

Oponentský posudek na magisterskou práci Michaely Matějkové “**Koevoluce mezi ektoparazity a hlodavci druhů *Microtus* a *Clethrionomys* na populační úrovni**”

Magisterská práce plynule navazuje a rozšiřuje práci bakalářskou, ve které se autorka zabývala prakticky stejným tématem. Nepovažuji tento fakt za negativum, naopak je chválihodné, že diplomantka u tématu setrvala a rozšířila studii o nová data, se kterými pevně věřím bude schopna se svým školitelem dosáhnout kvalitní vědecké publikace.

Z magisterské práce jasně plyne, že autorka zpracovala velké množství materiálu. Podrobila ho kvalitní fylogenetické analýze se zajímavými výsledky. V metodice je zmínka, že odchytů hlodavců byly prováděny od roku 2003 až do roku 2014, což svědčí o dlouhodobém studiu této problematiky v laboratoři, nicméně je jasné, že všechny uvedené vzorky nemohla autorka práce sama nashromáždit. Proto oceňuji v metodice uvedené přesné údaje o počtu zpracovaných hlodavců samotnou autorkou.

Práce je po formální stránce v pořádku. Jak již jsem výše naznačil, počet zpracovaných vzorků svědčí o péči a zaujetí autorky pro terénní práci, kterou doplnila o jistě neméně náročnou práci v molekulárně biologické laboratoři. Mně osobně se práce velmi líbí. Nicméně se v práci vyskytly i určité nedostatky, které uvádím níže, kde jsem i zainkorporoval několik otázek.

Metodika

Doba na elongaci PCR při amplifikaci úseku o délce přibližně 1kb je udána 2 min – bohatě by stačila poloviční doba a šetřila by se tím i polymeráza. Úsměvný překlep je na str. 30 - TAE pufr je zde napsáno jako Tae pufr (čajový pufr?). Vůbec nepochybuji o tom, že ML provedený v on-line verzi programu PhyML je špatné řešení, jen mě zajímá, proč vybrala autorka tento program, když mohla využít zabudovaný např. RAxML v programu Geneious, ve kterém byl vytvořen alignment a NJ analýza?

Výsledky

Celou práci se táhne slangové používání výrazů jako např. „Celkem jsem nově analyzovala 97 norníků...“ nebo „... jsem osekvenovala 64 hrabošů...“ – byly analyzovány sekvence vybraných genů norníků/hrabošů a ne norníci nebo hraboši.

V sekci 4.1. Sekvence a alignmenty trochu zmateně působí popis výběru taxonů – víc bych se soustředil na výčet co bylo zařazeno do současného alignmentu a nezmiňoval bych, že něco bylo přialignováno k datasetu z bakalářské práce a že ta bakalářská práce navazovala na magisterskou práci Terezy Marvanové...

Obrazová kvalita mapek (Obr. 4-6) a i fylogenetických stromů a haplotypových sítí mohla být o poznání lepší. Obrázky jsou většinou to první na co se člověk zaměří a je škoda, že první dojem z práce není úplně pozitivní. Navíc, jestli se dobře pamatuji, na tento problém jsem již poukazoval při oponování bakalářské práce.

Proč byl dataset sekvencí z norníků doplněn o pseudogeny? (str. 33) Očekával bych dlouhé větve u pseudogenů – naopak dlouhá větev je u linie 1. Nemůže jediná sekvence linie 1 znamenat osekvenovaný pseudogen, usuzuji tak podle délky větve, která je až několikanásobně delší než ostatní větve (Obr. 7).

A klasická otázka: Nemůže být bazální pozice linií 1 a 2 na Obr. 7 způsobena LBA, protože jsou arteficiálně přitahovány k outgroupu (ten má zkrácenou délku větve, kolikrát? není uvedeno)?

Znázornění podpory nodů na Obr. 7 mohlo být mnohem elegantnější a lépe viditelnější – podpory u nodů 4-6 se jen těžko odhadují.

Obr. 8 fylogeneze *M. agrestis* – podle čeho byla stanovena linie 1 a 4, které nejsou monofyletické, tzn. řada sekvencí je fylogeneticky blíže k linii 6 nebo 7 než k bazálnějším sekvencím z linie 1?

Diskuze

Nepovažuji úplně za správné dělit geografické oblasti Evropy na státní celky – to jsou člověkem uměle vytvořené území a neodráží žádné geografické souvislosti. Dokonce se na straně 49 diskutuje o „geografické specifitě pro Litvínov“.

V podstatné části diskuze autorka srovnává dosažené výsledky s publikovanými daty. Tato pasáž je pro mne jako člověka podrobně neseznámeného s publikovanými výsledky hůře pochopitelná, respektive je těžké si představit jednotlivé výsledky různých prací, které se často liší od výsledků autorky magisterské práce. Na jednu stranu chválím autorku, že podrobně a trpělivě asi na pěti stranách vše odiskutovala, na druhou stranu jsem si říkal, jak by byl na tomto místě skvělý nějaký obrázek, který by přehledně graficky shrnul nebo spojil nová data s těmi publikovanými.

Zaujala mě zmínka o nejnovější studii Filipiho a kol. (2015), který na rozdíl od zde prezentovaných výsledků dosáhl 100% podpory všech nodů. Autorka to vysvětluje tím, že Filipi osekvenoval celý mitochondriální genom. Mohl bych poprosit o bližší komentář k této pravděpodobně zásadní publikaci?

Přes uvedené připomínky práci považuji za kvalitní a doporučuji k obhajobě. Magisterskou práci Michaely Matějkové zatím hodnotím známkou mezi výborně a velmi dobře a těším se na prezentaci a obhajobu.

V Českých Budějovicích, 21. 5. 2015


RNDr. Ivan Fiala, PhD



Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci

Koevoluce mezi ektoparazity a hlodavci druhů *Microtus* a *Clethrionomys* na populační úrovni

Autorka: Michaela Matějková

Oponent: Josef Bryja

Diplomová práce M. Matějková si klade za cíl "srovnat populační strukturu hostitelů a jejich ektoparazitů pomocí mitochondriální DNA, rekonstruovat evoluční historii studovaných druhů a analyzovat parametry ovlivňující stávající rozložení populační struktury". Přestože to není v cílech explicitně uvedeno, tak z kontextu vyplývá, že se bude jednat zejména o dva druhy rodu *Microtus* (i když v některých částech práce jsou analyzovány i další druhy) a jeden druh rodu *Myodes* (v práci je všude uváděn dříve používaný a dnes neplatný název *Clethrionomys*) a vši rodu *Hoplopleura*. Evidentně se jedná o rozšíření předchozí magisterské práce T. Marvanové a vlastní bakalářské práce M. Matějkové, bohužel ale není zcela zřejmé, v čem se nynější magisterská práce od těch předchozích obsahově liší (kromě toho, že byly přidány některé sekvence navíc). Vlastní práce má 61 stran, přičemž 14 a půl strany tvoří tabulky a obrázky s přehledem materiálu (které měly být asi umístěny do Apendixu), 8 stran celostránkové obrázky ve Výsledcích a 8 stran citace literatury. Vlastní text práce má tedy cca 30 stran.

Úvod práce je zdařilý (až na drobnosti uvedené níže) a jsou zde popsány hlavní východiska dané práce, tj. možnosti diferenciací parazitů v závislosti na evoluci hostitele, známé fylogeografické struktury studovaných hostitelů a shrnutí dosud známých informací týkajících se genealogie vší. Bohužel další části práce za úvodem pokulhávají. Studentka sice nasbírala nový materiál všech studovaných taxonů, osekvenovala je na části mitochondriální DNA a pokusila se provést základní fylogeografické analýzy, což hodnotím velmi pozitivně, nicméně vlastní prezentace výsledků a jejich interpretace mohla být provedena rozhodně lépe. Hlavní nedostatky jsou dle mého tyto:

1) Převážná část práce se týká **fylogeografické struktury** tří druhů hrabošovitých hlodavců na základě analýz sekvencí cytochromu *b*. U všech tří druhů bylo recentně publikováno několik fylogeografických studií a jedná se o jedny z genetického hlediska nejlépe prozkoumaných evropských živočichů vůbec, a tudíž **mně trochu uniká smysl této analýzy**. Je rozhodně možné, že třeba předchozí studie v důsledku chybějícího materiálu nenašly nějakou genetickou linii (a objevila se až v této magisterské práci) – bohužel toto se mně z textu nepodařilo zjistit. Mně osobně by se třeba i líbilo dát dohromady co nejkompletnější výsledky z již publikovaných prací, přidat další vlastní sekvence a lokality a provést s tímto kompletním genetickým datasetem některé fylogeografické analýzy, které umožňují recentní rozvoj analytických přístupů. Nic z toho se však v práci nevyskytuje. Ba naopak: (i) Není jasné, na základě čeho byly vybírány sekvence z GenBank – rozhodně nejsou kompletní; (ii) Fylogenetické analýzy jsou sice provedeny relativně správně, nicméně jejich interpretace již mnohdy ne (zejména tam, kde není signifikantní podpora jednotlivých větví). Není třeba zřejmé, na základě čeho byly definovány vnitrodruhové linie – čím se třeba odlišuje linie 6b a 7b u *M. arvalis*? Rozhodně by pomohla správně provedená analýza haplotypových sítí, která by hlavní linie asi oddělila. V práci je však tato analýza provedena až v rámci jednotlivých vnitrodruhových linií, takže neukazuje vůbec nic (navíc se tam vnáší zmatek s dělením vzorků podle jednotlivých států). (iii) Velká část textu výsledků (a diskuze) popisuje rozmístění jednotlivých linií v prostoru a srovnává je s předchozími studiemi. Bohužel názvy linií jsou často uváděny různě, obrázky jsou s chybami (případně ty správné obrázky zcela chybí, viz níže) a výsledky jsou srovnávány nikoliv jen s neaktuálnějšími poznatky, ale i se staršími pracemi, čímž vzniká dost velký zmatek a přiznám se, že i po detailnějším soustředěném čtení jsem si z této nejdelší části práce neodnesl vůbec nic.

2) Velmi jsem se těšil na **srovnání fylogeografické struktury hostitelů a jejich parazitů**, tj. jeden z hlavních cílů práce. I když v práci nejsou použity žádné sofistikované postupy pro analýzy případné koevoluce, zcela bych se spokojil s nějakým grafickým vyjádřením asociací mezi liniemi hostitelů a jejich parazitů. I toto však **v práci chybí**. Jediným takovým náznakem je Obr. 10, kde jsou na nevyřešeném fylogenetickém stromě parazitů umístěny symboly jednotlivých druhů hostitelů (nikoliv vnitrodruhových linií) – na tento obrázek však zase není nikde odkaz v textu, asi proto, že takový text neexistuje. Asociace mezi vnitrodruhovými liniemi hostitelů a parazitů jsou tak nakonec popsány v podstatě jen v posledním odstavci na str. 35, který je typickým příkladem osobitého stylu celé práce. Jako příklad uvádím větu: "*Velmi dobře to je viditelné u C. glareolus v linii 2, která se prolíná se západní linií vši a liniemi 6 zahrnující centrální Evropu spolu s linií 7, která se táhne od Anglie po západní a centrální Evropu až na Balkán, které se prolínají jak s východní, tak západní linií vši.*" Kromě výrazné kostrbatosti textu třeba nikde v práci není definováno, co znamená "východní" a "západní" linie vši a celý text tak zcela postrádá smysl (nehledě na to, že "linie 2" je asi překlep).

3) **Prezentace výsledků** formou dle mého názoru **zaostává za běžným standardem** a je zde plno nejasností. Jako příklady uvádím zejména následující: (i) Obr. 7-9, tj. fylogenetické stromy a mapy rozšíření jednotlivých kládů – u map není vždy zřejmé, který klád zobrazují; není jasné, co jsou červené čáry na mapách (je zde sice odkaz na bakalářskou práci, nicméně fylogenetická analýza v této práci žádnou takovou hranici nenaznačuje; na Obr. 8 není jasný ani druh, ke kterému se které části obrázku vztahují a poslední dvě mapy v pravém sloupci dole jsou identické; zcela zmatečné je značení linií na Linie 1, 1a, 2, 2a, atd.; mapy mají různá měřítka a formáty, atd. (ii) haplotypové sítě byly kritizovány již výše – postrádám smysl této analýzy uvnitř jednotlivých fylogeografických linií a myslím, že zcela kontraproduktivní je zde uvádění jednotlivých států, protože studované organismy nerozpoznávají státní hranice. (iii) fylogeografická struktura hostitelů – v úvodu by bylo velmi pěkné mít mapu shrnující současné znalosti o vnitrodruhové struktuře hostitelů, případně lokalizaci potenciálních glaciálních refugií – nynější text na str. 8-10 je místy nejasný a obrázek by hodně vyřešil.

4) **Diskuze není až tak úplně diskuzí**, ale spíše opětovným opakováním výsledků, případně shrnutím faktů typu "nynější práce rozšířila počet lokalit této linie o několik dalších lokalit". V některých odstavcích se nevyskytují žádné reference na publikované práce a nikde jsem se také nedozvěděl, který ze scénářů "ko-evoluce" pěkně definovaných v Úvodu, tedy nakonec platí pro studovaný hostitelsko-parazitický systém. Rozhodně bych autorce doporučil rozdělit Diskuzi na několik podkapitol, z nichž by každá analyzovala určitou část výsledků (nyní jsou jednotlivé odstavce poskládány dosti chaoticky), a také by nebylo špatné si o dané problematice něco více přečíst. Např. původ hrabošů polních na Orknejích (str. 48) byl vysvětlen zcela jednoznačně v pracích publikovaných v Molecular Ecology (Martínková et al. 2013) a Evolution (Cucchi et al. 2014).

V práci je celá řada dalších drobnějších nedostatků a nejasných formulací, které však nebudu vyjmenovávat všechny (některé jsem okomentoval tužkou ve svém výtisku práce a jsou k dispozici). Nicméně alespoň některé (**není nutno na ně reagovat, kromě dvou otázek zvýrazněných tučně**):

Název práce – správně by mělo být "rodů" a ne "druhů"

str. 2 – jak mohou všenky udržovat genetický tok mezi nepříbuznými druhy hostitelských druhů?

str. 8 – u obecných popisů modelů refugií chybí popisy refugií pro severské druhy a pro druhy vyžadující kontinentální či atlantické klima (viz Stewart et al. 2010, Procs. R. Soc. London B)

str. 11 – "čtyřmi hostitelskými druhy rodu *Rhabdomys*" – podle mých znalostí se v tomto rodu vyskytují max. 2 druhy (*R. pumilio* a *R. dilectus*)

str. 12 – obrázek výsledků z bakalářské práce by se hodil a ledacos by třeba osvětlil

str. 13 – cíle jsou definovány velmi obecně, navíc cíl 3 byl naplněn jen částečně



str. 22 – proč jsou v tabulce uvedeny i jiné druhy rodu *Microtus* než *M. arvalis* a *M. agrestis*? Pokud byli zahrnuti do všech analýz, tak by měli být pak být i na všech obrázcích. Na Obr. 5 by pak měly být jednotlivé druhy rozlišeny.

str. 33 – proč byly pro fylogenetické analýzy použity i sekvence pseudogenů? Toto přece celou analýzu komplikuje a nic to o fylogenezi mtDNA nevypovídá (navíc to může snižovat podporu mitochondriálních linií).

str. 34, 2. odst. – vzájemné vztahy mezi druhy rodu *Microtus* nebyly náplní magisterské práce a byly dříve vyřešeny už mnohem lépe

str. 34, konec 3. odstavce – Skotsko není možno nazývat "sever Anglie"

str. 35, 2. odst. – první věta je nesrozumitelná. Navíc pozor na používání termínu "bazální" či "báze stromu" – závisí vždy na kontextu.

Obr. 11-14 – legenda k haplotypovým sítím je nedostatečná (nehledě na to, že tyto sítě neříkají téměř vůbec nic). Na obr. 14 chybí modrá linie "edentula 2".

str. 49, 2. odstavec – 2. věta je velmi kostrbatá

str. 50 – nakolik je dle autorky pravdivé tvrzení, že "jednotlivé linie *H. acanthopus* se liší v míře hostitelské specificity" a nakolik jsou tyto rozdíly způsobeny dosud nedostatečným vzorkováním? Druhá možnost nebyla v diskuzi ani zmíněna.

str. 52 – věta "Díky plně osekvenovanému mitochondriálnímu genomu u *C. glareolus* byla nalezena linie tvořená pseudogeny, která byla následně rozšířena o další pseudogeny nalezené v genomové bance" je nelogická. Dtto 1. věta závěru (str. 53).

str. 62 a 63 – použitý marker je "cytochrom b" a nikoliv "cytochrom oxidáza b"; studovaný druh je "*M. agrestis*", ne "*M. agrestit*".

Závěr:

Studentka se během přípravy své diplomové práce zcela jistě naučila řadu laboratorních technik, stejně jako analýz získaných dat, nicméně v prezentaci výsledků a jejich zasazení do širšího kontextu jsou stále velké rezervy a práce tak dosahuje pouze průměrné úrovně jak po formální, tak po obsahové stránce. Magisterská diplomová práce však přináší nová originální data, která věřím, že budou adekvátně zpracována v následných publikacích, a proto i přes zjevné nedostatky práci **doporučuji k obhajobě** na PŘF JU v Českých Budějovicích.

Ve Studenci 19.5.2015

Doc. Mgr. et Mgr. Josef Bryja, Ph.D.