

RNDr. Petr Nguyen, Ph.D.

Přírodovědecká fakulta JU

Branišovská 1760, 37005 České Budějovice

Věc: Oponentský posudek na diplomovou práci

Diplomová práce Bc. Pavlín Kočové se zabývá populační analýzou tasemnice *Ligula intestinalis* pomocí ddRAD sekvenování. Důraz je kladen na identifikaci evolučních sil zodpovědných za diferenciaci populací této tasemnice, jmenovitě se autorka zaměřuje na adaptaci a izolaci vzdáleností, což je v současné evoluční genetice velmi aktuální téma.

Standardně členěná práce má celkem 52 stran včetně 11 obrázků a 9 tabulek v hlavním textu a 5 obrázků a 1 tabulky v příloze. V úvodu autorka představuje modely speciace, markery používané při jejich studiu a modelový organismus *L. intestinalis*. Přehlednosti textu by prospělo zjednodušení terminologie např. dle práce Smadja a Butlin (2011, Mol Ecol 20, 5123–5140), která speciaci sympatrickou, ekologickou i adaptivní zahrnuje pod jednotný termín speciace za přítomnosti genového toku („speciation with gene flow“). V této části bych uvítal více příkladů demonstrujících adaptace a vznik druhů u parazitů. Nevím, jak relevantní jsou příklady speciace herbivorního hmyzu. U toho se například dle jedné hypotézy předpokládá, že adaptaci na nového hostitele musí předcházet rozšíření hostitelského spektra („oscillation hypothesis“; Janz et al. 2006, BMC Evol Biol 6, 4). Našla by tato hypotéza nějakou podporu u parazitů? Další věc, která mě zaujala je náhodná fragmentace DNA pomocí specifického štěpení restrikázami (str. 5). Provádí se fragmentace úplná nebo částečná?

Motivace a cíle práce jsou jasné. Metody jsou poměrně detailní s několika nedostatky a nejasnostmi. Složení polymerázové řetězové reakce neuvádí koncentrace složek. Míchání knihoven asi nepředcházela „velikostní separace jedinců“ jak je uvedeno na str. 11. Proč není velikostní selekce fragmentů DNA prováděna pomocí použitých AMPure XP beads ale na přístroji Pippin prep? Byly knihovny ekvimolárně míchány ze všech 8 PCR replik? Není mi jasné, jak je v kap. 3.2.2 definována populace a lokus. Odpovídá lokus RAD alele?

Výsledky jsou jasné popsány a doloženy obrazovou dokumentací a tabulkami. Bohužel na několik tabulek chybí odkazy v textu (Tab. 2, 4 a 6). Autorka uvádí, že „reverse“ sekvence měly horší kvalitu, což je poměrně běžné. Má tedy cenu provádět RAD sekvenování v režimu „pair-end“, když se „reverse“ čtení nepoužívají? Sekvenační data z několika lokalit smíchaná do dvou knihoven (L2 a L3) měla nižší kvalitu, jak autorka uvádí v diskuzi, patrně kvůli stáří a možné degradaci DNA vzorků a nebyla tedy použita. Byla kvalita DNA před analýzou kontrolována a neměly by být vzorky míchány do knihoven „náhodně“? Jak to, že je počet získaných lokusů v Tab. 3 vyšší než počet sekvencí uvedený v Tab. 2? Podle čeho jsou řazeny vzorky v Tab. 5?

Diskuze je zajímavá a důkladně napsaná. Našel jsem v ní mnoho otázek, které mě v průběhu čtení napadly a na některé z nich i rozumné odpovědi. Jen na str. 38 je popis hledání lokusů pod selekcí příliš detailní a opakuje výsledky. K této kapitole mě napadá, zda by nemělo při analýze populační struktury parazitů ryb smysl seskupovat lokality dle povodí? Nepomohlo by to například vysvětlit rozdíl mezi etiopskou populací a zbytkem Afriky?

Celkově považuji práci za velmi zdařilou. Celkový dojem bohužel kazí větší množství drobných chyb a překlepů. I přes výše uvedené práce bez pochyby splňuje nároky kladené na tento typ kvalifikačních prací na Přírodovědecké fakultě JU, a proto ji doporučuji k úspěšné obhajobě.

V Levíně dne 18. 5. 2018

RNDr. Petr Nguyen, Ph.D.



BIOLOGICKÉ CENTRUM AV ČR, v. v. i.

Parazitologický ústav

adresa: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice
telefon: +420 387 775 403
fax: +420 385 310 388

IČ: 60077344 | DIČ: CZ60077344
číslo účtu: 5527231/0710, ČNB České Budějovice
www.paru.cas.cz | e-mail: paru@paru.cas.cz

Oponentský posudek diplomové práce

Autor: Bc. Pavlína Kočová

Název: Populačně-genomická analýza generalistického parazita – tasemnice *Ligula intestinalis*

Magisterská práce navazuje na předchozí bakalářskou studii autorky (Genetická struktura populací tasemnice *Ligula intestinalis*), tentokrát s využitím nových genomových markerů, a to sice ddRADseq, a nového studijního materiálu z Oregonu a Afriky. Práce je po slohové stránce dobře vypracována a s minimem překlepů, což oceňuji. Cíle práce jsou jasně stanoveny, stejně tak jako použitá metodika a následné zpracování dat.

V úvodu se autorka zabývá různými typy adaptací, speciací a diferenciací, které vedou k vývoji nových populačních patternů a následně i k vyčlenění nových linií a druhů. Poslední část úvodu se soustředí na popis *L. intestinalis* a studie využívající tohoto parazita jako modelový organismus v různých kontextech. Všechny kapitoly jsou poměrně stručné a v některých ohledech by jim prospělo přidání informací např. uvedení typů RADseq metody a trochu podrobnější popis metody samotné nebo vazby modelového organismu a jeho rybího meziphosteje, který je, jak autorka uvádí, důležitý pro vznik adaptací u *L. intestinalis*.

Část "Materiál a metodika" popisuje použité laboratorní a bioinformatické metody k získání a zpracování dat. Poměrně velká část se, z pochopitelných důvodů, soustředí na zpracování dat získaných z RADseq. Nicméně, autorka by měla stejnou pozornost věnovat i ostatním podkapitolám. Bohužel, se mi nikde v textu nepodařilo najít jak sekvence primerů pro amplifikaci COI a COB geny, tak program pro termocycler nebo práci, ze které byly tyto údaje převzaty. Stejně je tomu i u údajů o délce sekvencí těchto dvou genů. S přihlédnutím k tomu, že mitochondriální geny byly použity k počáteční identifikaci mitochondriálních linií *L. intestinalis*, si myslím, že je to informace celkem podstatná. Podkapitola zabývající se genomovými analýzami upřesňuje výběr použitých programů a velice podrobně popisuje nastavení a využití jednotlivých parametrů. Autorka také rozdělila finální dataset na několik variant (4) pro lepší porozumění populační struktuře. Kladně hodnotím především redukci počtu vzorků v kladu A, čímž se minimalizovalo riziko zkreslení výsledků analýz.

Otázky:

- Jakým způsobem by studentka hledala vhodné restriktázy pro *L. intestinalis*, pokud by a) měla, b) neměla k dispozici referenční genom?



- Čím by se metoda přípravy knihoven vylepšila/zhoršila, kdyby se sloučily první dva kroky restrikce a ligace do jednoho?
- Z jakého důvodu byly sekvence COI a COB konkatenovány?
- Proč byl počet vzorků v kladu A redukován právě na 20?

Kapitola "Výsledky" se skládá ze čtyř částí – fylogenetické hodnocení mitochondriálních dat, kvalita a výběr sekvencí z RADseq a následující dvě podkapitoly se zabývají globální a lokální diverzitou populací *L. intestinalis*. Řazení podkapitol logicky koresponduje s členěním kapitoly "Materiál a metodika". Autorka zpracovávala data několika způsobů a získané výsledky prezentuje stručně a výstižně. Při hodnocení RADseq dat autorka vyloučila vzorky obsažené ve dvou knihovnách kvůli nízké počtu a kvalitě sekvencí, čímž sice snížila množství vzorků ve finálním datasetu, ale zabránila tím zkreslení výsledných dat a výsledků. Provedené typy analýz RADseq dat jsou vhodně zvoleny (F_{ST} analýza, Admixture klastrovací analýza, PCAdapt a FineRADstructure) a dobře zodpovídají položené otázky. Studentka byla schopna na základě těchto výsledků odhalit a objasnit strukturu populací *L. intestinalis* s vyšší rozlišením než dosud nabízela mitochondriální a mikrosatelitní data, to konkrétně vnitřní členění populací nejen podle geografického původu, ale i podle druhu meziphostitele. Nicméně grafické zpracování výsledků je občas trochu nepřehledné, např. pozice kořene fylogenetického stromu, u Obr. 8 A bych uvítala označení lokalit a vyznačení diskutovaného vzorku CZ79Ab_Rim třeba hvězdičkou, k výsledkům FineRADstructure by bylo dobré přidat lištu s lokalitami na obě osy k vylepšení orientace.

Otázky:

- Jak si autorka vysvětluje, že vzorky z Etiopie vytvořili samostatnou skupinu a neklastrovali s geograficky nejpodobnějšími vzorky z Keni?
- Je členění populací *L. intestinalis* podle rybího meziphostitele výsledkem IBA nebo IBD?

Stejně jako předchozí kapitola, tak i kapitoly v "Diskusi" mají evidentní návaznost na výsledky. Autorka zahrnuje výsledky získané z mitochondriálních dat, kdy byly zjištěny nové linie pro africké vzorky i hypotézy, které mohly vést k tomuto členění. V práci je i zahrnuta podkapitola zabývající se metodickými překážkami při přípravě RADseq knihoven, což považuji za příhodné a přínosné shrnutí. Následující dvě kapitoly se soustředí na globální a lokální diverzitu populací, kdy byla v obou případech zjištěna silná vazba na geografický původ vzorku a druh meziphostitele. Celá práce je pak zakončena relevantním shrnutím všech získaných poznatků společně s návrhem budoucí perspektivy tématu.

Otázky:

- Jaká je největší technologická překážka při přípravě RADseq knihoven?
- Proč jsou RADseq data vhodnější pro odhalování vnitřní populační struktury než mikrosatelitní data? A nebylo by v tomto případě lepší využívat rovnou celé genomy?



Předložená práce má ucelený charakter, je jasně formulována a nově nabyté výsledky prohlubují poznání o vnitřní diverzifikaci populací *L. intestinalis*. Jako velké plus této studie vidím, že autorka v průběhu magisterského studia prokázala velkou snahu zvládnout různé aspekty vědecké činnosti. Seznámila se jak s prací v terénu při sběru vzorků, tak jejich zpracování v laboratoři a to za použití rutinních i velmi pokročilých metod, a dále získala i zkušenosti ve statistickém hodnocení dat. I přes uvedenou kritiku některých pasáží, se domnívám, že práce splňuje všechny podmínky kladené na diplomovou práci, a proto ji doporučuji k obhajobě, přičemž výsledné hodnocení vyjádřím až po obhajobě.

V Č. Budějovicích, 15. Května 2018

RNDr. Dagmar Jirsová, Ph.D.