

POSUDEK NA MAGISTERSKOU DIPLOMOVOU PRÁCI
J. CHLUMSKÝ: SROVNÁNÍ *MELAMPYRUM BOHEMICUM* S PŘÍBUZNÝMI TAXONY A
REVIZE AKTUÁLNÍHO ROZŠÍŘENÍ

Práce Jana Chlumského je pokusem o moderní taxonomickou syntézu různých postupů, vedoucích k bližšímu poznání taxonomicky relevantní variability studované skupiny rostlin, jíž je v tomto případě tzv. „*Melampyrum subalpinum* agg.“. Práce navazuje na předběžné morfometrické studie komplexu školitele M. Štecha a doplňuje je o výsledky hybridizačních experimentů mezi druhy *Melampyrum nemorosum* a *M. bohemicum*, analýzou obsahu DNA pomocí průtokové cytometrie (dále FCM) a isoenzymovou analýzou 4 systémů. Děle přináší revizi aktuálního rozšíření druhu *M. bohemicum* na území ČR včetně cenných informací o velikosti a stavu nalezených populací. Jde tedy o poměrně ambiciózní studii, která měla ve svém zadání potenciál významně přispět k vyřešení taxonomické problematiky studovaného komplexu.

Práce je psána formou klasického rukopisu v rozsahu 50 stran s 5 přílohami, obsahujícími lokalizaci studovaných populací, vegetační fytoocenologické snímky na lokalitách *M. bohemicum* a ilustrativní fotografickou dokumentaci. Formální grafická úprava práce je na velmi dobré úrovni, množství překlepů je vcelku nízké, vyjádření jsou až na výjimky dobře srozumitelná. Seznamu citované literatury se bohužel některé nepřesnosti nevyhnuly, např. rukopisy a knižní publikace jsou citovány nejednotně, zkracování jmen časopisů není zcela konzistentní, citace Otto 1991 je neúplná, v některých případech je porušeno abecední pořadí, jednotlivá čísla ročníků by se neměla uvádět.

Autor v podstatě dosáhl cílů, jež si v úvodu své práce vytkl a výsledky FCM i isoenzymových analýz, hybridizačních experimentů i praktické revize našich lokalit lze označit za zajímavé, slibné a – co je jistě pro autora i čtenáře zejména potěšující – podporující značnou část z logicky postulovaných apriorních hypotéz, ať již byl autorem těchto hypotéz školitel či autor sám. Přesto musím konstatovat, že uplatněný postup a metodika řešení, spolu s mému myšlení poněkud vzdálenější logikou uspořádání a obsahu jednotlivých kapitol podle mého názoru není zcela ideální a bude patrně bránit přinejmenším snadné transformaci rukopisného textu na publikovatelný výstup.

Ukázkou ne zcela konzistentně promyšleného postupu najdeme již v názvu a úvodních kapitolách při definici výchozích studovaných taxonomických jednotek. Autor, jak lze vydedukovat z textu, v podstatě přijímá jako východisko své práce názor Štecha, že úzkolistý taxon studovaného komplexu černýšů, známý z Rakouska pod jménem *M. angustissimum* a od nás a ze Slovenska jako *M. bohemicum*, jsou totožné, a jsou varietou širokolistého, morfologicky variabilního a pravděpodobně hybridogenního taxonu *M. subalpinum*, známého z oblasti Vídeňského lesa. Přesto podle názvu jde v práci o srovnání *M. bohemicum* (tedy *M. subalpinum*, ať už je správné jméno druhu to či ono) s příbuznými taxony (jimiž je ovšem ve studovaném území nanejvýš *M. nemorosum*, které je práci pojednáno spíše okrajově). V práci je většinou označován „rakouský“ úzkolistý taxon jako ‚*M. angustissimum*‘ a český a slovenský jako ‚*M. bohemicum*‘, přestože nikde není prezentován jediný důvod (snad kromě státní příslušnosti rostlin a botanické tradice) pro oddělování českých a slovenských od rakouských populací. Pokud by již autor svou práci chtěl ještě jednou prokázat nemožnost geografické definice „tradičních“ taxonů, měl patrně přinejmenším slovenské populace rovněž nazývat zvláštním jménem. Používání jména ‚*M. subalpinum* s.str.‘ pro širokolisté populace z Vídeňského lesa je navíc v tuto chvíli nejisté, jak autor sám na základě Reinerovy práce (str. 6) přiznává.

V úvodních pasážích (kap. 1.2.2) autor rovnou popisuje variabilitu „skupiny *Melampyrum subalpinum* agg.“, aniž by předtím tuto skupinu a její taxony definoval. Pro pochopení dalšího textu by jistě bylo užitečné sumarizovat, jak dřívější autoři vlastně ‚*M. angustissimum*‘ a ‚*M. bohemicum*‘ odlišovali, resp. jestli bylo odlišné od pojetí autorů Flora Europaea. Není vlastně jasné, zda autorovo pojetí *M. bohemicum* (kap. 1.2.3) odpovídá našemu staršímu, užšímu pojetí nebo už zahrnuje nové poznatky – totéž se týká mapky na obr. 1 – zahrnuje již v práci provedenou revizi nebo ne? Kapitola 1.2.5 o velikost jaderného genomu je poté značně neorganicky zařazena.

Dotazy k metodice:

- Mělo použití konkrétních 4 enzymatických systémů v analýze jiný než pragmatický význam?
- Nerozumím použití termínu subpopulace v kap. 2.2 (str. 14) „souvislý výskyt rostliny na větším území“? Jak byly vybírány lokality pro pořízení snímků?

- Jak byly vybírány rostlin pro FCM a isoenzymové analýzy 2.3 (15), jak byl jejich výběr korelován a jak se vťahoval k vyčteným cílům? Zejména se mi zdá, že spíše než deklarovaným pokusem o prokázání hybridogenního původu široolistých populací *M. subalpinum* výběr směřoval k postižení genetické variability *M. subalpinum* s.l. v populacích z různých arel výskytu. Byly nějak korelovány populační odběry pro tyto analýzy s dřívějšími populačními odběry vzorků na morfometrii? Proč vlastně nebyly analyzované populace morfometricky proměřeny – takto lze o vztahu zjištěné genetické variability a morfologie rostlin pouze spekulovat (například několikrát opakované tvrzení o morfologické identitě geneticky izolovaných populací ze Slovenska s našimi populacemi *M. bohemicum* může být pravdivé, ale rozumný důkaz v textu chybí, tyto populace nebyly analyzovány ani v práci Štecha (2006)).
- Metodika přípravy vzorku pro FCM odpovídala nebo neodpovídala uvedenému postupu (předposlední odstavec 2.3 (str. 16))?

K hybridizačnímu experimentu:

- V kapitole 3.1 se připouští nevyrovnaný počet zásahů vzhledem ke zničení některých květů, ale kolik jich vlastně bylo zničeno? K potvrzení neblahého tušení čtenáře o proniknutí opylovače do zakrytého květu, vyplývající z výsledků prezentovaných na Obr. 4, má autor odvalu se přiznat až v diskusi na str. 36.
- Negativní výsledek pokusu o vyklíčení hybridních semen nemá výpovědní hodnotu, pokud nebyla provedena úspěšná kontrola s výsevem semen nehybridních.
- Co myslí autor tvrzením (str. 36), že „hybrid se za tu dobu stačil vyvinout ve stabilní jednotku“ – v celé práci je přeci dokazována značná morfologická i genetická variabilita potenciálně hybridogenních populací!

K vegetační charakteristice:

- Jaký vlastně byl smysl mnohorozměrných analýz snímkového materiálu – očekával autor nějakou strukturovanou variabilitu vegetace v závislosti na ekologii, geografické polohy, příslušnosti k morfo- či cytotypům apod.? Mezi cíli práce toto nebylo.
- TWINSPAN rozdělil snímky na 2 hlavní skupiny podle 2. osy variability zjištěné DCA – mají gradienty 1. a 2. osy nějakou ekologickou interpretaci?
- V diskusi této kapitoly (4.2.1, str. 28) autor píše o jednotnosti vegetace na lokalitách *Melampyrum bohemicum*, doložené výsledky DCA, ale zároveň píše (odst. 2), že „dle druhového složení stromového patra a indikátorových druhů ... lze jednu část charakterizovat jako bory a jednu jako porosty se smrkem“ – to se zdá být pro nezasvěceného přeci jen poněkud odlišný vegetační typ?

K výsledkům isoenzymových analýz:

- je zajímavé, že PCoA ukazuje genetickou vzdálenost některých populací (Puchberg a Gumpoldskirchen) jako značnou, ležící na opačném konci gradientu hlavní osy variability, v UPGMA vychází jako téměř nejpodobnější (Obr. 14 vs. 13); autor si tohoto rozdílu povšimnul, komentář jsem však nenašel – lze to nějak vysvětlit?

V prvních dvou přílohách (obojí seznamy lokalit) není vysvětleno, k čemu se tyto lokality vztahují, lokality snímkovaných ploch byly pak nepochopitelně zařazeny jako tabulka do textu. U seznamu „nenalezených“ (mělo jistě být spíše neověřených) lokalit postrádám bližší identifikaci prohledávaného místa a vyjádření autora o pravděpodobnosti znovunalezení druhu.

V závěru bych poněkud protestoval proti tvrzení, že nebyla prokázána možnost hybridizace. Přestože hybridních semen málo, což ukazuje na existenci prezygotických nebo časné postzygotických reprodukčních bariér a semena nevzešla, což naznačuje (ale vzhledem k designu pokusu nepotvrzuje) existenci dalších postzygotických bariér, o jednoznačný důkaz se nejedná; zobecnění pro rakouské populace je pak zcela hypotetické. Lesníci budou bezpochyby protestovat proti tomu, že mýcení stromů a výsadba stromů nových jsou „nešetnými lesnickými zásahy“.

Přes větší množství výše uvedených připomínek práce celkově bezesporu splňuje nároky kladené na magisterské diplomové práce a jednoznačně ji doporučuji k obhajobě s hodnocením **velmi dobře**.

V Č. Budějovicích, 23.1.2007, Jan Kučera

Oponentský posudek na diplomovou práci

pana JANA CHLUMSKÉHO

Srovnání *Melampyrum bohemicum* s příbuznými taxony a revize aktuálního rozšíření

Metodicky svoji studii založil Jan Chlumský především na (i) hybridizačních experimentech, (ii) analýze velikosti genomu a (iii) rozboru genetické diverzity pomocí studia izozymů na vybraných populacích tří geograficky a morfologicky vymezených typů z příbuzenského okruhu *Melampyrum subalpinum* s. l. Experimentální jádro práce doplňují (iv) terénní záznamy o početnosti, stavu, přírodních podmínkách a cenologické příslušnosti českých a slovenských lokalit *Melampyrum bohemicum*. Práci doplňuje kvalitní rozbor stavu taxonomických přístupů k danému příbuzenskému okruhu. Celkový objem zpracovaných dat spíše překračuje obvyklý rámec diplomových prací. Zvolené metody jsou standardně využívány při biosystematickém a taxonomickém studiu a jejich zařazení do práce bylo nesporně krokem správným směrem. Pracnost a technická náročnost zvolených metod byla diplomantem úspěšně zvládnuta. Výsledky, kterých bylo analýzou dosaženo, jsou střizlivě interpretovány a diskutovány s potřebnou invencí a kritičností. Rozsah práce, množství užitých pramenů a typografické zpracování jsou na úrovni obvyklé u diplomních prací taxonomického zaměření.

Recenzní připomínky poznámky a náměty:

1. Za myšlenkové jádro práce považuji **potenciálně hybridogenní původ širokolistých populací *Melampyrum subalpinum***, který volá po důkazu na jiných než pouze geograficko morfologických indiciích přinesených v dřívějších podrobných studiích vedoucího práce Milana Štecha. Experimentální hybridizace, která dokazuje křížitelnost recentních populací a mohla by dokonce připravit materiál, pro morfometrické ztotožnění aktuálních hybridů s hybridogenními populacemi je v taxonomii využívána od 30. let 20. století (*Galeopsis*, *Gilia*). Je škoda, že negativní výsledek velmi pracných a jistě poctivě provedených experimentů nic závažnějšího v tomto směru nepřinesl. Rád bych proto, kdyby v tomto směru diplomant nastínil **(1.1.)** důvody, které jej vedly k zařazení této metody; **(1.2.)** jaké základní typy výsledků očekával a jak by je interpretoval; **(1.3.)** z jakých zkušeností experimentální hybridizace v rodu *Melampyrum* vycházel; **(1.4.)** v čem spočívají nevýhody či výhody rodu *Melampyrum*, pokud by měl být použit jako model pro studium experimentální hybridizace, **(1.5.)** zda se bylo možné opřít o zkušenosti z analogických studií v blízké příbuzných rodech, např. *Rhinanthus*, a konečně **(1.6.)** jak hodnotí frekvenci přirozené mezidruhové hybridizace v rámci (středo)evropských zástupců čeledi *Orobanchaceae* (sensu Agiosperm Phylogeny Group), kam je v současnosti rod *Melampyrum* řazen.

2. **Isozymové patterns** posloužily v minulosti vícekrát jako **efektivní důkaz** jak aktuální přirozené hybridizace, tak hybridogenních druhů v mnoha rodech angiosperm, pteridofyt či mechorostů (např. *Iris*, *Plagiomnium*, *Asclepias*, *Gymnocarpium*, *Phlomis*, *Polystichum*, *Ulmus*, *Polytrichastrum*, *Lycoris*), úspěšně byla v tomto směru tato metoda aplikována taky českými botaniky na hybridogenezi v rodech *Pilosella*, *Tragopogon*, *Potamogeton* a *Luzula*. **(2.1.)** Podařilo se ve spektru alel v jednotlivých testovaných enzymatických systémech nalézt nějaké druhově specifické alely, zejména v sympatrických populacích, kteréžto alely by mohly sloužit jako markery při důkazu hybridizace, nebo byly výsledky hodnotitelné pouze statisticky? **(2.2.)** Které další molekulární metody považuje

diplomant za efektivní při důkazu hybridogeneze (stačí uvést 2 nejčastější s vysvětlením podstaty metody a důvodu proč jsou při důkazu hybridogeneze přinášejí úspěch).

3. Obsah DNA může za určitých okolností také přinést důkaz o hybridogenezi. Vycházejíc z toho, že *Melampyrum* se neliší počtem chromosomů, měla být nejprve provedena pilotní studie jak se velikost genomu chová v rodu *Melampyrum* a jaké adaptivní vlastnosti lze v rámci tohoto rodu u velikosti genomu očekávat a teprve potom volit design studia tohoto znaku při řešení mikroevolučních otázek. Pokud se ale mýlím, nechť prosím diplomant vysvětlí **(3.1.)** proč takto nepostupoval. 3 + 10 měřených rostlin z populace je určitě dost, ale pouhých šest analyzovaných populací nemohlo prakticky nic přinést. Flow cytometrie je v Čechách neobvykle oblíbená metoda a přes nejvyšší koncentraci botanicky využívaných flow-cytometrů na jednoho obyvatele naší republiky, jsou cytometrické laboratoře ve vegetační sezoně beznadějně mnoho týdnů dopředu obsazeny, takže tuším důvody proč bylo analyzováno jen **šest** populací (Šest bylo i enzymatických systémů a šest bylo i fází kvetení v hybridizačních pokusech 666=d'ábelská kombinace, takže v tom mohl být i nějaký numerologický či rituální záměr, který může naznačovat i spojení *Melampyrum bohemicum* s kultem uctívání zemřelých viz foto J. Svobodové v příloze - **toto prosím nečíst u obhajob nahlas!!!**). **(3.2.)** Proč nebylo cytometricky analyzováno raději více populací s menším počtem opakování, namísto replikace 3+10 měření z každé populace? V metodice je o trochu mlhavě nastíněno použití PI a DAPI, což mohlo být napraveno doplněním údajů o fluorochromech v legendách grafů a tabulek, což se ale nestalo. **(3.3.)** Kdy a proč byl jako fluorochrom použit propidiumiodid a kdy DAPI? (Tj. v čem se tyto barvičky liší, co mají společného a v čem jsou jejich výhody nebo slabiny ve vztahu k interpretacím velikosti genomu?).

4. Cenologická data z lokalit určitého druhu jsou nesmírně komplexní výpovědi o jeho ekologiii. Protože práce, jak název napovídá, by měla být hlavně srovnáním taxonů, nechápu proč až filatelistická snaha navštívit všechny české a slovenské výskyty *Melampyrum bohemicum* s cílem zařazení snímkaných porostů do syntaxonomického systému nebyla raději zčásti nahrazena nebo doplněna pořízením dostatečného množství snímků z lokalit *Melampyrum angustissimum* a *M. subalpinum* s. str., kteréžto snímky by následně byly společně analyzovány v podstatě bez jakéhokoli syntaxonomického zařazení. **(4.1.)** Mohl by diplomant vysvětlit proč takto nepostupoval? (zmínit případné výhody či naopak úskalí takové analýzy).

Hlavními výsledky práce jsou:

- (i) v rovině analytických dat o geografické distribuci a současném stavu populací *Melampyrum bohemicum* v ČR a na Slovensku
- (ii) v rovině didaktické, tj. v dobrém osvojení si metod, jejich pečlivém provedení a kritickém zhodnocení výsledků
- (iii) v pilotní analýze využitelnosti experimentální hybridizace, izozymových spekter a flow cytometrie pro mikroevoluci v komplexu *Melampyrum subalpinum*

Práce splňuje všechny požadavky a předpisy kladené na magisterské diplomové práce. Pokud by Jan Chlumský nenašel uplatnění v doktorském studiu na Jiho či jiné české univerzitě, nechť zkusí štěstí v tomto směru také v Brně, jeho naděje určitě nebudou malé.

Dne 23. ledna 2007 Petr Bureš, Ústav botaniky a zoologie, Masarykova univerzita v Brně