

Posudek diplomové práce „Molekulární fylogeneze rodu *Geosmithia*“

Autorka: bc. Celie Korittová

Předložená práce se zabývá standardní molekulárně-systematickou metodou, studiem fylogeneze vybraného rodu pomocí analýzy sekvencí DNA několika genů. V současné systematické biologii se jedná o osvědčený a široce používaný metodický přístup. Jako modelový organismus byl zvolen rod *Geosmithia* – pozoruhodný rod mikroskopických askomycetů, který je dlouhá léta studován vedoucím této práce, dr. Miroslavem Kolaříkem. Z tohoto důvodu měla studentka k dispozici bohatou, z celosvětového hlediska unikátní, sbírku kultur tohoto rodu. Proto předmětem práce nebyl terénní výzkum, odběr vzorků a izolace čistých kultur či mikroskopická analýza morfologických znaků. Těžiště práce byla v získávání sekvencí DNA, zpracování molekulárních dat a konečné interpretaci výsledků. Uváděnými cíly práce je především zvolit vhodné genové markery pro molekulární fylogenezi rodu a pro účely DNA-barcodingu a stanovit mezidruhové hranice mezi několika kritickými operačně taxonomickými jednotkami (v textu pracovníě označenými OTU 8, OTU 36, OTU 37 a OTU 38). Cíle této práce byly ovšem splněny jen částečně.

Text práce je uveden kapitolou Literární přehled zabývající se poměrně stručně historií výzkumu rodu *Geosmithia*. Zde například chybí i jen stručný výčet hmyzích symbiontů rodu. Následuje poměrně zdařilá kapitola o významu molekulárních znaků pro systematiku hub. Tuto kapitolu lze označit za nejlépe napsanou část této diplomové práce. Následuje kapitola Metodika – zde je uvedena rozsáhlá tabulka se seznamem kmenů zahrnutých do fylogenetické analýzy. V tomto seznamu ovšem chybí právě zmiňované kmeny z OTU 37 a OTU 38.

Následuje popis metodiky, který je vzhledem k zaměření práce, poměrně nedostatečný. Zcela chybí i velmi krátká zmínka o zvolené metodě extrakce DNA, z tabulky 3 není jasný výsledný objem PCR reakční směsi při použití různých typů DNA-polymerázy. Dále jsou uvedeny různé alternativní postupy použité při optimalizaci PCR (úprava teploty při nasedání primerů, přidání dimethylsulfidu jako PCR enhanceru, změna typu DNA-polymerázy při špatné amplifikaci), nicméně zde nebo dále v kapitole Výsledky chybí zmínka o výsledcích těchto optimalizací. U metodicky zaměřené práce považuji za chybu, že nejsou uvedeny výsledná optimální složení reakčních směsí a teplotní režimy používané při PCR během rutinní analýzy zvolených genů. V následující kapitole o zpracování molekulárních dat chybí několik drobných údajů: Podle které metody (v jakém programu) byly zjištěny variabilní pozice v datasetu, proč byl zvolen substituční model podle BIC a ne podle jiné metody a kde v genu *Tsr 1* je umístěn odstraněný hypervariabilní region a jak je dlouhý (uvést v absolutní délce i v procentech k celkové délce amplikonu).

Kapitola Výsledky je příliš stručná a některé údaje nejsou příliš srozumitelné – např. tabulka 9 nebo údaje o celkovém počtu zahrnutých vzorků v kombinovaném datasetu všech čtyř genů. Popisy obrázků 1-5 jsou nedostatečné – chybí vysvětlivky k označení skupin A-F, rovněž chybí označení kladů čísla OTU a legenda k měřítku délky větví. Není řádně vysvětleno, v čem spočívá rozpor mezi různou topologií větvení jednotlivých skupin při analýze různých genů. Chybí mi i jednoznačný závěr, který marker považuje autorka za nejvhodnější pro barcoding u rodu *Geosmithia*. Nejasnosti pokračují i dále v kapitole Diskuse. Zde např. chybí podrobnější komentář jak a proč „geny Mcm 7 a TEF-1 alfa selhávají v rozlišení hlubších fylogenetických vztahů“. Zde by byla vhodnější i kvalitnější diskuze s citovanou literaturou. Při diskuze příbuzenských vztahů jednotlivých OTU by bylo žádoucí uvést do

kontextu nálezy na konkrétních dřevinách (*Pinaceae* versus listnaté dřeviny) s ekologickými preferencemi hmyzích vektorů a jejich vazbami na konkrétní dřeviny. Ve Výsledcích i Diskusi není rovněž dostatečně splněn jeden z hlavních cílů práce – není vyřešena nebo adekvátně diskutována otázka, zdali OTU 8, OTU 36, OTU 37 a OTU 38 lze rozlišovat jako samostatné druhy.

Formální připomínky k práci:

V textu je řada stylistických neobratností, některé anglické termíny by bylo vhodné přeložit do češtiny (např. Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition – česká literatura je k tomu dostupná). Označení genu pro translační faktor 1-alfa je v textu nejednotné. U tabulek 7 a 9 by bylo žádoucí sjednotit zarovnání řádků. U tabulek 5,6, a 8 jsou sloupce popsány „primer forward“ a „primer reverz“, což není česky ani anglicky. Grafické rozlišení obrázků 1-5 je příliš nízké.

Otázky pro uchazečku:

- 1) Který z použitých genů je nejvhodnější pro barcodingový marker u rodu *Geosmithia* a proč? Jaká kritéria jsou pro výběr barcodingového markeru rozhodující?
- 2) Které z OTU 8, OTU 36, OTU 37 a OTU 38 lze rozlišovat jako samostatné druhy? Popište jejich morfologické znaky a ekologické nároky. Sumarizujte výsledky Vašich fylogenetických analýz.
- 3) Jak silná je vazba na jednotlivé hostitelské dřeviny u jednotlivých druhů/OTU rodu *Geosmithia*? Jak vazba houby na dřevinu souvisí s vazbou hmyzího vektora na konkrétní dřevinu – vyskytují se druhy hub jen na dřevinách preferovanými hmyzími vektory nebo existují i výjimky?
- 4) Jak souvisí paralelní rozšíření některých druhů rodu *Geosmithia* na různých kontinentech s lidskou činností? Lze předpokládat pozitivní vliv např. mezinárodní obchodu se dřevem nebo sadebním materiálem na šíření druhů hub mimo původní stanoviště?
- 5) Vysvětlete termín substituční saturace na třetí pozici kodonu a vliv tohoto jevu na molekulární fylogenetiku.

Práce má neúměrné množství nedostatků, proto ji doporučuji hodnotit stupněm „dobře“. Toto hodnocení ovšem podmiňuji dostatečným a správným zodpovězením výše uvedených otázek, v opačném případě bych akceptoval i hodnocení stupněm „neprospěl/a“.

V Brně, 14.5.2013

doc. RNDr. Michal Tomšovský, Ph.D.