

Posudek magisterské diplomové práce Bc. Jany Bud'ové **Genetická diverzita vodních plžů *Aplexa hypnorum* a *Anisus vorticulus* v rámci střední Evropy.**

Autorka si zvolila poměrně zajímavé a velmi aktuální téma. Vedle teoretických poznatků je zhodnocení vlivu geografických a antropogenních faktorů na populační strukturu a diverzitu všemožných zástupců evropské fauny velice potřebné pro odhad možností fungování populací organismů v současné, lidskou činností pozměněné, krajině.

Pozitivně hodnotím autorčinu účast na všech stupních studie od sběru vzorků na velkém množství lokalit, až po zpracování v laboratoři. Bohužel ale musím konstatovat, že v celkovém dojmu práce přes svou aktuálnost nevyužila svůj potenciál. Z části je to dáno objektivními, metodickými, překážkami při sekvenování problematických vzorků, z velké části však také vinou slabšího zpracování textu. Práce působí jakoby byla "šitá horkou jehlou", na mnoha místech měly být výsledky prezentovány dotaznější formou. Naopak v kontrastu s roztříštěností výsledků působí poměrně zdařile úvod a závěrečná diskuze.

Největší výhrady mám zejména ke struktuře kapitoly 5 – Výsledky. Text je příliš fragmentovaný na popisy výsledků pro jednotlivé geny a místy se vytrácí posloupnost. Například, na str. 36, není jasné zda 3 nepoužité sekvence byly vyřazeny z důvodu nízké kvality (směsný signál) nebo z jiného důvodu. Z výsledků také není hned zřejmé, kam se zařadily na str. 36 zmiňované sekvence z Německa, případně zda se jejich haplotypy prolínají s haplotypy českého povodí Labe. Tyto sekvence jsou viditelně zařazeny až do celkového stromu na str. 48.

Největší slabinu výsledků vidím v nedostatečném grafickém zpracování výsledků. Fylogramy i většina populačních stromů jsou nepřehledné a pro čtenáře je skoro nemožné udělat si z nich obrázek o celkové variabilitě a vztazích mezi populacemi. Např., Obrázky 10, 12 a 14, které prezentují stromy pouze s popisky haplotypů bez další legendy, nejsou příliš informativní. V populačních sítích, Obr. 13 a 15, zcela schází grafické zpracování – namapování povodí, lokalit nebo jiné biologicky relevantní informace. V Obr. 17 a 18 byly použity nevysvětlené zkratky lokalit, které se z textu obtížně odhadují, obdobně tabulka 18 a další části práce. Doufal jsem, že zkratky budou alespoň v Příloze 3 se seznamem lokalit. V tabulce 6 čtenář musí vydedukovat, co znamená barevné rozdělení tabulky do povodí - chybí legenda nebo odkaz na ni v jiné části práce (Příloha 1).

Je pozitivní, že výsledky analýzy AMOVA potvrzují předpoklad významu povodí pro populační strukturu *A. hypnorum*. V tabulce s výsledky analýzy (str. 37-38, bez čísla) však není jasné, zda se hodnota FST a zejména její signifikance vztahuje k celému testu, nebo k nejvyššímu stupni hierarchie - povodí, který je předmětem hodnocení (v prog. Arlequin hodnoty pro Va, Vb, a Vc). Totéž platí pro tabulku na str. 39. AMOVU by také neškodilo vyzkoušet s jinou konfigurací populací. Např., z Obr. 11 je patrná minimální vzdálenost mezi haplotypy z povodí Odry a Moravy. Zajímalo by mě, jak to vypadá při sloučení těchto povodí s vysvětleným procentem variability a signifikancí testu. Je třeba samozřejmě uvažovat velmi nízký počet vzorků z povodí Odry.

Také mám několik poznámek k metodické části práce. Zajímalo by mě, zda se autorka pokusila problém s DNA kontaminovanou případnými inhibitory nějak řešit. Byla kvantita a kvalita DNA ověřena jinou, specifitější, spektrofotometrickou metodou než na nanodropu (např. Qubit, PicoGreen)? Byly vyzkoušeny alternativní způsoby extrakce DNA (klasická fenol-chloroformová izolace, nebo chelex, atd.)? Diskuse se omezuje jen na citaci práce Skujiené a Soroka (2003) (která mimochodem schází v literárním seznamu) a na konstatování, že přes známé problémy s mukopolysacharidy plžů zůstává izolace pomocí kolonkových kitů pravděpodobně nejefektivnějším způsobem extrakce.

Smeary COI u *A. hypnorum* na gelu v Obr. 8 ukazují ne zrovna nejlepší amplifikaci i u úspěšných reakcí, možná jde jen o nepovedenou fotku gelu. Nicméně, autorka použila univerzální COI primery, které jsou přirozeně první volbou, ale často amplifikují jaderné pseudogeny, nebo naopak u některých organismů selhávají. Bylo kromě složení PCR směsi experimentováno i s teplotou annealingu, které by mohlo pomoci zbavit se nežádoucích produktů? Jak autorka v diskuzi správně uvádí, bylo by lépe designovat specifické primery. Nebyl takový pokus učiněn na základě sekvencí dostupných v GenBank? Případně by mohlo pomoci zaklonovat smeary do plazmidů a pokusit se zjistit příčinu neúspěšného sekvenování (koamplifikace více produktů atd.). Podobně by zaklonování produktů nejspíš vyřešilo problém s ITS2 u *A. vorticulus* a vedlo by k získání většího množství sekvencí hostitele i parazita.

Přestože byly sekvenovány dva mitochondriální geny, nebyly v žádné analýze použity konkatenované matice. Tady předpokládám, že je to z důvodu nízkého množství vzorků, pro které se podařilo získat oba geny. Přesto mohl být tento fakt okomentován alespoň v diskuzi.

Závěrem, práci doporučuji k obhajobě, celkové hodnocení by však mělo přihlídnout i k prezentaci práce při obhajobě.



Jan Štefka

V Č. Budějovicích 06.09.2013