

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci

Molekulárně genetická proměnlivost netopýrů rodu *Hypsugo* v západní Palearctidě

Autor: Bc. Štefan Balog

Oponent: Mgr. Peter Vallo, PhD.

Bc. Štefan Balog se ve své magisterské diplomové práci věnuje, jak už ostatně napovídá název práce, molekulárně genetické analýze tří druhů netopýrů rodu *Hypsugo* v západní Palearctidě: *H. arabicus*, *H. ariel* a *H. savii*. Analýza představuje podklad pro budoucí částečnou taxonomickou revizi těchto druhů, neboť přináší nové a zásadní informace o genetické variabilitě mezi zkoumanými populacemi, zejména co se týče význačného postavení iránských populací *H. arabicus* a egyptických populací *H. ariel*, a poměrně hlubokého vnitřního rozdělení *H. savii* do tří linií.

Práce je standardně členěná a má celkem 112 stran, z toho 95 vlastního textu s 32 vloženými obrázky a 35 tabulkami, a 10 stran příloh obsahujících seznamy analyzovaných vzorků a/nebo sekvencí a seznam genetických distancí. Seznam použité literatury obsahuje slušných 142 zdrojů. Obrázky, zejména tedy spočítané fylogenetické stromy a sítě, nejsou vizuálně příliš lákavé a přehledné, ale jistě správně prezentují výsledky popsané v textu. Prezentaci zpracovaného tématu by ovšem možná víc bylo prospělo grafické propojení zobrazených (sub)linií s mapkami rozšíření druhů/(sub)linií a rozmístění lokalit, nikoliv pouze strohé zkratky haplotypů a jednu malou mapku na začátku. Toto zmiňuju pouze jako osobní názor a možný nápad při přípravě následného manuskriptu. Co se týče tabulek distancí, pouze upozorním na orámování buňek a zarovnání hodnot doleva, které pro mě není obvyklé, a také na přítomnost znaku % u každé hodnoty, navíc bez mezery, který patří pro celou tabulku do záhlaví, popř. do popisu tabulky.

Text je střídavé kvality a vypadá, že byl psán v časové tísní. Češtinu jako cizinec hodnotit nebudu, nicméně chybějící písmenka rozeznat umím, a bylo jich celkem dost. Nebudu zde uvádět seznam, chyby děláme všichni, ale slovo “mitochondriální” by se v Obsahu diplomové práce vyskytovat nemělo. Zde se sám omlouvám za chybné úvozovky, nešel mi přesvědčit textový procesor, že i potřebuju spodní. Jinak např. zkratky jmen poskytovatelů vzorků v příloze v legendě bez teček XY, v tabulce s tečkami X.Y., chybějící “et” u posledního autora v Literatuře u Ruedi et al. (2013), formát písma názvu časopisu u Benda et Horáček (1998), Harrison (1982) “Pipistrellus” taky není kurzívou popis Přílohy č. 3 “Geogaficky”, Pavlinov et Lissovski (2012) název knihy verzálkami, a další různě v textu.

Celkově je práce složená z prací dvou, taxonomického přehledu a taxonomického zhodnocení, mezi které je vmezeřena technická část tvorby a analýzy dat. Taxonomické oddíly byly jistě sepsány věcně správně pod pozorným dohledem školitele, i když potenciál diskuze příliš využit nebyl. Je také škoda, že se autor nepokusil o datovací strom a fylogeografickou analýzu, která by vnesla do taxonomického výčtu evolučně-historický kontext. Fakticky nemám výhrady vůči formulovaným závěrům, i když, jak se vyjádřím níže, nejsou podklady pro tyto závěry úplné. Práce by mohla být méně strohá ve strojovém sečtení distancí mezi význačnými (sub)liniemi a interpretací ve smyslu “toto je asi poddruh, protože distance x %, toto asi druh, protože y %”. Respektive, víme už za tu řádku let využívání mtDNA *cytb*, co hodnoty distancí zhruba znamenají. Na druhou stranu, v diplomové práci by podle mě mělo smysl diskutovat interpretaci těchto hodnot šířeji a s bohatším referováním k publikacím. Rozhodně by to bylo bývalo smysluplnější, než se rozepisovat o technikách rutinních laboratorních procedur. Grafické vysvětlení třikrát definované zkratky PCR a postup výroby 1% agarózového gelu podle mě nemají v diplomové práci místo. Mimochodem, kolik agarózy se to rozmíchá ve 100 ml pufru?

V technické části, týkající se tvorby a analýzy alignmentu mi ovšem chybí několik zásadních

informací a mám zde pár drobných výtek a jednu velkou:

1, Dle jakého úzu jsou jaderné geny značeny verzáčkami (ACOX, STAT, COPS) a cytochrom *b* jako *Cyt-b*? Ví autor, jak se v genetice označují geny a jimi kódované proteiny?

2, Spíše otázka, proč se autor rozhodnul takto ani ne polovičatě zahrnout fragment kontrolního regionu mtDNA (resp. tedy D-loopu)? O který fragment konkrétně se jednalo, obsahoval hypervariabilní region a jak byl tento region alignován a analyzován? Nejde mi do hlavy, proč by měl mít nižší variabilitu než *cytb*. Mám za to, že když ze vzorků bylo možno dostat celý *cytb*, šlo by dostat i podstatně delší úsek D-loopu. Jak přesně byla kvalita sekvencí nedostatečná? V tomto odstavci mě rovněž zaujal výraz “nekorigované p-distance”. Existují “korigované p-distance”?

3, Presentaci postupu amplifikace a sekvenace *cytb*. Zrovna v diplomové práci je vhodné ukázat, kam který primer sedá a který se kterým jaký fragment cílového genu amplifikuje.

4, Analýza intronů. Nejdřív bych se rád zeptal, na základě čeho se autor rozhodnul pro konkrétní touchdown PCR protokoly u jednotlivých jaderných intronů? Uvedeny jsou pouze zdroje jednotlivých primerových párů. Dále k intronům, největší výtka nakonec, ačkoliv ovlivňuje celou prezentaci a interpretaci dat. Autor v textu u intronů zmiňuje haplotypy. Jak k nim přišel? Chybí jakákoliv zmínka o diploidní povaze používaných jaderných intronů, přítomnosti bodového a délkového polymorfismu u sekvencí složených ze dvou simultánně čtených alel, způsobu rekonstrukce haplotypů, a sestavení a analýzy alignmentu za zcela jisté přítomnosti indelů. Toto jsou zásadní informace pro zhodnocení fylogenetických stromů spočtených z intronů, zejména, pokud se na ně autor odvolává v podpoře fylogeneze a taxonomie rekonstruované klasicky na mtDNA. Tento bod by bylo vhodné detailně osvětlit při obhajobě diplomové práce.

Závěr:

Autor pracoval v laboratoři pro získání části sekvenčních dat z rozsáhlého souboru tkáňových vzorků, sekvence analyzoval standardními postupy fylogenetické analýzy a formuloval taxonomické implikace zjištěných fylogenetických stromů. Závěry práce shledávám zajímavými a v revidované formě publikovatelnými. V současné podobě má ale práce poměrně dost drobných nedostatků plynoucích z nepozornosti při sepisování, nemá úplně propojenou část fylogenetické analýzy sekvencí s částí taxonomickou, a zejména nejasně prezentuje analýzu sekvencí jaderných intronů. Tuto magisterskou diplomovou práci doporučuji k obhajobě.

V Brně dne 30.1.2023

Peter Vallo

Ústav biologie obratlovců AV ČR, Brno