

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Veroniky Otiskové **Morfometrická a genetická analýza skupiny *Centaurea macroptilon***

Cílem oponované diplomové práce byla studie taxonomicky komplikované skupiny *Centaurea macroptilon*. Na 41 stranách textu a 9 stranách příloh se pokusila za pomoci dvou základních přístupů objasnit potenciální strukturu široce rozšířené skupiny. Vzhledem ke komplexnosti taxonomie chrp oceňuji, že řešený dílčí problém je dobře vymezen a autorka se úspěšně vyrovnala s velmi komplikovanou nomenklaturou. V úvodu je schopna čtenáři řešený problém dobře popsat a zasadit do širšího kontextu. Vzhledem k časové náročnosti zvolených metod odvedla značné množství práce a získala odpovídající množství dat. Úkolem oponenta je však hledat slabiny práce, a tak se o to pokusím.

Metodika

Úvodní části metodiky věnující se výběru vhodných lokalit jsou psány dost těžkopádně a nepřehledně. Rovněž mapa na obr. 2 zobrazující lokality by si zasloužila vyšší kvalitu včetně zvýraznění lokalit z regionů odkud byly taxony popsány. Podle mého názoru by si krátký komentář zasloužil i výběr znaků. Z úvodu plyne, že studované taxony se podle literatury liší jen třemi znaky, proto by bylo vhodné okometovat výběr mnohých dalších. Další části metodiky považuji za vcelku zdařilé.

Výsledky

Z metodiky je patrné, že prakticky u všech populací byla měřena ploidie průtokovou cytometrií. V diskusi se pak píše, že rozdíly mezi taxony/regiony nebyly zjištěny. Nechápu ale, proč tato analýza není prezentována ve výsledcích.

K morfometrické části mám několik dotazů. Je dobrým zvykem prezentovat rovněž rozmístění znaků v ordinačním prostoru analýzy PCA. Zajímalo by mne, proč také nejsou řádně uvedeny znaky, které přispívají k oddělení jednotlivých skupin v diskriminační analýze. To je výsledek, který od této analýzy požadujeme především. Prezentace pouhých rozmezí (ve formě grafů) pro jednotlivé skupiny tuto informaci nenahradí. Například by mne zajímalo, jak se liší koeficienty znaků pro analýzu s jedinci a analýzu s průměry populací, která všechny 3(4) taxony víceméně dobře oddělila. Nepřineslo by srovnání významu jednotlivých znaků pro konkrétní analýzy informaci o tom, které znaky jsou silně plastické (tedy v populacích velmi variabilní) a které jsou ty relativně důležité a na populační úrovni stabilnější?

Dále nerozumím diskriminační analýze s postupným výběrem znaků na str. 26. Skutečně jen 4 znaky byly průkazné? Není to pro 4 skupiny málo? Za těchto okolností mi přijde tato analýza poněkud zbytečná.

Za velmi spornou považuji analýzu na str. 27 promítající pasivně jihoslovenské populace do diskriminační analýzy třech zbývajících skupin. Rozhodně se mi zde nelíbí formulace „pro ověření, ke kterému taxonu bude jihoslovenská podskupina morfologicky patřit, jsme provedli diskriminační analýzu a jihoslovenskou podskupinu pasivně promítli do ordinačního diagramu“. Za situace, že jihoslovenské populace jsou na populační úrovni normální diskriminační analýzou dobře oddělitelné, mi z principu tento přístup přijde podivný. Může autorka vysvětlit, proč tak postupovala? Ke stejnému účelu by se hodila i klasifikační diskriminační analýza. Nezkoušela ji autorka také udělat? A zajímavá by byla také diskriminační analýza pouze české a jihoslovenské skupiny. Proč nebyla provedena? Velmi pravděpodobně by byly opět obě skupiny na populační úrovni odděleny. Byla zajímavá informace, které znaky v této diskriminační analýze tyto dvě skupiny oddělují.

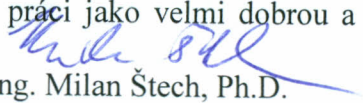
Výsledky analýzy AFLP byly jistě pro autorku zklamáním. To se často stane a není to katastrofa. Ovšem poněkud mi schází detailnější popis výsledků. Co jsou 3 izolované rostliny na ordinačním diagramu PCoA? Nejsou to rostliny z izolované populace na hranicích Srbska? Má autorka nějaké vysvětlení proto, že Bayesovské shlukování nenašlo žádnou smysluplnou strukturu, zatímco na základě PCoA se dá uvažovat o jistém geografickém gradientu?

Diskuse a závěr

Taxonomický závěr je vždy poněkud subjektivní, ale ten, který je prezentován v práci, mne vcelku překvapil. Vzhledem k velmi slabé nebo lépe řečeno žádné genetické diferenciaci mezi studovanými populacemi je celkem pochopitelné, že je navrženo všechny studované taxony spojit do jediného druhu. Ovšem už nevidím důvod, proč dělit tento druh právě na dva taxony – severní a jižní. Jejich potenciální genetická diferenciaci na základě získaných dat je opravdu slabá. Naopak, slabá morfologická diferenciaci na populační úrovni je možná u všech čtyřech zkoumaných taxonů. Proto bych osobně buď přijal řešení, že nelze rozlišovat žádné poddruhy nebo naopak všechny čtyři. Mohla by autorka jasně uvést, co jí tedy vedlo k přijaté koncepci? Upozorňuji, že tvrzení o geografické blízkosti *C. macropylon* a *C. indurata* minimálně není přesné. Přímá návaznost rumunských populací na balkánské asi není známá, a pak jsou jihoslovenské populace mnohem blíže rakouským než rumunské. Navíc je třeba mít na paměti, že materiál z Balkánu byl velmi omezený.

V přílohách bych ocenil nějaké logické upořádání tabulky v příloze 1 tak, aby se v ní dobře hledalo (např. podle taxonu, země nebo abecedy). Bylo by vhodné promítnout například číslo lokalit i do mapy 2, ovšem ta by musela mít zcela jinou kvalitu.

Především vzhledem k množství odvedené práce hodnotím celkově práci jako velmi dobrou a o výsledné známce by měla rozhodnout úroveň obhajoby.


ing. Milan Štech, Ph.D.
Křenovice, 13.1.2016

Diplomová práce Veroniky Otiskové se zabývá problematikou poměrně malé skupiny chrp z okruhu *Centaurea macroptilon* a snaží se ji taxonomicky vyřešit. Takto vymezená skupina je problematická z hlediska nejasného taxonomického postavení tří rozlišovaných taxonů ve Střední Evropě. Autorka se snaží s využitím klasických biosystematických metod (průtoková cytometrie, morfometrika, AFLP) daný problém rozklíčovat. Dlužno podotknout, že jakkoliv je použitý metodický aparát vhodně zvolen, nebylo dle mého soudu zcela využito jeho potenciálu (viz dále). Z obecného hlediska diplomová práce vykazuje veškeré náležitosti, které si taková práce žádá. V úvodní kapitole jsme seznámeni se studovanou problematikou a navzdory drobným krkolomnostem v textu je napsána tak, že čtenář získá poměrně solidní představu o této skupině chrp a o tom, co je cílem DP.

V metodické části je celkem vyčerpávajícím způsobem popsán veškerý použitý metodický aparát a způsob jak, byl sebrán a zpracován materiál pro DP. Přesto si neodpustím několik poznámek k této pasáži. Pro sběr taxonu *Centaurea oxylepis* je popsán pravděpodobný a dosti rozsáhlý areál, kde by se měl taxon vyskytovat (dle původního popisu), aby se posléze čtenář dozvěděl, že z tohoto areálu byly sebrány pouze 3 populace (str. 10). Je to zde jen podivně napsáno, nebo tomu tak skutečně je? Navíc ve výsledkové a diskuzní části práce se hojně operuje s tzv. českou a jihoslovenskou podskupinou u tohoto taxonu. Nebylo by tedy od věci takové členění zvýraznit i v mapce (Obr. 2), například už jen proto, že k „jihoslovenské podskupině“ by mělo náležet 8 populací a v mapce je v této oblasti viditelných jen 7 bodů. Metodika AFLP je popsána až do zbytečných detailů a v porovnání s ostatními částmi to působí poněkud nesourodě. V odstavci věnovanému zpracování AFLP dat mne zaujalo několik drobností – např. výpočet distance z Jaccardova koef. podobnosti přes odmocninu a zahrnutí programu Structure Harvester aniž by ve výsledcích byla jediná zmínka o výstupech z tohoto programu.

Výsledkovou část práce považuji kvalitativně za dosti nevyrovnanou a na mnoha místech až odfláknutou. Např. zpracování dat z průtokové cytometrie připomíná spíše parodii. Opravdu by byl takový problém získaná data zpracovat alespoň ve formě tabulky, kde by se člověk dozvěděl kolik bylo od každého taxonu/populace změřeno rostlin, jaká byla jejich variabilita v relativní velikosti genomu, atd.? Proč taková data u morfometrických analýz poskytnuta jsou a zde nikoliv? Morfometrická část výsledků je naopak zpracována standardně a v zásadě správně. Některé analýzy vypadají trochu samoučelně (např. analýza s postupným výběrem znaků), protože nejsou dále v textu jakkoliv využity. Naopak některé obvykle používané analýzy (např. klasifikační analýzy nebo analýzy podskupiny jedinců zahrnutých do AFLP) mi zde scházejí. Přitažená za vlasy mi pak přijde analýza dvou skupin vymezených dle AFLP (viz dále). Tím se dostávám k výsledkům z analýzy AFLP, které mi navzdory veškerému očekávání poskytly spíše rozčarování. Nejde ani tak o to, že to kdovíjak pěkně nevyšlo, ale jde zejména o to, že zpracování výsledků v mnoha směrech pokulhává. Pomínu-li absenci základních charakteristik o počtech zpracovaných rostlin pro jednotlivé taxony, počtech lokusů, jejich případné taxonomické specifitě, atd. (které bývá zvykem v takových studiích uvádět), tak i přesto publikované zpracování dat nelze považovat za příliš zdařilé. Např. v morfometrické části práce proklamované rozdělení datasetu na dvě skupiny se neukázalo ani ve fylogenetické síti (obr. 25), ani ve výstupu ze Structure (obr. 26) a osobně ho příliš nevidím ani v PCoA (obr. 24), ačkoliv zvolené barevné a tvarové podání symbolů v obrázku může evokovat pocit existence dvou jasně vymezených skupin. Zde mám na mysli zejména splynutí modrých a zelených trojúhelníků zvolených pro vizualizaci jižní a východní skupiny. Ve skutečnosti je dle mého názoru zelená skupina poměrně hezky vymezena. Nicméně i kdyby tomu tak nebylo, tak mi přijde dosti odvážné usuzovat něco o postavení taxonu na základě 9 jedinců (počet zelených trojúhelníků). Co mi v této části také chybí je absence zpracování výstupů z programu Structure. Když už se v metodické části autorka zmiňuje o programu Structure Harvester, tak bych zde očekával obvyklé

výstupy, které umožňují posoudit nejlepší počet skupin (log likelihood, delta K, similarity, aj.).

V diskuzi pak autorka podle mého názoru interpretuje získaná data mnohdy až příliš sebejistě, aniž by to bylo věrohodně podloženo. Nejprve je zamítnuta diferenciace jihoslovenské podskupiny, ačkoliv nejrobustnější data získaná během DP, tedy morfometrika, ukazují určitou míru odlišnosti této skupiny – minimálně na stejné úrovni jako je diferenciace skupin ostatních. Toto tvrzení je posléze opět zpochybněno a je zde řečeno, že se nejedná o sourodou skupinu a různé populace mohou patřit různým taxonům. Proti tomuto závěru nelze nic moc namítat, ale nahlíženo touto optikou je pak každá v DP *a priori* vymezená skupina natolik nesourodá, že jihoslovenská není žádnou výjimkou. V části hodnotící výsledky AFLP je nejprve poukázáno na to, že v řešení této problematiky metoda selhala (s čímž lze do určité míry souhlasit), aby posléze byla, dle mého názoru, dezinterpretovaná analýza PcoA použita jako hlavní argument pro rozdělení celého komplexu do dvou skupin na úrovni poddruhů, ačkoliv morfometrická data toto rozdělení v žádném případě neimplikují. Toto považuji za dosti manipulativní přístup při nakládání s daty.

Mám-li to shrnout, pak autorce DP nelze v žádném případě upřít velkou míru pracovitosti a snahy rozlousknout tuto velmi obtížnou skupinu chrp, ale na druhou stranu sledávám ve zpracování a interpretaci dat natolik závažné nedostatky, že nemohu práci hodnotit lépe, než na pomezí klasifikačního stupně velmi dobře a dobře. Finální rozhodnutí učiním až na základě obhajoby DP.

Případné otázky do diskuze:

- 1) Jak je to tedy s použitelností AFLP dat – je absence struktury ve většině analýz daná špatným „pročištěním“ dat, špatným zpracováním a nebo skutečně studovaná skupina nevykazuje genetickou diferenciaci?
- 2) Při hledání geografické struktury v molekulárních i fenotypických datech se poměrně často využívá metod, které umějí tuto strukturu hledat (namátkou např. Geneland) – proč nebyla takové analýze AFLP (případně i morfometrická) data podrobena?

10.1. 2016

