

Oponentský posudek

Předložená diplomová práce magisterského studenta **Karla Kodejše** s názvem **Populační genetika a speciální mechanismy u řasníků rodu *Stylops* (Strepsiptera)** popisuje populační genetiku a fylogeografii řasníků *Stylops ater* a dalších čtyř druhů rodu *Stylops* za použití dvou odlišných typů genetických markerů a různých populačně genetických a fylogenetických metod. Téma práce je nadmíru zajímavé a přínosné, studium populační genetiky parazitů může přinést celou řadu informací o chování a biologii řasníků rodu *Stylops* a nepřímo i o jejich hostitelích, jimiž jsou samotářské včely pískorypky. V úvodu podotýkám, že přestože je mi toto téma velmi blízké, neboť jsem na něm také v minulosti okrajově pracovala, posudek jsem se snažila zpracovat maximálně objektivně a veškeré připomínky doufám poslouží k dalšímu posunu práce na daném tématu v navazujícím doktorském studiu.

Diplomová práce má rozsah 58 stran a po formální stránce splňuje veškeré nároky kladené na tento typ práce. Práce je přehledně členěna do jednotlivých kapitol a podkapitol, grafická úprava odpovídá požadavkům. Práce je psaná čtivě, obsahuje relativně malé množství pravopisných chyb a překlepů, vyskytují se zde však četné formulační lapsy, které nasvědčují, že si autor po sobě práci v klidu nepřečetl (konkrétní příklady níže). Použité zdroje jsou citované správně a jejich výběr reflektuje zpracovaná témata. Konkrétní připomínky k citacím jsou též uvedené níže. Z formálního hlediska jsou slabinou práce obrázky, u nichž chybí podrobné popisky a jsou bez podrobné znalosti textu často nepochopitelné. Obrázky mají být samovysvětlující.

Jak už jsem zmiňovala, téma oponované diplomové práce je neuvěřitelně zajímavé, autor práce společně se svým školitelem a dalšími pomocníky dokázali nashromáždit velké množství materiálu, kterým disponuje jen málokdo jiný na světě. Také vím, že když Karel chce, je velice schopný a dokáže obsáhnout široké spektrum různých metod a problémů. O to více mě mrzí, že musím konstatovat, že obsahová stránka za formální výrazně zaostává a autor ani zdaleka nevyčerpal možnosti, které mu dané téma a nasbíraný materiál poskytly. V každé části textu je znát, že mu autor nevěnoval potřebnou pozornost a nepronikl dostatečně do hloubky a to je také důvodem navrhovaného hodnocení. Práci přesto doporučuji k obhajobě.

Literární přehled je na poměry diplomové práce (a tématu) velice stručný, pouhé dvě kapitoly a tři strany textu. To považuji za velice nedostatečné. Když pominu to, že by uvedené dvě kapitoly mohly být obsáhlejší, postrádám zde celou řadu kapitol jiných. Pokud má práce v názvu speciální mechanismy, čekala bych, že se o této problematice něco dozvím, úplně zde však chybí. Podobně jsem postrádala např. krátkou kapitolku o fylogenetických vztazích v rámci řasníků, o pozici rodu *Stylops* ve fylogenezi a vztazích v rámci tohoto rodu. Kapitola 2.2 by velmi zasloužila rozdělení do více kapitol a patřičné rozpracování jednotlivých částí.

Metodika je zpracována obstojně, autor však v rámci celého textu (nejen metodiky) poněkud bojuje s tím, jaké informace náleží do metodiky, výsledků a diskuse. Z konkrétních připomínek jsou nejdůležitější dvě. V metodice zcela chybí přehled počtu testovaných jedinců pro jednotlivé markery a druhy, některé z těchto informací (třeba ze u COI nebyly zpracovány klíčové vzorky ze Skandinávie a Pobaltí), jsem se tak dozvíдалa až ze zmínky v diskusi! Tabulka 1 je v tomto směru zcela nedostačující. Obdobně důležitou připomínkou je, že u mikrosatelitů, které jsou nové a nepublikované, v práci zcela chybí jejich otestování (viz konkrétní připomínky). Bez znalosti jejich chování se nemůžeme spolehnout na další analýzy (viz konkrétní připomínky).

Výsledky jsou po obecné stránce v pořádku, zde však mám řadu připomínek k použitým metodám a i těm, které tu chybí. Podrobněji níže.

Diskuse je podobně jako literární úvod velice stručná. Autor sice diskutuje všechny důležité výsledky a diskuse je také relevantní vzhledem k vytyčeným cílům práce, nicméně zde prakticky chybí srovnání s jinými výzkumy a množství citovaných prací je zde velice malé. Autor spíše uvažuje nad získanými výsledky, než by se je snažil srovnat s jinými podobnými studiemi. Je mi známo, že toto téma nestuduje příliš mnoho laboratoří a množství literatury je tak omezené, přesto si myslím, že adekvátní příklady nalézt lze, jen tomu nebyla věnována dostatečná pozornost. Také zde postrádám diskusi o vztahu kvality použitých markerů a detekované gen. variability a diskusi o dalších příčinách detekované velmi nízké genetické variability u *Stylops ater*, která je jedním z nejzajímavějších výsledků celé práce.

Konkrétní připomínky (není nutné celé číst, je toho moc a je to spíše pro účely budoucích oprav textu):

Str. 12

a) Bylo by hezké detailněji rozvést morfologické, ekologické a etologické adaptace řasníků, když je autor zmiňuje.

b) „...dospělí samci jsou vždy volně žijící..“

Trochu zavádějící sdělení, chybí informace, že samčí larvy jsou taky parazitické, podobně jako samice celý život.

c) „Míra hostitelské specifity se překvapivě lišila i mezi samci a samicemi..“

To mi překvapivé nepřijde vůbec, vzhledem k tomu, že samci a samice žijí úplně jinak.

d) „...schopnost překonávat imunitní odpověď hostitele“ a dále

Zde velice postrádám nějaké detailnější informace a mechanismech, jak to řasníci dělají, takto to má jen velice malou informační hodnotu.

e) „U čeledi Xenidae a Stylopidae, které v rámci řasníků tvoří odvozenou monofyletickou skupinu..“

Zde právě chybí fylogenetický background. Obě čeledi jsou fylogeneticky odvozené, nebo jen Stylopidae? Formulace!

f) Celý odstavec začínající „Řasníci čeledi Stylopidae, parazitující na včelách, mají u prvních..“ má být jinde, před ním i po něm řeší autor hostitelskou specializaci a přenos triungulinidů, nepasuje sem tedy.

Str. 13:

a) „Na základě předchozích výsledků klastrují řasníci druhového komplexu *Stylops nevinsoni* do dvou odlišných linií. Jedna linie parazituje časně jarní a druhá pozdně jarní druhy včel. Je tedy možné, že zde dochází k sympatrické speciaci.“

Pokud to dobře chápu, tohle je vlastní výsledek, to do úvodu vůbec nepatří! Podobně: „V rámci studovaného rodu tomuto scénáři nejvíce nasvědčují předběžné analýzy u druhového komplexu *Stylops nassonowi* parazitující zejména podrody *Hoplandrena* a *Plastandrena* rodu *Andrena*.“ Podobně „Na základě signálu z mitochondriálního genu COI a jednoho jaderného genu se zdá, že tento druh prošel v nedávné době velkou expanzí z malého refugia.“

b) „Na základě předchozích dat (Černá et al., 2013) se u druhu *Stylops ater* zdá být důležitou jak adaptace na hostitele, tak jeho geografické rozšíření.“

Zajímalo by mě, na základě jakých výsledků citované práce toto autor tvrdí. Nic takového tam totiž není, práce řeší hostitele.

c) „V rámci areálu však dokáže parazitovat jen některé populace hostitelského druhu *A. vaga* (Černá et al., 2013)“

Nepřesné, nic takového nebylo v citované práci řečeno, do některých populací spíš nedomigroval.

Str. 14:

a) V kapitole 3.1 by měla být uvedena metoda sběru materiálu.

b) Tab. 1. Nepatří do metodiky, ale to přílohy. Místo ní by tu měla být souhrnná tabulka, kde by pro každý studovaný druh byly vypsány lokality (třeba po státech), množství jedinců v každé lokalitě, kolik jedinců bylo zpracováno kterým markerem, atd. To jsou informace, které zde velice chybí. Také by se velice hodila mapa s body sběru, to vypovídá velice hodně o prosbírání v rámci areálu.

c) V celé Tabulce 1 chybí číslování stran.

Str. 31

a) Chybí číslo stránky.

b) kapitola 3.2 – chybí mi zde souhrn, kolik jedinců, z jakých lokalit bylo analyzováno pro msat i pro COI (viz připomínka výše).

c) „...kdy byl z důvodu většího počtu jedinců použita verze izolačního kitu umožňující izolaci celé destičky o 96 vzorcích naráz.“

Formulace!

d) Kap. 3.3 – zcela chybí testování mikrosatelitů (byť se kapitola tak jmenuje), jsou nepublikované a tedy je to nutné udělat, aby se vědělo, jak se chovají. Tedy vzít aspoň 15 jedinců z jedné populace a kouknout se na variabilitu, očekávanou heterozygotnost, atd. Když toto není hotové, není možné interpretovat výsledky dalších analýz!

e) Tab. 2: zde by kromě sekvencí primerů měly být výsledky testování jednotlivých lokusů a délky výsledných fragmentů. Také zde zcela chybí zdůvodnění sekvence GTT.. na počátku reverse primerů (viz Brownstein et al. (1996)).

f) „U použitých primerů se po několika pokusech osvědčila koncentrace každého z nich 1 $\mu\text{mol/l}$.“

Chybí zde informace, ze se vytvoří multiplex mix (od každého primeru po 1 μl) a z tohoto mixu se pak dává 0,5 μl do PCR reakce.

g) „Fragmentační analýza byla prováděna v servisní laboratoři sekvenace DNA ve druhém suterénu budovy PřF, Viničná 7.“

Doplnit, na jakém konkrétně stroji, jestli je v druhém suterénu nebo na půdě je úplně jedno.

Str. 33:

„Zde lze optimální K odvodit z hodnoty ΔK “

Chybí zde stručné vysvětlení metody a hlavně její citace (Evano et al. 2005).

Str. 34:

V metodice ABC úplně chybí popis testovaných scénářů a jejich vysvětlení. Popis je později až ve výsledcích a diskusi, ale má být v metodice (včetně schémat).

Str. 35:

a) Na začátku kapitoly o analýze mitochondriální DNA by mělo být jasně definováno, kolik vzorků, jakých druhů a z jakých populací bylo zpracováno. U každého vzorku (asi v Tab. 1) by též mělo být uvedeno, jakými primery byl získán. Koneckonců pro nahrání do GenBanku je to nezbytné.

b) „Sekvenace probíhala Sangerovou metodou v sekvenační laboratoři PřF UK v centru Biocev.“

Opět chybí typ sekvenátoru.

Str. 36:

a) „sekvence rozděleny podle druhu řasníka a oříznuty na stejnou délku“

A jaká tedy byla?

b) 3.4.4. – chybí popis, jakou metodou byly tvořeny haplotypové sítě. Median-joining?

c) Vedle haplotypových sítí by bylo správné udělat ještě fylogenetické analýzy.

c) „Pro otestování síly vlivu daného faktoru byla u některých jedinců provedena analýza molekulární variance (AMOVA)“

U kterých jedinců a podle jakého klíče? Tyto informace musí v metodice být!

d) AMOVA – GenAlEx neumí počítat k AMOVě p-hodnoty, bez nichž to celé postrádá smysl. Samotná procenta vysvětlené variability nestačí, pokud netestujem, že jsou rozdíly skutečně signifikantní. Pro AMOVu je tedy lepší využít program Arlequin.

Str. 38 a 39:

a) Na začátku výsledků by měly být výsledky testování použitých msat lokusů a taky základní pop. gen charakteristiky testovaných populací. Bez toho není možné vůbec pokračovat.

b) „Jedinci byli rozděleni do populací podle států, neboť jednotlivé lokality v rámci nich se pravděpodobností zařazení do klastrů nelišily ani v jednom případě. „

Mám problém pochopit, na základě jakého klíče byly jedinci pro analýzu Structure sloučeni do populací. Pokud nebyli jedinci uloveni řekněme na jednom hnízdišti, nedá se moc o populacích mluvit. Bez nějakého logického klíče nelze výsledky ve Structure grafu poskládat a graf je tak ztratí mnoho z vypovídající hodnoty. Uspořádání vzorků je zde základ, zvlášť pokud je populační struktura slabá. Seřadila bych k sobě jedince nachytné skutečně na jedné lokalitě a celý graf bych uspořádala podle nějakých koordinát, třeba gps, aby zvířata chycená u sebe byla i v grafu pokud možno u sebe. Možná to tak máte, ale není to z metodiky vůbec patrné.

c) $\Delta K = 9$ mi přijde úplný nesmysl, je to pravděpodobně jen rudiment obecně slabé populační struktury. I metoda Evano et al. 2005 má svá omezení a při hodnocení optimálního K je třeba zvažovat i grafický výstup Structure analýzy. Uvažovala bych nejspíše o $K=2$.

d) Nepříliš vypovídající hodnota Structure analýzy může být důsledkem jednak nízké genetické variability celkové a taky nízké kvality použitých markerů. Právě proto musí jakýmkoli složitějším analýzám předcházet tyto základní!! Bez znalosti, jak se markery chovají se nedá o populační struktuře nic moc říct.

e) Detekovaná populační struktura vybízí k otestování isolation by distance (IBD), to by mohlo napovědět více o populační struktuře.

Str. 40 + 41:

- a) Popis scénářů a případně schémata patří do metodiky.
- b) „pátý scénář opět zohledňuje změny populační velikosti při odštěpení od mateřské linie, ale počítá s nezávislým oddělením skandinávské a pobaltské populace“
Nerozumím. Je tím myšleno, že se nejdříve oddělila skandinávská populace a poté od evropské ještě pobaltská?
- c) Obrázky na str. 41: tady si autor mohl dát alespoň malou práci, aby přejmenoval populace a aby byly shodné populace stejnou barvou. Jinak se v tom nedá skoro vyznat. Opět zcela nedostačující legenda.

Str. 43 - 45:

- a) „U druhu *Stylops ater* díky malé (téměř nulové) variabilitě ve sledovaném genu žádná struktura pozorovatelná není.“
Co přesně jsou jedinci označení jako SD? Myslela jsem, že Skandinávie, ale v diskusi vyloučeno, že ti zcela chybí.
- b) Obrázek 6 měl být rozdělen na dva samostatné obrázky pro každý druh zvlášť.
- c) AMOVA neslouží k tomu, aby se zjišťovala síla závislosti, ale k otestování rozdílů mezi definovanými skupinami. Z principu jde o statistiku, a tedy by měla být výsledkem p-hodnota!

Str. 47:

- a) Nechápu, co přesně je u skyline plotů na ose Y, když jsou tam výsledky pod hodnotou 0? Chtělo by to popisek. Jaké jsou konkrétní hodnoty Ne?
- b) „Nejmarkantnější pokles byl zaznamenán u druhu *Stylops ater*, zatímco nejmenší u druhu *S. melittae*“
Jak veliký je ten reálný pokles, jaké jsou konkrétní hodnoty Ne?

Str. 50:

- a) Chybí mi diskuse vztahu kvality použitých markerů a detekované gen. variability a také diskuse o příčinách detekované nízké genetické variability u *S. ater*, která mi přijde skoro nejzajímavějším zjištěním celé studie.

Str. 51:

- a) „Pomocí ABC byly, vzhledem k nedostatečné strukturovanosti ve většině areálu, zjištěné pomocí klastrovací analýzy testovány scénáře vývoje vztahů mezi třemi populacemi“
Formulace!
- b) „Vzhledem k větší vnitropopulační variabilitě byla za zdrojovou populaci považován evropský klastr“
Formulace!
- c) První polovina kap. 5.2. by z větší části měla být součástí metodiky.

Str. 52+53:

Kap. 5.4 - Chybí diskuse na téma rozdíly ve velikosti Ne mezi druhy a jejich možné příčiny.

Str. 58:

Vymazat citaci PopArt.

Na závěr několik otázek:

- 1) Co přesně se ví o strategii šíření studovaných druhů? Jak přesně dochází k přenosu triungulinidů a zda je to u všech druhů stejné, tedy kontaktem samic?
- 2) Kolik genomů řasníků je dnes známo a jak se liší velikostmi?
- 3) Viz. str. 13: „redukce areálu na refugia a opětovné rozšíření s případným vznikem druhotného kontaktu takto vzniklých druhů. Takovýchto příkladů známe celou řadu.“ Uvedené příklady nejsou o parazitech, ví se o tom něco?
- 4) Viz kap. 3.2: Byla izolace DNA provedena stejně pro analýzu mikrosatelitů i COI? Nepotýkali jste se s vysokými koncentraci u msat?
- 5) Viz kap. 3.3: Msat byly testovány jen pro druh *S. ater*? Jiné druhy jste nezkoušeli? Jak vypadá crossreaktivita?
- 6) Viz. 3.3.6: Z jakého důvodu nebyla provedena analýza ABC také na COI? ABC umí pracovat i se sekvenčními daty.
- 7) Viz. 3.4.5: Nejsem fylogenetik a nemám s datováním velké zkušenosti. Zajímalo by mě však, jak moc jsou získané historické odhady dle autora skutečně relevantní? Je *Drosophila* dostatečným měřítkem, když jsou řasnici parazité a mají tedy pravděpodobně jinou mutační rychlost? Jak to řeší v jiných řasnících studiích?
- 8) Viz. 4.1.1: Ve Structure analýze není nikterak zvýrazněné, že někteří parazité pocházejí z *A. cineraria*. Mělo to nějaký vliv? U COI jste to řešili, u msat zdá se vůbec. Proč?
- 9) Viz. 4.1.1 a 4.2.1 Jak si autor vysvětluje detekovanou velice nízkou míru genetické diverzity u druhu *Stylops ater*?
- 10) Viz. 4.2: U analýzy mitochondriální DNA bych očekávala fylogenetické analýzy - ML, Bayes. Z jakého důvodu nebyly provedeny, zkoušel je autor provést?
- 11) Viz. 4.2.2: Jaké jsou odhady současných efektivních velikostí populací u jednotlivých druhů?
- 12) Viz. 4.2.2: Jaký vliv na skyline plot analýzu má detekovaná nízká genetická variabilita? Snižuje výrazně přesnost?

Navrhované hodnocení: dobře

V Liberci dne 6.9.2017

Mgr. Kateřina Černá, PhD.