

## Oponentský posudek magisterské práce

### Ana Lokmer: Polyphasic approach to the taxonomy of the selected oscillatorian strains (Cyanobacteria).

Biologická fakulta JU v Českých Budějovicích, 2007.

Anglicky psaná magisterská práce Any **Lokmer** má velmi dobrou úroveň. Jedná se o moderní taxonomickou studii vybraných kmenů oscillatoriálních cyanobakterií s použitím a zvládnutím všech důležitých metodických přístupů. Členění práce, jasná formulace textu, dokumentace i přehled prostudované literatury jsou klady této práce, z níž by měly být podstatné části připraveny k publikaci v prestižních časopisech. K jednotlivým částem:

**Úvod** (Introduction) je jasně formulovaný a dokazuje, že autorka bohatě citovanou literaturu skutečně prostudovala a dokázala z ní vytěžit podstatné informace. Mimo to z formulací vyplývá, že autorka se dobře seznámila se spleitou problematikou současného taxonomického hodnocení cyanobakterií. Bylo by jistě záhodno, kdyby tedy mohla v uvedené problematice pokračovat i ve své další profesní kariéře.

**Cíle práce** jsou jasně formulovány a byly splněny.

**Materiál a Metodika:** Výběr 25 kmenů představuje slušně reprezentativní vzorek pokrývající hlavní typy oscillatoriálních sinic. Přesto bych měl k němu několik kritických poznámek: Jednak se domnívám, že mohly být zastoupeny více jednoduché typy z řádu Pseudanabaenales, zejména z rodu *Leptolyngbya*. Pokud už tento velice heterogenní rod byl do práce zahrnut, pak je to pouze jeden kmen, který spíše skresluje výsledky. Domnívám se však, že do práce zahrnut být neměl, ale příslušný kmen, označený nesprávně „*Oscillatoria*“ musel být po revizi do rodu *Leptolyngbya* přeřazen. Je tomu tak? (\*)

Autorka v předchozí (úvodní) kapitole dobře komentuje problematiku geografického rozšíření sinic, kosmopolitismu, endemismu a ekologické vyhraněnosti. Tato kritéria měla být respektována i při výběru kmenů. Je sice záslužné, že bylo revidováno a opraveno určení několika kmenů z Pákistánu a jednoho z Brazílie, ale hodně to komplikuje celkové závěry a hodnocení, jestliže sortiment všech ostatních kmenů je v podstatě ze střední Evropy a Itálie. Další dotazy:

Co jsou „strains collected by the author“ (p.9)? (\*) Z Tab. 1 nevyplývá, které kmeny byly izolovány autorkou.

Oceňuji, že autorka zvládla zřejmě všechny metodiky potřebné k hodnocení moderní diverzity sinic. Metodika je popsána stručně a jasně.

Jeden další dotaz: Byl nějaký důvod, proč autorka vybrala pro své analýzy a komplexní hodnocení z heterocytozních sinic právě jeden kmen *Nodularia spumigena* a jeden *Fischerella mucicola*? (\*) Oba jsou mimochodem genotypově, fenotypově i ekologicky značně rozdílné.

**Results and Discussion:** Autorka rozděluje skupinu kmenů z rodu *Phormidium* do 5 skupin. Na fylogenetickém stromečku na Fig. 9 však nejsou tyto skupiny (clusters) vyznačeny. Orientace při ověřování popisovaných výsledků s dokumentací je proto obtížná. Ve stromečku jsou některé kmeny tištěny polotučně, některé nikoliv. Je obvyklou praxí, že autoři zvýrazňují (oddělují) ve stromečcích ty kmeny, které sami studovali a sekvenovali. Zde tomu tak není. Proč? (\*) Opět to ztěžuje orientaci ve výsledcích. Mimo to kmeny skupiny II a III jsou ve stromečku promíchány a neliší se ani nijak podstatně morfologicky; proč nejsou klasifikovány do jedné skupiny? (\*) Znamená to, že rozdělení do skupin na str. 13 je jen

podle fenotypových znaků? Proč ale potom jsou do jedné skupiny řazeny také na př. *Ph. tergestinum* a *Ph. aerugineo-coeruleum*? (\*) Tyto dva kmeny vycházejí ve stromečku dosti daleko od sebe a nejsou si nijak blízké ani fenotypově.

U skupiny „*Phormidium autumnale*“ na str. 15 není uvedeno číslo skupiny (VII). U skupiny VIII je podobná situace jako u skupiny 5. Jak autorka vysvětluje, že oba druhy, které zařadila do skupiny VIII (a které se liší fenotypově) jsou na fylogenetickém stromečku tak daleko od sebe? (\*) Totéž platí ještě ve větší míře u rodu *Geitlerinema*. Tento rod je ve stromečku rozptýlen do 5 velmi vzdálených pozic. Lze to nějak vysvětlit? (\*) U typů, které lze morfologicky dobře definovat, např. u r. *Oscillatoria*, vychází i molekulární charakteristika dosti jednoznačně.

Celkově jsem ocenil přesné popisy morfologie a ultrastruktury u všech kmenů, ale domnívám se, že při zpracování mělo být vzato jako výchozí kritérium spíše pozice ve stromečku a zdůrazněny znaky, které jsou společné pro kmeny sdružené v jednom genetickém clusteru. Alespoň to je nyní obvyklá praxe při revizích cyanobakteriálních rodů a není důvod ji měnit.

Kladem práce jsou bezesporu cenné údaje o morfologické variabilitě a stabilitě některých znaků kmenů v kulturách, které poskytují důležitá data k aktuálním problémům v cyanobakteriální taxonomii a kde všechna podobná pozorování jsou žádoucí. Mám na mysli hlavně údaje o velikosti a šířce vláken, apikálních buňkách a zejména údaje o vnitřní struktuře buněk. Zde mám jeden dotaz: Existují nějaká data o stálých rozdílech v parietálním uložení thylakoidů u rodu *Geitlerinema*, tj. mezi typicky parietálním oproti triangulárnímu uspořádání? (\*) Ví se, zda jsou tyto rozdíly stálé a charakteristické pro jednotlivé kmeny a druhy? (\*) Tyto rozdíly by mohly být dosti významné pro revidovanou rodovou klasifikaci.

Za významné považuji výsledky o variabilitě kmenů z hlediska molekulární analýzy a kritické hodnocení identifikace kmenů, což je nejobsažnější část celé práce. Jedině podobnými přesnými daty, jako autorka uvádí, se dá uvést moderní systém sinic do přijatelného a srozumitelného stavu. Autorka zařazuje své molekulární hodnocení až do této kapitoly 3.3 „Phylogenetic analysis“. Při povaze celé práce by asi bylo vhodnější právě z této části vycházet a morfologickou analýzu přiřadit k jednotlivým clusterům. To, co jsem vytýkal na začátku, že ve fylogenetických stromečcích nejsou uvedeny jednotlivé clustery, je částečně odčiněno v této kapitole (analýzou na str. 22-27), dokumentované dílčími stromečky na Fig. 10 a 11. V tomto hodnocení je hlavní hodnota práce, měl bych jen jednu námitku, že v textu nejsou zřetelně odlišeny výsledky autorky a citovaná data přejatá z literatury. Jen namátkou: Pozice clusteru G s *Phormidium* cf. *irriguum* kmen KOVACIK 1987/5 a *Phormidium autumnale* UTEX 1580 je velice diskutabilní. Ale autorka neanalyzovala ani kmen UTEX, ani na př. dále diskutovanou *Oscillatoria princeps* kmen NIVA-CYA 150, o jehož morfologii se mnoho neví. Kmen *O. princeps* je navíc uveden jen ve „velkém“ stromečku na Fig. 9, a to velice vzdáleně od ostatních *Oscillatorií*. Je pro to nějaké vysvětlení? (\*)

Z posledních molekulárních prací o diverzitě sinic vyplývá běžný logický závěr, že typy s parietálním uložением thylakoidů (Pseudanabaenales) jsou odděleny od složitých typů s radiálními a nepravidelně uloženými thylakoidy (Oscillatoriales). Autorka toto rozdělení více méně také respektuje na Fig. 10 a 11, ale nikoliv ve stromečku na Fig. 9. Jak by to mohla vysvětlit? (\*)

Faktický autorčin rozbor jednotlivých skupin je však velice cenný a přináší mnoho nových důležitých dat.

**References:** Seznam prostudované literatury (11 a půl stránky, to je téměř 200 citací) je obdivuhodný. Je zde shrnuta celá moderní literatura, která se k tomuto tématu vztahuje a ze zasvěcených citací v textu vyplývá, že autorka uvedené práce četla a respektovala.

**Závěr práce:** V „Conclusions“ jsou stručně uvedeny hlavní obecné výsledky, které by mohly být rozšířeny a podle mého názoru by jim prospělo číslování. Zde by měly být také odděleny obecné závěry a potvrzení některých obecných faktů od přímých závěrů, vyplývajících pro konkrétní taxonomickou klasifikaci sinic.

**Dokumentace** (tabulky, fylogenetické stromečky, fotografie) je stručná, nicméně dostačující. Autorka se soustředila hlavně na fotografickou dokumentaci kmenů, která je nejlepší kvality (včetně EM snímků) a snese i nejpřísnější kritéria k publikaci.

**Závěr:** Studie Any Lokmer přispívá podstatným způsobem k řešení závažných problémů v taxonomické klasifikaci vláknitých cyanobakterií bez heterocytů. Autorka zvládla všechny moderní metody této práce a její data zejména z elektronové mikroskopie a genetického sekvenování jsou nová a cenná. Moje dotazy a poznámky ke zpracování nijak nesnižují její dosažené výsledky a hodnotu této obtížné studie. (Prosím při obhajobě zodpovědět dotazy, které jsem označil ve svém posudku červenou hvězdičkou.)

Práce je předložena v dobré angličtině, technicky dobře vybavena. V textu je sice znatelný počet překlepů (na př. v psaní jmen taxonů), což ovšem připisuji časové tísně před odevzdáním práce. Studie přináší cenné poznatky z vědeckého hlediska, které by měly být publikovány. Splňuje zcela požadavky na magisterské dizertace a navrhuji klasifikaci nejlepším stupněm (výborně).

V Třeboni, 23.5.2007.

  
Jiří Komárek

## Review of a master thesis of Ana Lokmer

Ana Lokmer did quite an interesting piece of scientific work in her diploma thesis. I enjoyed her "Introduction" based on nice selection of taxonomic and phylogenetic cyanobacterial papers. I was almost amazed by a clever description of a method for selection of sequences from extensive and often unreliable GenBank pool. I was pleased by the amount of traditional morphological data made on strains. And, in addition, I admire the amount of molecular and phylogenetic work. In this respect, I believe that Ana did a good job and that her thesis is well worth of a successful defense for Mgr. title. However, while reading the thesis, I had some emotional affections that need to be expressed by several comments and questions.

I liked your finding that width of the cells within filaments was quite stable and reliable among all these simple morphometric measurements. In green filamentous algae (e.g. *Klebsormidium*, *Stichococcus*), we have found very similar situation in our studies. However, it is often quite interesting to look at the pattern of change in variable features, rather than to merely interpret this plasticity as environmentally induced and, thus - from some mysterious reason, uninteresting and even unimportant for a taxonomist.

On page 19, you state that apical cell shape was most stable from morphological features. However, you did not conduct any formal analysis testing this simple hypothesis. Why?

You write about "genes coding for apical cell shape" on the same page. Do you really believe that the "genes for" concept can be applied for the interpretation of such complex morphological features? Do you know any single algal or cyanobacterial example? On the other hand, I know several examples of more complex and rather epigenetic intracellular machineries involved in morphogenesis of algal and plant cells (desmid cells ontogeny, *Acetabularia* ontogeny, diatom frustule ontogeny, etc.).

I would like to have the chapters on intra-locality variability in morphology and in molecular characters joined together. In this situation, morphological and molecular data seem to be parts of two isolated intellectual worlds. They need not to be.

Low bootstrap supports are a problem of your phylogenetic analyses. I am sure that critical reviewers of a paper based on these results would be happy to sweep you down because of unreliability of many your conclusions based on low supported phylogenetic clusters. We still have to learn how to discuss these molecular trees. Branches with low or no bootstrap support could simply place anywhere – and we cannot make any hypothesis on the basis of a given topology. For example, your discussion of a position of *Geitlerinema* sp. and *Ph.* cf. *tergestinum* is practically useless. Actually, they can place anywhere in other analysis. Even the support 61/-/0.98 for a clade containing these two divergent sequences is low and you should be very cautious to make any conclusions.

Your clusters C, F and G represent a similar issue. Cluster C is noted as an example of well supported group and you even discuss some ecological preferences of these clade. However, the actual supports are very low. I would place a bet that this and most similar clades will disappear in phylogenetic analyses involving more concatenated genes. Simply look at similar studies made e.g. on streptophytes basal

to vascular plants or on some dinoflagellates, where a lot of gene sequences are available. You will see that almost none of the similarly little supported clades that were widely discussed in older papers actually survived. In this respect, I have quite a little confidence in your deductions.

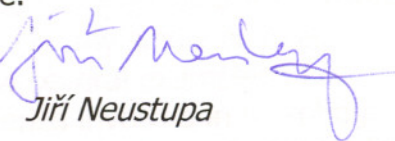
In conclusions, you argue that members of the genus *Oscillatoria* were found in two clusters. However, the single *Oscillatoria* member of one of these clades - *O. princeps* - is not placed in any single supported clade on any tree level. This organism could actually be related to any of other clades of your tree. Based on your data, there is clearly no indication that *O. princeps* is related to heterocytous cyanobacteria (p. 28).

In results you mentioned four clades (A, *Phormidium* 2, C and G) containing strains with radial thylakoid arrangement. However, in Conclusions, you wrote that there were two such clades. In addition, there is really no indication in text of this chapter, which one "poorly supported clade by the bootstrap values as a whole, but with five well supported clusters within" you actually had in mind, when discussing this issue.

In general, I would like more elaborate discussion of your results, involving perhaps more formal tests and interpretations on the relation of phenotypic and molecular/ecological data.

Figs 10-12 lack description so that they might be confusing for a reader.

I would perhaps evaluate this thesis with a "very good" grade - but I am prepared to change my mind after a nice and convincing defense.

  
Jiří Neustupa