

**Bc. Adéla Matějková
2018**

Genetické zhodnocení siků (*Cervus nippon* spp.) z ochránářského hlediska

Diplomová práce

Posudek oponenta

Předložená diplomová práce Adély Matějkové se zabývá genetickým zhodnocením siků (*Cervus nippon* spp.) z ochránářského hlediska. Autorka se zde zaměřila hlavně na dva ohrožené poddruhy siků, na siku vietnamského (*C. n. pseudaxis*) a siku tchajvanského (*C. n. taiouanus*). Cílem práce je genetické zhodnocení hlavně chovů v různých Zoo z České Republiky, Polska, Anglie a Německa, celkem se jedná o analýzu 106 vzorků, z toho 9 vzorků představuje siku vietnamského (celkově v zajetí je chováno 85 zvířat) a ostatní vzorky jsou sikovité tchajvanští (343 zvířat chováno v zajetí, dle údajů v Příloze 2 a 3). Pro genetickou analýzu autorka zvolila dva mitochondriální geny (cytb a D-loop), tím je ovšem limitována a je schopna sledovat pouze maternální linii, na což sama upozorňuje. Součástí práce jsou také sekvence z databáze Genbank pro všechny poddruhy siků pro tyto zmíněné geny.

Bohužel se nemohu ubránit srovnání s prvotní verzí této práce z prosince 2017. Došlo ke zlepšení textu, zpracování, bohužel ale ne k nijak výraznému. Celkové zpracování není stále dobře zvládnuté jak stylisticky tak analyticky, obsahuje četné překlepy, prázdnou stránku 15 (asi nejspíš na poznámky oponenta). Práce by si zasloužila jak stylistické, tak grafické úpravy, které by vedly k lepší prezentaci výsledků, kvalitnějším interpretacím a vůbec k orientaci v textu a obrázcích, což je teď velmi složité až nemožné. Práce cituje celkem 63 vědeckých prací či jiných zdrojů. Nezvykle jsou součástí práce i přílohy na CD, které se přes školitele autorky ke mně nakonec dostaly.

Jednotlivé dotazy nebo připomínky:

Úvod

-v úvodu Obr.II – použit oskenovaný obrázek z práce Banwell 1999, neexistuje nějaká novější práce? Nebo převzít a vlastnoručně předělat? Nebo použít např. Ba et al. 2013?

-v úvodu práce autorka rozebírá hybridizaci u siků a pro detailnější úvahy nad hybridizací cituje bakalářskou práci (Zajícová 2016), což mi nepřijde jako nejlepší zdroj.

Metodika

- v analýze pro datování stromu v programu BEAST není uvedeno, jaký byl použit tree prior, a podle srovnání délek větví v analýzách z MrBayes a BEAST se zdá, že špatný.
- bohužel nevhodným vybráním pouze mitochondriálních genů se nemůže autorka zaměřit na odhalování případných hybridů.

Výsledky a diskuze

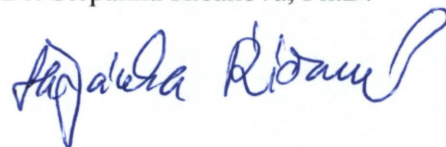
-moc nechápu, proč jsou dělány dva různé stromy, tj. jen z genbankových sekvencí a pak včetně ZOO vzorků, které byly sekvenovány. Proč neexistuje jen jeden kompletní strom, nejprve pro Cytb a D-loop? Případně kombinovaný? Tím, že stromy se ZOO vzorky jsou pouze na výřezech celkového stromu, není možné vidět detailní vztahy a tím si udělat vlastní, nezávislou interpretaci výsledků.

- měl se udělat jeden strom z kombinace obou markrů (po náležité analýze konfliktů; stejně je to efektivně jeden lokus) a ten pak po kládech rozdělit na jednotlivé stránky hlavního textu, tak jak se to dělá ve všech publikacích s velkými stromy. Tento strom měl obsahovat všechny vlastní i převzaté sekvence. Za ním měl být strom datovaný (v publikaci by asi byl jen datovaný a druhý strom v příloze, ale tohle je diplomová práce, ta má obsahovat oboje). Rozhodně nemají být stromy na CD, které NENÍ součástí DP.
- ve výsledcích není vůbec zmíněno, na jak dlouhém úseku pro jednotlivé geny (Cytb a D-loop) jsou fylogeneze založené, zda se jedná o kompletní sekvence nebo částečné.
- „genbank mining“ byl udělán příliš „důkladně“ (nevhodně) pro celou čeleď Cervidae. Myslím, že pro potřeby práce by se stačilo soustředit na podčeleď Cervinae (rody *Axis*, *Dama*, *Cervus*, *Elaphurus*). Stromy pro Cytb a D-loop se ZOO vzorkama by měly být zcela určitě jen v rámci podčeledi či přímo jen v rámci rodu *Cervus*. Také nevím, proč jako outgroupy jsou použity druhy jako okapi? Mezi počty sekvencí a druhů jsou informace o ZOO vzorcích naprosto ukryté, nečitelné, rozhodně bych doporučila editaci stromů, použití barev, apod.
- Obr. IV-V-VI „mitochondriální afinita“ poněkud zvláštní a nepoužívaný výraz, vždy se spíše mluví, že získané sekvence jsou podobné nebo příbuzné či že spadají do skupiny (či kládu). Tyto obrázky jsou vždy jen výřezy z celkového stromu. Chybí v popisku obrázků informace, o jaký model se jedná, atd.
- tabulka genetických distancí má zcela netradiční jednosloupcový formát, a díky tomu má 30877 řádků. Navíc asi není důvod uvádět všechny distance, když cílem práce jsou pouze dva poddruhy. Okapi (a mnoho dalších outgroupů) zcela jistě v tabulce také být nemusela ...
- „pokus o datování“ bylo použito jen pro genbankové sekvence (pro cyt b)? Mělo by být zmíněno.
- datovaný strom má zcela odlišné „vnitropoddruhové“ délky větví a tedy mnohem hlubší (starší) fylogeografii než stromy z MrBayes. Proč? Proč tento podivný (do očí bijící) výsledek není v práci komentován?
- datovaný strom (celý v příloze na CD! a na Obr. X) je velmi podivný, nejedná se o ultrametrický strom, kde všechny terminály mají být v čase 0. Další podivnost se týká dotazu již zmíněného v metodice. Také chybí konfidenční intervaly uzlů (95% HPD).
- oddělení siky tchajvanského je podle výsledků autorky datován na 1.08 Ma. Jak tento výsledek sedí na jiné práce? Proč má sika tchajvanský tak hlubokou (starou) vnitřní fylogeografii? Proč to není v práci diskutováno? V úvodu práce je naopak napsáno: „Na Tchaj-wan se tito sikové patrně dostali díky pevninskému mostu asi před 40–10 tisíci lety (McCullough 2009)“. Podle Tab. IV má sika tchajvanský pouze 3 haplotypy. Jak je možné, že v datovaném stromě má 21 oddělených terminálů?
- datovaný strom obsahuje pouze jednu sekvenci siky vietnamského. Proč? (viz. dotaz proč byly odděleny analýzy vlastních a přejatých sekvencí)
- Tab. IV genetická variabilita- nalezena pro 180 použitých sekvencí? Jakých, ze ZOO nebo Genbanku? Který strom pro cyt b představuje tuto diverzitu? Co je „obstojná“ diverzita? Chybí srovnání s jinými taxony.
- použití slova „osobitý“ celkem 8x v textu (v např. „osobité linie siků; osobitých vlastností daných taxonů; mohou být morfologicky velmi osobité; Míru osobitosti linie/taxonů též udává i jejich stáří“, atd.), mi připadá nevhodné, nekonkrétní, neodborné
- jaká je situace hybridizace siků a jelena evropského v ČR, případně v dalších zemích? Jaká je míra hybridizace těchto dvou druhů? Jak se detekují hybridy? Jak vypadají?

Magisterská práce má být potenciálně publikovatelnou prací (dle instrukcí pro oponenta), a to v případě předložené práce rozhodně nebylo splněno. Práce také nesplnila zadání v názvu

práce. Práce je navíc již předělanou druhou verzí. Práci jen velmi neochotně doporučuji k obhajobě a o celkovém hodnocení se rozhodnu až po zhlédnutí prezentace a diskuzi.

RNDr. Štěpánka Říčanová, Ph.D.



V Českých Budějovicích 15/5/2018

Oponentský posudek diplomové práce Adély Matějkové: „Genetické zhodnocení siků (*Cervus nippon* spp.) z ochránářského hlediska.“

Oponent:

Mgr. Jarmila Krojerová, Ph.D.

Ústav biologie obratlovců AV ČR, v.v.i.

& Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství AF MENDELU Brno

Diplomová práce Adély Matějkové je věnována fylogenetické revizi druhu *Cervus nippon* zejména s ohledem na postavení dvou ohrožených poddruhů siky vietnamského (*Cervus nippon pseudaxis*) a siky tchajwanského (*C. n. taiouanus*) ve vztahu k jiným taxonům v rámci druhu *Cervus nippon* a zhodnocení čistoty evropského chovu obou taxonů na základě dvou úseků mitochondriální DNA (cytochrom *b* a D-loop).

Bohužel předložená DP nespĺnila mé očekávání, které bylo o to větší, že se dané problematice dlouhodobě věnuji. Musím konstatovat, že již název DP nebyl dobrou volbou – je příliš vágní a navíc evokuje dojem, že sika je ohroženým druhem, což platí jen pro některé poddruhy v oblastech přirozeného výskytu, včetně dvou, kterým se autorka ve své práci věnovala. Název DP mohl být konkrétnější a měl dle mého názoru zrcadlit zaměření na dva zmíněné poddruhy.

DP má celkem 56 stran včetně 15 stran, které tvoří přílohy. Součástí je také několik externích příloh, které jsou k ní přiloženy na CD. Je napsaná v českém jazyce. V práci je větší množství překlepů, zdvojených slov, stylistických chyb, jsou použity nevhodné termíny (např. dílčí autoři, pištlivá vokalizace, zoo zvířata) nebo nevhodné formulace např.: „populace jelenů evropských jsou sikou velmi významně znehodnocovány“ nebo „sikové ochotně hybridizují“, atd. To bohužel snižuje kvalitu i celkový dojem z předložené práce.

I když celkové členění DP odpovídá požadavkům na diplomové práce, jednotlivé části by měly být obsahově více propracované. Studentka cituje v seznamu 63 literárních prací, což budí dojem dostatečné znalosti literatury a orientace v tématu, bohužel tyto práce nejsou vhodně použity v textu (v úvodu ani v diskuzi). Jen jako příklad uvedu nevhodné použití naší práce Barančková et al. (2012) ve vztahu ke škodám, které sika působí v zemědělství a lesnictví a které tato práce rozhodně neřeší (týká se původu sik introdukovaných do ČR). Na mnoha místech zas naopak citace prací zcela chybí. Časté jsou i chyby v citacích např. Matsimoto et al. 2015 místo Matsumoto et al. 2015, Bo et al. 2006 místo Li et al. 2006 (Bo je křestní jméno), Ba et al. 2013 vs. 2015 atd. Často používaná práce McCullough (2009) je ve skutečnosti kniha složená z kapitol, které napsali různí autoři – studentka by měla správně citovat jednotlivé kapitoly a ne knihu jako celek a pokud ji tak cituje, tak správný tvar je McCullough et al. (2009), protože editoři jsou tři.

Cíle práce nejsou vhodně formulovány (viz text „první cíl by představoval“; nebo sekvence dvou úseků mtDNA netvoří „mitochondriální profil“). Cíle DP by měly být jasně definovány a měl by být jasný také přínos DP k již známým skutečnostem, které by měly být rovněž vhodně podchyceny v úvodu práce. Hlavně první část práce, tedy analýza založená výhradně na sekvencích stažených z databáze GenBank byla již několikrát publikována a z DP by mělo být zřejmé, proč se tedy tato analýza opakovala (např. využití novějších údajů o datování fosilií).

Velké výhrady mám k popsané metodice DP. Chybí přehledný popis získaných vzorků a nemyslím tím dlouhé tabulky uvedené v přílohách, ale tabulku, která by zpřehlednila získané vzorky, aby bylo jasné kolik vzorků od jednotlivých poddruhů bylo získáno případně odkud. V popisu metodiky je jen uvedeno získání 106 vzorků. Až po pracném sčítání jednotlivých zvířat

v Příloze 3 jsem se dověděla, že studentka měla k dispozici 9 vzorků siky vietnamského ze 4 různých chovů a 97 vzorků siky tchajwanského ze tří chovů, přičemž nejvíc 69 vzorků bylo získáno z chovu v parku Cornbury, přitom tato lokalita není mezi institucemi, kde se sika tchajwanský chová uvedena (Příloha 1). Z práce se nic nedovíme o těchto chovech a jejich historii, přitom tyto informace jsou pro samotnou práci mnohem významnější než podrobné popisy zbarvení či jiné informace uvedené v úvodu, které s tématem přímo nesouvisí. Chybí také alespoň obecnější úvod týkající se významu *ex situ* chovů pro ochranu druhů.

Také metodika týkající se části analyzující sekvence z GenBanku není dostatečně popsána – chybí tabulka, kde by byly použité sekvence popsány případně u nich byla uvedena zdrojová práce - citace. Také není popsáno, jak velké byly analyzované datasety – počet haplotypů a délka sekvencí v bp (např. zmíněná sekvence AJ304501.1 je jen 402 bp dlouhá a nejde tedy o celý cyt *b*)

Velkou výtku mám k zbytečně rozsáhlým a nepřehledným fylogenetickým stromům se zbytečně velkým počtem téměř identických nebo identických haplotypů (vypadá to, že nejsou použité haplotypy ale přímo vzorky). Pro účely práce by bylo mnohem lepší po prvotní analýze vybrat haplotypy zastupující jednotlivé mitochondriální linie siků a s tím analyzovat vlastní haplotypy siky tchajwanského a vietnamského. Výsledky jsou celkově nepřehledné, není uvedeno přiřazení jedinců k haplotypům a skutečně tápu, na základě čeho byly spočítány haplotypové diverzity v Tabulce 4. V práci chybí vysvětlení některých použitých zkratk (např. TMRC, HDP).

K práci mám následující dotazy:

1. Jaké jsou to „konvenční“ poddruhy (str. 4)?
2. Zajímá mne názor studentky na to, jaké faktory mohou ovlivnit míru hybridizace siků a jelenů evropských a také na popsání rozdílů ve směru křížení (laň sika x samec jelena evropského vs. laň jelena evropského x samec sika - v čem je zásadní rozdíl mezi podmínkami ve Velké Británii a v ČR?)
3. I když je práce věnována sikovi tchajwanskému, a to ještě ve smyslu ochranném, v úvodu zcela chybí informace o probíhající záchraně tohoto druhu na Tchaj-wanu. Jaká je současná situace a výsledek reintrodukce?
4. Jak probíhal sběr tkáňových vzorků ze žijících jedinců? Kdo odběry prováděl? Jak probíhal sběr chlupových vzorků a jak jejich analýza? Dle mé zkušenosti DNA izolovaná z těchto vzorků bývá nekvalitní a analýzu je potřeba minimálně 1x opakovat (u mikrosatelitů se u těchto vzorků běžně používá „multi-tube approach“) Kolikrát byla zopakována analýza u problematických vzorků?
5. Jak dlouhé sekvence byly analyzovány, kolik bp měly výsledné datasety pro cyt *b* a D-loop?
6. Jak je možné, že se klastrování haplotypů cyt *b* a D-loopu u dvou jedinců liší? Skutečně je podle autorky možným důvodem mitochondriální rekombinace, jak je naznačeno v diskuzi? Kolikrát byla analýza obou markerů u těchto dvou jedinců zopakována, případně zopakována izolace DNA?
7. Dochází ke křížení mezi sikou a sambarem na Tchaj-wanu? Nemohlo by toto křížení vysvětlit chybné klastrování sekvence AJ304501.1?
8. Jaké jsou hodnoty genetické vzdálenosti mezi jednotlivými mitochondriálními liniemi sik (tři resp. 5 podskupin v rámci kontinentální Asie)? Jak taxonomické členění použité v práci Groves and Grubb (2011) koresponduje s výsledky této práce? K čemu se studentka přiklání v případě obou cílových taxonů?

9. Jsou ve fylogenetických stromech znázorněné skutečně jen haplotypy nebo jde o jedince/vzorky? Domnívám se, že jde o druhou možnost, což je metodicky špatně.
10. Do pozornosti bych dala studentce práci Matsumoto et al. 2015, ze které vyplývá, že z Tchaj-wanu do Japonska byly v padesátých letech exportováni hybridní ze soukromých chovů a to hybridy jak se sambarem tak s jelenem evropským. Nedokazují podobnou zkušenost i výsledky autorky, tedy že do Velké Británie mohli být importováni z Tchaj-wanu kříženci nebo jejich potomci a proto tato zvířata nesou mitochondriální DNA jelena evropského? Jde o ideální námět, který mohla studentka rozvést v diskuzi.
11. Z jakého datasetu autorka vycházela při uvádění počtu haplotypů a haplotypové diverzity H_d v tabulce 4, nelze spojit sva a genbanková data, nejde o srovnatelný vzorek. H_d má smysl počítat jen pro vlastní data a získané hodnoty případně srovnat s publikovanými pracemi. Pokud jsou počty haplotypů vypočítány na základě toho, co je v současnosti v Genbanku, není to spíše zrcadlem intenzity výzkumu v různých oblastech nebo u různých poddruhů než genetické diverzity u jednotlivých linií?

Celkově mám dojem, že studentka nezvládla danou problematiku a v mnoha místech „plave“. Z vlastní zkušenosti vím, že taxonomie jelenovitých není jednoduchá a různí autoři se mezi sebou liší v názoru co je druh/podruh/linie atd., ale studentka si měla vybrat některý z pohledů a toho se držet v rámci své DP. Skutečně nelze napsat „jsou to dva kriticky ohrožené druhy“ a hned zatím je v závorce uvést latinsky jako poddruhy *C. n. pseudaxis/taiouanus*). Také už dle názvu DP bych čekala, že se studentka bude věnovat i ochranné tématice a významu *ex situ* chovů pro ochranu druhů, ale tohle téma není rozvedeno a naopak studentka zbytečně mnoho prostoru věnuje složité taxonomii druhu *Cervus nippon*, což není v souladu s názvem ani cíli DP.

Mé početné dotazy a připomínky zrcadlí celkovou úroveň předložené práce. Studentka ovšem při své práci získala potřebné zkušenosti v molekulárně-genetické laboratoři a zkušenosti při práci s programy pro analýzu mitochondriálních dat. Zajímavou částí je fylogenetická analýza s datováním (nejlepší část celé práce). Práci proto přes všechny výše zmíněné nedostatky **doporučuji k obhajobě** a hodnotím stupněm „C, dobře“. Výsledné hodnocení bude samozřejmě záviset na schopnosti reagovat na výše zmíněné dotazy i na celkové obhajobě DP.

V Brně, 14. května 2018


Mgr. Jarmila Krojerová, Ph.D.