

Posudek na diplomovou práci Bc. Martiny Wijové

Diplomová práce M. Wijové na téma „Evolutionary relationships of Spirurina (Nematoda: Chromadorea: Rhabditida) with special emphasis on dracunculoid nematodes inferred from SSU rRNA gene sequences“ představuje fylogenetickou studii vztahů vybraných druhů řádu Spirurida, především zástupců nadčeledě Dracunculoidea.

Předložená diplomová práce je zpracována formou manuskriptu připraveného (nebo zasláného) k oponentskému řízení do mezinárodního vědeckého časopisu. Vzhledem ke skutečnosti, že se jedná o studentku magisterského studia hodnotím tento přístup velice pozitivně. Samotná práce představuje molekulární analýzy vybraných druhů hlístic, vedoucí k získání sekvencí malé ribozomální podjednotky, fylogenetickou analýzu dat s použitím vybraných metod fylogenetické rekonstrukce a samotnou interpretaci a diskusi výsledků. Svými výsledky přináší důležité a cenné informace aplikovatelné v taxonomii hlístic a naznačuje potřebu revize některých nadčeledí, čeledí a rodů. Celková úroveň práce je velice dobrá.

K úvodní části mám několik drobných připomínek.

- Kapitola „Úvod“ by měla být označená vhodněji jako abstrakt nebo shrnutí, jelikož interpretuje také některé výsledky předložené diplomové práce.
- Řádek 8. vhodnější formulace by mohla být „morfologické znaky k determinaci druhů“
- Druhý paragraf by měl zahrnovat informaci (alespoň orientační) o současném počtu popsáných druhů na základě morfologie a anatomie a nejen široký odhad podle Lamsheada (1993) nebo alespoň informace o počtu popsáných druhů v rámci Spirurida, popřípadě Dracunculoidea.
- Počet druhů v genové bance není nutné hodnotit optimisticky neboli pesimisticky. Počet sekvenovaných druhů jednak v průběhu posledních let velice rychle narůstá a jednak cílem vědecké práce není bezúčelné sekvenování druhů. Proto je také logické, že se středem pozornosti stává sekvenování virulentních patogenů a parazitů člověka a užitkových zvířat.
- Pojem „několik nejasností“, které podle autorky vedly ke studiu fylogenetického postavení drakunkuloidních hlístic by měl být nahrazen vhodným vysvětlením.
- Strana 2, druhý odstavec. Formulace: „Molekulární analýza nepotvrdila existenci rodů čeledi Philometridae“ by mohla být vhodněji nahrazena: „Fylogenetická analýza nepotvrdila monofyletický původ čeledi Philometridae a rodů v rámci této čeledi.“
- Strana 3, předposlední odstavec. Diplomová práce přispívá k poznatkům o vztazích mezi Ascaridomorpha, Rhigonematomorpha a Spiruromorpha, ale neřeší problém jejich vzájemných vztahů jak je v práci uvedeno, jelikož skupina Ascaridomorpha je v analýze zastoupena pouze třemi druhy a Rhigonematomorpha druhem jedním, to by mělo být v závěrech zohledněno.

Další připomínky tj. připomínky k samotnému manuskriptu z mé strany jsou charakteru recenze manuskriptu a v žádném případě nesnižují hodnotu předložené magisterské práce.

V názvu článku by bylo vhodnější nahradit "evolutionary" za "phylogenetic".

Cíle studia jsou velice jasně a přesně stanoveny, nicméně výsledky indikující odpověď na tyto stanovené cíle nejsou zahrnuty v abstraktu a také diskuse postrádá analýzu některých cílových bodů (viz níže). Navrhovala bych také stručné „conclusions“ jako poslední odstavec diskuse sumarizující hlavní výsledky jako odpověď na stanovené cíle.

Materiál a metodika

- Chybí jednotlivé komponenty a jejich koncentrace u PCR reakce (uvedená je pouze Taq polymeráza). Není uvedeno jakým způsobem byly primery definovány a v které části SSU rDNA se navazují. Rovněž není uvedena délka analyzovaného DNA fragmentu. Nejsou uvedeny sekvence interních primerů použitých k sekvenování.
- Lišil se alignment pro data skupin A, B a C? Jestli ano, tyto informace by měly být uvedeny v textu. Jestli ne, proč nebyly všechny druhy zahrnuty do analýzy skupiny A?
- Byla provedena analýza, která by potvrdila, že eliminace gapů nepředstavuje ztrátu fylogenetického signálu?
- V textu by bylo užitečné uvést důvod proč byly použity čtyři různé poměry Ts/Tv pro alignment a vysoký počet analýz pro každou skupinu. Z textu vyplývá, že pro každou ze skupin B-D bylo provedeno 12 analýz tj. čtyři různé poměry Ts/Tv v rámci analýz Maximum parsimony (MP), Maximum likelihood (ML) a Bayesian analysis (BI). Pro skupinu A bylo provedeno 16 analýz (navíc LogDet analýza). Není jasné, jestli různé poměry Ts/Tv byly použity pro zhotovení alignmentu nebo také při fylogenetické rekonstrukci.
- Vhodné by bylo uvést referenci pro použití LogDet metody pro eliminaci „long branch attraction“ efektu.
- Nicméně prezentovaný fylogenetický strom na obr. 1A nenaznačuje fenomén „long-branch attraction“ (viz také níže).
- V textu nejsou uvedeny algoritmy použité pro rekonstrukci MP a ML.
- Není uvedeno jakým způsobem byl selektován evoluční model GTR+G+I. Z textu vyplývá, že pro odhad parametrů modelu nebyl použit ModelTest, ale parametry byly odhadovány současně s délkou větví. Nutno uvést použitý software, protože v případě skupin s vysokým počtem druhů je tato metoda časově náročná a neumožňuje kalkulaci 1000 replikací pro odhad bootstrap hodnot použitím PAUP software.

Výsledky

- Podle autorky selekce outgroup vychází z výsledků MP tj. outgroup nejlépe odpovídající kritériu MP. Předpokládám, že se jedná o nesprávnou formulaci. Běžně se selekce outgroup neprovádí ve smyslu vylepšení MP rekonstrukce. Jaké byly jiné použité a testované outgroup kromě jmenovaných alternativních outgroup? Výběr outgroup by měl být jasně zdůvodněn.
- Shoda mezi topologiemi fylogenetických stromů by měla být statisticky testována (LRT, Templeton test..).
- V případě, že autorka uvažuje o striktním konsensu jako výsledku různých metod, neměla by předpokládat „long branch attraction“ efekt, jelikož metoda MP je velice citlivá k tomuto jevu a u metody ML tomu tak není. V případě, že uvažuje o konsensu obou metod, postuluje hypotézu, že efekt „long branch attraction“ se v daném případě nevyskytuje, v opačném případě by se snažila sloučit dvě inkompatibilní topologie.
- Použití "good correlation" pro vztah mezi taxonomií založenou na morfologii a výsledků fylogenetických analýz použitím molekulárních dat je nevhodné, jelikož korelace je statistický termín.
- Strana 6. Monofyletický původ nemůže být potvrzen u čeledí, kde byl analyzován pouze jeden jedinec.
- *Philometra*, *Philometroides* a *Dentiphilometra* se mi zdají být polyfyletické a ne parafyletické.
- Analyzované vztahy mezi hostiteli a nematody na obrázku 2 zahrnují nematody parazitující pouze v larválním, adultním nebo obou stádiích? Tato informace + informace o hostitelské specifitě larválních a adultních zástupců Philometridae parazitujících u ryb by mohla být uvedena v tabulce a více analyzována v diskusi, jelikož představuje jeden z cílů práce (nacházím pouze nepatrnou zmínku na straně 6).

Diskuse

Diskuse, přestože kvalitně zpracována, je zaměřena na analýzu vzájemných fylogenetických vztahů mezi analyzovanými řády a čeleděmi, dále na fylogenetickou pozici jednotlivých čeledí a možný vztah k morfologii a životní strategii. Chybí ale spojitost se stanovenými cíly práce.

Str. 9., druhý paragraf. Pokud druh *Anguillicola crassus* je recentně zařazen mezi Dracunculoidea, nemožno konstatovat "monophyletic status of Dracunculoidea with the prominent exclusion of *A. crassus*." Navrhovaná revize postavení tohoto druhu v rámci čeledě je oprávněná.

Tabulky

Na početných místech v článku nacházím použití čeledí nebo nadčeledí, na obrázcích ani v tabulkách u jednotlivých druhů tyto informace postrádám. Proto by bylo užitečné dodat do tabulek 1 a 2 systematické zařazení všech analyzovaných hlístic, což podstatně ulehčí čitateli orientaci, zejména pokud článek bude publikován v nematologicky nespécializovaném časopise.

V tabulce 1 chybí označení "host group" v třetím sloupci. Rok izolace považuji za nepodstatnou informaci pro tuto práci. Naopak chybí "accession number".

V tabulce 2 by analogicky s tabulkou 1 měl být uveden hostitelský druh, případně jeho systematické zařazení.

Obrázky

U obrázků by bylo vhodné uvést typ fylogenetické analýzy použitý k rekonstrukci. Podle popisu se zdá, že obr. 1A prezentuje ML fylogenetickou rekonstrukci, 1B a 1C striktní konsensus všech použitých metod (ML, MP a BI). Není jasné, výsledkem které analýzy je obr. 2.

Nejsou uvedeny algoritmy použité pro počítání hodnot bootstrapu (vhodnější by bylo je uvést v textu kapitoly Materiál a Metody). Není jasné proč byla použita prezentace bootstrapu odpovídající alignmentu s poměrem Ts/Tv 1:3.

Obr. 1C ukazuje fylogenetický strom, kde žádný kromě jednoho vztahu není podpořen hodnotami bootstrapu; tzn. jeho vypovídací hodnota je téměř nulová. Myslím, že není nutné prezentovat tyto výsledky formou obrázku.

U obr. 1B a 1C není jasné, které analýze nebo kombinaci analýz odpovídá striktní konsensus (viz výše).

Počty charakterů, hodnoty likelihood, evoluční modely a jejich parametry by bylo lépe uvést v tabulce nebo v textu výsledků.

Obr. 2. Bootstrap analýza není statistický test, proto hodnoty bootstrapu nepředstavují "statistical support".

Závěrem bych ráda konstatovala, že kvalita práce plně odpovídá úrovni diplomové práce studenta magisterského studia, práci doporučuji k obhajobě a hodnotím nejvyšším klasifikačním stupněm.

V Brně, 31. 1. 2006

RNDr. Andrea Šimková, PhD.

POSUDEK DOJEL ELEKTRONICKOU POSTOU. ORIGINAL BUDE DODAN DODATEČNĚ.

Oponentský posudek na magisterskou práci
Martina Wijová: Evolutionary relationships of Spirurina (Nematoda:
Chromodorea: Rhabditida) with special emphasis on dracunculoid nematodes
from SSU rRNA gene sequence

Magisterská práce Martiny Wijové je zpracována v dosud poměrně nestandardní formě – tvoří ji anglicky psaný rukopis zjevně připravený pro publikaci (či snad již odeslaný) a tři stránky stručného úvodu. Je možné, že tato forma vyvolá diskusi o podobě magisterských prací, a to nejen v rámci komise - sám bych ji považoval za poměrně rozumnou, tím spíše, že jedním z hlavních kritérií diplomových prací na BF je jejich publikovatelnost.

Protože vlastní rukopis má více autorů, je obtížné určit, z jaké části byl vypracován autorkou diplomové práce – tím větší by měla být věnována pozornost úvodu, který je jedinou částí autorce zcela jistě náležející a navíc částí velmi stručnou. Prospěla by mu jistě větší ostražitost ve vztahu k některým „lehkovážným“ a nedoloženým formulacím. Například k odhadům počtu hlístic (40 – 100 milionů) autorka uvádí, že vyšší odhad je zřejmě nadhodnocený – to ví z vlastní úvahy, z literatury, má pro to jiný než intuitivní argument? Ostatně vlastní formulace „...z důvodu této uniformity by semohl pohybovat počet druhů...“ není příliš obratně volena. Podobně je na straně 2 úsudek, že „Pravda bude někde uprostřed – v kombinaci obou přístupů“ v lepším případě jen zbytečné klišé, v horším případě obcházení seriózní analýzy současného stavu problematiky.

Vlastní rukopis má strukturu a kvalitu standardní fylogenetické studie provedená na zajímavé a z evolučního pohledu opomíjené skupině parazitických nematod. Z metodického hlediska jsem v práci nezaznamenal žádný vážný problém – vzhledem ke komplikovanosti současné metodologie molekulární fylogenetiky a variabilitě názorů na oprávněné postupy, nemá význam opakovaně diskutovat nastavení jednotlivých programů, parametrů, apod. Za upozornění stojí spíše některé ne zcela přesné či smysluplné formulace:

Str. 6

- Autorka tvrdí, že daná kombinace outgroupů poskytla nejvíce parsimoní řešení, tj. nejkratší strom. Tato úvaha je nesmyslná – délka stromu se pochopitelně mění se vzdáleností outgroupů, aniž by to cokoliv vypovídalo o kvalitě získané topologie.
- Stejně tak nelze o jednom taxonu říci „The only clade supported with less than 65% bootstrap is that of *Physaloptera alata*“. Jedná se samozřejmě o skupinu, na jejíž bázi se zmíněný druh odštěpuje.

Str.7


- Tvrzení, že čeledi (specifikované v druhém odstavci) jsou monofyletické (obr. 1a) je poměrně bezobsažné, protože každá z těchto čeledí je reprezentována jediným rodem – naopak v jediném případě, kde se objevuje více rodů (*Philonema* a *Philometra*) se čeleď rozpadá.
- Na několika místech v textu se objevuje formulace „independent family“, jejíž smysl mi též není zcela jasný.

Kromě těchto formálních (formulačních) upozornění, mám dvě věcné připomínky:

- V práci se několikrát zdůrazňuje nepřilíš jisté postavení druhu *Anguillicola crassus*. Z vlastní topologie je nestabilita (či spíše podstata nestability) tohoto druhu zřejmá – jedná se o dlouhou větev, teorií naopak s dalšími druhy sdílí jen malé množství společných znaků (krátká „společná větev“). Protože postavení tohoto taxonu je poměrně důležité - jedná se o jediný druh, který zde narušuje monofylii skupiny Dracunculoidea, bylo by podle mého názoru vhodné testovat alternativní topologie, kupříkladu pomocí konstraintu v MP, nebo prostřednictvím LRT.

- Má nezávažnější výhrada se týká interpretace některých topologií. Jejím důsledkem je podoba rozšířené analýzy v rámci čeledi Philometridae. Ta vychází z výsledků primární analýzy, zobrazené na obrázku 1a. Nová matice zahrnuje pouze zástupce čeledi Philometridae (včetně několika nově doplněných druhů) a outgroupu v podobě čeledi Dracunculidae. Z hlediska ověřovaných vztahů je však toto uspořádání chybné a může v principu vést k významnému zkreslení výsledků. Obrázek 1b ukazuje výslednou topologii, ve které je čeleď Philometridae monofyletickou skupinou. Avšak vzhledem k tomu, že z předchozí analýzy (1a) známe s jistotou pouze monofylii čeledi Dracunculidae a monofylii skupiny v rozmezí *Philometra obturans* – *P. ovata*, může být skutečná pozice větve *Alinema/Nilonema kdekoliv*, aniž by byla analýzou 1b jakkoliv určena (může být umístěna například až za rodem *Micropleura*, ale v principu třeba i hlouběji na topologii). Podstata problému spočívá v tom, že příslušnost libovolného taxonu do určité skupiny lze posuzovat pouze tehdy, jsou-li v matici zahrnutí zástupci této skupiny, zástupci dalšího, nejlépe sesterského taxonu a outgroup. Protože v provedené analýze tomu tak není, jakýkoliv taxon se nutně stane zdánlivě součástí „testované“ čeledi. Jako recenzent rukopisu bych to považoval za fatální opomenutí, v důsledku kterého má tato konkrétní analýza velmi omezenou vypovídací hodnotu. Tím je například také zpochybněno tvrzení na str. 10, že rod *Micropleura* tvoří bazální linii a je pro něj oprávněně vytvořena samostatná čeleď Micropleuridae. Domnívám se, že ideálním řešením by bylo zahrnutí všech použitých sekvencí do jedné analýzy, bez ohledu na jejich délku. Výsledná matice v rozsahu asi 30-40 taxonů by rozhodně nebyla pro dnešní fylogenetické programy žádným problémem.

Závěr: Předložená práce je konzistentní a ucelenou fylogenetickou studií. Výsledky jsou zcela jistě publikovatelné – doporučoval bych však pro účely publikace modifikovat některé analýzy a interpretace ve výše zmíněném smyslu. Práci doporučuji jako podklad pro další řízení.



Václav Hypša