

Posudek na disertační práci Jana Štefky: Host specificity, genetic variability and genealogy in populations of model parasite species

Studium parazitů se složitými životními cykly pomocí nových metod populační genetiky je bezpochyby jednou z největších výzev současné molekulární ekologie. Ač se jedná bezesporu o krásný a vzrušující směr výzkumu, článků na dané téma je stále žalostně málo. Předložená práce je proto velice vítaným počinem. Navíc se díky vhodně zvoleným dvěma modelovým druhům s odlišnými životními cykly, značnému úsilí (viditelného hned například na nadstandardním počtu získaných sekvencí či počtu analyzovaných mikrosatelitových lokusů) a notné dávce badatelského štěstí podařilo přinést spoustu nových netriviálních poznatků.

Práci tvoří soubor čtyř vysoce kvalitních publikovaných článků a jednoho rukopisu ve finální fázi před zasláním vhodně doplněných úvodními kapitolami o modelových druzích a použité technice. Úvodní kapitoly považuji za velmi cenné, neboť i čtenáři s minimálními znalostmi některého z mnoha oborů, které autor evidentně brilantně ovládá (parazitologie, fylogenetika, populační genetiky), se zde dostane poučení nutného k pochopení dále následujících spisů. Zvláště se mi líbila kapitola o populační genetice, kde je stručně avšak velmi výstižně přiblížena koalescenční teorie. Možná je škoda, že stejně nebyla věnována pozornost bayesiánským přístupům k analýze populační struktury na základě mikrosatelitových dat, když už byly tyto techniky použity.

Žádné závažné připomínky k práci nemám. Hledání chyb v takto kvalitním spisu, jehož podstatná část navíc prošla recenzním řízením špičkových časopisů daných oborů, je zoufalým počinem srovnatelným s hledáním jehly v kupce sena. Dovolím si jen několik nepodstatných dotazů a připomínek, jež možná jen odrážejí nízkou míru orientace autora posudku v problematice předložené práce.

Mé dotazy se týkají především spisu č. 3.

1. Připadá mi, že počet cyklů zadaných v programu Structure se pohybuje spíše u dolního okraje běžně používaných hodnot. Byly kontrolovány, zda během analýzy již došlo k ustálení hodnot?
2. Hierarchický přístup zadávání vstupních dat do programu Structure mi přijde jako vsutku dobrý a vtipný nápad. Vymyslel to autor sám nebo vyčetl z literatury?
3. Přestože vyšla analýza v programu Structure velmi pěkně, nebylo by dobré zkusit některý program, který dokáže pracovat i s geografickými koordinátami vzorků (např. TESS)?
4. Myslím, že pro studium demografické historie (konkrétně zde size contractions) by bylo vhodnější použít nějakou novější alternativu k již poměrně omšelému programu Bottleneck, u kterého navíc velmi závisí na zadaných parametrech mutačních modelů mikrosatelitových lokusů, což jsou parametry pohříchu těžce odhadnutelné. Vhodný by byl například MSVAR. Na obhajobu autora disertace je však třeba říci, že se jedná o celkem okrajovou záležitost spisu a navíc zmíněný program M. A. Beaumonta vsutku není „user friendly“.
5. Zajímavým výsledkem je objevení dvou separovaných linií z jezera Tana vázaných specificky na různé druhy ryb. Ví se něco o odlišnostech biologie hostitelských druhů?

Závěrem mohu s potěšením konstatovat, že předložený spis jasně vyhovuje požadavkům kladeným na disertační práce. Práci doporučuji k obhajobě a navrhuji její vysoce kladné ohodnocení.

V Praze dne 19.5.2008


Pavel Munclinger



Posudek na doktorskou disertační práci Mgr. Jana Štefky

„Host specificity, genetic variability and genealogy in populations of model parasite species“

Předložená práce (98 stran) je založena na čtyřech původních vědeckých pracích (2 publikovaných, 1 v tisku a jednoho dosud nepublikovaného rukopisu), kde je Mgr. Štefka většinou prvním autorem. Po obecném úvodu věnovaném evoluci vztahu parazita a jeho hostitele (specialisté vs. generalisté), metodickým otázkám (využití teorie koalescence, potenciální problémy) a popisu obou modelových organismů (tasemnice *Ligula intestinalis* a veš *Polyplax serrata*) si autor vytyčuje následující cíle: 1. mapovat genetickou variabilitu u obou modelových druhů; 2. odhadnout míru toku genů uvnitř i mezi hostitelsky a geograficky izolovanými soubory parazitů; 3. rekonstruovat demografické a evoluční události; a 4. interpretovat výsledky s ohledem na biologii a evoluční historii hostitelů.

Výsledky ukázaly rozdílný charakter rozložení genetické proměnlivosti u obou modelových organismů: v případě *Ligula intestinalis* velkou roli vzdálenosti v globálním měřítku a současně zanedbatelnou strukturovanost v lokálním měřítku, zatímco v případě *Polyplax serrata* hrála geografie zásadní roli. Tyto rozdíly autor vysvětluje rozdílnými disperzními schopnostmi hostitelů (rybožraví ptáci vs. hlodavci). Ve druhém případě byla zjištěna přítomnost dvou odlišných, sympatricky se vyskytujících linií (jedna parazitující pouze na myšici lesní, druhá na m. lesní a křovinné), které mohou reprezentovat samostatné druhy – ty mohly vzniknout následkem duplikace na hostiteli *A. flavicollis*. V závěru autor naznačuje některé možné cesty budoucího výzkumu.

Při posuzování předložené práce jsem se musel vyrovnat hned se dvěma handicapy: první je společný všem posudkům prací, které již prošly náročným sítím recenzního řízení v respektovaných vědeckých periodikách (Int. J. Parasitol., IF=3,337; Mol. Ecol. Notes, IF=1,220), druhý potom vychází z faktu, že jsem v daném oboru (tj. parazitologii) naprostým laikem. Předem se proto omlouvám, pokud budou některé mé poznámky a dotazy působit nepatřičně či naivně. Následující pasáž bych proto rád pojnal spíše jako diskusi s autorem – z toho důvodu jsem zvýraznil otázky, na které bych rád znal odpověď (zpravidla spíše abych ukojil svou zvědavost).

Manuscript No. 1:

str. 31 a Fig. 2: oba stromy jsou méně podobné než autoři tvrdí, u ITS2 v zásadě neexistuje žádná jasná genealogická struktura mezi klady, ale ani klady nejsou zcela shodné. Nepostřehl jsem **proč byly haplotypy 12 a 13 vyloučeny z analýzy?**

str. 31 a Fig. 3: na obrázku i v textu prezentováno víceméně pouze subjektivní kvalitativní zhodnocení rozdělení párových rozdílů (mismatch distribution) – **byla shoda s predikcí signifikantní?**

Table 6: podobně postrádám kvantifikaci průkaznosti pro parametr populačního růstu g ; tento parametr je sice výrazně vyšší u kladu A než u B, přesto $g = 195,2$ pro klad B zřetelně přesahuje hodnotu 100, přičemž spodní hranice 95% intervalu spolehlivosti (163,3) se ani v nejmenším neblíží nule, což naznačuje, že i u kladu B je možno uvažovat o exponenciálním populačním růstu (viz moje předchozí poznámka: i přes výrazně „kostřbatý“ charakter křivky na obr. 3 můžou být pozorovaná data v signifikantním souladu s modelovou predikcí).

str. 32 a Fig. 4: v textu se tvrdí, že u kladu 3-3 nelze rozhodnout mezi izolací vzdáleností (IBD) a disperzí na dlouhou vzdálenost (LDD), ale v obr. 4 uvedeno pouze LDD.

Fig. 1 a 4: na obr. 1 je uvedeno, že klad A je výhradně evropský, ale z obr. 4 je patrné, že tato skupina obsahuje i haplotypy z Tuniska.

str. 33, horní odstavec: vysoká míra divergence mezi klady A a B skutečně může odrážet skutečnost, že jde o dva samostatné druhy, nicméně autoři poněkud zamlčují skutečnost, že i ostatní klady jsou velmi divergentní (ve skutečnosti ještě divergentnější) – **považují tedy i tyto klady za samostatné druhy?** Zdá se, že úroveň vnitrodruhové divergence je u tohoto druhu velmi vysoká a může odpovídat situaci popsanou u nematod Blouin et al. (1998).

str. 35, předposlední věta ve 2. odstavci: „This seems to support the status of *D. interrupta* as an isolated cryptic species...“ se mi jeví poněkud v rozporu se skutečností, že haplotypy tohoto taxonu se objevovaly uvnitř haplotypů *L. intestinalis*, ani netvořily monofyletickou skupinu (navíc je to v rozporu s tím, co je uvedeno v jednom z následujících rukopisů).

Manuscript No. 3:

str. 60, první odstavec, a str. 71, legenda k Tab. 1: F_{IS} není fixační index

str. 61: popis modelů je poněkud zkratkovitý – **proč byl např. u dvoufázového modelu (TPM) použit zrovna poměr 90% SMM a 10% IAM?** Buď je třeba vysvětlit, nebo uvést citační odkaz.

str. 60 a 61: burning by mělo být burn-in

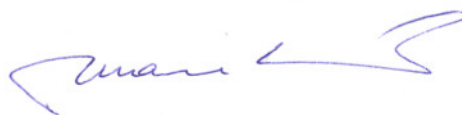
str. 74 a Tab. 3: **není mi zcela jasné, co vlastně je „sample“ – parazit z jedné lokality (1 jezero nebo řeka) a z jednoho hostitele?**

str. 66: ANOVA asi má být AMOVA

Manuscript No. 4:

str. 93 (vpravo dole) a str. 94: nízká úroveň mtDNA diverzity a vysoká diverzita jaderné DNA nemusí být nutně v rozporu („mutually conflicting“, „in conflict“), je třeba brát v úvahu, že mtDNA má 4x nižší efektivní velikost. Vysvětlení nízké variability COI je sice možné, ale nepřiliš pravděpodobné. Odkaz na signifikantní odchylky neutrality u tohoto genu v kladu C může být zavádějící: jak známo všechny použité testy (Tajima's D atd.) jsou senzitivní vůči změnám velikosti populace (současná velikost ovlivňuje silněji počet segregujících pozic, zatímco průměrný počet nukleotidových rozdílů je více ovlivněn velikostí původní populace), takže statisticky průkazné hodnoty těchto mohou spíše indikovat recentní populační růst (nebo recentní bottleneck). **Byla data testována pomocí mismatch distribution nebo na likelihood bázi např. programem Lamarc?**

Závěrem lze konstatovat, že předložená doktorská disertační práce je po vědecké stránce kvalitní a obsahuje řadu zajímavých výsledků. Splňuje všechny požadavky na ni kladené a proto doporučuji, aby ji Mgr. Jan Štefka ve smyslu platné vyhlášky obhajoval před příslušnou komisí a po úspěšné obhajobě mu byl udělen titul PhD.





Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Viničná 7, 128 44 Praha 2

Tel: 221951820; Fax: 224919704; E-mail: parazit@natur.cuni.cz

<http://www.natur.cuni.cz/parasitology/>

Posudek na dizertační práci Jana Štefky „Host specificity, genetic variability and genealogy in populations of model parasite species

Práce je zaměřena na vnitrodruhovou analýzu a hostitelskou specifitu vybraných druhů parazitů (jednoho endoparazita a jednoho ektoparazita). Je třeba ocenit široký záběr práce z hlediska počtu analyzovaných izolátů/kmenů i jejich reprezentativnosti s ohledem na původní (mezi)hostitele i geografické rozšíření. Rovněž tak je potřeba ocenit „opatrný“ přístup k interpretaci molekulárních analýz/fylogenetických vztahů i hledání vhodného „markeru“ s dostatečnou výpovědní hodnotou pro analýzu populací studovaného druhu parazita. Výsledky výzkumu byly zveřejněny jako tři publikace v kvalitních mezinárodních časopisech (2x International Journal for Parasitology, 1x Molecular Ecology Notes) a jeden příspěvek je zaslán k posouzení do časopisu Molecular Ecology. To samo o sobě již dokládá vysokou kvalitu výsledků i mezinárodní respekt/zájem o výsledky autora.

Práce ukazuje řadu dalších cest pro pokračování výzkumu a dostatečně stimuluje čtenáře k dalším úvahám/otázkám, z nichž některé helmintologické si zde dovoluji položit:

- Lze u analyzovaných izolátů *Ligula intestinalis* (a zejména v případech, kdy by se jednalo o sympatrický výskyt s reprodukční bariérou mezi dvěma izoláty/kmeny) uvažovat o nových druzích? Jinými slovy, je tedy dnešní *L. intestinalis* komplexem druhů? Tento dotaz sice částečně zodpovídá diskuse ke třetí publikaci, nicméně co vše je podle autora ještě potřeba udělat/definovat, aby bylo možno přistoupit k popisu nových (doposud kryptických?) druhů řemenatek?
- Jak vlastně vypadá situace v definitivních hostitelích *Ligula* spp.? V práci je zmiňována ojedinělá možnost zkřížené inseminace a vzniku hybridního potomstva dvou původně odlišných izolátů (t.j. rozdílných např. v mezihostitelské specifitě či jinak). Lze tedy očekávat nějaké geograficky definované hybridní zóny nebo jsou hybridi nějak znevýhodněni a neudrží se v prostředí?
- Existuje dnes výzkum, který by objasnil, v čem by mohla spočívat odlišná mezihostitelská specifita řemenatek? Předpokládám, že u charakterizovaných (a např. i sympatricky se vyskytujících) izolátů/populací mají bazálnější i odvozenější zástupci kaprovitých ryb stejnou šanci nakazit se procerkoidy různých kmenů těchto tasemnic, takže o uchycení infekce zřejmě rozhodují nějaké (mně neznámé) interakce ryba-larva tasemnice. Autorem citovaný vliv odlišné imunitní reakce (Arme 1997) může být jedním vysvětlením, nicméně recentní výzkum škrkavek (*Ascaris lumbricoides* a *A. suum*, viz také zmínka v diskusi dizertační práce) ukazuje i na nezanedbatelnou roli efektorových molekul produkovaných parazitem, např. různě účinných inhibitorů hostitelských trávicích enzymů (trypsinu).

Přestože jde o dizertační práci vysoké kvality, přehledně členěnou, čtivou a sepsanou za použití hezké angličtiny (pokud mohu posoudit), lze s vynaložením určitého úsilí najít i nepatrné „vady na kráse“ v odborné i formální úrovni práce. Jen namátkou lze uvést:

- (a) Na str. 3 bych pro úplnost informace možná doporučoval zmínit existenci gonochoristických tasemnic a motolic, a rovněž hermafroditických hlístic.
- (b) Na str. 7 (3. odst.) je trochu matoucí konstatování „plerocercoid infects several fish species“. I když rozumím tomu, co chce autor sdělit, chápu slovo „infect“ spíše jako proces infikování nového hostitele, takže v takovém pojetí je infekčním stadiem pro ryby procerkoid měnící se až po proniknutí do ryby (pozření rybou) na plerocerkoid.
- (c) Doporučoval bych používat jednotně britskou nebo americkou angličtinu (viz „analysed“ vs. „analyze“, „recolonisation“, „recognizable“, „maximise“, atd.).
- (d) Poměrně řídké se vyskytující překlepy určitě nesnižují vědeckou úroveň tohoto díla (str. 3 dole: Cyclophillid tapeworms, str. 7 dole: „suppress“ má být zřejmě „suppression“, apod.).
- (e) Autor se (jako řada jiných) nevyvaroval ani překlepů v seznamu citovaných prací (především zkomolená jména některých autorů) a nejednotnosti formátu použitých citací.

Závěr: Předložená dizertační práce dostatečným způsobem prokazuje odbornou erudici a schopnost vědecké (týmové) práce autora. Práci jednoznačně doporučuji k obhájení s následním přiznáním titulu Ph.D.

V Praze 21. května 2008


Prof. Petr Horák