

**Posudek Diplomové práce Bc. Michala Rindoše**  
**„Molekulární fylogeneze a historická biogeografie lišajovitých rodu**  
***Agrius* (Lepidoptera: Sphingidae)“**

Vypracoval Mgr. Oldřich Říčan, Ph.D.

Úvod práce je sepsán čtivě, srozumitelně, stejně tak metody, se zbytkem práce už je to mnohem horší. Některé kapitoly mohly být zcela vynechány nebo velmi zredukovány (kap. 1.2. Fylogeneze lišajovitých, která se práce vlastně vůbec nedotýká; kap. 1.3. Biogeografie lišajovitých měla být zaostřena pouze nebo více na studovaný rod; kap. 3.2. Izolace DNA je zbytečně detailní – vše se prostě dělo podle standardního protokolu; kap. 3.4. Elektroforéza opět mohla být obsloužena jednou větou).

**Metody** jsou v podstatě popsány dostatečným způsobem co do délky a způsobu popisu, ale už ne co do obsahu.

- (1) Při PCR bylo ve všech případech použito 40 cyklů. Proč tomu tak bylo, je si autorka vědoma tohoto úskalí a rizika? (... stejný dotaz jako nedávno (už jsou to 2 roky ?) na kolegyni Marešovou)
- (2) U tvorby datované fylogeneze (BEAST) není nikdy uvedeno jakým způsobem bylo naloženo s analýzou jednotlivých markerů (opět stejný dotaz jako na k. Marešovou ... ?)
- (3) Byla provedena analýza potenciálních konfliktů mezi mitochondriálním a jaderným fylogenetickým signálem? (opět viz k. Marešová ... ?)
- (4) (BEAUTI/BEAST) Proč byl použit model striktních molekulárních hodin?
- (5) (BEAUTI/BEAST) „Mimo kalibrace uzlů byly všechny ostatní „hodnoty“ ponechány v přednastavené podobě“. Co priors, všechny nemohli být ponechány přednastavené?
- (6) (BEAUTI/BEAST) U kalibračních uzlů nejsou uvedeny konfidenční intervaly a vypadá to že ani do analýzy nevstupovaly? Jak přesně byly kalibrace zadány v BEAUTI?
- (7) (BioGeoBears) Jak byly defonovány hranice oblastí (str. 17), kde jsou např. v analýzách hranice Severní, Střední a Jižní Ameriky, kde je hranice Afriky? Proč tyhle oblasti a ne nějaké adjustované marko-ekoregiony ? Bylo něco takového zkoušeno?
- (8) (BioGeoBears) Proč byla použita pouze DEC analýza?

Drobné dotazy (připomínky):

- Co znamená „amplifikovat použitelný výsledek“? (str. 14)
- Co je hlavním úkonem prováděným v Geneiousu (já to vím, jen že v práci se to nepíše)? (str. 16)

**Výsledky** jsou jednoznačně nejslabší kapitolou práce, Jsou chaotické, téměř neorientovatelné (např. chybí odkazy na zrovna popisované obrázky, přeskakuje se bez oznámení z fylogeneze/biogeografie rodu na fylogeografii druhů), a velmi často zcela špatně interpretované. Legendy obrázků jsou zcela nedostatečné. Většina kladogramů je zcela nečitelných a neposkytuje potřebné informace.

**Kap. 4.1. Fylogeneze r. *Agrius* a obr. 10**

- (1) Každý druh byl v analýze reprezentován jedním jedincem?
- (2) V obr. 10 chybí:
  - Podpory uzlů;
  - Pravděpodobnosti rekonstrukce biogeo na uzlech;
  - Konfidenční intervaly datování uzlů;
  - Legenda oblastí a mapa s hranicemi;

- (3) Proč má stejný ancestrální areál na třech bazálních uzlech vždy jinou barvu?
- (4) Byly areály outgroupů zahrnuty to biogeografické analýzy?
- (5) Jak to, že jsou oba kalibrované uzly starší než je jejich kalibrační čas?
- (6) Jak to, že je strom v podstatě vikarianční, i když byl použit DEC model?
- (7) Jak to, že v celém textu práce není ani jednou o vikarianci, která vyšla, žádná zmínka a je místo toho argumentováno, že v této analýze vyšly dálkové disperze (či dokonce migrace?).
- (8) Jak je možné, že Indie je rekonstruována u uzlu spojujícího druhu sp., *convolvuli*, *godarti* a *rothshildi*?
- (9) Jak byly vlastně areály druhů pro biogeo analýzu do analýzy zakódovány?
- (10) Je strom zkonstruován z obou genů (není to nikde v legendě ani v textu výsledků), jak bylo naloženo s oběma geny? (viz otázka u metod).
- (11) Nesrovnalosti s datováním mezi textem a obr. 10:
  - Text uvádí 6.9 Ma pro odštěpení předka *convolvuli*, obr. 10 ukazuje ca 7.5 Ma;
  - „Tento předek se pak rozštěpil na dva samostatné druhy před 1.7 Ma“ – Nic takového na obr. 10 není, tam je něco přes 5Ma;
  - ... „*A. convolvuli* je parafyletický“ – Nic takového na obr. 10;
  - ... „první [vyspecioval?] *A. godarti* před asi 1.3 Ma“ – Nic takového na obr. 10 není, je tam ca 5 Ma;
  - ... *A. rothshildi*, „který recentně vzniknul na Nové Kaledonii“ – nic takového na obr. 10 není, opět je tam 5 Ma;
  - ... „odštěpil *A. luctifera* před ca. 3.4 Ma – na obr. 10 je 4 Ma.
  - ... „*A. cingulata* se odštěpuje pře ca 2.5 Ma – na obr. 10 je *cingulata* sesterský *luctifera* a uzel je 4 Ma.

#### **Kap. 4.2. Historická biogeografie r. *Agrius* (také obr. 10 (??))**

- (1) „Starý svět byl zřejmě kolonizován z Afriky, a to před ca. 5.7 Ma“ – obr. 10 nic takového neukazuje, je tam naopak vikariance ze širokého areálu, která se ale netýká specificky jen Afriky.
- (2) „Z Austrálie, ...byla kolonizována i Indonésie a přes ní opakovaně Oceánie“ – nic takového na obr. 10 není, obr. 14 je nečitelný, navíc se v názvu kapitoly mluví o biogeo rodu, obr. 14 je fylogeo *A. convolvuli* – chaos nad chaos.
- (3) Pokračuje mnoho kolonizačních „výsledků“, nic z nich ale není na obr. 10, a obr. 13-14 neobsahují žádnou biogeo analýzu. Stejně ale není poznat, o čem se zrovna v této kapitole píše (o biogeo rodu?, o fylogeo jednotlivých druhů“?, kdy o kterém? – prostě chybí struktura a odkazy na obrázky).
- (4) „Výsledek v obr. 10 naznačuje že předek r. *Agrius* byl pravděpodobně zdatným letcem se schopností dálkových disperzí a tedy i kolonizace vzdálených kontinentů“ – NIC takového obr. 10 neukazuje, znovu opakují, že ukazuje vikariance (samozřejmě extrémě podezřelé z mnoha důvodů).

#### **Kap. 4.3. Vnitrodruhová diverzita *A. convolvuli***

- (1) „dva (haplotypy?) byly vyhodnocené jako nevyhovující“ – jak?, na základě čeho?
- (2) Vůbec jsem nepochopil důvod ani provedení ani výsledek „klastrované“ TCS, zřejmě ani autor, neboť (u obou obrázků) je v textu popisován pouze výsledek klasické TCS.

#### **Diskuse**

„Hlavním cílem bylo sestavit fylogenezi (to se moc nepovedlo, nebo lépe řečeno to není možné posoudit – viz mnoho bodů výše) a pokusit se rekonstruovat ancestrální distribuci lišajů rodu *Agrius* (ano, u pokusu to zůstalo).“

Nemá moc cenu rozebírat Diskusi vzhledem k charakteru výsledků ... opakují se interpretace, které na obrázcích výsledků prostě nejsou.

#### **Závěr (práce)**

„Molekulární fylogeneze a biogeografie prezentovaná v této práci ozřejmuje historii lišajů rodu *Agrius* (NE), fylogenetické vztahy mezi druhy.“ (TĚŽKO POSOUDIT – výsledky to neumožňují) a jejich rychlou expanzi napříč starým a novým světem (na rodové úrovni NE, na druhové úrovni obr. nečitelné, chybi biogeo analýzy)

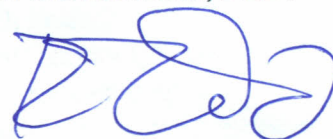
„Rekonstrukcí hist. biogeo předkládaná práce osvětluje disperzní schopnosti předka (NE) a poukazuje na fakt, že migrující druhy jsou starší [než endemitní].“ (NE – jsou v obr. 10 2x sesterské, čili stejně staré – to ale navíc mluvíme pouze o liniích oněch druhů, ne o druzích samotných – viz. např str. 31, kde se píše, že druh vznikl před 6.9 Ma – nic takového, to je pouze datum oddělení jeho linie od linie nejbližšího v analýze zahrnutého druhu)

#### **Závěr (oponenta)**

Práci doporučuji k obhajobě, ale bohužel pro chyby v analýzách, interpretaci jejich výsledků a v podstatě díky tomu nesplnění cílů musím navrhnout hodnocení stupněm dobře. Očekávám, že mnohé se snad vyjasní při obhajobě.

V Č. Budějovicích, 19. května 2017

Mgr. Oldřich Říčan, Ph.D.



## Oponentský posudok na diplomovú prácu

Názov práce: **Molekulární fylogenéze a historická biogeografie lišajovitých rodu *Agrius* (Lepidoptera: Sphingidae)**

Diplomant: **Bc. Michal Rindoš**  
Přírodovědecká fakulta  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

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

Oponent: Mgr. Peter Kaňuch, PhD.  
Odd. ekológie živočíchov, Ústav ekológie lesa SAV, Zvolen

Predložená (slovensky a niekde československy ;-)) písaná) diplomová práca je výsledkom molekulárneho výskumu fylogenézy, biogeografie ale aj ekológie skupiny motýľov, pre ktoré je charakteristický rýchly/výkonný let, pričom niektoré druhy migrujú na vzdialenosť aj vyše 1000 km a zaujímavá ko-evolúcia zmyslov a správania s ich hlavnými nočnými predátormi. Tieto vlastnosti z nich robia nesporne atraktívny objekt evolučného bádania. Práca je členená do štandardných kapitol a diplomant pri jej písaní vychádzala tiež z poznatkov publikovaných v cca 80 recentných a/alebo historicky zásadných zdrojoch svetovej literatúry. **Jedná sa teda o štandardnú diplomovú prácu, ktorá ako rozsahom, tak i formou a hlavne kvalitou pôvodných poznatkov v plnej miere vyhovuje súčasným požiadavkám pre takéto typ prác v danom študijnom odbore.**

Michal Rindoš už v úvode práce dokazuje jeho veľmi dobrý prehľad v študovanej problematike. Jednak čo sa týka fylogenetických rekonštrukcií ale tiež samotnej zoologickej systematiky študovanej skupiny. Diplomant vo svojej práci prezentuje veľké množstvom zozbieraných genetických údajov zo štyroch druhov motýľov vybraného rodu *Agrius*, čo je na jednej strane chvályhodné, na druhej strane je medzi jednotlivými druhmi veľké rozdiely v počte vzoriek. Možno by stačilo preto sústrediť prostriedky iba na posledný z troch definovaných cieľov a teda zamerať sa len na detailnejšiu fylogeografickú analýzu *A. convolvuli* (kde je aj najviac údajov) a osobitne v súvislosti s jeho migračným správaním. K práci nemám žiadne ďalšie zásadné pripomienky a preto v nasledujúcej časti by som chcel upozorniť iba na niekoľko drobných nedostatkov, ktoré som v práci našiel, prípadne by som si dovoľil položiť pár otázok či navrhnúť možné úpravy, ktoré by sa mohli hodiť pri zostavovaní publikácie, ktorá predpokladám bude konečným výstupom Michalovej práce.

X x Ciel' č. 3 – Potrebné špecifikovať akej úrovne vnútro-druhových rozdielov sa analýza má týkať.

- x x Kap. 3.3. resp. 3.5. – Nie je uvedená dĺžka fragmentov (bp), ktoré sa amplifikovali, resp. na akú dĺžku boli orezané pre analýzy.
- x x Kap. 3.3. – Nerozumiem aká prvá časť génu COI. Bola potom sekvenovaná aj druhá časť a nejaká sa spájali do jednej sekvencie?
- x x Kap. 3.3. – Štandardne sa uvádza PCR recept vo finálnych koncentráciách a nie v objemoch.
- x Kap. 3.3. – Aká bola koncentrácia genomickej DNA v ng/μL? Bola nejaká variabilita v kvalite extrahovanej DNA rámci veku suchých vzoriek?
- x Tab. 1 – Prečo je všade <sup>col</sup>časť „1“? Pri charakteristike <sup>pr</sup>primerov by bol asi praktický nejaký ilustračný obrázok, ktoré časti COI sa danými primermi amplifikovali.
- x x Kap. 3.4. – Farbivo SYBR Green sa používa na morenie agarózového gélu a teda na vizualizáciu DNA pod UV spektrom. Do gélu sa nakladá PCR produkt zmiešaný s ďalším farbivom aby bolo vidieť či sa uložil dobre do jamky.
- x x Kap. 3.5. – Akým algoritmom sa robil alignment sekvencií?
- x Kap. 3.6.4. resp. 4.4. – Pri parametroch diverzity by bolo dobré použiť nejaké rarefaction na kontrolu rozdielnej veľkosti vzoriek vo vybraných geografických oblastiach.
- x x Kap. 4. prvý ods. – Toto je nejasné. Ak bolo 323 sekvencií, tak čo sa ďalej amplifikovalo? Prvý úsek génu COI a kde je druhý úsek? Všetky sekvencie prvého úseku COI boli skrátené a upravené na 688 bp? Akej dĺžky bp bol fragment Wingless génu?
- x Kap. 4.1. a 4.2. – Zdá sa mi málo pravdepodobné, žeby parafyletický výsledok mohla spôsobiť kontaminácia DNA behom izolácie. Môže byť kontaminované hocičím... Aký bol relatívny rozdiel sekvencií?
- x x Obr. 9 – Hodila by sa legenda aby sa nemuselo dedukovať ktorým druhom, ktoré symboly asi patria.
- x x Obr. 10 – Čo je to za vzorku „AU sp“?
- x Kap. 4.3. – Skutočne sa možno domnievať, že migračné správanie je haplotypovo špecifické? Nebude daný výsledok spôsobený len tým, že daný haplotyp je dominantný a tým pádom bol častejšie evidovaný v Európe? Podľa prílohy 1 je Hap\_06 aj v Ázii a inde. Existujú podobné príklady takýchto významných behaviorálnych rozdielov determinovaných podľa haplotypu aj u iných druhov?
- x x Obr. 11 a 12 – V týchto obrázkoch nevidím označenie haplotypov ako v prílohe 1. Namiesto týchto prezentovaných haplotypových sietí by bolo lepšie zobrazenie distribúcie a frekvencie haplotypov na geografickom podklade v mape. Toto by výrazne sprehľadnilo prezentovanú informáciu. Rozsiahle tabuľkové prílohy sú žiaľ dosť neprehľadné.
- x Kap. 4.4. – Existuje pri genetickej diferenciácii geografických oblastí nejaká korelácia s ich vzájomnou vzdialenosťou alebo závislosť od stupňa izolácie či rozlohy

vzorkovaného územia? Pri analýze molekulárnej variancie by bolo vhodnejšie použiť priestorovú SAMOVA, kde sú zohľadnené aj geografické koordináty populácií.

- x Kap. 5. – Asi by som nezačínal diskusiu opakovaním výsledkov ale by som v prvom odseku zosummarizoval najhlavnejšie zistenia, ktoré sa následne budú diskutovať.
- x Kap. 5.1. a 5.2. – Porovnávanie s uvádzanými dvoma druhmi vtákov (mixovanie inak len s motýľmi) asi nie je celkom vhodné. Navyše sú aj lepšie príklady migrantov ako drozdy.

Vyššie uvedené poznámky a otázky neznižujú úroveň predloženej diplomovej práce a preto si dovoľím konštatovať, že je kvalitným príspevkom v danej problematike. Získané údaje sú dostatočné pre vyvodenie prezentovaných záverov. **Michal Rindoš preukázal schopnosť odborne pracovať pod vedením svojho školiteľa.** Prácu preto odporúčam k obhajobe a navrhujem **hodnotenie "výborne"**.



Vo Zvolene, 20. 5. 2017

