

Oponentský posudek na magisterskou práci:

Jana Korelusová: Phylogeny of heterocytous Cyanobacteria (Nostocales and Stigonematales).

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity České Budějovice

[Rok dokončení: 2008, 33 stran]

Magisterská, anglicky psaná práce Jany Korelusové je založena na molekulárním hodnocení kmenů heterocytózních sinic, zejména s použitím metody sekvence 16S rDNA. Autorka sama sekvenovala 23 kmenů, zvládla dobře tuto metodiku a použila své výsledky spolu s literárními údaji a dalšími výsledky z databank ke konstrukci fylogenetických stromečků, k hodnocení vývojových vztahů v této skupině sinic a k rozvinutí teorií o fylogenetických procesech heterocytózních rodů. Práce je tedy zcela moderní, je založena na progresivních metodických a myšlenkových trendech v cyanobakteriální taxonomii. Má všechny znaky podobných prací se svými přednostmi, ale i fatálními zápory. Nepochybuji ovšem, že může být bez problémů přijata k publikaci ve vysoce impaktovaném časopise.

Použil jsem výraz „fatální zápor“. Na něm trvám, ovšem musím zdůraznit, že toto hodnocení nepadá na hlavu autorky, ale mám na mysli většinu avantgardních molekulárně-taxonomických prací z poslední doby, které jsou k publikaci přednostně přijímány. Jde v podstatě o to, že mnozí molekulární taxonomové (a zdá se, že tuto víru přijala i autorka) opovrhují do značné míry tradiční taxonomii a botanickými nomenklatorickými pravidly, usilovně se snaží dokázat, že jsou chybná, ale současně bez jediného slova pochybností užívají stará taxonomická jména, kterými jsou jejich kmeny označeny. Jednoduše proto, že jim nic jiného nezbyvá a kdyby se drželi jen označení kmenů, dostanou se do neřešitelných konfusí. Má to několik nepříjemných důsledků:

- 1) Řada kmenů je špatně určena. Autorka si je toho vědoma, ale na straně 19 píše, že „so many mistakes from so many different sources are improbable“. I kdyby však byla špatně určena jen polovina z těch, které chybně označeny jsou, byl by to závažný problém. Ani autorka se nevyhnula tomu, aby ve veškerém dalším hodnocení neužívala jména, která nekontrolovala. Na její obranu musím uznat, že to bylo nad jakékoliv možnosti v magisterské práci.
- 2) Molekulární analýzy jsou pro současnou taxonomii nesmírně důležité a dokonce rozhodující, mají však především pomáhat řešit taxonomické problémy. Je zajímavé, že téměř všichni autoři vytýkají nedostatky dosavadního systému, ale před jakoukoliv taxonomickou nápravou se většinou zastaví.
- 3) Molekulární analýzy pochopitelně prokazují heterogenitu většiny rodových jednotek sinic. Tento prostý fakt je však jen konstatován a taxonomické řešení chybí. Tím se stává, že se často diskutuje postavení rodů na základě různých skupin kmenů „exclusive typ“, což vede k rozličným negacím dřívějšího systému. Předpokládal bych, že by taxonomické řešení následovat mělo.

Toto je však jen všeobecný úvod a nyní připojuji jen některé vybrané poznámky k vlastní práci (abych zkrátil oponentské řízení, prosím aby se autorka vyjádřila jen k bodům, označeným *):

- Název je velice široký. I když úvahy o fylogenezi heterocytózních sinic jsou obsahem závěrečné kapitoly, je titul nadnesený vzhledem k obsahu a vlastní práci
- * Obecně bych měl jednu výtku. Autorka ignoruje v duchu mnoha dalších podobných špičkových prací moderní požadavek tzv. polyfázického hodnocení taxonů. Zejména morfologie a ekologie přišly hodně zkrátka (s výjimkou poslední fylogenetické úvahy, kde diskutuje význam typu větvení stélky).

* V práci je užíván jako základ bakteriologický systém z Bergey's Manual z roku 2001, který byl již dosti překonán a korigován. I když autorka nesouhlasí s kombinovanými návrhy na moderní systémy, které se snaží toto bakteriologické pojetí sloučit s dalšími kritérii (Hoffmann & al. 2005a, 2005b), mohla se alespoň zmínit, proč je opomenula.

Je zajímavé, že autorka cituje rozsáhlou molekulární primární literaturu, korigující vztahy mezi jednotlivými rody sinic, ale vynechala následné práce i týchž autorů, obsahující jejich taxonomické závěry. Chybí zde např. důležité práce Casamatta & al. (2006), Gugger & al. (2002), Li & al. (2002), Rajaniemi & al. (2005), Willame & al. (2006) a další.

* Na straně 4 se autorka zmiňuje o konfliktu „between phylogenetic studies and morphological classification“. Ale v tom je právě jádro problému. Molekulární hodnocení mají právě přispět tento konflikt odstranit a vypracovat systém, který by vysvětloval jak fylogenetické vztahy, tak i morfologii. K tomuto úkolu je však třeba provádět příslušné studie i se znalostí fenotypových a ostatních znaků. Není to jednoduché, ale právě to současná taxonomie potřebuje. Co si o tom autorka myslí?

* Na straně 9 v charakteristice „cluster H1“ autorka píše „Cluster H1 gathers strains of cyanobacteria with double false branching“ a jako první příklad uvádí „traditional Nostocales“. Kde např. u čeledě Nostocaceae je „double false branching“, které má autorka na mysli?

Strana 9 u charakteristiky H2: „...Rivulariaceae (except two *Tolypothrix elenkinii* strains ...)“. To je nevhodná formulace. Zařazení *Tolypothrix elenkinii* do Rivulariaceae až dosud snad nikoho nenapadlo.

Strana 9 u charakteristiky H3: „This clustering shows polyphyletic origin of some genera“. Podle systému by mělo zde být spíše řečeno „heterogenitu dosud uznávaných rodů“.

* Strana 8 až 10 – dotaz: Sekvenované kmeny z rodu *Symphyonemopsis* tvoří zřejmě heterogenní komplex. Je už známá také morfologická charakteristika jednotlivých kmenů, zejm. kmene VAPOR 1? To by mohlo přispět i k vysvětlení velice důležité otázky fylogeneze a vymezení rodu *Brasilonema*.

Strana 10: *Brasilonema roberti-lamii* (nikoliv „lamii“) je původně popsána z ostrova Guadeloupe, nikoliv z centrálního Mexika (tam byl tento druh nalezen později).

Strana 12 a jinde: autorka diskutuje postavení rodu *Tolypothrix* na několika místech. To je ale heterogenní rod, jak vyplývá z fylogenetického hodnocení. Jestliže uvažujeme o postavení tohoto rodu, musíme vycházet z větve, která obsahuje typový druh, což je *T. distorta* (a ta perfektně odpovídá postavení H5.1 – strana 20). Všechny ostatní subclustery s jinými druhy „*Tolypothrix*“ se liší i morfologicky a musí být klasifikovány zřejmě do jiných rodů. Tato skutečnost by měla být respektována i v dalších komentářích a diskusích.

* Strana 13 a 24-25: Autorka poukazuje u rodu *Chlorogloeopsis* na to, že *Ch. fritschii* a kmeny *Chlorogloeopsis* z Grónska se liší na úrovni 2 rodů. To je velice zajímavé a mělo by to být vyřešeno alespoň v budoucnu. Autorka píše, že „morphological data are not available“. Od *Chlorogloeopsis fritschii* to není pravda, grónské kmeny, které mají evidentně docela odlišnou ekologii, by to ovšem bylo potřeba. Pochybuji, že se jedná jen o „cryptogenera“. Vyřešení tohoto problému by bylo o to závažnější, jestliže autorka rozvíjí na straně 24-25 hypotézu o tomto rodu jako předku heterocytózních sinic. Není mi jasné k jakému „*Chlorogloeopsis*“ se vztahuje věta „This organism (or its sequence) is not available“. Pokud k nějakému „hypothetical ancestor“, pak je celá teorie dosti labilní.

- * Strana 14: K diskusi o významu pravého větvení pro fylogenesi a klasifikaci cyanobakterií měla být použita určitě také práce Golubic & al. (1996), která se týká přímo této problematiky.
- * Strana 18: K rozsáhlé diskusi o clusteru H4 pokládám za nezbytné provést fenotypovou kontrolu sekvenovaného kmene rodu *Petalonema*. Stalo se tak? Je to jinak velmi hypotetická úvaha.
- Strana 18-19: Rovněž v clusteru H5 jsou některé závěry bez současné revize kmenů velmi problematické. *Capsosira lowei* evidentně neodpovídá popisované heteropolární stélce původního typu rodu *Capsosira*. Mimo to v celé skupině existuje již mnoho příkladů „větvení“ nebo alespoň podélného dělení buněk u několika rodů. Nevím, proč by komplex *Nostoc*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* a *Trichormus* měl být víc problematický než kterýkoliv jiný z této skupiny. Zkratku NAAT považuji za přebytečnou (je to podobné jako „LPP-groups“ a obdobná značení bakteriologů). Jednak všechny jednotlivé rody v této skupině obsažené jsou evidentně heterogenní a musí být rozděleny do nižších genetických jednotek (co tedy vlastně do toho komplexu NAAT spadá?), jednak nazývat tuto skupinu „morphotypem“ není správné. Jako morfotypy byly dosud považovány morfologicky odlišné jednotky v rámci jednoho genotypu, zde jde o pravý opak.
- S tím souvisí i hodnocení na straně 21-23. Autorka píše „Any clear taxonomic characters do not support the inner division of the cluster“. To ovšem platí jen v případě, že se vezmou nekriticky pouze sekvence bez současné revize kmenů a k tomu se používají uvedená nerevidovaná jména. Smyslem moderní taxonomie by právě mělo být hledání těch morfologických znaků, které jsou v koincidenci s genetickými analýzami a provedení příslušných revisí a taxonomických oprav. K tomuto cíli se již bohužel autorka nedostala. Tomu se však nelze divit, je to další obrovská práce, autorka mohla být však v tomto směru opatrnější a přesnější ve formulacích.
- Strana 21-22: Příkladem urychleného zevšeobecnění jsou např. diskuse o rodech *Tolypothrix*, *Trichormus* (který je rovněž heterogenní), o komplexu *Anabaena/Aphanizomenon* (kde autorka nezdůraznila, že se jedná jen o část planktonních druhů *Anabaena*), o rodech *Anabaenopsis* a *Cyanospira*, které se liší strategií tvorby akinet, *Nodularia* (kde jsou sekvenovány jen planktonní kmeny) atd.
- Strana 24-25 – Závěrečná kapitola je věnována hypotese o evoluci heterocytózních cyanobakterií, založených na výchozích rodech *Chroococciopsis/Chlorogloeopsis*. Je to jistě docela zajímavá teorie, ale její podpoření založené především na schopnosti fixace atmosférického dusíku v anaerobním prostředí prostřednictvím specializovaných buněk je nedostatečné. Samozřejmě fylogenetická pozice těchto rodů by měla být prvním argumentem. Existuje však i řada dalších neheterocytózních vláknitých sinic se stejnou charakteristikou dusíkového metabolismu (*Trichodesmium*, *Planktothrix* – diazocyty). Možná by mohly být dále zmíněny i další podobné teorie evoluce heterocytózních sinic, např. Adamsova, založená na srovnání struktury stěn u *Oscillatoria* a *Nostoc*, tedy poukazující na zcela odlišné, ale závažné fylogenetické vztahy.
- * Strana 27 (závěry): Nerozumím zcela smyslu věty „*Brasilonema*... It is considered to be an ancient genus because its phylogeny does not correlate with geographical distribution.“ Rovněž závěr s *Tolypothrix* a *Calothrix* je nepřesvědčivý, protože se nejedná o oba rody v celém rozsahu, např. ani kmene typového druhu rodu *Tolypothrix* se to netýká.

Závěr:

Nicméně hodnotím-li práci Jany Korelusové jako vědeckou studii v kontextu se současným stavem vědy o cyanobakteriích, množství a preciznost vykonané práce, koncepční stránku i způsob zpracování, musím konstatovat, že přináší řadu nových poznatků a patří mezi mimořádné magisterské disertace. Protože zastávám názor, že hodnotit se má to, co autor skutečně udělal a ne to, co ještě udělat mohl a nebo měl udělat jinak podle názoru oponenta, navrhuji proto jednoznačně hodnocení stupněm **v ý b o r n ě**.


Prof. RNDr. Jiří Komárek

Oponentský posudek magisterské diplomové práce
Phylogeny of heterocystous cyanobacteria
vypracované Janou Korelusovou

Předložená práce se zabývá fylogenezí sinic tvořících heterocyty metodami molekulární fylogeneze, především pomocí analýzy 16S rDNA.

V úvodu se autorka zabývá současným stavem taxonomie sinic, který je založen na syntéze klasických a molekulárních přístupů. Tato syntéza není často jednoduchá, autorka upozorňuje na možné problémy s využitím 16S sekvencí pro molekulární fylogenezi. Příkladně jeden z diskutovaných problémů, špatné primární určení sekvenovaných kmenů, v autorčině případě určitě nehrozí.

Vlastní experimentální práce spočívá v získání 23 nových sekvencí 16S rDNA. Kmeny sinic nebyly vybrány náhodně, cíleně se sekvenovaly kmeny rodů nedostatečně zastoupených v databázi, tak aby došlo k zaplnění mezer ve fylogenetickém stromě. PCR produkty 16S rDNA byly přímo sekvenovány bez klonování. Vlastní sekvence doplnilo celkem 600 sekvencí 16S rDNA sinic tvořících heterocyty z databáze GenBank.

Důraz práce je položen na kritickou analýzu vlastních i cizích dat. Výsledky jsou shrnuty v několika fylogenetických stromech a doprovázeny diskusí. Analýza vedla k několika originálním výsledkům:

- Byl potvrzen monofyletický původ sinic tvořících heterocysty.
- Byl potvrzen pantropický výskyt rodu *Brasilonema*. Zajímavý byl výsledek, že genetická příbuznost izolovaných kmenů nekorelovala s jejich geografickou distribucí.
- V několika případech nekorelovaly tradiční a fylogenetické skupiny sinic. Většinou, tak jak je obvyklé u jednoduchých organismů, morfologické znaky nebyly schopny postihnout genetickou variabilitu. V jednom případě došlo překvapivě i k situaci opačné. Zástupci rodů *Raphidiopsis* a *Cylindrospermopsis* byli ve fylogenetickém stromě vzájemně promíchány, což indikuje nevhodnost či proměnlivost použitých tradičních taxonomických znaků.
- V práci jsou dokumentovány dva možné případy horizontálního transferu genů, v jednom případě se jedná o krátký inzert v regionu V1 16S rDNA přítomný u některých a chybějící u jiných zástupců téže skupiny. Vzhledem k vnitřní heterogenitě tohoto fragmentu u příbuzných sinic je pravděpodobné, že nejde o inzerci recentní. V druhém případě jde o existenci dvou naprosto rozdílných sekvencí 16S rDNA u téhož kmene z nichž jedna reprezentuje fúzní gen mezi sinicovou a bakteriální 16S rDNA. Několik nepřímých důkazů indikuje, že v tomto případě nejde o artefakt.

V závěru práce je navržen průběh fylogeneze sinic tvořících heterocyty. Navržená hypotéza i použité argumenty jsou logické, nicméně vzhledem ke své specializaci je nejsem schopen posoudit.

Konkrétní připomínky

Proceeding – preceeding str. 11 odst. 1

Sekvenovaný kmen *Fischerella* sp. PAP92 jsem nenašel ani ve výsledcích ani ve stromech.

Vzhledem k souhrnému charakteru práce mi chyběly odkazy na některé práce přímo související s tématem, např.:

R. Ueno, V. A. R. Huss, N. Urano, S. Watabe: Direct evidence for redundant segmental replacement between multiple 18S rRNA genes in a single Prototheca strain. *Microbiology* 153 (2007), 3879-3893


S. R. Miller, R. W. Castenholz, D. Pedersen: Phylogeography of the Thermophilic Cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (2007), 4751-4759

Dotazy

1. Dá se na základě současných znalostí (akinety) modelový kmen *Nostoc* sp. PCC 7120 (původně *Anabaena* sp. PCC 7120) zařadit do rodu *Trichormus*?
2. Sekvence vložená do V1 tvoří více či méně dokonalý palindrom indikující vlásenkovou sekundární strukturu rRNA (např. téměř perfektní palindrom u sekvence AB093487, ACTATGTAGAGACCTAGCATTGCTACGTCTCTACATCGT). Je toto uspořádání typické i pro další V1 úseky u bakterií?

Závěr:

Podle mého názoru splnila předložená práce své cíle. Navíc ukázala jak je důležitý kritický výběr kmenů pro sekvenování. Diplomovou práci Jany Korelusové doporučuji k obhajobě a navrhuji známku výborně.



Martin Tichý

V Třeboni, dne 26. května 2008