

**Miroslava Sýkorová: Molekulární fylogeneze podčeledí Spondylidinae a Lepturinae
(Coleoptera: Cerambycidae) pomocí mitochondriální
16S rDNA**

Oponentský posudek

Předložená bakalářská práce patří k tomu typu, kde úkol oponenta spočívá především v posouzení „řemeslné“, spíše než koncepční stránky celé studie. V tomto smyslu se jedná o práci svým rozsahem jistě převyšující průměrnou bakalářskou práci (sekvence získány ze 103 druhů a zpracovány v poměrně podrobné fylogenetické analýze). Vzhledem k tomuto faktu se mé poznámky a připomínky týkají především metodické stránky práce.

- str. 1. Formulace „*Molekulární znaky, zejména sekvence bází v DNA..... představují vítaný a do značné míry nezávislý test výsledků získaných na znacích klasických, zejména morfologických.*“ působí poměrně komicky v době, kdy molekulární data představují dominantní zdroj fylogenetické informace a vychází z nich většina současných fylogenetických koncepcí.
- Pro celou studii byl zvolen poměrně často využívaný marker, gen pro 16S rRNA. V textu je také vysvětleno, proč byla analýza založena na velkém množství vzorků a krátkých sekvencích (cca 500 bp). Ačkoliv je touhou po co nejúplnějším taxonomickém vzorku pochopitelná, nepokládám takový přístup za vhodný: tento typ matic („vysoká ale krátká“) je obecně znám svou náchylností k fylogenetickým artefaktům.
- str. 8. Pro výpočet distancí byl zvolen *výhradně* algoritmus LogDet. Jak autorka správně uvádí, tato metoda byla vytvořena pro zcela specifické podmínky, kdy se sekvence jednotlivých taxonů signifikantně liší ve frekvencích jednotlivých nukleotidů. Vzhledem k tomu, že se jednalo o taxonomicky poměrně úzce vymezenou skupinu organismů, zajímalo by mě, zda takové rozdíly skutečně mezi jednotlivými taxony jsou a jakou metodou to autorka ověřovala.
- Za nejkritičtější bod celé analýzy ovšem považuji práci s alignmentem.
 1. Především mě zarazí (understatement) přístup k vlastní proceduře alignování: „*Orientační alignment v ClustalW implementovaném v programu MEGA 4) vykazoval vzájemná posunutí zjevně homologických úseků i při různých nastaveních parametrů. Proto jsme použili manuální alignment, při kterém jsme se snažili zohlednit skupiny druhů, které jsou považovány za příbuzné v existujících klasifikacích a zároveň tvořily skupiny druhů v kladogramu s použitím orientačního alignmentu programem ClustalW.*“ Tento přístup je v současné praxi molekulární fylogenetického výzkumu naprosto neobhájitelný. (Osobně bych autorce doporučoval, aby se o jeho obhajobu ani nepokoušela a přijala tento fakt jako poučení do další práce). Pokud by autorka měla v budoucnu v úmyslu podobnou studii publikovat, bude muset zcela jistě přistoupit na standardní algoritmické vytvoření alignmentu. Zmíněné posunutí „*zjevně homologických úseků*“ je známou vlastností alignovacích programů založených na progresivním heuristickém procesu. Často jej lze eliminovat nebo alespoň zmírnit nastavením parametrů. Zcela vyhnout se mu lze použitím programů založených například na konzistenčním přístupu (T-coffee).
 2. Bez ohledu na techniku sestavení alignmentu je z charakteristiky výsledků zjevné, že fylogenetický signál je poměrně slabý a data obsahují značnou úroveň šumu. Za takové situace je nutné věnovat úsilí především testování alternativních alignmentů (vzniklých při různých parametrech) a různých souborů znaků (např. odstranění nejednoznačně alignovaných pozic z matice). Jinými slovy, je třeba testovat přítomnost signálu ve vlastních sekvencích a jeho odolnost k různým metodám/parametrům alignovacího procesu. Předložená práce se oproti tomu věnuje především intenzivnímu testování stability signálu v jediném arbitrárně vytvořeném alignmentu: pokud je tento „špatně“, pak je zcela irelevantní celá následná fylogenetická analýza.

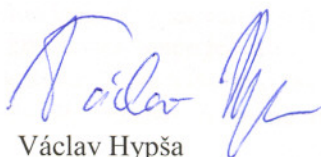
Smyslem těchto výtek není dokázat, že získané výsledky (tedy topologie) jsou špatné, ale že použitý postup neposkytuje žádné vodítko, jak si ověřit jejich věrohodnost a stabilitu. Na druhou stranu oceňuji kritickou snahu nepřecházet konfliktní výsledky pouhým odkazem na odlišné metody, ale studovat jejich podstatu

v dalších analýzách (např. vyloučení rodů *Centrodera* a *Atimia* podezřelých z „přitahování“ nepříbuzných taxonů).

- str. 10. Nepříliš přesvědčivé mi připadá zdůvodnění faktu, že výsledky získané metodou MP nebyly nakonec do práce vůbec zahrnuty (*obsahovaly příliš mnoho zjevně nesprávných asociací.... Možným důvodem je nižší počet znaků informativních pro parsimonií v alignmentu*). Pomineme-li skutečnost, že „nesprávné asociace“ by vyžadovaly přesnější objasnění, nemají-li být považovány za zcela subjektivní názor (co se mi nelíbí, to vyhodím), nezní celé vysvětlení příliš logicky: v témže odstavci se totiž hovoří o poměrně vysokém počtu parsimoniálně informativních znaků (pro jednotlivé skupiny od 117 do 279). Je zřejmé, že problém spočívá v jiných vlastnostech dat a v chování MP jako takové – kupříkladu lze předpokládat, že značné procento informativních pozic tvoří homoplazie (to by autorka mohla lehce zjistit z konzistenčních indexů MP analýz, které byly ovšem z práce vyloučeny).
- Str. 10. Diskuse. Monofylie uvedených skupin, získaná metodou ME (obr. 3) je zřejmě z věcného hlediska v pořádku, přesto by mě zajímalo, zda si autorka uvědomuje, že použitá metoda zakořenění stromu nezaručuje, že nejde o artefakt (Dokázala by si představit, za jaké situace by mohl takový artefakt vzniknout? A jak se mu nejlépe vyhnout?).

Vlastní fylogenetické a taxonomické závěry lze obtížně hodnotit pokud není člověk specialista na taxonomii tesaříků. Celkově však práci považuji za zdařilou a především imponující množstvím zpracovaných dat. Návrh jejího hodnocení (mezi 1 a 2) bych chtěl definitivně rozhodnout na základě prezentace a reakcí autorky na jednotlivé připomínky.

V Českých Budějovicích, 23.1. 2008



Václav Hypša