

**Posudek Diplomové práce Bc. Jany Marešové  
„Fylogeografie perleťovce mokřadního (*Boloria eunomia*) a srovnání  
s podobně rozšířenými druhy“**

Vypracoval Mgr. Oldřich Říčan, Ph.D.

Práce je sepsána čtivě, srozumitelně, informativně, a věcně, s malým množstvím překlepů či gramatických nesrovnalostí, obsahuje veškeré očekávané kapitoly, a neobsahuje tak časté obecné písemnictví.

Metody jsou v podstatě popsány dostatečným způsobem, ale to pouze dokud se nezačnou číst výsledky, a bohužel byly metody neúplně (body 2 a 3) a zčásti i špatně (bod 4, bod 1?) použity.

Dotazy k metodám:

(1) Při PCR bylo ve všech případech použito 40 cyklů. Proč tomu tak bylo, je si autorka vědoma tohoto úskalí a rizika?

(2) U tvorby datované fylogeneze v BEASTu je uvedeno jak byl vybrán substituční model, ale není uvedeno jakým způsobem bylo naloženo s jednotlivými geny (markery). S popsaného se mi zdá, že byly všechny tři markery spojeny jako jeden dataset a tak i analyzovány. To mi nepřijde nejšťastnější. Očekával bych alespoň rozdělení jaderných a mitochondriálních, a také zohlednění kodónových pozic. Doporučuji toto udělat pro případný pokus o publikování.

(3) Vzhledem k bodu 1 nebyla provedena analýza potenciálních konfliktů mezi mitochondriálním a jaderným fylogenetickým signálem. Pokud konflikty existují, jedná se u kombinované analýzy o něco mezi dvěma pravdami. Stálo by za prozkoumání zda konflikty existují a pokud ano, postupovat podle bodu 1, v případě četným a zásadních konfliktů pracovat s oddělenými jadernými a mitochondriálními daty. Konflikty tohoto typu mohou napovědět o různých historiích obou pohlaví.

**(4) Bohužel pro výsledek celé práce byl špatně vybrán model v BEASTu, kterým měl u vnitrodruhové studie být koalescenční a ne speciální. Nejen z logiky věci a popisu v manuálu k BEAUTi ale i z mé vlastní zkušenosti toto ovlivní výsledky zcela diametrálně (každý terminál je ve zvoleném modelu brán jako samostatný druh a vztahy mezi terminály jsou speciální události!).** Při výběru koalescenčního modelu je pak třeba předem na stejných datech otestovat pomocí *skyline plots* jaký koalescenční model vybrat (to už jsou ale titěrnosti a výběrem *constant size* modelu bych byl ukolébán – i když bych se samozřejmě zeptal ...).

Výsledky

Z výsledků jsem získal dojem, že pro datování a rekonstrukci stromu v BEASTu byl použit pouze dataset z mt DNA genu COI. Nikde to ale není vysloveně napsáno, takže se spíše domnívám. To by ale odpovídalo na mé dotazy 1 a 2, až na to, že datování a topologie jsou pak pouze na základě mt DNA (což už se dnes bohužel – přesto že na takovýchto datech vznikla fylogeografie jako obor – skoro nedá publikovat).

Dotazy k výsledkům:

(5) Z jakého datasetu tedy byly vytvořeny stromy v BEASTu? Podle velmi neporovnatelného počtu sekvencí získaných pro jednotlivé geny hádám že pouze z mt DNA genu COI.

(6) Proč byl u *B. eunomia* analyzován jaderný gen Arginine Kinasa, kdežto u druhu *B. selene* gen Wingless? Nikde v metodách to není zmíněno, naopak z metod jsem měl dojem že byly pro oba druhy analyzovány tři geny.

(7) Haplotypová síť genu Wingless u druhu *B. selene* vykazuje strukturu podobného rozsahu jako u jiných genů i u druhého druhu, přesto je vše obarveno jen jednou barvou a čtenář tak

nemá možnost si prostudovat, kdo je kdo na mapě a v síti (už trpím stařeckou dalekozrakostí, ale díky mladické krátkozrakosti jsem po sundání brýlí pochopil, že tmavší fialovou barvou je Amerika ☺).

(8) Zcela pedantsky správně by měly pro BEAST analýzu být terminály kolabovány do haplotypů, neboť jinak (ale ani tady, já to často taky nedělám a pak se musím bránit) nemůžeme očekávat zcela štepnou evoluci.

Práci doporučuji k obhajobě, ale bohužel pro chyby v analýzách (které ale tvoří kostru celé práce) musím navrhnout hodnocení stupněm velmi dobře, přestože neanalytická (diskusní) část práce je výborná.

V Č. Budějovicích, 20. května 2015

Mgr. Oldřich Říčan, Ph.D.



## Posudek diplomové práce

**Práce: Fylogeografie perletovce mokřadního (*Boloria eunomia*) a srovnání s podobně rozšířenými druhy**

**Autorka: Bc. Jana Marešová**

Pracoviště: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Přírodovědecká fakulta

Školitel: RNDr. Zdeněk Faltýnek Fric, Ph.D.

Konzultant: M.Sc. Pavel Fortunato Matos Maravi

Oponent: Ladislav Bocak, Ph D., Universita Palackého v Olomouci

Předložená práce se zabývá fylogeografií dvou druhů motýlů a autorka studovala tři molekulární markery pro konstrukci haplotypových sítí a datování evolučních událostí. V úvodní části práce autorka přináší podrobný literární přehled, dále velmi podrobně popisuje metodiku práce, především laboratorní postupy. Výsledky jsou uvedeny srozumitelně a na jejich základech je předložena diskuse.

Práci jednoznačně hodnotím jako velmi nadprůměrnou a bylo mi potešením zpracovat posudek. Kombinace vlastní laboratorní práce, analýzy výsledků a předložení smysluplného vyhodnocení v diskusi si zaslouží uznání.

### **Doporučuji práci k obhajobě a její pozitivní hodnocení.**

Dále uvádím některé připomínky a dotazy, které jsou spíše náměty do diskuse. Část připomínek upozorňuje na chyby formálního charakteru a není nutno se k nim při obhajobě vyjadřovat (veškeré stránkování dle elektronické pdf verze, kurzivou citace z práce).

p. 8: *Boreální druhy v Severní Americe a Evropě přežily na jih od ledovce a na severovýchodě Palearktického regionu, kde ledovec nebyl.*

- nepřesné vyjádření, protože severovýchodní část palearktické oblasti není ani součástí Evropy ani Severní Ameriky

pp. 9-10

*Tento druh byl poprvé popsán Esperem roku 1799 jako Papilio eunomia. Hübner tomuto popisu nevěnoval pozornost a roku 1800 druh popsal pod novým názvem Argynnis apherape, pod tímto jménem byl druh známý až do té doby, kdy Reuss znovu objevil původní Esperův popis a druhové jméno apherape označil jako mladší synonymum eunomia a proto je tedy považováno za název neplatný (Mayr & Ashlock 1991).*

Zde autorka komentuje nomenklatorickou situaci, která je mimo evidentně její obor. Při popisu těchto situací jsou obvykle uváděny originální binomeny a autorství jména a nepoužívají se obraty jako "poprvé popsal" - stanovení druhu je akt, který nastane

pouze jednou z definice nebo "nevěnoval pozornost". Synonyma vzniklá tímto způsobem označujeme jako mladší subjektivní synonyma a je správnější citovat autora, který zjištění publikoval (to chybí) a nikoliv obecnou učebnici systematické zoologie (Mayr & Ashlock 1991).

Dále následuje výčet poddruhů. Poddruhy se označují trinomenem, použití závorek je řízeno pravidly - je nepravděpodobné, že by Korshunov (1997) nesprávně zařadil popsaný taxon do jiného rodu, zcela nesprávné je uvedení autora u poddruhu označeného jako *caelestis*.

Nejsem specialista na Nymphalidae, ale tyto poddruhy mi připadají jako taxonomicky velmi pochybné entity a asi by autorka měla vyjádřit názor na jejich delimitaci nebo jejich existenci ignorovat. Především, když její výsledky ukazují na neopodstatněnost delimitace tak vysokého počtu poddruhů a když se v dalším textu hodnocení taxonomického chaosu ve skupině nevěnuje.

p. 15 ... *fytoecnologicky před přítomností květů P. bistorta, a podruhé na pcháči bahenním (Cirsium palustre) po rozkvětu P. bistorta.*  
- pravděpodobně měla autorka na mysli "fenologicky"

- p. 19: Zaujal mne cíl datovat extinkce (*Odatovat biogeografické události (disperze/extinkce)*). Jak autorka zjistí, že v některé líní/oblasti došlo k extinkci?

p. 20 Metodika

*Veškerý materiál byl shromážděn školitelem (Z. Faltýnek Fric) za velké pomoci Gabriela Nèva, Jana Ch. Habela, Marcina Sielezniewa, Aloise Pavlíčka a Martina Konvičky.*

- tento text patří spíše do poděkování, doporučuji: technický styl, informace v tabulkách (případně včetně sběratelů), krátké slovní shrnutí v textu.

#### - **Alignment**

Informace o metodě alignmentu jsou velmi neúplné. Byly všechny sekvence zcela délkově konstatní? Byla kontrolována translace na aminokyseliny a možnost přítomnosti nelegitimních stop kodonů?

#### - **Datování evolučních událostí v programu Beast**

*Pro výpočet molekulárních hodin.....*

V práci není hodnocena mutační rychlost ani testována možnost konstantní mutační rychlosti (molecular clock hypothesis). Akceptuji, že je použité nastavení "relaxed clock" bez testování konstantní mutační rychlosti, ale není možné napsat, že byl proveden výpočet molekulárních hodin.

Formálně závažnější je použití kalibračních bodů bez uvedení, na čem jsou založeny - převzato z jiné publikace?

Není uvedeno hodnocení konvergence, není uveden burn-in před kombinací běhů. To je nutno pro případnou publikaci doplnit.

Byly parametry pro jednotlivé pozice kodonů vypočteny samostatně nebo byla provedena pouze optimalizace pro všechny pozice?

### **Fylogenetická analýza**

Fylogenetické stromy byly vyprodukovány v programu Beast, který je pro tento účel nevhodný. Tento program často vytvoří topologie nekonzistentí s jinými metodami.

— Proč nebyl alignment analyzován metodou maximum likelihood nebo bayesiánskou analýzou s použitím programu MrBayes?

Získání souboru stromů z bayesiánské analýzy by umožnilo rekonstrukci ancestrálních území.

p. 25

*které se shoduje se štěpením větví v kladogramu (Obrázek 7).*

Na obrázku 7 není uveden kladogram. Mužete uvést jaký typ fylogenetického stromu je uveden na obr. 7?

p. 30

v legendě k obrázku 7 je uvedeno " čísla nad větvemi označují podporu". Vzhledem k tomu, že strom byl vytvořen bayesiánskou analýzou jedná se o zpětné pravděpodobnosti, ale podstatnější je fakt, že přes velmi nízké zpětné pravděpodobnosti není tento fakt nikde diskutován. Jaký je názor autorky na tak nízké hodnoty?

Diskuse

p. 39

*Zjištěná vysoká genetická diferenciacce mezi oběma regiony nejspíš souvisí s různými ekologickými podmínkami, kterým se musel motýl v průběhu času přizpůsobit (Hope et al. 2013).*

— Dotaz: domníváte se, že použité markery jsou přímo vystaveny selekci různými ekologickými podmínkami?

p. 40

*Populace z francouzské lokality Morvan jsou vysoce příbuzné s ardenskými a je to díky tomu, že do Morvanu byl motýl právě z Belgie nedávno reintrodukovan.*

Diskusi bych omezil na přírodní procesy. Vedle vlivu glaciálů a interglaciálů působí umělá introdukce v 70. letech, jako zcela jiná tematika. Zjištění je triviální a odvádí od mnohem cennější diskuse založené na Vašich výsledcích.

Nepřesná vyjádření:

*a žír provádějí pouze v noci ..... žerou v noci*

*Ke snůšce vajec dochází v červnu .... kladou vajíčka*

*výhřevný opad ..... výhřevnost je množství energie získatelné spálením, to asi nemá autorka na mysli.*

*pocházejí z orientálního refugia ..... zde bych se vyhnul pojmu "orientální", protože to evokuje vazbu na orientální zoogeografickou oblast, což není pravda.*

*V mikrozkmavce by měla být izolovaná DNA. .... DNA sice není vidět, ale nejistota, kde je po izolaci DNA, není na oprávněná.*

*Pro první část COI ..... 3' nebo 5' část genu? Použijte technické označení*

*Produkty, které se po elektroforéze ukázaly jako úspěšné, ..... úspěšná je amplifikace, nikoliv produkt*

*Tento model byl použit přes grafické rozhraní MrMTgui ... program byl ovládán přes grafické rozhraní*

*U druhu B. eunomia byly populace zařazeny ..... Populace B. eunomia byly zařazeny ...*

*Jednotlivé sekvence byly po úpravě a sjednocení zkráceny na 672 bp. ... Co má autorka na mysli "sjednocení sekvencí"?*

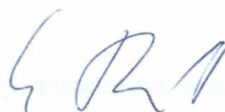
*V obou případech se projevila výrazná genetická diferenciacce mezi Palearktickým a Nearktickým regionem. .... Poznámka: tyto regiony se geneticky nediferencovaly, diferencované jsou DNA markery. Jedná se jen o nepřesnost, ale je nutné vyhnout se takto zkratkovitým vyjádřením.*

#### Seznam literatury

Množství překlepů a chyb ve formátu.

- různé pomlčky při uvedení stránek
- uvádění čísel v rámci ročníku i pokud jsou stránky v ročníku průběžně číslovány (někdy ročník uveden, jindy ne)
- tečka za názvem časopisu, před uvedením ročníku
- uvedení university v citaci kvalifikační práce (srovnej citace Gorbunov a Graton)
- jméno časopisu plně vysááno (většinou), uvedeno zkratkou (Holdhaus 1954)
- mezera mezi ročníkem a dvojtečkou, mezera za dvojtečkou, mezery kolem pomlček atd.

V Olomouci, 7. 5. 2015



Ladislav Bocak, Ph D.