

Posudek na magisterskou práci Jany Martinů „Parazitologicko-hostitelská koevoluce mezi vešmi druhu *Polyplax serrata* a myšicemi rodu *Apodemus*“

Vypracoval Mgr. Oldřich Říčan, PhD

Práce navazuje na článek Štefka a Hypša (2008). Je sepsána velmi srozumitelně a přehledně. Úvod je výstižný, má jasný cíl ke kterému je směřován a balastní text se v práci vůbec nevyskytuje. Cíle práce, které mají práci obohatit oproti zmíněné publikaci jsou jasné, i když k jejich realizaci mám bohužel hlavní výtky. Laboratorní molekulární a fylogenetické metody jsou dobře zvládnuté. Zde mám několik komentářů a otázek hlavně ke koevolučním metodám. Výsledky a diskuse jsou opět sepsány jasně a věcně, ale s interpretačními omezeními plynoucími z taxon samplingu.

Otázky a komentáře:

Cíl 1: Taxon sampling

Prvním cílem práce bylo rozšířit studovaný vzorek parazitů o nové lokality. K tomuto bodu mám hlavní výtky, jejichž obsah mi okamžitě vyvstal ještě než jsem práci přečetl a který se bohužel po přečtení potvrdil.

Vztahy parazit – hostitel jsou velmi složité. Jako jednodušší paralelu ke vztahu parazit – hostitel si můžeme vzít vztah organismus – geografická oblast. V této problematice (historické biogeografii) je třeba brát taxon sampling a geography sampling velice vážně, neboť interpretace jsou velice závislé na samplingu (otázky vázané k samplingu jsou tam naprosto zásadní). Význam pro koevoluční studie parazit – hostitel bude obdobný.

V práci se např. uvádí (stejně jako ve Štefka a Hypša, 2008), že mechanismem duplikace parazita na hostiteli může být přechodná fragmentace areálu hostitele (např. refugia ledových dob). Tato mag. práce ve shodě s Michaux et al. (2004, 2005) nachází v rámci obou hostitelských druhů několik genetických linií, které jsou interpretovány jako pozůstatky několika refugií. V mag. práci J. Martinů (obdobně jako v Štefka a Hypša, 2008) je ale u obou druhů hostitelů studován materiál jen z části areálu druhů a jen z jedné z několika genetických linií (str. 13; *A. flavicollis*: „většina zde studovaných populací se zařadila do nejpočetnější linie 1A; *A. sylvaticus*: „vzorky parazitů pocházejí jen z jedné ze dvou linií - ze západoevropské linie 2“).

U obou hostitelských druhů tedy není zrovna ideální sampling lokalit a genetických linií. Není tedy zcela možné porovnat distribuci genetických linií parazita s genetickými liniemi a geografii hostitele (což byl cíl práce č. 2, neboli hlavní cíl). Koncepce a design obdobných studií (které jsou velmi komplexní a vyžadují mnoho předchozích fází výzkumu a nedají se dělat z jedné vody načisto) by měl kopírovat co nejdříve diverzitu hostitelů a tomu by měl být podřízen výběr lokalit (oblastí pro sběr dat) ještě před započítáním vlastní práce. **Otázka 1:** Bylo tímto způsobem postupováno a příčina nerozšíření samplingu o klíčové body byla čistě dílem nepřízně štěstěny při terénních pracích, nebo byl tento přístup opomenut? Zmínky o dodatečném sběru v tom smyslu jak navrhuji se objevují až v cílech do budoucna takže usuzuji že byl opomenut.

Cíl 2: Porovnat distribuci genetických linií parazita a hostitele (koevoluce)

Ke koevolučnímu scénáři mám pár připomínek. V práci není popsáno jakým způsobem ani jakým software bylo dosaženo koevolučního schématu na obr. 7. Na mě to působí, jako že byl vytvořen „empiricky“. V koevoluční práci bych čekal širší rozbor metodologie i její aplikace. **Otázka 2:** Jakým způsobem bylo tedy vytvořeno koevoluční schéma a obr. 7 (byl použit nějaký software)?

Cíl 3. Rychlost evoluce mtDNA parazita a hostitele.

Tento cíl netrpí samplingem do stejné míry jako koevoluční problematika. **Otázka 3a.** Jakým způsobem (příp. v jakém software) byly „zachyceny odpovídající si uzly větvení v topologiích parazita a hostitele“ při porovnání rychlosti evoluce parazita a hostitele (str. 6)? Tento moment není v práci moc rozebírán, přestože je vlastně metodicky jedním se studiem koevoluce (cíl. 2). Není mi ani moc jasné, proč byly vybrány jen po jedné sekvenci z jednotlivých linií A, C, a Baj1 (pokud to není jen proto, že takhle se to mnohem snáze dělá)? (**otázka 3b**). Chtěl bych zde tedy slyšet nějakou obhajobu použitého přístupu.

Přes konceptuální problémy ale práce přináší zajímavá a přesvědčivá zjištění, kterými jsou momenty týkající se hostitelské specifity nebo druhové diverzity parazita. Například zjištění, že parazit je tvořen třemi značně divergentními genetickými liniemi, které jsou pravděpodobně kryptickými taxony, je umocněno argumentem, že divergentní linie parazita sdílejí tentýž druh hostitele a navíc žijí v sympatrii.

To že ale práce nedosáhla podstatných nových výsledků v porovnání s prací na kterou navazuje (Štefka a Hypša, 2008) považuji za důsledek opomenutí v designu studie a sběru dat. Předchozí studie jasně naznačovala, že hlavní problém bude v reprezentativním samplingu hostitelů a lokalit. Interpretační fáze práce se tak přes tento problém nemohla posunout dále, přestože autorka doplnila datasety o podstatný kus nové práce. Není ale zásadní o kolik je nová práce navýšena ale o co je navýšena.

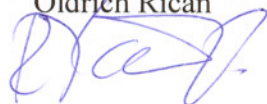
Na druhou stranu je třeba mít soudnost a uvědomit si, že odchyt těchto konkrétních hostitelů (myšic) není zcela jednoduchý. Na mnoha místech areálu není snadné chytit dostatečný počet jedinců, který musí být poměrně vysoký, neboť míra infestace parazitem je poměrně nízká. Navíc na rozdíl od zoologických prací nelze spoléhat na poskytnutí materiálu, protože je prostě nutné všechno nachytat in persona. Práce se pak při větší koncentraci na práci v terénu může velmi lehce stát čistě zoologickou faunistickou prací. Podobné práce jsou asi tedy nutně kompromisem. A je třeba zdůraznit, že oponovaná práce je velmi zdařilým kompromisem. Magisterská práce má studenta naučit pracovat v dané problematice, což si myslím, že se zde podařilo. Moje zásadní výtky jsou navíc navrženy do koncepce případné doktorské práce, takže finální rozuzlení problému je v dohlednu.

Navrhuji hodnotit práci stupněm „výborně“ až „velmi dobře“ podle průběhu obhajoby.

V Českých Budějovicích

23. 1. 2009

Oldřich Říčan



Posudek na magisterskou práci Jany Martinů „Parazito-hostitelská koevoluce mezi vešmi druhu *Polyplax serrata* a myšicemi rodu *Apodemus*“

Ve své diplomové práci se autorka zabývá souvislostmi vnitrodruhových genealogií v rámci systému parazit-hostitel. Problematika koevoluce je v současnosti velmi aktuální a články s touto tematikou jsou vesměs publikovány v kvalitních časopisech. Jako model byl v tomto případě zvolen *Polyplax serrata*-*Apodemus* spp, který zavedl školitel autorky. Cíle práce jsou rozšíření stávajících datasetů sekvencí COI vší a COB myšic, hledání hostitelské specifity a geografické izolace jednotlivých linií. Autorka chtěla i porovnat evoluční rychlost vší a myšice.

Práce je psaná kultivovaným jazykem, je čtivá a vlastní text obsahuje jen málo nejasností a gramatických chyb (např. neighbour joining místo správného neighbor joining, Juke-Cantor místo správného Jukes-Cantor; autorka by se také měla rozhodnout, zda bude používat termín hostitelská specifita nebo specificita; rejsek není hlodavec, viz str. 3).

V Úvodu autorka na čtyřech stranách shrnuje dosavadní znalosti týkající se parazito-hostitelské koevoluce a vlastností modelu *Polyplax*-*Apodemus*. Přestože se přímo koevolucí nezabývá, získal jsem dojem, že obsah a rozsah Úvodu jsou adekvátní.

Z části Materiál a metodika (4 strany) lze usoudit, že autorka zvládla aplikaci různých metod, jako jsou izolace DNA, PCR, design primerů a fylogenetické analýzy. Soudím, že dané metody byly použity adekvátně a postup prací je reprodukovatelný. Mám však výhrady k metodice sběru materiálu a k popisu lokalit:

1. Autorka měla, podle mého soudu, výrazně více rozepsat metodiku sběrů. Uvádí, že byly prováděny v letech 2001-2008. Znamená to, že se sběru vší věnovala již na střední škole? Pokud snad sběry neprováděla osobně a vzorky tkáně myšic a vší získala od spolupracovníků, měla to, podle mého soudu, v práci výslovně uvést.

2. Také popisu lokalit mohlo být věnováno více úsilí. Na Obr. 1 je Sofie umístěna do Makedonie. Domnívám se, že místo, kde leží Sofie, na této mapě vůbec není, anebo je na samém jejím kraji. Autorka si mohla dát větší práci a vložit mapu, která by ukazovala všechna místa sběru, místo toho, aby přidávala mapu z článku Štefka a Hypša (2008), a to ještě bez patřičné citace. Lokality typu „Krušné hory“ a „Českomoravská vrchovina, lokalita 1“ jsou vzhledem k rozlehlosti těchto pohoří snad příliš stručné.

3. V Tab. 1 jsou uvedeny „staré sběry“. Jejich původ není nijak citován. Až po přečtení článku Štefka a Hypša (2008), mi byl jejich původ objasněn.

K fylogenetickým analýzám:

4. Autorka by měla ujasnit pasáž „ML analýza byla provedena v programu Phym1 s použitím modelu GTR a parametry odhadnutými z dat“. Znamená to, že model obsahoval gamma korekci a invarianty? Proč byl zvolen tento složitý model?

Mezi výsledky (na 8 stranách) patří 134 nových sekvencí, tři fylogenetické stromy vší a myšic, haplotypová síť vší, analýza populačních struktur a odhad poměru rychlostí evoluce vší a myšic. Domnívám se, že množství získaných dat je pro magisterskou diplomovou práci více než dostačující. Autorka rozšířila dataset COI *Polyplax serrata* z práce Štefka a Hypša (2008), především o populace ze západní Evropy a provedla i fylogenetickou analýzu

hostitelských druhů myšic. Zabývala se populační strukturou vši ve vztahu k hostiteli a geografickému původu. Nakonec odhadla poměr evoluční rychlosti hostitele a parazita.

Na str. 9 je odkaz na neexistující Tab. 4. Předpokládám, že se jedná o Přílohu 1. Popisy obrázků by podle mě měly být přesnější:

5. Na Obr. 2, 3 a 4 chybí celá řada bootstrapových hodnot. Jedná se o chybu, anebo jde o uzly, v nichž nebyla získaná topologie podpořena? V takovém případě je zvykem při použití více metod tyto uzly nějak označit, třeba *. Také bývá zvykem zaokrouhlovat bootstrapovou hodnotu na celá čísla. Z Obr. 2 mi nebylo jasné, ke kterým liniím vši se vztahují obrázky myšic. Z legendy také neplyne, co vlastně znamenají. Na Obr. 5 není zřejmé, co jsou 5a, 5b a 5c.

V diskusi (7 stran) autorka komentuje získané výsledky, zejména rozdílnou hostitelskou specifitu jednotlivých linií *P. serrata* a mechanismy jejího vzniku. Navrhuje také další možnosti zkoumání zvoleného modelu. Diskuse je smysluplná a ukazuje, že autorka dostatečně porozuměla zkoumanému problému i získaným výsledkům.

K diskusi mám následující otázky:

6. Autorka usuzuje, že v případech záchyty linie B *P. serrata* na myšici křovinné jde nejspíše o náhodného hostitele. S tímto závěrem nelze než souhlasit. Jako test navrhuje získat další vši z daných oblastí. Je zde i možnost provedení infekčního testu? Přežije *P. serrata* na myšici dlouhodobě v laboratoři a je schopna se i rozmnožovat?

7. Vzhledem k tomu, že linie C zřejmě z nedostatku původního hostitele proniká na norníky a norníci byli chyceni pouze dva, a navíc na jediné lokalitě, upozorňuje autorka na nutnost rozšíření sběrů. Z mé zkušenosti se při odchyty myšic do pastí obvykle chytí i norníci. Jak to bylo v případě autorčiných odchytů?

Seznam literatury bývá pro oponenty šancí najít nějaké chyby, i kdyby jinde nebyly. Předložená práce trpí v citacích obvyklými nedostatky a odvažují se tvrdit, že ve zvýšené míře.

8. Odlišné formáty citací. Bouzid et al. (2008) má jiný formát než ostatní citace. Na rozdíl od ostatních citací je u Hafner et al. (1994) uvedeno i issue. Některé citace končí tečkou, jiné ne.

9. Odlišně zkrácené názvy časopisů. Zkrácený název časopisu Evolution není Evol., jak je to u Althoff a Thompson (1999) a u Clayton a Johnson (2003), ale Evolution, jak je to uvedeno u Hueselnbeck et al. (1997) a u Prugnolle (2005). Proceedings of the National Academy of Sciences mají dokonce tři různé zkratky: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (např. Clayton et al., 2003), Proc. Natl. Acad. Sci. USA (např. Wu a Li, 1985) a PNAS (Smith et al., 2006).

10. Neúplné citace. U Prugnolle et al. je uveden pouze jeden autor ze sedmi. Citace Kocher et al. (1989) a Michaux et al. (2002) končí názvem článku (v druhém případě neúplným).

11. Přebývající nebo neúplné odkazy v textu. Hafner (2008), Catteau (2006), Paterson et al. (2000) a Kowalski (2001) nejsou v seznamu literatury. Na citaci Guindon et al. (2005; PHYML online) chybí v textu odkaz. Místo něj je tam odkaz na Guindon a Gascuel (2003; PHYML). U odkazu Michaux et al. (1998) na str. 9 není patrné, zda se jedná o Michaux et al., 1998a nebo 1998b.

12. Ke 13 citacím uvedeným v seznamu literatury jsem nenašel odkazy v textu. Jedná se o Blouin et al. (1995, 1999), Charleston a Perkins (2006), Clayton et al. (2003), Demanche et al. (2001), Huelsenbeck et al. (1997), Johnson a Clayton (2002), Jousson et al. (2000), Libois et al. (2001), Light et al. (2008), Macholán et al. (2001a) – existuje i Macholán et al. (2001b)?, McCoy (2001) a Thomas et al. (1996).

Na práci jako celek mám následující otázky:

13. Autorka uvádí možné důvody inkongruence topologií fylogenetických stromů parazitů a jejich hostitelů. Jak často se podle ní mohou na těchto inkongruencích podílet fylogenetické artefakty?

14. Je plánován podrobnější výzkum hranice východní a západní linie B *Polyplax serrata*, která zjevně probíhá územím ČR, a případné hybridní zóny myšic i vší?

Závěrem:

Z předložené magisterské práce Jany Martinů vyplývá, že autorka si během studia osvojila řadu molekulárně-biologických, fylogenetických a „klasicky“ statistických metod. Získala veliké množství dat, která analyzovala. Své výsledky podle mého názoru i adekvátně diskutovala. Nutno vyzvednout i fakt, že práce se zabývá fylogenezí obou partnerů parazitohostitelského vztahu. Na druhou stranu, po formální stránce má práce jisté rezervy, z nichž většině by šlo jistě předejít, kdyby autorka věnovala větší pozornost kontrole textu. Konkrétní hodnocení ponechávám na příslušné komisi, doporučuji kladné přijetí.

RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.
Katedra zoologie PřF UK
Viničná 7
128 44 Praha 2

