků vědecko-výzkumné činnosti doktorandky. Autorka předložené disertační práce působila jako doktorandka na katedře genetiky a biotechnologií. Nejvýznamnější část svých odborných poznatků a výzkumných výsledků získaných v průběhu doktorského studia aplikovala do své disertační práce.

Aktuálnost tematiky

Zvolené téma DP se zabývá problematikou invazního druhu mechovky *Pectinatella magnifica*, která osídluje významné množství vodních ploch v ČR, zejména v Jihočeském kraji. Z uvedeného vyplývá přínos předložené práce. Obsah práce, která se věnuje této problematice lze z tohoto pohledu hodnotit jako aktuální. Řešená problematika odpovídá odbornému zaměření a vědecko-výzkumné orientaci fakulty zemědělské a technologické JČU v Českých Budějovicích.

Způsob zpracování tematiky

Práce je standardně zpracována, text je doplněn potřebnými tabelárními a grafickými výstupy. Práce obsahuje všechny další potřebné náležitosti včetně statistického vyhodnocení výsledků získaných na výzkumných lokalitách vodních nádrží. Práce využívá již existujících vědeckých poznatků a praktických zkušeností oborů participujících na řešené problematice. Teoretický a metodický výklad řešené problematiky, založený na zpracované rešerši zejména

zahraničních autorů, zabývajících se danou problematikou, by snad mohl být více doplněn poznatky z konkrétních výzkumných úkolů, na kterých se doktorandka podílela v průběhu svého doktorského studia.

Z formálního hlediska jsem v práci zaznamenal některé textové nepřesnosti, např. Knínečské přehradě správně Kníničské přehradě aj. Z věcného hlediska jsem v disertační práci vedle některých uvedených připomínek vážnější nedostatky nenalezl.

Připomínkovat či diskutovat je možno tyto problémy:

- 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?
- Mohla by být bochnatka americká indikátorem čistoty vod?
- Mohla by populace bochnatky představovat problém pro funkční objekty vodních nádrží? Jaké invazní riziko bochnatka americká představuje?
- Představuje populace bochnatky riziko či spíše přínos pro kvalitu vody, zejména ve vodárenských nádržích?
- Jak velkým rizikovým faktorem je bochnatka pro další vodní organismy v případě rozkladu kolonií, kdy dochází k vysoké spotřebě rozpuštěného kyslíku.
- Uvnitř kolonií bochnatek v našich vodách lze nalézt i celou řadu druhů mikroskopických řas a sinic. Jaký mají tyto organismy vztah k bochnatce?
- 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?
- Považuji za vhodné, aby autorka práce stručně charakterizovala, jak své poznatky z řešení dané problematiky využije ve své následující praxi.

Vědecký přínos práce a možnost využití dosažených výsledků.

Předložená DP shrnuje získané poznatky a výsledky odborné a výzkumné činnosti doktorandky v oblasti řešené problematiky. Vychází z výzkumných projektů řešených či spoluřešených autorkou disertační práce. V práci uváděné výsledky výzkumu mohou znamenat nový pohled na invazní druh mechovky *Pectinatella magnifica*, která osídlila významné množství vodních ploch Jihočeského kraje. Z uvedeného vyplývá přínos předložené práce. Výzkumné a následné publikační aktivity s sebou přináší nové poznatky, nové literární prameny i nové zkušenosti. Zároveň výzkumné aktivity reagují na aktuální společensko-vědní potřebu a nové trendy v dané problematice. Z pohledu uplatnění obsahu předložené práce v praxi je velice významná možnost předávání uvedených poznatků jejich budoucím uživatelům, tj. zejména rozhodujícím orgánům veřejné správy, podnikům povodí a dalším správcům a majitelům vodních nádrží.

Neméně významným přínosem bude předání informací studentům na fakultě zemědělské a technologické JČU v Českých Budějovicích.

Závěrečné stanovisko

Závěrem konstatuji, že téma disertační práce je v současné době aktuální. Výsledky Ing. Venduly Moravcové jsou příspěvkem k řešení dané problematiky s novými poznatky spolu s dokumentovanými a v práci interpretovanými konkrétními výsledky v modelových lokalitách vodních nádrží. Při řešení zvolené multioborové tematiky autorka uplatnila a skloubila poznatky z několika vědních disciplín a dosáhla vytčených cílů. Disertační práce splňuje dané požadavky, doporučuji předložit ji k obhajobě a po jejím úspěšném průběhu navrhuji udělit Ing. Vendule Moravcové vědecko-akademickou hodnost "philosophiae doctor" ("Ph.D") ve studijním oboru „Krajinná a aplikovaná ekologie“.

V Brně dne 2. Března 2023



prof. Ing. Miroslav Dumbrovský, CSc.

OPONENTSKÝ POSUDEK NA DOKTORSKOU DISERTAČNÍ PRÁCI

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

Autor práce: Ing. Vendula Moravcová

Školitel: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph. D.

doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph. D.

Oponent: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

Oponovaná doktorská disertační práce Ing. Venduly Moravcové je zaměřena na hodnocení variability bochnatky americké (*Pectinatella magnifica*) pomocí vybraných molekulárních markerů. Doktorskou práci mohu považovat za velice účelné a smysluplné propojení zoologicko-ekologické studie s metodami současné molekulární genetiky umožňujícími posoudit diverzitu i u druhu, u kterého existují pouze strohé informace o sekvenci a struktuře genomu. Bochnatka americká je považována v Evropě za nepůvodní druh s dobrým potenciálem se nekontrolovatelně šířit. Z těchto důvodů považuji genetickou studii u takovýchto druhů za aktuální.

Doktorandka je první autorkou jedné IF publikace z roku 2017, která se přímo týká tématu doktorské disertační práce. Dále je spoluautorkou další vědecké publikace a dvou kapitol v knize. Ty se však tématu disertační práce netýkají.

Formální hledisko

Z formálního hlediska má práce o rozsahu 191 stran strukturu standardní vědecké práce. Je standardně členěna. Práce má několik samostatných příloh. Vlastní práce je tematicky tvořena dvěma samostatnými celky. První celek je zaměřen na biologii a ekologii bochnatky americké. Druhý celek je zaměřen na metody hodnocení genetické diverzity výše uvedeného druhu. Části práce zaměřené na biologii a ekologii na mě jednoznačně působí mnohem více konzistentně, odborně i stylisticky lépe zpracované. Naopak části disertační práce věnované molekulární genetice na mě působí mnohdy nepřehledně až chaoticky a rovněž použitý odborný jazyk je na zcela jiné úrovni ve srovnání s první částí práce. Orientace ve výsledkové části práce tvořené velkým počtem obdobně strukturovaných kapitol není příliš snadná. Některé terminologické připomínky uvedu v dalších částech posudku. Z obecného pohledu bych doktorandce doporučil úplný vědecký název *Pectinatella magnifica* (Leidy 1851) použít pouze jednou, a to když o bochnatce hovoříte poprvé. Ve vědeckém textu je standardní při dalším zmiňování používat zkrácený tvar *P. magnifica*. Do názvů kapitol je zbytečné uvádět třídu, do které je bochnatka americká zařazena. Při výběru grafických výstupů shlukové analýzy doporučuji autorce práce se zamyslet nad tím, zdali zvolené zvětšení má vypovídající schopnost. Obdobně doktorandce doporučuji se zamyslet nad tím, jakou fotodokumentaci použít pro hodnocení výsledků elektroforetických analýz. Na jednotlivých snímcích se obvykle uvádí popis elektroforetických drah názvy analyzovaných vzorků. V seznamu zkratk

doporučuji zkratku vysvětlit českými termíny, a nikoliv kombinací českých a anglických výrazů. Tato připomínka se týká mimo jiné i nesprávně používaných anglických názvů chemických sloučenin (Ethidium Bromide) v textové části práce. Doktorandka by měla používat správné zkratky jednotek (s - sek).

Aktuálnost tématu, vědecké hypotézy a cíle práce.

Aktuálnost tématu práce jasně vyplývá ze skutečnosti, že objektem zájmu je nepůvodní invazní zoologický druh, který se v Evropě šíří i v souvislosti s klimatickými změnami. Vědecká hypotéza předpokládá, že u bochnatky americké bude zjištěna nízká genetická variabilita, a to z důvodů převažujícího klonálního rozmnožování. Vědeckou hypotézu považuji za vhodně zvolenou. Rovněž vlastní cíle práce jsou jasné a konkrétní. Jedná se o posouzení genetické diverzity a ověření vlivu kvality analyzované genomické DNA na výsledky molekulárních metod. Vzhledem k tomu, že základní analytickou metodou je technika AFLP, jsou cíle zvoleny správně. Technika AFLP si klade nároky na množství extrahované DNA i na teoreticky možnou přítomnost různých kontaminantů ovlivňujících restriční štěpení i polymerázovou reakci.

Literární rešerše

Pro zpracování literárního přehledu doktorandka použila celkem 200 literárních pramenů. V naprosté většině se jedná o původní vědecké práce, které mají jasný vztah k řešené problematice. Musím však konstatovat, že počet novějších prací mladších pěti let je citováno minimum. Mezi citovanými pracemi převažují zdroje zaměřené na biologii a ekologii bochnatky americké. Část literárního přehledu věnované právě této problematice považuji za nejzdařilejší část doktorské disertační práce. Informace jsou podány konzistentní formou, je používána správná terminologie a vlastní text je účelně doplněn řadou schémat a obrázků. Doktorandka detailně popisuje morfologii a anatomii bochnatky, její rozmnožování, původ, ekologickou náročnost a invazní šíření v Evropě.

Části literární rešerše zaměřená na genetiku a aplikaci molekulárních markerů je věnován výrazně nižší počet stran. Dle mého názoru je tato část literární rešerše zpracována na nižší úrovni. Psaný text a používaná terminologie na mne působí dojmem, že autorka dané problematice dost dobře nerozumí. V úvodních pasážích je obecně definována genetická diverzita a její význam pro adaptabilitu organismů. Následně se autorka pokouší ne zcela korektně definovat termíny genom, gen a genofor.

- *Můžete prosím tyto termíny (gen, genom, genofor) správně definovat? Je znám karyotyp (2n) bochnatky americké?*
- *Je možné na základě současných dostupných informací navrhnout u bochnatky americké markery určené k barcodingu respektive k metabarcodingu?*

Pokračující část literární rešerše doktorandka zpracovala ve stylu obecného encyklopedického přehledu různých typů molekulárních markerů. Postrádám zde jakékoliv propojení s vlastní prací či s analýzami, které byly u mechovek prováděny a které jsou publikovány. I v této části práce je možné nalézt některé nepřesnosti. Sondy u RFLP metody nemají strukturu palindromů. Například termíny endonukleární restriktáza či protiběžný řetězec mi nejsou známe.

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

Všeobecné encyklopedické zpracování této kapitoly považuji za nepřiliš vhodně zvolené. Uvedený přehled molekulárních markerů a technik však nemohu rovněž považovat ani za aktuální. Nejnovější metodu, kterou autorka zmiňuje je technika AFLP z roku 1995. V přehledu markerů pak mimo jiné postrádám jakékoliv zmínky o sekvenování DNA (Sangerovo, celogenomické), o makerech typu DNA microarray nebo qRT-PCR. To, že i u skupiny *Bryozoa* probíhá intenzivní genetický výzkum, svědčí i fakt, že doposud bylo publikováno celkem 13 celegenomických sekvencí u druhů zařazených do této taxonomické skupiny.

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

Použité metody

Použité metody lze rovněž rozdělit do dvou skupin. První část metod je zaměřena nejen na odběr vzorků, ale zejména ekologickou charakteristiku stanovišť a na vývoj četnosti výskytu bochnatky americké na těchto lokalitách. Do těchto analýz je zahrnuto i hodnocení meteorologických údajů a zpracování statistické analýzy.

Větší prostor dává doktorandka molekulárním analýzám zaměřených na hodnocení genetické diverzity. Již v úvodu posudku jsem zmínil, že bochnatku americkou není možné považovat typický genetický model. Jedná se o geneticky málo prozkoumaný druh a tento fakt je pak limitující pro výběr vhodných analytických metod. Musím konstatovat, že doktorandka vhodně zvolila dvě metody (AFLP a ISSR), které je možné úspěšně použít u taxonů s minimem informací o sekvenci jejich genomů. Doktorandka v úvodu ověřila dvě metody extrakce genomické DNA a následně zrealizovala experimenty zaměřené na posouzení vlivu stárí a skladování biologického materiálu na kvalitu a kvantitu DNA. Tyto experimentální kroky považuji vzhledem k metodě AFLP za vhodně zvolené a správně popsané v metodické části práce. Doktorandka dále uvádí amplifikaci fragmentu jaderného genu pro 28S rRNA. Doktorandce bych doporučil uvádět výsledné koncentrace jednotlivých komponent místo objemů, které byly do reakce přidávány. Tato připomínka se týká i dalších PCR analýz.

- *Jaký byl důvod amplifikace části genu pro 28S rRNA? Jednalo se o marker integrity respektive vysokomolekularity izolované DNA? Jak byl potom velký ampikon? Proč byl pro elektroforetickou separaci použit 3% agarózový gel?*
- *Pro tyto analýzy jste použila Vámi navržený primerový pár? Jak jste při navrhování primerů postupovala?*

Technika AFLP je stěžejní pro disertační práci. Informace o historii a principu této metody, které jsou zmíněny v úvodu této kapitoly, patří do literární rešerše, nikoliv do metodiky. Vlastní metodický postup se doktorandka snaží charakterizovat zcela nekonkrétním odkazem na vlastní diplomovou práci, která však není standardně citována a tudíž je pro oponenta i čtenáře nedohledatelná. Takovýto popis stěžejní metody považuji za nedostatečný, neumožňující reprodukování výsledků. Doktorandka se v této části práce odkazuje na přílohu 23, kde má být prezentován diagram metody AFLP. Příloha 23 však obsahuje informace o amplifikovaných fragmentech vzorků pocházejících z jedné hodnocené lokality. Kapitoly popisující fragmentační analýzu AFLP markerů a následné statistické zpracování dat jsou zcela nelogicky zařazeny až za kapitolou zabývající se zcela jinou metodou – ISSR.

- *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.*

Další molekulární nástroj použitý při řešení doktorské práce jsou ISSR markery. V úvodu metodické části doktorandka obecně popisuje princip této metody. Domnívám se, že tyto informace by měly být zařazeny do literární rešerše. Vlastní metodický postup má dokumentovat příloha 24. Ta je však věnována technice AFLP. Metoda ISSR je znázorněna v příloze 25 v podobě převzatého schématu s odkazem na www.researchgate.net. Na tomto odkazu se však použité schéma nenachází. Vzhledem k tomu, že práce je psána v českém jazyce, doporučuji i převzatá schéma opatřit českými popisky.

Vlastní metoda ISSR je v práci charakterizována pouze strohou informací o názvech 4 použitých primerů. Popis složení amplifikační reakce je rovněž nedostatečný. Z uvedeného zápisu není možné dohledat, jaká byla výsledná koncentrace primerů a BSA v reakci. Informace, že byly elektroforegramy vyfoceny pomocí speciálního fotoaparátu, jsou také nedostatečné. Je nutné uvést typ přístroje a jeho výrobce. Informace o bezpečné likvidaci materiálu kontaminovaného ethidium bromidem považuji za redundantní.

- *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.*

Dále musím konstatovat, že v naprostém nesouladu je popis statistického vyhodnocení výsledků ISSR analýzy s realitou, která je prezentována ve výsledkové části práce. V metodické

části práci doktorandka uvádí, že vstupní ISSR data byla zpracována formou binární matice, která byla následně vyhodnocena shodnými statistickými metodami jako výstupy AFLP analýzy. Ve výsledkové části doktorandka jednoznačně uvádí, že ISSR analýza dopadla neuspokojivě či negativně. Výsledková část práce proto logicky neobsahuje žádné hodnocení diverzity metodou ISSR.

- *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.*

Výsledky a jejich diskuse

Rovněž výsledková část doktorské práce představuje dvě samostatné části. První část tvoří výsledky zaměřené na hodnocení výskytu bochnatky americké ve vztahu k průběhu počasí v hodnocených ročnících 2014 – 2021. Doktorandka hodnotila výskyt kolonií a jejich velikost. Dle mého názoru správně diskutuje změny výskytu bochnatky na jednotlivých vodních plochách. Jsou hledány příčiny těchto změn. Autorka práce dokázala propojit vývoj průběhu počasí, jeho vztah k teplotě vody a k výskytu bochnatky americké. Svá tvrzení dokládá regresní analýzou, kdy těsnost závislosti hodnotí koeficientem determinace. Změny výskytu bochnatky jsou vhodně dokumentovány grafy. Tuto část práce považuji za dobře zpracovanou.

Druhá výsledková a diskusní část se týká molekulárních analýz. Jednotlivé podkapitoly jsou logicky řazeny tak, jak byly jednotlivé analýzy prováděny. Nejprve doktorandka podává přehled o získaných parametrech kvality a kvantity izolované DNA. Výsledky prezentuje tabulkovou formou, ve které jsou charakterizovány všechny získané vzorky. Domnívám se, že takto rozsáhlá tabulka patří do příloh práce. Takto prezentované výsledky působí nepřehledně. Mnohem vhodnější by bylo výsledky prezentovat například formou grafu, kde zjištěné průměrné koncentrace a poměry absorbancí budou doplněny například chybovými úsečkami dokumentujícími variabilitu dat. V prezentované tabulce není vysvětleno, co je míněno stářím vzorku v době izolace. V tabulce se nacházejí i sloupce, které mají u všech vzorků stejnou číselnou hodnotu (vlnová délka a objem měřeného vzorku). Tyto údaje pak postrádají informativní charakter. Následující část práce prezentuje výsledky amplifikace fragmentu jaderného genu pro 28S rRNA. Výsledky jsou doloženy elektroforegramem, kde však postrádám informace o velikosti amplikonu. Původně jsem se domníval, že cílem tohoto testu bylo hodnocení integrity respektive fragmentace izolované DNA. Doktorandka však uvádí, že cílem bylo ověření, zdali izolovaná DNA není kontaminovaná cizorodou DNA, například sinicemi. Autorka práce uvádí, že přítomnost amplikonu dokazuje, zda je vytěžená DNA druhově příslušná organismu *Pectinatella magnifica*.

- *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?*

- *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?*

V dalších kapitolách se doktorandka pokouší prokázat vliv stáří vzorku a mrazu na kvantitu a kvalitu extrahované DNA. Termínem mráz je zřejmě míněno uchování vzorků v mrazicím boxu při -20°C. Výsledky jsou doloženy sloupcovými grafy, které absentují jakékoliv prvky základní deskriptivní statistiky. Proto získané výsledky nemohu považovat za relevantní s nulovou vypovídací hodnotou.

Výsledky AFLP metody doktorandka dokumentuje snímky elektroforegramů separovaných fragmentů v agarózovém gelu. Tyto výsledky chápu jako orientační ověření, zdali došlo k preselektivní či selektivní amplifikaci. V metodice však autorka uvádí, že AFLP analýza byla provedena s použitím fluorescenčně značeného selektivního primeru a amplikony byly separovány pomocí kapilární elektroforézy genetického analyzátoru s následným zpracováním chromatogramů programem GeneMapper 5.0. Očekával bych, že AFLP analýzy budou dokumentovány právě chromatogramy, ze kterých je mimo jiné patrná kvalita AFLP dat.

- *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 přeexponování 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?*

V následujících kapitolách doktorandka dokumentuje výsledky AFLP analýz u všech získaných vzorků a dále u jednotlivých subpopulací. Jedná se 15 samostatných kapitol, které mají identickou strukturu. V každé kapitole je prezentován výřez letecké ortofotomapy dané vodní plochy, grafické vyjádření výskytu polymorfních AFLP fragmentů, jejich četnosti a strom vytvořený shlukovou UPGMA. Údaje prezentované graficky jsou ještě jednou slovně popisovány. Mohu konstatovat, že orientace v takto prezentovaných výsledcích je velice obtížná. Čtenář se ve výsledcích ztrácí a vzhledem k počtu kapitol – lokalit má nesmírný problém zaznamenat jakékoliv obecné závěry. Kapitola hodnotící všechna data je pak doplněna grafickými výstupy, které jsou vzhledem k počtu dat ve velice špatné kvalitě – výsledky shlukové analýzy a kompletní DNA fingerprinting. Výsledky práce a jejich diskuse by měly dát jasný důkaz, který povede k přijetí či zamítnutí vědecké hypotézy, kterou je tvrzení, že u bochnatky americké bude zjištěna nízká genetická variabilita, a to z důvodů převažujícího klonálního rozmnožování. Domnívám se, že takto prezentované výsledky nepředstavují adekvátní důkazy. Shluková analýza sice podává informace o variabilitě AFLP profilů

hodnocených vzorků, ale detailnější náhled do struktury a variability hodnocených subpopulací však neposkytuje. Oceňuji, že doktorandka získala velké množství vstupních dat. Zcela dobře nechápu, proč v disertační práci nebyla data vyhodnocena adekvátním způsobem. Moje překvapení vyplývá z faktu, že Ing. Vendula Moravcová je první autorkou vědecké publikace (Moravcová, V., Moravcová, J., Čurn, V., Balounová, Z., Rajchard, J., a Havlíčková, L. (2017). AFLP reveals low genetic diversity of the bryozoan *Pectinatella magnifica* (Leidy, 1851) in the Czech Republic. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 24(1), 1-6.), která je zaměřena na identické téma a která je prostá veškerých mnou zmiňovaných připomínek. V publikaci doktorandka podala jasný důkaz, že dokáže vědecky pracovat a že dokáže AFLP data adekvátně zpracovat a vyhodnotit. V prvoautorské práci doktorandka používá program STRUCTURE pro hodnocení populací a subpopulací, data dále vyhodnocuje PCA analýzou. Toto jsou zcela jistě relevantní metody, které například s hodnocení H_o a H_e mohou poskytnout odpověď na vyslovenou vědeckou hypotézu.

- *Doktorandky bych se rád zeptal, proč zjišťují 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.*

Dalším tématem, které je prezentováno ve výsledcích a diskusi doktorské práce jsou ISSR markery, které jak jsem již dříve zmínil, nebyly úspěšně optimalizovány a neposkytly tudíž výsledky použitelné pro analýzu genetické diverzity bochnatky. To, že metodické postupy optimalizované v jiných laboratořích nebo pro jiné organismy nemusí bezchybně fungovat pro Vámi hodnocený druh, je realitou, která při plánování experimentů mnohdy nastává. Negativní výsledek je také výsledkem a i v doktorské disertační práci má své místo.

- *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 zavrhlá?*

Celkové hodnocení doktorské disertační práce

Musím přiznat, že celkové hodnocení doktorské disertační práce Ing. Venduly Moravcové a její doporučení k obhajobě pro mne nebylo zcela jednoduché. K práci mám celou řadu kritických připomínek, a to z jednoho důvodu. Molekulární analýzy zde nejsou v pozici marginální metody použité jako doplněk jiných složitých a náročných experimentů. Genetická diverzita je přímo v názvu práce a je rovněž součástí vědecké hypotézy. Z tohoto důvodu se domnívám, že práce musí být z molekulárně genetického pohledu korektní. V závěru jsem se rozhodl práci k obhajobě doporučit a to z následujících důvodů:

1. Doktorandka je první autorkou kvalitní vědecké publikace, ve které prokázala, že dokáže samostatně vědecky pracovat a správně analyzovat získané výsledky.
2. V disertační práci doktorandka kvalitně zpracovala kapitoly zaměřené na biologii a ekologii bochnatky americké včetně vyhodnocení experimentů biologicko-ekologického charakteru.
3. V disertační práci byl hodnocen zoologický druh, u kterého je k dispozici minimum genomických dat, nejedná se o modelový druh, a tudíž zde existuje značně omezená možnost volby použitelných genetických markerů.

Celkovou úroveň zpracování doktorské disertační práce však musím označit jako velice slabou. Proto mám na doktorandku řadu vysvětlujících dotazů, a proto požaduji do práce vložit několik oprav formou errata.

Oponovaná disertační práce a zejména publikační výstup Ing. Venduly Moravcové lze považovat za materiály dokumentující vědecké aktivity doktorandky v oblasti hydrobiologie a molekulární genetiky. Předpokládám, že během obhajoby bude doktorandka správně reagovat na řadu dotazů a připomínek a že zásadní nedostatky práce doplní formou errata.

Za těchto předpokladů doporučuji přijmout tuto práci k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby doporučuji udělit Ing. Vendule Moravcové akademický titul

„Philosophiae Doctor“ (Ph.D.).

V Praze dne 7. března 2023

doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

Katedra genetiky a šlechtění

FAPPZ ČZU v Praze

Oponentský posudek
doktorské disertační práce Ing. Venduly Moravcové „Studium genetické diverzity kolonií
***Pectinatella magnifica* (Leidy 1851)“**

Severoamerická mechovka *Pectinatella magnifica*, z kmene mechovců (Bryozoa), je druhem, který je nutno považovat v našich podmínkách za invazní. I když nejsou známy významné negativní důsledky její kolonizace našich biotopů, díky unikátnímu a poněkud nezvyklému vzhledu neuniká pozornosti laické veřejnosti, která oprávněně vznáší dotazy, co vlastně lze od jejího rostoucího výskytu u nás očekávat. Předložená doktorská disertační práce pokračuje ve výzkumu tohoto unikátního živočicha, probíhající na oboru krajinné a aplikované ekologie Zemědělské a technologické fakulty Jihočeské univerzity již řadu let a navazuje na získané výsledky unikátním studiem její genetické diverzity. Z tohoto pohledu se tedy jedná o velmi přínosnou aktivitu, která dosavadní poznatky vhodně doplňuje.

Řešení zadaného tématu si vyžádalo velké úsilí, založené na analýzách stovek vzorků a těžko docenitelnou náročnost při jejich vyhodnocení a interpretaci. Ty prokázaly, že genetická diverzita kolonií *Pectinatella magnifica* je na území jižních Čech velice nízká. I když byly tyto závěry předvídatelné vzhledem k invaznímu charakteru šíření z omezeně možného počtu propagulí, přesto je toto zjištění nesmírně důležité a představuje důležitý přínos pro další studium. Shlukovacími analýzami byly vzorky rozčleněny do dvou klastrů, přičemž podobnost vzorků v prvním větším klastru se pohybovala přibližně mezi 60 – 90 %. V této souvislosti je pak zvláště cenné zjištění, že společnou vlastností vzorků, tvořících druhý menší klaster, je růst ve vodách, které nedosahují 20°C, uváděných tuto mechovku jako kritická teplota pro její prosperitu. Tento poznatek je nepochybně inspirací pro další rozpracování tématu.

Předložená práce se neorientuje výlučně na genetickou diverzitu kolonií v podmínkách (převážně) jihočeských akvatických ekosystémů, jak je avizováno v jejím názvu, ale přináší i nové poznatky související s ekologií tohoto druhu, především teplotními a klimatickými aspekty a nároky na kvalitu vody a substrátu pro uchycení zooidů. To dokladuje, spolu s rozsáhlou a vyčerpávající literární rešerší, velice dobrou připravenost doktorandky na řešení tématu. Velice podobně, snad s ještě větším důrazem na metodickou náročnost, lze hodnotit i hodnocení všech důležitých aspektů zpracování vzorků DNA mechovky, ať už se jedná o vyhodnocení vlivu stáří vzorku či teploty zamrazení na množství a kvalitu DNA.

Část práce sice již byla publikována, nicméně řada prezentovaných poznatků a závěrů by si patřičnou prezentaci zasloužila rovněž.

K práci mám několik poznámek spíše upřesňujícího nebo opravného charakteru, či dotazů, které však nijak nesnižují její kvalitu:

- V Úvodu (str. 10) je, byť pouze jednou, nesprávně použit termín invazivní namísto invazní organismus
- k diskusi – jak rozumět obrázkům statoblastů na Obr. 1.4? Jsou to přeci jen velmi rozdílné útvary, přičemž ten levý připomíná spíše statoblast mechovky *Plumatella*

repens. Nebo existují dvě morfologicky odlišné formy uváděné autory Barnes et al. (2009)? K obrázku je v textu uveden i chybný odkaz na obr. 1.5 a 1.6.

- chybné názvy
 - str. 19 „larev rodu *Chyromidae*“ – má být „larev čeledi Chironomidae“ a nikoliv kurzivou, tu lze použít pouze pro rody a druhy, nikoliv vyšší taxonomické jednotky (v práci vícekrát mylně)
 - larvy rodu *Cryptobironomus*, má být *Cryptochironomus*

Předložená doktorská dizertační práce přináší řadu nových poznatků důležitých pro další práci na této problematice a její závěry budou nepochybně v tomto směru velmi důležité. Mnou uvedené poznámky jsou vedeny především snahou o diskuzi ke studované problematice a zpřesnění interpretací, nikoliv zpochybněním kvality odvedeného vědeckého díla. Konstatuji, že práce splňuje požadavky kladené na dizertační práci doktorského studijního programu Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a doporučuji proto příslušné komisi její kladné přijetí jako doktorské disertační práce.

V Brně dne 21. 2. 2023


doc. RNDr. Zdeněk Adámek, CSc.
Fakulta rybářství a ochrany vod JU
Vodňany