



THE CZECH ACADEMY OF SCIENCES
INSTITUTE OF ANIMAL PHYSIOLOGY AND
GENETICS
Laboratory of Mammalian Evolutionary Genetics
Brno, Czech Republic

From: Miloš Macholán Tel.: 532 290 138 Fax: 541 212 988 E-mail: macholan@iach.cz

Posudek na diplomovou práci Bc. Barbory Křístkové „Kandidátní geny pro behaviorální adaptace u tropických a temperátních ptáků“

Diplomová práce B. Křístkové se zaměřuje na dvě základní otázky. Tou první je srovnání variability vybrané sady genů, zapojených do cirkanuálních rytmů, a to u pěvců temperátní zóny a u druhů tropických. Výchozím předpokladem je existence nižší proměnlivosti u temperátních druhů v důsledku stabilizující selekce, která vyladuje přesné načasování migrace pěvců. Subjekty druhého srovnání byly dva poddruhy hýla rudého, konkrétně populace *Carpodacus e. erythrinus* ze Šumavy a Českomoravské vrchoviny a *C. e. kubanensis* z pohoří Pirin v Bulharsku, které se liší migračními trasami. K tomuto účelu byla použita analýza 22 mikrosatelitových lokusů doplněná o baterii standardních populačněgenetických testů. Základní premisy obou částí jsou jednoduché a přímočaré: v prvním případě by mikrosatelity nacházející se v kandidátních genech měly vykazovat nižší úroveň variability než lokusy mimo ně, ve druhém bychom měli očekávat existenci rozdílů v privátních alelách a genetickou diferenciaci mezi poddruhy (v tomto případě vyjádřenou indexem F_{ST}).

Výsledky práce nepotvrdily ani jednu z hypotéz, což by nemělo být na závadu. Souhlasím s panem školitelem, že tím jsou pravděpodobně zajímavější, než kdyby jen potvrdily předchozí studie. Je ovšem otázka, co nám vlastně analýza mikrosatelitů může říct. Především se musím přiznat k určité skepsi vůči použití rychle mutujících markerů ke zjišťování genetických rozdílů mezi geograficky vzdálenými populacemi, notabene bez bližší znalosti způsobu, jakým vlastně mutují (tj. bez znalosti konkrétního mutačního modelu). Vysoká mutační rychlost může vést ke zvýšené frekvenci výskytu homoplastických alel (tj. alel identických stavem, nikoli původem). Tomu lze jistě předejít použitím lokusů s nižší mutační rychlostí, uznávám také, že ptáci mají přece jen větší disperzi (*dispersal*) než drobní savci. Další otázkou je, do jaké míry je analýza mikrosatelitů vhodná pro detekci selekce. Jedním z cílů této práce bylo řešení otázky „Působí na geny spojené s behaviorálními adaptacemi stabilizující selekce u temperátních druhů ptáků?“. Přišlo by mně logičtější se nejprve ptát, jestli na tyto geny *vůbec* působí stabilizující selekce, lépe řečeno, do jaké míry lze tuto selekci pomocí mikrosatelitů detekovat. Proto v práci postrádám srovnání ne temperátní vs. tropické druhy, ale kandidátní geny vs. zbytek. Na druhou stranu jestliže jsou „nekandidátní“ lokusy zatíženy vysokou homoplazií, potom jejich detekovaná variabilita může být nižší než skutečná. (K tomu ještě poznámku: rozhodně bych v práci nepoužíval termín *neutrální mikrosatelity* – buď bych neutrální dal do uvozovek, nebo hned při první zmínce vysvětlil, že jde o *terminus technicus*; nevím, jakým způsobem byly tyto lokusy vybrány, ale teoreticky se může stát, že i ony jsou ve vazebné nerovnováze s lokusy pod selekcí.) Jiným problémem podobných srovnání může být fakt, že jednotlivé lokusy se neliší jen tím, zda jsou či nejsou pod selekcí (případně pod jakou), ale budou se pravděpodobně lišit i mutační rychlostí, případně mutačním modelem, které nemusí souviset s úrovní bazálního metabolismu (hmotností, délkou života atd.).

Výše zmíněný rozklad je však spíš námětem k obecnější diskusi a netýká se samotné práce B. Křístkové. Ta bezesporu odvedla spoustu práce, zvládla příslušnou metodiku a nastudovala penzum literatury (~ 110 citačních odkazů). Na druhou stranu je více než zřejmé, že autorka byla ve velkém časovém presu. Svědčí o tom vysoký počet jazykových chyb a dalších formálních nedostatků (např. kapitola Analýza mikrosatelitových lokusů, resp. její název a první odstavec, se v práci objevuje dvakrát), některé pasáže nebo legendy k obrázkům (namátkou Obr. 1, Graf 11) by chtěly lépe nebo podrobněji vysvětlit. Srozumitelnosti by jistě prospělo i uvedení explicitních hypotéz nebo predikcí v Cílech (tím spíše, že jak školitel sděluje, hypotézy byly skutečně předem formulovány). V úvodu se míchají cirkadiánní a cirkanuální rytmy, dlouho není jasné, kterým z nich se práce věnuje. Na zmatení se podílí i zařazení kapitoly o cirkadiánních rytmech, přestože dále jsou srovnávány geny podílející se na cirkanuálních rytmech (pokud se na obou biorytmech podílí stejné geny, mělo by to být jasně napsáno). Občas jsem byl na pochybách, do jaké míry jde o formulační nepřesnosti a do jaké autorka zcela neporozuměla podstatě toho, o čem píše. Alespoň tak na mě působí např. pasáž na str. 13 pojednávající o alelách genů a mikrosatelitů. Podobně program Structure neprovádí „admixture“ analýzu (i když tuto možnost můžeme v programu zadat): jeho primární funkcí je přiřazovat jednotlivé vzorky (jedince) do předem definovaného počtu skupin (klastřů) tak, aby Hardyho-Weinbergova nerovnováha a rozdíly ve frekvencích alel uvnitř těchto klastřů byly minimální. Volbu „admixture“ využijeme tehdy, jestliže máme důvod se domnívat, že mezi klastry („populacemi“) existuje genový tok. Diskuse pak pohříchu z velké části opakuje výsledky.

Poslední poznámka se týká výsledných hodnot F_{ST} mezi populacemi/poddruhy hýla rudého. Na str. 54 autorka říká: „ F_{ST} hodnota u neutrálních mikrosatelitů byla sice nízká, ale průkazně se lišila od nuly ($p < 0,05$).“ O 3 strany dál už ovšem konstatuje, že: „... tyto dvě populace se geneticky signifikantně neliší ani na lokusech kandidátních genů, ani na lokusech neutrálních mikrosatelitů.“ Tady je zřejmý rozpor v hodnocení výsledků. Abych věc ještě zkomplikoval: podle údajů v Tab. 14 by měla být pravdivá prvně uvedená věta na str. 54. Já si ovšem myslím, že (a) ta signifikance u NM lokusů je dána čistě tím, že jich bylo 17 (když se podíváme na vlastní hodnoty F_{ST} , tak u genu CLOCK je skoro 2,5x vyšší než u NM); a (b) protože těch párových srovnání bylo testováno víc, měla by se použít Bonferroniho korekce, po které by i rozdíl u NM lokusů byl nesignifikantní. Proto je dle mého názoru blíž skutečnosti tvrzení na str. 57.

K práci bych měl jen dvě drobné otázky:

1. Proč vybrán gen SERT, když se nepodílí na biorytmech? Na chování se podílí spousta genů, tak proč zrovna tento?
2. Čím si autorka vysvětluje rozdíl výsledků Structure na základě lokusů v kandidátních genech (Graf 15) a lokusů mimo ně (Graf 17)? Všechno, co nám Graf 17 říká, je to, že když programu zadáme počet klastřů $K = 2$, oba poddruhy obsahují zhruba stejný podíl jedinců obou klastřů. Má to nějakou biologickou relevanci? Je škoda, že autorka nezvýšila K , možná bychom se o populační strukturu obou poddruhů dozvěděli o něco víc.

Abych to celé nějak shrnul. Nebudu tvrdit, že diplomová práce B. Křístkové je brilantní vědeckou prací nebo klenotem národního písemnictví. Na druhou stranu ale musím zopakovat, že dostatečně zvládla metodiku příslušných laboratorních technik, a především pro ni ne zcela známou oblast

populačněgenetických matematických analýz. Odvedla velký kus práce při studiu literatury, s pipetou v ruce i před displejem počítače. Jestliže lze na tuto práci nahlížet jako na pilotní, pak se těším na další výsledky. Diplomovou práci doporučuji k obhajobě.

V Brně 9. 9. 2019

prof. Miloš Macholán, CSc.