

Ludmila Pohlová

2011

Fylogenetické vztahy recentních koňovitých

posudek oponenta

Fylogenetické vztahy mezi recentními druhy koňovitých lichokopytníků jsou až překvapivě špatně známé, uvážíme-li, že jde o nevelký počet druhů, které jsou obvykle k dispozici v každé zoo, a uvážíme-li dále, že tato skupina je dlouhodobě modelem pro všemožné evoluční a paleontologické studie. L. Pohlová ve své magisterské práci navazuje na bakalářskou rešerši z roku 2008 – oponenta těší, že jeho tehdejší závěr „[o]becně jde o rešeršní práci toho typu, jak si ji na katedře zoologie představujeme: stručný, ale úplný přehled problematiky s vymezením sporných bodů, jimiž má smysl se zabývat, a realistická vize, co s tím dál, včetně navrženého souboru druhů a dat, na něž je třeba se zaměřit“ byl správný: bakalářská rešerše opravdu neskončila v šupletí, ale stala se základem pro vlastní výzkumný projekt. V něm L. Pohlová vytvořila 1. obrovskou matici nemolekulárních 161 znaků pro všechny recentní taxony a 2. matici 16 molekulárních partic z GenBanku, doplněnou o 11 vlastních sekvencí cytb a 12S rRNA. Fylogenetické analýzy jednotlivých partic i kombinované matice (MP + Bayes) jsou navíc doplněny o analýzy homogenity dat a jejich vlivu na tvar kombinovaného kladogramu metodami ILD resp. PBS. Množství práce je tedy úctyhodné, metodologie adekvátní, oproti bakalářské práci je Opus 2 navíc i nesrovnatelně líp napsaný.

K práci mám několik připomínek:

1. Srovnávání autorčinných výsledků s literárními komplikuje absence fosilních druhů v kombinovaných maticích. Chápu, že motivem tu byla snaha vyhnout se dohledávání morfologických znaků pro ty fosilie, jejichž sekvence jsou známy (je jich asi pět druhů), nicméně i doplnění pouhého fosilního cytb do kombinované matice by ukázalo, kam vlastně tyto sekvence zapadají (uznávám: strom cytb se od kombinovaného příliš neliší, takže nelze očekávat nic revolučního) – to je asi základní věc, kterou je třeba dodělat před publikováním práce.
2. Druhý problém spočívá ve výrobě kombinovaných matic – protože je zjevně nemožné zjistit, co přesně vlastně který molekulární učenec sekvenoval (příčemž se věří, že koně od zebry snad rozpozná), dala autorka přednost vytvoření konsenzuálních sekvencí pro každý klasický „druh“ a jejich následné kombinaci. Bohužel ale nepublikovala původní fylogeneze jednotlivých sekvencí pro jednotlivé particy – pak se špatně pozná, zda některé particy nedávají vůbec špatnou informaci, zda jsou podle nich jednotlivé druhy opravdu monofyletické apod., nejvíc to mrzí u nemolekulárních znaků (předpokládám, že byly kódovány jednotlivé „poddruhy“, z práce se to nepozná). I vytváření konsenzuálních sekvencí nebylo úplně šťastné: *ferus x caballus*, *africanus x asinus*, *hemionus x kiang* (ale ne *khur* a *hemippus*, ani *zebra x hartmannae*), ačkoliv z cytb a 12S stromů jasně plyne, že nejde o recipročně monofyletické druhy (v případě domestikantů by to jeden ani nečekal).
3. Parsimonní vs. bayesovské stromy jednotlivých partic působí dojmem, že MP obsahuje fylogenetickou informaci, kdežto BA nikoliv. To bude optický klam: BA stromy obsahují délku větví a pp samy od sebe, kdežto kladogramům by to bylo třeba dodat (délka větví, bootstrap, bremer etc.) – pak by se patrně zjistilo, že podpora některých větví je velmi nízká.

4. Presentace fylogenetických výsledků je dost hrozná: procházet další a další stromy, které obsahují buď to, co ostatní, anebo nějakou pitomost, je úmorné (muselo to být úmorné i pro autorku, která tu očividně neví, co psát; zde se také koncentrují ty nejhorší formulace). Také kombinované analýzy by bylo dobré přeorganizovat – nonMOL, MOL (chybí), mt, nu bez Y (chybí), Y (Y chromosom je sice formálně „nukleární“, ale lze očekávat různé odchylky vzhledem k tomu, jak se dědí).

5. Fakt, že mtDNA sedí na morfologii líp než na nukleární DNA, je pozoruhodný: asi by to chtělo prozkoumat nemolekulární partici podrobněji (osteologie x vnější morfologie x cytogenetika).


6. Obr. 48 je špatně (asi špatně umístěné číslo 2), takže tab. 4 těžko rozumět.

7. Diskuse je slušně napsaná, nicméně s evolučními implikacemi bych počkal, dokud tam nebudou fosilie a molekulární hodiny.

8. Nemolekulární znaky jsou prezentovány velmi nepřehledně (stavy znaků nejsou očíslovány, čtenář musí sledovat mezery mezi slovy) a především chybí samotná matice. Nápadný je malý počet eko-etologických znaků – jsou equidi všichni stejní, anebo prostě nic nedělají? („Sociální organizace typu 1 a typu 2“ působí dojmem syntetických „syndromů“, které by se asi měly rozpitvat na jednotlivé pozorovatelné znaky.)

Práci obecně hodnotím kladně a doporučuji k obhajobě.

16. května 2011



prof. RNDr. Jan Zrzavý, CSc.

Oponentský posudek
na diplomovou práci
Bc. Ludmila Pohlová: *Fylogenetické vztahy recentních koňovitých*

Oponent: Prof. RNDr. MVDr. Petr Hořín, CSc.
Ústav genetiky FVL VFU Brno

Diplomová práce Ludmily Pohlové je tvořena celkem 76 stranami textu včetně příloh. Práce je členěna tradičním způsobem od úvodní části po závěr. Seznam použité literatury je na 6 stranách textu, přílohy obsahují seznam nemolekulárních znaků použitých v práci se samostatným seznamem literatury odlišným od předchozích odkazů, a dále seznam přístupových čísel sekvencí v GenBank.

Úvod je na 6 stranách textu pojat jako stručná informace o čeledi koňovitých a o problematice jejich taxonomie a fylogeneze. Cíle práce jsou definovány v 5 bodech. Metodická část popisuje sběr nemolekulárních i molekulárních dat použitelných pro naplnění cílů práce a ve zvláštním oddíle je popsána metodologie získání vlastních sekvencí dvou mitochondriálních genů. Posledními oddíly metodické části jsou popis tvorby konečné kombinované matice, její použití k analýze fylogeneze koňovitých a stručný odkaz na metody fylogenetické analýzy. Relativně podrobně je dále popsána analýza homogenity dat. Výsledky jsou prezentovány na 29 stranách formou souvislého textu proloženého obrázky s konkrétním fylogenetickým stromy a tabulkami. Následná diskuse se na 11 stranách věnuje zejména fylogenetickým vztahům koňovitých určených různými postupy a přístupy, poslední částí je pokus o evoluční interpretaci těchto dat. Závěry a perspektivy byly zformulovány na jedné straně.

Téma diplomové práce bylo vybráno velmi vhodně, jde o aktuální problém i proto, že koňovité lze v mnoha ohledech považovat za vhodný model komparativních a fylogenetických studií. Deklarované cíle byly naplněny způsobem odpovídajícím možnostem diplomové práce. Za hlavní přednost práce považuji komplexní přístup k řešení problematiky fylogeneze koňovitých, tj. snahu využití nejrůznějších typů dostupných dat. Takto formulované zadání je na druhé straně značně ambiciózní a vyžaduje nejen schopnost komplexní analýzy, ale také komplexní interpretace získaných výsledků. V tomto ohledu si autorka nedokázala vždy s problémem adekvátně poradit. Jednou z příčin je pravděpodobně i způsob zpracování úvodní části, která poukázala na základní problémy a rozpory v názorech na taxonomii a fylogenezi koňovitých, na druhé straně však nevyústila v dostatečně kvalitní analýzu možných přístupů k jejich řešení, z níž má následně přirozeně vyplynout definice cílů práce. Hromadění výsledků jiných studií a z nich vyplývajících otázek nestačí. Kdyby se autorka více věnovala přístupům k řešení, jejich přednostem a omezením, získala by informace potřebné pro lepší interpretaci vlastních dat. Mohla se zde zabývat například informační hodnotou mitochondriálních markerů a jaderných genů. Stejně tak

mohla být větší pozornost věnována metodám fylogenetických analýz a jejich volbě, zejména s ohledem na to, že některé z nich jsou kritizovány v diskusi bez bližšího objasnění.

Cíle práce jsou definovány jasně, mají v kontextu práce jako celku smysl a logickou posloupnost. Za neobratnou formálně i věcně považuji formulaci „změnit stávající stav nevyjasněné fylogeneze“, i když jejímu smyslu rozumím. Použité metodiky považuji za adekvátní, jako genetik se ve svém hodnocení zaměřím spíše na data molekulární povahy. Přesto nelze opominout, že autorka odvedla kvalitní práci a shromáždila do analyzované matice ucelený soubor morfologických a jiných dat použitelných k vyhodnocení příbuznosti a evoluce v této skupině lichokopytníků. Podobným způsobem byla schopna dohledat i dostupná data o molekulárních markerech. Za další klad práce považuji získání vlastních dat, tj. sekvenci dvou mitochondriálních genů, které se standardně využívají k fylogenetickým analýzám a pro něž současný stav znalostí takovou analýzu neumožnil. Vlastní laboratorní analýzy byly provedeny standardními postupy a jejich výstupy byla také standardními nástroji vyhodnoceny. Větší pozornost mohla být v metodické části věnována charakteristice a výběru metodik pro fylogenetickou analýzu, srovnatelně s metodikou testování homogenity dat. Kvalita práce jako celku utrpěla formou prezentace – text je málo strukturovaný a některé části mají až narativní povahu. To platí zejména pro výsledkovou část, kde kvalita získaných dat zanikne díky jejich nepřehledné prezentaci. Nejvýznamnější výsledky mohly být prezentovány ve formě sumárních tabulek podobných Tab. 6 uvedené v diskusi. Do této tabulky mohlo být také zahrnuto shrnutí autorčiných vlastních výsledků z části 4.2.1., str. 44. Jak už jsem uvedl, získané výsledky považuji za kvalitní příspěvek do diskuse o fylogenezi koňovitých, zejména proto, že představují integraci různých typů dat. Diskuse výsledků je založena na studiu rozsáhlé literatury, ale její kvalita je v různých částech různá. U tzv. nemolekulárních dat bych (možná vzhledem ke svému zaměření) věnoval více pozornosti evoluci karyotypu, která se u koňovitých zdá být relativně rychlá. Tato situace je vhodným modelem pro srovnání s výsledky založenými na jiných typech dat a autorka této příležitosti nevyužila (viz otázky oponenta).

Za hlavní nedostatek práce jako celku však považuji autorčino opominutí základního problému molekulární fylogenetiky, kterým je interpretace výsledků získaných pomocí různých typů markerů, jak už jsem uvedl v souvislosti se zpracováním úvodní části. Nejde pouze o „taxonomické pokrytí“ genů, diskutovanou v části 4.1. Velká část fylogenetických studií byla provedena pomocí analýzy mtDNA, na niž se také experimentálně zaměřila autorka. Interpretace těchto dat však musí brát v úvahu nemendelovskou (maternální) dědičnost těchto genů a velkou mutační rychlost ve srovnání s nukleárními geny a nelze tedy na jejich základě automaticky generalizovat. Stejně tak fylogenetická analýza nukleárních genů je validní pouze v případě, že jde o skutečné ortology – mj. z tohoto důvodu byla ustavena databáze OrthoMaM. Dále je třeba vzít v úvahu, že fylogeneze některých genů

(například právě MHC) se liší od neutrálních lokusů, díky například pozitivní selekci, mezidruhovému sdílení alel apod. Není tedy překvapující, že geny MHC-DQA vykazovaly pro autorku překvapující vztahy (str. 49) – rozdílnost mezi fylogenetickými stromy získané pomocí neutrálních markerů je považována za jeden z indikátorů možné selekce při studiu specifických lokusů. Současná literatura je charakteristická množstvím analýz specifických genů, kde se autoři zabývají tím, zda fylogenetické vztahy pro sekvence těchto genů jsou v souladu s obecnou představou a taxonomií studované skupiny. Vzhledem k těmto skutečnostem je obecná interpretace molekulárních dat dosud nedořešeným problémem, a to nejen ve fylogenetice koňovitých. Není proto překvapující, že autorka identifikovala řadu rozporů a nemohla dospět k jednoznačnému závěru. Za klíčový výsledek předkládané diplomové práce považuji shrnutí na str. 44, ve kterém autorka přispěla k této debatě kvalifikovaně podloženým názorem, že koňovití jsou monofyletická skupina, která se dále člení na koně a osly se zebrami. Je škoda, že se v první části diskuse autorka nevěnovala kritické analýze limitací v interpretaci svých dat. Její komplexní matice a některé části diskuse jsou tím bezpochyby ovlivněny. Souhrn oddílu o jaderných genech na str. 50 je v tomto smyslu neúplný a zčásti nekorektní.

Pokud jde o koně Převalského, autorka nezmínila, že publikace o celogenomové sekvenční domáčího koně a jeho polymorfismu neodhalily specifické odlišnosti mezi koněm domácím a koněm Převalského. Ani v obecné rovině by odkaz na znalost kompletního genomu domáčího koně neměl v práci zabývající se fylogenetikou Equidů chybět. Diskuse k problému zebry bezhřívě shrnuje aktuální stav vědění a vede i ke korektním závěrům ve vztahu k zebrám v zoologických zahradách.

Část 4.4. nazvaná Evoluční interpretace mých výsledků je určitě sympatickým pokusem o evoluční interpretaci řady vlastních a literárních dat a v diplomové práci má své místo. Je však třeba připomenout, že je založena zčásti na konfliktních datech, jak vyplývá z předchozí části práce, a zčásti na názorech nebo hypotézách. Tato část je proto značně spekulativní a její hodnota spočívá zejména v tom, že umožnila autorce utřídit si myšlenky, formulovat svůj odborný názor a přidat jej do spektra již existujících lépe nebo hůře podložených názorů. Při přípravě následné publikace však bude zapotřebí značné opatrnosti při formulaci podobné části.

Po formální stránce mám kromě výše uvedených ještě připomínku k obecnému pojetí textu. V instrukcích fakulty pro oponenty je psáno, že práce má být chápána spíše jako rukopis budoucího článku. V tomto smyslu má být odborný text objektivní, tj. s minimem hodnotících výrazů a personalizace typu „atraktivní“, „vyhození z matice“ apod. V některých případech je u autorky patrné začátečnické nadšení, kdy někdy vzniká dojem, že autorka chce něco *a priori* dokázat nebo změnit a pak zklamane konstatoje, že se to „bohužel“ nepovedlo. Také

přístup k pravidlům českého jazyka je někdy velkorysý. Tyto formality jistě nediskvalifikují odbornou hodnotu práce, ale měly by diplomantku upozornit i na tyto aspekty odborné práce.

K autorce mám dva dotazy:

1. Mohla by autorka rozvést svou výslednou představu o monofyletické skupině koňovitých ve vztahu k aktuálním znalostem o vývojových vztazích na úrovni karyotypů?
2. Mohla by se blíže vyjádřit o své představě o vztazích mezi domácím koněm a koněm Převalského, včetně interpretace rozdílů v karyotypech?

Závěrem je možno konstatovat, že autorka předložila diplomovou práci, která svědčí o její schopnosti získávat a analyzovat odbornou literaturu na zadané téma, produkovat vlastní laboratorní výsledky, zhodnotit získané informace, pod odborným vedením je uspořádat a prezentovat je. Předložená diplomová práce naplnila příslušné požadavky a proto doporučuji její přijetí k obhajobě s hodnocením **velmi dobře**.

V Brně dne 20. května 2011

Petr Hořín

