

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci

Šárka Svobodová: Morfologická a genetická diference druhů *Euphrasia stricta* a *E. nemorosa*

Diplomová práce Šárky Svobodové je zaměřena na taxonomicky složitý rod *Euphrasia*, který patří do skupiny poloparazitických *Orobanchaceae* studovaných v rámci katedry botaniky PŘF JU z mnoha různých aspektů. Téma je to tedy aktuální a zajímavé. Je smutným úkolem oponenta být kritický, takže ve většině posudku budu spíše upozorňovat na nedostatky. Nicméně na začátku bych rád vyzdvihl velký klad předložené práce, kterým je použití široké škály metod tak, aby obraz studovaných jevů byl co nejuplněnější. Také odvalu studentky pustit se i na tenký led složitých statistických metod jako jsou zobecněné lineární modely se smíšenými efekty nebo analýza ISSR dat v programu Structure musím ocenit, jakkoliv mám ke statistickým analýzám i výhrady.

V předložené práci studentka navazuje na svoji práci bakalářskou – jakkoliv to se překvapivě ukázalo být místy nevýhodou. Zejména v úvodu – jako by si studentka v bakalářské práci trochu „vystřílela prach“. Jistě nemělo smysl opakovat rešerši z bakalářské práce, ale přesto mi úvod přijde informačně chudý. A témata by se našla – např. fenotypová plasticita, která jsou v úvodu věnovány pouhé dva krátké obecné odstavce, přestože jde o jedno z nosných témat diplomové práce. Celkově mi úvod přijde málo provázaný a některé informace by bylo vhodné spojit (například taxonomické pojetí a variabilita znaků se diskutují na více místech). Hlavní problém však vidím jinde. Autorka se úzkostlivě vyhýbá jakémukoliv odkazu na svoji předešlou práci, ačkoliv na ni přímo navazuje. Úporná snaha neopakovat se vede k tomu, že z úvodu přímo neplyne to nejdůležitější – jaký je výchozí stav znalostí (ten je popsán jen velmi obecně) a proč je vůbec zajímavé studovat právě vybrané otázky a proč právě metodami, které byly použity.

Již první oddíl metodiky ukazuje, do jak složité skupiny se studentka pustila. Snahu formalizovat definici skupin *E. stricta* agg. a *E. nemorosa* agg. pomocí hybridního indexu pak musím jen pochválit. Jen škoda, že stavy znaku „postavení větví“ jsou definovány vágně (a navíc pochybuji, že by větve někdy odstávaly skutečně v tupém úhlu $> 90^\circ$, tab. 1) a že chybí zdůvodnění přijaté škály (osobně bych očekával striktnější definici „čistých“ druhů).

Byl proveden opylovací pokus, který ukázal, že studované druhy jsou schopny tvořit hybridní semena. To je výborný výsledek, přesto je na místě opatrnost. Semena totiž po vysetí nevzešla. Je to připisováno nepřízní počasí a stanovištních podmínek, ale co když je to tím, že hybridní semena jsou skutečně málo životaschopná a je zde bariéra ve fázi klíčení? To mohlo a mělo být vydatné téma do diskuse.

Morfometrická analýza přesvědčivě ukázala na rozdíly mezi *E. stricta* agg. a *E. nemorosa* agg., přestože existují i nevyhraněné, snad hybridní populace. Naopak drobné druhy v rámci *E. nemorosa* agg. jsou odlišeny slabě. Myslím ale, že je těmto druhům v této části práce věnována zbytečná pozornost. Zvolená metodika a sada znaků totiž ani lepší výsledek neumožňovaly – do analýzy byly zahrnuty znaky, které odlišují dva hlavní druhové agregáty, zatímco znaky, které odlišují taxony v rámci agregátů (odění, větvení lodyhy, atd.) zahrnuty nebyly. Opět, toto mohlo být v diskusi zmíněno. Problematické je provedení diskriminačních analýz. Skupiny *E. nemorosa* agg. a *E. stricta* agg. byly definovány na základě 3 znaků. Dva z nich (délka koruny a délky osinek) byly zahrnuty do morfometrických analýz a logicky se objevují mezi nejlepšími prediktory. Ačkoliv při prvotním určení byly znaky posuzovány za populaci jako celek, nikoliv na úrovni jedinců, je to trochu důkaz kruhem. Vzhledem ke složitosti skupiny se tomu asi nebylo možné vyhnout, ale tato skutečnost měla být adekvátně zdůrazněna v diskusi. Také při takto strukturovaných datech nemá moc smysl ptát se na odlišení druhů jako takové, ale spíše klást důraz na otázky jako které jiné znaky také odlišují takto definované druhy a jak dobré (např. v % správně klasifikovaných jedinců) to odlišení je. K diskriminačním analýzám mám i další, spíše technické připomínky, např. při klasifikaci nebyla použita krosvalidace, slovní popis výsledků někdy nesouhlasí s tabulky a obrázky (např.: obr. 11, kde se lépe odděluje *E. uechtritzina* než *E. curta*, jak je v textu; podle textu na str. 38 má být analýza kultivačního pokusu založena na 4 znacích, ale v odpovídající tab. 8 jich je 10), nerozlišuje se mezi klasifikací založenou na pravděpodobnostních modelech a na klasifikační

funkci pro každou skupinu, atd. Část morfometrických dat asi pocházela z bakalářské práce, což je v pořádku, data jsou analyzována znovu a v jiném kontextu – jen to mělo být v metodice zmíněno.

Dále byla provedena geometrické morfometrika, ale v celé práci mi schází klíčová informace, proč vůbec byla použita a proč zrovna na boční zub listenů. Jistě s tím bylo dost práce a přitom délka a šířka zubu i délka osiny byly zahrnuty v klasické (*distance-based*) morfometrice a tak vlastně nic nového nevyšlo. Očekávala autorka nějakou jinou informaci, kterou mohla tato analýza přinést? Na základě čeho?

Pokud jde o genetickou variabilitu, metoda ISSR dala slibné výsledky. Do budoucna bych ale stejně doporučoval otestovat publikované mikrosatelitové primery, cenový rozdíl při rutinním použití je minimální. Data jsou podrobně analyzována, použití programu Structure je dokonce nadstavba. Jen je škoda, že postup nebyl lépe popsán, zejména klíčový bod určení optimálního počtu skupin. Zarazilo mě ale, že výsledky nejsou nijak provázány s výsledky morfometrie. Některé populace vyšly jinak, zejména populace VLho2 vyšla geneticky jako *E. nemorosa*, ale morfologicky byla hodnocena jako *E. stricta*, a populace Zat byla geneticky přechodná, ale morfologicky *E. nemorosa*. Tyto populace jsou v grafech zobrazujících genetickou variabilitu (např. obr. 17, 18) zobrazeny podle výsledků genetických, což je opět do kruhu. Oddělení taxonů vypadá mnohem lépe než by vypadalo, kdyby grafy byly obarveny opravdu podle morfologie (přičemž čtenář má dojem, že to tak je!). Také mám pocit, že výběr populací pro genetickou analýzu nebyl úplně systematický; je velká škoda, že genetická data nebyla k dispozici pro většinu morfologicky analyzovaných populací a že nelze udělat přímé srovnání. Do budoucna a třeba pro publikaci výsledků je toto třeba doplnit.

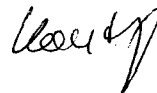
Významnou součástí práce je kultivační pokus testující význam fenotypové plasticity. To je mnohdy podceňovaná složka variability a zařazení této tematiky do taxonomické studie je výborné. I když jeden z testovaných druhů nevyšel a i když volba hostitelů nebyla ideální (oba jsou považováni za dobré hostitele, o rozsahu plasticity by jistě více vypovídalo srovnání dobrého a špatného hostitele), poskytuje pokus slibné výsledky. Studentka si je ale těchto omezení vědoma a zdůrazňuje je v diskusi a do budoucna plánuje rozšíření pokusu. Zase jen škoda, že statistické analýze chybí pár drobných krůčků k dokonalosti, například absence krosvalidace v diskriminační analýze tady docela vadí, vzhledem k malému počtu vzorků.

Po formální a jazykové stránce předložená práce vyhovuje, i když zvláště pečlivý oponent by našel několik nejednotností v seznamu literatury a také kvalita obrázků (ve smyslu rozlišení a tisku) by mohla být lepší. Pokud jde o metodickou šíři a množství dat, je tato diplomová práce určitě nadprůměrná. Naopak propojení jednotlivých celků a vzájemná srovnání dílčích výsledků ve výsledkové části a zejména v diskusi mohla být lepší.

Práce Šárky Svobodové jednoznačně splňuje požadavky kladené na magisterské diplomové práce. Vzhledem k uvedeným připomínkám navrhuji hodnocení stupněm velmi dobře nebo výborně, podle průběhu obhajoby. V rámci obhajoby bych rád slyšel zejména zamyšlení (1) nad morfologickými rozdíly mezi taxony a použitou škálou hybridního indexu, (2) nad cílem geometrické morfometrie, (3) čím by mohly být způsobeny rozpory mezi morfologickými a genetickými data a (4) co by mohly znamenat skupiny definované pomocí Structure uvnitř jednotlivých druhů v ISSR datech.

V Českých Budějovicích, 18.1.2011

Petr Kouřecký



Oponentský posudek magisterské diplomové práce Šárky Svobodové

Morfologická a genetická diference druhů *Euphrasia stricta* a *E. nemorosa*

Vypracoval Pavel Trávníček

Předložená diplomová práce si kladla za cíl s pomocí soudobých biosystematických metodických postupů řešit problematiku morfologické a genetické odlišnosti druhů v rámci dvou agregátů našich světlíků. Dílčími cíli pak bylo zhodnocení míry mezidruhové hybridizace a vlivu fenotypové plasticity na determinační znaky vybraných druhů.

V práci je využíváno množství metodických postupů na poměrně vysokém počtu jedinců, čímž je dosaženo značné robustnosti zjištěných závěrů a je tedy nesporným kladem této práce. Mimo to je práce logicky členěna a je psána čitelnou formou s malým množstvím stylistických chyb či překlepů. Přesto by si některé pasáže práce zasloužily vyšší míru rozpracování (viz dále) či hlubší analýzu získaných dat, neboť místy může čtenář nabít dojem, že něco bylo opomenuto.

K práci mám tyto konkrétní připomínky a otázky:

- 1) Cíle práce (str. 6) – Mezi cíli je uvedena i snaha o určení významu fenotypové plasticity na diagnostické znaky. Tento cíl předjímá rozsáhlé kultivační pokusy zkoumající vlivy různých abiotických či biotických podmínek na celkový vzhled rostlin a je trochu zklamáním, že kultivační pokus je omezen pouze na vliv hostitele. Toto samozřejmě není chybou, ale cíl měl být formulován jinak.
- 2) Metodika (str. 7) – Přestože chápu potřebu použití nezávislé metodiky k určení jedinců do jednotlivých druhů, není mi úplně jasné, proč tento postup byl aplikován na celé populace a nikoliv na jedince. Je autorka přesvědčena o tom, že všechny zkoumané populace jsou složeny jen z jedinců, kteří jsou morfologicky ztotožnitelní vždy jen s jedním z „čistých“ druhů?

Navíc mi v této pasáži chybí to, jak bylo v rámci hlavních skupin taxonů (agregátů) použito odění k odlišení dalších druhů – např. formou souhrnné tabulky.

Další nejasností je znak „postavení větví“, kde je pro skupinu druhů *E. nemorosa* přisouzena hodnota „tupý úhel“, pro *E. stricta* „ostrý úhel“ a pro přechodné typy „intermediární“. Z toho vyplývá, že skupina druhů *E. nemorosa* má dolů sehnuté větve a přechodné typy většinou pravoúhlé, což pravděpodobně neodpovídá realitě ...

- 3) Sběr a zpracování materiálu (str. 10) – Zde je několik nepřesností v počtech lokalit ve srovnání s přílohou 1 (čísla v závorkách) – *E. stricta* 19 (20), přechodné typy 5 (6) a *E. tatarica* žádná (1) – i s obrázkem 2 (zde je *E. tatarica* zobrazena)
- 4) Klasická morfometrie (str. 11 a dále, Obr. 3) – Na str. 11 je uvedeno že bylo měřeno 35 znaků, aby o dalších 5 řádků níže bylo napsáno, že bylo použito jen 26 znaků (resp. 35-9), aby se ve výsledku počítalo vždy jen s 25 znaky (viz Výsledky). Přijde mi to poněkud komplikované pro orientaci.

Na Obrázku 3a jsou 3 znaky (CTL, CLL a CH) u kterých není zcela jasné, jak se měřily.

Na Obrázku 3b je znázorněno i to, že se do analýz zahrnuly de facto i délky osinek na listenech, ačkoliv tyto byly použity pro „předurčení“ taxonů. Minimálně u diskriminačních analýz tak dochází k částečnému důkazu kruhem. V tomto směru je nejasný i termín „velikost květu“ (str. 7) a jeho vztah ke znaku „délka koruny“ (CL).

- 5) Geometrická morfometrie – Pro analýzu tvaru byl vybrán nejširší zub 10. Listenu. Zde mi chybí pádná argumentace podporující vzájemnou homologii nejširších zubů na listenech z různých jedinců.
- 6) ISSR (str. 14 a dále) – V úvodu na str. 5 autorka zmiňuje zpravidla časově náročnou optimalizaci této metody, nicméně v metodice jakákoliv zmínka o tom, jak byla optimalizace provedena, zcela chybí.
- 7) Kultivační pokus (str. 17 a dále) – Autorka udělala kultivační pokus na dvou hostitelských druzích (*Triticum* a *Pisum*) za účelem zhodnocení morfologické diference v závislosti na hostiteli. Proč byli vybráni právě tito hostitelé, když jsou oba považováni za hostitele dobré (viz. Diskuse, str. 45)?
- 8) Vlastní stať Výsledky (od str. 19) hodnotím velmi pozitivně, neboť vypovídá o velmi dobrých schopnostech autorky adekvátně zpracovat získaná data a její dobré orientaci v použitelném software pro toto zpracování. Přesto i zde je několik drobností:
 - Výstup ze SplitsTree (NJ analýza) – zde jsou jedinci z populace Vlho2 označeni modrou barvou, což by nasvědčovalo jejich určení jako *E. nemorosa*, nicméně v Příloze 1 a na obrázcích 8 a 9a je tato populace shodně určena jako *E. stricta*. Upřímně doufám, že jde o nějakou záměnu vzorků v molekulárních analýzách a že se skutečně analyzovali jedinci náležící *E. nemorosa* a nikoliv *E. stricta*. Protože pokud tomu tak není, tak to ukazuje, že ona metoda předurčení druhů na základě 3 stavů 3 znaků je minimálně v některých případech zcela nevyhovující. Na druhou stranu řazení některých jedinců určených jako *E. nemorosa* (jedinci z populace Zat a částečně Len) do klastu *E. stricta* (Obr. 18) poukazuje na určité rezervy v metodě „předurčení“ rostlin (resp. celých populací).
 - u analýz z programu STRUCTURE poněkud postrádám určení toho správného počtu klastrů (K), které je v datech nalezeno – v metodice je popsáno, že se zkoušelo K=1 až K=12, ale chybí zde nějaké zhodnocení, proč byly vybrány 3 klastry v případě celého datasetu (Obr. 19) a 4 klastry v případě *E. stricta* (Obr. 20) i *E. nemorosa* (Obr. 21)
- 9) Diskuse (str. 41 a dále) je bohužel psána pro všechny kapitoly separátně a jde spíše o zhodnocení jednotlivých dílčích výsledků a nikoliv práce jako celku. Proto zde postrádám např. potenciální vliv prokázané hybridizace mezi zkoumanými taxony (*E. stricta*, *E. nemorosa*) na strukturu populací světlíků a vhodnosti zde použitého modelu hodnocení taxonomické příslušnosti na úrovni populací a nikoliv jedinců. Navíc toto zjištění by mělo být konfrontováno i s výsledky z molekulárních analýz pokud možno i na obecnější rovině a nikoliv pouze ve smyslu konstatování, že některé „divné populace“ mohou být ovlivněny hybridizací. Naopak některé zde uvedené závěry např. ohledně taxonomického zařazení populací *E. curta* (švédské vs. české populace) jsou dle mého názoru za hranicí toho, co molekulární data říkají. Relevantní otázka v tomto směru by se spíš měla zabývat

oprávněností určení českých populací jako *E. curta*, když ji ani morfometrická ani molekulární data v podstatě nepotvrdila.

Ačkoliv slabších míst předložené práce by se dalo najít hned několik, oceňuji zejména chuť autorky se zabývat touto problematickou skupinou a množství metodických přístupů a analytických nástrojů, které při studiu využila. Proto v tuto chvíli hodnotím práci nejednoznačně známkou 1-2 a těším se na obhajobu, kde budou jak doufám smeteny všechny mé výše uvedené námítky ze stolu.

Otázky:

- 1) Nemohu se nezeptat, zda nebyla vyzkoušena skutečně nějaká nezávislá metoda k určení jednotlivých taxonů? Mám na mysli něco na způsob průtokové cytometrie.
- 2) Jak je vysvětlován původ oněch morfologicky velmi blízkých taxonů jež jsou rozlišovány v rámci obou agregátů (např. *E. tatarica*, *E. slovacca*, apod.)? Myslíte si, že hrála v jejich evoluci nějaký význam potenciální hybridizace s jinými a případně s jakými taxony?
- 3) V molekulárních analýzách celkem překvapivě vyšla velká blízkost populací druhů *E. uechtriziana* a *E. slovacca*, jakkoliv oba taxony patří do rozdílných agregátů. Jak je možné tento dílčí závěr interpretovat?

V Průhonicích 17.1.2011


Pavel Trávníček