

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Jiřího Kyslíka „Fylogeneze myxozoi založená na genech specifických pro žahavce“

Jiří Kyslík se ve své práci věnuje získávání molekulárních dat, zejména sekvencí genů pro nematogalektiny, které jsou posléze využity k fylogenetickým analýzám myxozoi. Obecnější pasáže literárního úvodu jsou psány čtivě a s jistým nadhledem prokazujícím, že se autor v tématu dobře orientuje. Text je psán dobrou češtinou, byť obsahuje nějaké ty překlepy a místy jsou použity ne zcela korektní termíny. Zejména mne upoutalo použití termínu „rodina“ místo „čeled“ v obrázku 5 převzatém údajně z Fiala a kol. 2014, kterýžto zdroj ovšem není uveden v seznamu použité literatury. Také by mě zajímalo, zda se termín „minovaný“ (viz tab. 7, 8) v českém prostředí běžně používá. Relativně hojně jsou chyby v interpunkci (čárkách). Nevím, zda „Shulman 1959“ za názvem taxonu Bivalvulida (str. 3) je autorem tohoto jména, nebo citovaným zdrojem – v seznamu citací chybí. Jde-li o uvedení autora názvu taxonu, neměl by být v závorce, navíc působí zvláště, že hned vedle u názvu Multivalvulida autor uveden není. Na str. 9 je uvedeno, že v rámci malocosporeí jsou v taxonomii využívány sekvenční odlišnosti < 20 %. Není dvacet procent moc? V souvislosti s mikrosporidii je na str. 12 uvedeno, že byly považovány za „strukturně homologické“ myxozoi. Termínu „homologické“ bych se v tomto kontextu vyhnul – správný pojem by byl „analogické“. Na některé obrázky není odkázáno v textu (např. na obr. 6), na obr. 8 je pak odkázáno dříve než na obr. 7. V přílohách se střídají tabulky s obrázky, což ztěžuje vyhledávání. „Gen pro malou (ani velkou) ribosomální podjednotku“ neexistuje (str. 18) – ribosomální podjednotky jsou komplexy rRNA a proteinů. Moc nechápu větu „Jednotlivé části proteinu jsou zároveň kódovány jedním exonem, tudíž nematogalectiny představují tzv. single copy genes“.

S autorem práce se neshodnu na interpretaci některých větvení ve stromu na obr. 9. Neplatí totiž tvrzení, že „fylogenetické analýzy vyhodnotily zřetelně dvě hlavní linie (sladkovodní a mořská větev) s maximálními nodálními podporami“. Ať se na obr. 9 koukám, jak koukám, mořskou větev na něm nevidím (tak, jak je vyznačena, je to parafyletický „grade“), nodální podporu tudíž nemá žádnou. Nodální podporu 100/100/1 ale nemá ani sladkovodní větev, ať už „sensu stricto“ či s přidruženou linií mořského *Chloromyxum*. Maximální podporu má ve stromě pouze celá skupina myxozoi. Dále, pokud *Enteromyxum* resp. *Ceratonova* nejsou zástupci kládu *Kudoa* resp. močového kládu, nelze tvrdit, že *Kudoa* klád a močový klád jsou sesterské...

Mé výhrady k práci nejsou závažné a rozhodně ji doporučuji k obhajobě. Hodnotil bych ji prozatím stupněm „výborně“, finální hodnocení ovšem přijde až po vlastní obhajobě.

K obhajobě mám následující otázky:

- 1) První otázka se netýká přímo tématu práce, ale neodolám: v literárním přehledu mě zaujala zmínka o různém utváření mitochondriálních krist u myxozoi (tubulární, ploché, diskovité). Tvar krist bývá považován za relativně konzervativní znak: ví se toho víc o distribuci různých typů krist u myxozoi? Je nahodilá, nebo snad mohou mít různé linie tendenci zachovávat určitý typ krist? Nebo je příslušných studií tak málo, že zatím nelze k tomuto fenoménu mnoho co říci?
- 2) V kap. 10 je uvedeno, že různé typy nematogalectinů vznikají u žahavců alternativním sestřihem. Dále je uvedeno, že jde o „single copy genes“. Moc nerozumím tomu, jak lze pak z genomů dostat geny pro různé typy nematogalectinů – vznikají nebo nevznikají alternativním sestřihem jednoho genu? Po PCR obsahují geny pro nematogalectiny hodně intronů? Ty je třeba před analyzováním „vystříhat“ z alignmentů?
- 3) Jak je to s nematogalectiny z malocosporeí? V tabulce 9 je několik zástupců uvedeno...



Oponentský posudek na magisterskou práci Jiřího Kyslíka

Fylogeneze myxozoi založená na genech specifických pro žahavce

Předkládaná magisterská práce Jiřího Kyslíka se zabývá studiem evoluce a vzájemných příbuzenských vztahů hlavních vývojových linií výtrusenek – obligátně parazitických a do značné míry stále tajuplných živočichů patřících do skupiny Myxozoa. Zatímco fylogenetická pozice samotné skupiny Myxozoa se zdá být po zhruba dvaceti letech sporů díky recentním fylogenomickým studiím konečně s dostatečnou jistotou objasněna, a výtruseny tak můžeme považovat za extrémně zjednodušenou skupinu žahavců, vnitřní molekulárně fylogenetické vztahy většiny známých druhů myxozoi zůstávají nadále opomíjené, založené na jednom, vzácně několika molekulárních markerech. Laboratoř rybí protistologie Parazitického ústavu BC AV ČR v Českých Budějovicích pak představuje vědeckou skupinu, která se dlouhodobě snaží fylogenetické vztahy uvnitř skupiny Myxozoa molekulárními nástroji studovat, ideálně pomocí více než jednoho markeru. To se ukázalo jako úkol neobvykle komplikovaný, neboť geny zástupců Myxozoa mají neobyčejnou vlastnost odolávat amplifikaci vybraných lokusů a ignorovat univerzálnost navrhovaných primerů.

Magisterská práce Jiřího Kyslíka se snaží rozšířit současný třípoložkový seznam genů využitelných pro studium fylogeneze myxozoi o další dva. Vychází přitom ze studie Shpirer a kol. (2014) publikované teprve před rokem a půl, ve které autoři u vybraných zástupců Myxozoa a sesterského taxonu *Polypodium hydriforme* identifikovali skupinu genů vyskytujících se výhradně u žahavců – genové rodiny minikolagenů a nematogalektinů. Zde se dostáváme k dle mého názoru nejhodnotnější stránce magisterské práce, kterou je vlastní experimentální a analytická část. Jiří si z rodiny nematogalektinů vybral dva geny, na základě omezeného množství známých sekvencí navrhl primery a ty s různou úspěšností otestoval, příp. optimalizoval, na dlouhém seznamu zástupců Myxozoa (Tabulka 9). V případě Nematogalectin-related genu se mu podařilo osekvenovat 25, v případě genu Nematogalectin A 7 zástupců myxozoi, další sekvence byl schopen získat bioinformaticky z dostupných genomů/transkriptomů. Aniž bych měl bližší praktickou zkušenost s molekulárními technikami u myxozoi, toto na mě působí jako respektabilní množství experimentální práce a osvojených dovedností zvládnutých za jeden a půl roku.

Nejslabší stránkou magisterské práce je bohužel samotný text práce, konkrétně forma jakou se autor snaží v českém jazyce popsat předmět a výsledky svého studia čtenáři. Přitom práce nepůsobí, že by byla psaná ve spěchu. Dle mého názoru nebylo rozhodnutí napsat práci v češtině šťastné, studenti ve fylogenetických pracích často zápasí s problémem jak vhodně přeložit či opsat anglické odborné termíny a obraty do češtiny. Zde je práce členěna na deset úvodních kapitol a dále klasicky na cíle, metody, výsledky, diskuzi, závěr, seznam literatury a přílohy. Bohužel už od prvních kapitol má s problematikou neseznámený čtenář problém textu porozumět, text není čtivý, je roztahaný, plný prázdných i redundantních vyjádření, čtenář občas vůbec nechápe co chtěl danou větou autor sdělit. Jsem přesvědčen, že by se práce dala napsat mnohem stručněji

a srozumitelněji a že by se toho dalo dosáhnout snáze v anglickém jazyce. Výše popsany problém graduje v kapitole 7 “Fylogenetické vztahy v rámci myxozoi”, kde oponentovi nezbylo nic jiného než se obrátit na původní práci v kapitole diskutované, aby si problematiku ujasnil. Zde by mj. velmi pomohlo doplnit text o obrázek shrnujícím současné představy o fylogenetických vztazích v rámci Myxozoa. Velmi těžké také bylo porozumět textu Výsledků a ve velké míře i Diskuze, zde jsem se ale mohl naštěstí obracet k obrázkům s výslednými fylogenetickými stromy a chytout se tak před utonutím pověstného stébla. Nutno podotknout, že z pohledu grafické kvality a názornosti fylogramů kvalitního stébla.

K textu mám následující poznámky či dotazy:

str. 4 dole: “... jsou zde některá specifika naznačující, že Malacosporea jsou evolučně starší vývojovou linií.” Chtěl tím autor říci, že skupina Myxosporea vznikla později než Malacosporea?

str. 9, konec kapitoly: “V rámci linie Malacosporea jsou kritéria pro klasifikaci obdobná jako u myxosporeí. Nicméně nomenklatura této skupiny spočívá v posuzování detailních niancí jako jsou sekvenční odlišnosti (<20%) jednotlivých stádií či existence/absence specifických stádií.” Co přesně chtěl autor touto větou sdělit?

str. 15 dole: obrat “polytomicky klastrující klád” není opravdu šťastný

str. 16 uprostřed: Opravdu Fiala a Bartošová (2010) tvrdí, že “nezávislá evoluce stejných typů myxospor je u myxozoi častým artefaktem”? Artefaktem? Dala by se věta vyjádřit jinak?

str. 24 uprostřed: Opravdu “signální peptid slouží k translaci na na endopazmatickém retikulu”?

str. 24 dolní část: “Jednotlivé části proteinu jsou zároveň kódovány jedním exonem, tudíž nematogalectiny představují tzv. single copy genes.” Může autor objasnit, co si představuje pod pojmem “single copy gene”? A ujasnit, jak je to s přítomností intronů u nematogalektinů?

str. 25 nahoře: “Během evoluce žahavců došlo ke ztrátám některých typů nematogalektinů pomocí četných tandemových duplikací.” Prosím o objasnění.

Kapitola 11.3: Proč nebyly při navrhování primerů pro geny Nematogalectin-related a Nematogalectin A použity také sekvence *Polypodium hydriforme*?

Kapitola 11.9: Může autor pro zajímavost doplnit, jak dlouhé introny byly u nematogalektinů myxozoi nalezeny? A jak dlouhé byly sekvence Nematogalectin-related a Nematogalectin A genů po jejich odstranění? Ve výsledcích se o tomto již nikde nemluví.

str. 32 uprostřed: Proč byly jako outgroup použity sekvence žahavců namísto teoreticky blíže příbuzného *Polypodium hydriforme*?

str. 32 níže: “V rámci mořské větve myxosporeí klastrují sestersky mořský močový klád a klád Kudoa...” Toto dle Obrázku 9 není pravda. Jak by měl komentář k této topologii být správně?

str. 35 nahoře: Tvrzení že “Fylogenetické analýzy určily Myxozoa jako monofyletický taxon v rámci žahavců...” není překvapivé, když analýza obsahovala kromě outgroupu (zástupci Anthozoa) a myxozoi pouze tři zástupce skupiny Hydrozoa, která je outgroupu blíže příbuzná (viz např. kořen 18S rDNA analýzy, obrázek 12).

Kapitola 12.4: Z konkatenované analýzy Nematogalectin-related, Nematogalectin A a 18S rRNA genů (a jednogenových analýz nově osekvenovaných genů) se zdá, že oba geny Nematogalectin-related a Nematogalectin A jsou v ohledu fylogenetické informace kongruentní s 18S rDNA a statistické podpory vnitřních uzlů jsou v případě konkatenovaného stromu vyšší. Přesto vnitřní větev definující bazální pozici *Sphaerospora molnari* (Obrázky 11 a 12) zůstává podpořena nízkými hodnotami bootstrapu. Nenapadá autora nějaká teoretická příčina, proč je tomu tak?

str. 44 nahoře: Autor uvádí, že templátová DNA musí být ve vysoké kvalitě a kvantitě. Dle výsledků v kapitole 12.7 je mezní množství asi 1 ng DNA do reakce. Jen pro zajímavost, jaké množství DNA myxozoi je možné při izolaci typicky získat?

Tabulky a obrázky v příloze by bylo vhodnější číslovat samostatně – čtenář by pak nebyl překvapen pohledem na Tabulku 1 v kapitole 12.6 když před tím v kapitole 11.1 nahlížel do Tabulky 9.

Omlouvám se, že většina mých dotazů směřovala spíše k objasnění nejasných vyjádření v textu práce. Přes výše zmíněné výhrady k psané formě bych autorovi rád poblahopřál k výsledkům, kterých v průběhu svého magisterského studia dosáhl a konstatuji, že předkládaná magisterská práce splňuje požadavky kladené na magisterské práce na Katedře parazitologie, Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a doporučuji ji k obhajobě.

V Českých Budějovicích, dne 20. května 2016



RNDr. Jan Brabec, Ph.D.