

Posudek k diplomové práci Kataríny Nejmové:
**Molekulární fylogenetika a geometrická morfometrika aerofytických zelených rias
komplexu *Coccomyxa/Pseudococcomyxa* s. l.**

Diplomová práce Kataríny Nejmové se zabývá oblíbeným tématem posledních let, studiem molekulární variability organismů, které nelze rozlišit morfologicky. Katarína Nejmová vlastnoručně izolovala asi 25 nových kmenů řas z komplexu *Coccomyxa/Pseudococcomyxa*, u jedenácti z nich osekvenovala gen pro 18S rRNA, u 32 oblast ITS a u 24 kmenů získala podrobná morfometrická data. Domnívám se, že toto množství bohatě splňuje nároky na diplomovou práci. Z metodiky jsem schopen posuzovat část týkající se sekvenace a analýzy sekvenčních dat a zde musím konstatovat, že autorka odvedla perfektní práci. Postupovala zcela v souladu se současnými postupy, navíc velmi opatrně a precizně. Vyzdvihnout bych si dovilil zejména péči, kterou věnovala přípravě alignmentu sekvencí (s pomocí sekundárních struktur a podobně). Musím sebekriticky přiznat, že já sám jsem nikdy nepřipravoval alignment s takovou opatrností. Také obdivuji množství práce, která byla věnována podrobnému mapování substitucí na sekundární struktury a srovnávání kmenů v těchto znacích. Je zde jasně patrná snaha vyčíst ze získaných dat naprosté maximum informací. Podobný dojem jsem získal také z morfometrické části práce, u které se však necítím povolán posuzovat kvalitu. Za největší slabinu této práce považuji prezentaci výsledků. Kapitola výsledky je podle mého názoru příliš zbytnělá. Autorka se snaží zmiňovat veškeré detaily, ve kterých se kmeny liší (jednotlivé substituce nukleotidů atd.), které z valné většiny stejně nediskutuje, protože není zřejmý jejich význam. Domnívám se, že fylogenetické stromy vytvořené různými metodami lze shrnout do jednoho stromu, popis méně významných rozdílů mezi sekvencemi lze odsunout do appendixu nebo ponechat čtenáře, aby si je případně vyhledal na obrázku či schématu, morfometrické charakteristiky kmenů (str. 49-53) lze shrnout do tabulky, počet (bezmála 20) grafů prezentujících morfometrická srovnání, při kterých nebyly nalezeny v podstatě žádné rozdíly, lze redukovat. Čtení kapitoly výsledky by pak bylo jistě mnohem příjemnější. Autorka své výsledky poměrně fundovaně diskutuje a je si vědoma mnoha úskalí – přítomnost statistických artefaktů, možnost rekombinace mezi kmeny a přítomnost sekvenačních chyb. Z diskuze jsem nabyt dojmu, že autorka se v problematice velmi dobře orientuje. Na závěr bych chtěl konstatovat, že předloženou diplomovou práci považuji za velmi kvalitní a navrhuji ji hodnotit jako výbornou.

Otázky:

1. V diplomové práci jste sekvenovala celkem 3 přilehlé geny (18 S rRNA, ITS1 a ITS2), které jste analyzovala samostatně. Proč jste se nepokusila analyzovat tyto geny společně (konkatenovat je)? Je možné, že větší množství dat by vedlo k vyšší podpoře pro některé významné uzly ve vašem stromu.
2. V analýzách postrádám jakoukoli snahu klasifikovat kmeny do rodů a ukázat, že rody neodpovídají fylogenezi. Z literárního úvodu jsem se např. dočetl, že *Coccomyxa* a *Pseudococcomyxa* se liší způsobem uvolňování autospor ze sporangia – prasknutím stěny nebo zánikem stěny. Proč jste si nevšimla tohoto znaku a nepokusila se jej namapovat na fylogenetický strom kmenů, aby se ukázalo, zda je taxonomicky validní?
3. Pokud *Coccomyxa* a *Pseudococcomyxa* tvoří jeden rodový komplex a nedají se morfologicky odlišit, měly by se sloučit do jednoho rodu. Chystáte se k takovému kroku? Jak by se měl společný rod jmenovat?

4. Na stranách 70 a 71 diskutujete teoretickou možnost křížení mezi kmeny. Uvádíte, že rozdíl v jediné „compensatory base change“ (CBC) v helixu III mezi liniemi ukazuje, že se linie vzájemně nekříží; přítomnost hemi CBC nestačí. Mohla byste více rozvést tento argument, který jste načerpala z literatury. Není mi jasné, proč by tomu mělo tak být.
5. Intuitivně nejsnáze pochopitelný důkaz pohlavního rozmnožování je podle mého názoru nálezní kříženců – klonů, které obsahují část znaků vyskytujících se v jedné části populace a druhou část vyskytujících se v jiné části populace. Protože k pohlavnímu rozmnožování dochází nejsnáze v přirozeném prostředí, jeví se mi jako nejsnazší analyzovat pro tento účel několik (spíše mnoho) klonů z jednoho vzorku. Z některých vzorků jste izolovala více klonů, nepozorovali jste u nich něco podobného?
6. V metodice zmiňujete, že jste před fylogenetickými analýzami vylučovaly chimerické sekvence. Jaký byl původ těchto chimér, a nemohlo by se jednat právě o křížence?

Vladimír Hampl

Další technické poznámky (nežádám odpověď):

Text na **str. 14** nenavazuje na str. 13, část zřejmě chybí.

Str. 16 – Proč uchovááte DNA při 4°C a ne při -20°C

Str. 17 – *Paramecium bursaria* (místo *barsaria*)

Str. 18, 20 – uvést koncentrace zásobních roztoků chemikálií (polymeráza, dNTP, MgCl₂ aj.)

Str. 20 – Proč po klonování sekvenujete PCR produkty amplifikované z plazmidů a ne samotné plazmidy. Hrozí vznik PCR chyb.

Str. 22 – Proč jste používali při analýze ITS2 ve PhymI jiný model než v PAUP a MrBayes.

Str. 26 – chybí bootstrap na společné větvi *Coccomyxa*, *Choricystis*, *Botryococcus*.

Str. 31 – příbuznost skupiny D je pochopeno špatně. Z obrázku 9 nevyplývá, že je příbuznější A2, C a A1. Jedná se o nezakořeněný strom, ve kterém se D nachází mezi B a zbytkem.

Posteriorní pravděpodobnost pro „bipartition“ D+A2+A1+C není 0,98 ale 1,00. Strom na obrázku 10 má jinou topologii. Zde je D skutečně nejpříbuznější A2.

Str. 69 – používání pojmů „parafyletická skupina“, „parafyletické vztahy“ asi není zcela na místě. Nebylo by vhodnější „polyfyletická skupina“, „polyfýlii“.

Str. 69 a 70 – Znaky na sekundární struktuře ITS nedokazují větší příbuznost kladů A a C. Pokud neznáme původní stav, je možné, že inserce a delece vznikly na větvi vedoucí k B.