

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci

Veronika Schaabová: Variabilita *Calamagrostis phragmitoides* v ČR a srovnání s morfologicky podobnými druhy

Veronika ve své diplomové práci plynule navazuje na svoji bakalářskou práci a využívá z ní část dat, což je zcela v pořádku. Za pomoci kombinace několika různých metod podává přehled morfologické a genetické variability *C. phragmitoides* v České republice a poměrně reprezentativně i ve Skandinávii, doplněný o data z bližšího (Slovensko) i vzdálenějšího zahraničí. Právě kombinaci metod a evidentně velké množství odvedené práce a získaných výsledků hodnotím na této práci velmi kladně. Výsledky posouvají naše znalosti o studovaném druhu a mohou být dobrým základem pro publikaci, i když v některých ohledech (zejména fylogenetické vztahy) jsou zatím jen předběžné – ale to není vada posuzované diplomové práce, nutné další analýzy jsou už mimo téma práce.

Práce má standardní strukturu a slušnou jazykovou i grafickou úroveň a je psána s pouze malým množstvím chyb a překlepů a po formální stránce vyhovuje. Citace literatury jsou celkem sjednoceny, jakkoliv nejde o zcela standardní formát a ročník časopisu psaný jakýmsi ozdobným fontem trochu ruší; chyb je tam minimum, kromě nesprávných nebo neúplných citací software. Formální výhrady mám tak pouze k přílohám I-III, kde je v textech lokalit více chyb, někdy chybí označení státu (hlavně u lokalit ze Skandinávie) a občas je vidět, že to je překlad z angličtiny, ale důsledný („Seminskii Ridge“, ruská jména jsou i v českém textu přepsána podle anglických pravidel, a ne zcela jednotným způsobem,...).

Je škoda, že autorka někde v předmluvě nebo úvodu přímo nenapsala, že navazuje na svoji bakalářskou práci; dokonce mám pocit, že se to kostrbatými formulacemi snaží trochu utajit. Jde o to, že část důležitých témat (např. rešerše literatury o apomixii u rodu *Calamagrostis*) již byla zpracována v bakalářské práci, a proto se zde neopakují – jenže to se čtenář neznalý bakalářské práce nedozví.

Úvod diplomové práce přináší přehled dostupných údajů o morfologii, ekologii a rozšíření studovaných druhů *C. phragmitoides* a *C. canescens* a jejich postavení v rámci rodu, stručně je zpracována i problematika apomixie, která by se měla vyskytovat u *C. phragmitoides*. Bohužel zejména část o členění rodu a vymezení a rozšíření agregátu *C. purpurea* je zmatená a ukazuje na povrchní znalost literatury. V textu jsou rozpory, například citovaná mapa Hultén & Fries 1986 uvádí rozšíření druhu *C. langsдорфii* v Asii i Severní Americe, totéž Mitchell et al. 1968, ale na jiných místech diplomové práce se o tomto druhu mluví jako o sibiřském. Stejně tak tvrzení „zatímco o apomixii u některých skupin je známo hodně..., trávy nejsou tolik prostudované“ (str. 8) není pravdivé, literatura o apomixii u trav existuje, zejména u významných pícnin, takže třeba rod *Paspalum* lze považovat přímo za modelový, studovány jsou i další rody (*Poa*, *Pennisetum*,...). K úvodu mám následující dotaz:

- Studovaný druh je označován jako *C. phragmitoides*, ale někdy taky jako *C. purpurea*. Z úvodu mi není jasné, jaký je vztah mezi těmito jmény. Z různých náznaků lze nabýt dojem, že někteří autoři je považují za synonyma (= vše je jeden taxon), ale někteří ne (příčemž v tomto ohledu je celkem jedno, jestli jde o druhy nebo poddruhy). Na základě jakých rostlin (z jaké oblasti) byly tyto taxony popsány, jaké mají být jejich morfologické znaky a rozdíly, je známo něco o chromosomových počtech?

Metodika je psaná poměrně podrobně (chválím!), i když popis jednotlivých metod v metodice nebo úvodu je místy dost zkratkovitý až nesprávný (např. tvrzení, že u kodominantních markerů vidíme i recesivní alely, str. 10 – žádné takové tam ale nejsou, právě proto je marker kodominantní). Drobné technické detaily (viz na konci posudku) jistě budou v případné publikaci opraveny. Dva krátké dotazy mám k morfometrice: (a) jak bylo zacházeno s vícestavovými kvalitativními, ale přeci jen trochu uspořádanými znaky typu chlupy žádné – krátké – dlouhé? (b) co znamená tvrzení „do LDA nebyly použity poměry..., protože znak se ukázal jako nevýznamný“ (str. 15) – určení (ne)významnosti znaků by přece mělo být až jedním z cílů a výsledků analýz?

Výsledková část. Průtoková cytometrie odhalila tři cytotypy, všechny výsledky jsou dobře dokumentovány grafy i histogramy. Pro příště bych navrhoval shrnutí výsledků do jedné tabulky pro všechny cytotypy / druhy, lze je tak lépe porovnávat (čili spojil bych sloupce DAPI z tabulek 8 a 9, totéž PI). Cytometrické výsledky nebyly kalibrovány přímým počítáním chromosomů, takže nelze zjištěným cytotypům rovnou přiřazovat chromosomové počty – a zvláště ne v situaci, kdy je na stejném místě zdůrazňována naměřená variabilita ve velikosti genomu; to je poměrně závažná chyba a v práci se bohužel objevuje na mnoha místech.

Další částí výsledků je morfometrická analýza, provedená celkem obvyklými postupy. Přesvědčivě ukazují na rozdíly mezi druhy *C. canescens* a *C. phragmitoides*, podobně jako již bakalářská práce. Naznačen je i rozdíl mezi 8x a 10x cytotypy *C. phragmitoides*, naopak o 4x cytotypu se nedozvíme nic. Proč nebyly žádné tetraploidní rostliny zahrnuty do analýz? Ve výsledcích postrádám také grafické výstupy z diskriminačních analýz; tabulky s hodnotami morfologických znaků by bylo vhodné uspořádat podobně, jako je zmíněno u cytometrie. Rovněž mi chybí grafické srovnání (box-and-whisker diagramy) jednotlivých druhů / cytotypů, alespoň pro nejvýznamnější znaky, to by čtenáři umožnilo porovnání lépe než tabulky se spoustou čísel, zvláště když v nich taxony nejsou uspořádány vedle sebe.

Isozymová analýza byla zaměřená především na počet klonů, velmi dobré je i srovnání podobnosti klonů pomocí analýzy hlavních koordinát. Výsledky přesvědčivě ukazují na relativní jednotvárnost (i když ne úplnou uniformitu) *C. phragmitoides* a určitou variabilitu *C. canescens*. Proč však v práci chybí podle mě nejzajímavější výsledek – celková analýza (oba druhy dohromady) založená na frekvencích alel? Prosím o něj alespoň u obhajoby. Sekvenování DNA pak velmi vhodně doplňuje čelkový obraz, víceméně potvrzuje zařazení rostlin podle cytotypů i morfometrických analýz a v neposlední řadě přesvědčivě vyvrací jednu z rozšířených hypotéz o původu *C. phragmitoides*.

Jednoznačně nejslabší částí práce je diskuse. Částečně jsou diskutována pouze data ze sekvenování DNA, diskuse ostatních dat buď opakuje výsledky a úvod práce (morfometrika, cytometrie) nebo jednoduše neexistuje (isozymy). To je škoda, získaných výsledků je velké množství a je i s čím srovnávat. Například:

- Morfometrická analýza – byť na malém počtu rostlin – naznačuje, že dekaploidi se od oktoploidů liší převážně kvantitativními znaky, jsou obecně větší. To je u trav celkem obvyklá situace, pro porovnání se nabízí např. nedávno publikovaná studie olomouckých kolegů na rodu *Molinia*.
- Opakovaně je zmiňována variabilita ve velikosti genomu v řádu 5–7%. Čím si tento výsledek vysvětlujete, jak jej interpretovat, je rozdíl doložen společnými analýzami odlišných vzorků?
- Isozymové analýzy ukázaly na rozdíly v počtu klonů v populacích i na různou míru podobnosti klonů v rámci druhů. Interpretace výsledků ale schází a prosím o ni u obhajoby. Čili – co bylo očekáváno („nulová hypotéza“) a proč, a co tedy plyne ze zjištěných dat? V úvodu je zmiňována isozymová studie MacDonals & Lieffers 1991 na příbuzném druhu *C. canadensis* – jaká je podobnost / rozdíly získaných výsledků ve srovnání s touto studií, co by případné rozdíly mohly znamenat?
- Poslední odstavec závěru uvádí, že středoevropské rostliny *C. purpurea* agg. nejsou v rozporu s očekáváním obligátně apomiktické. To je aspekt, který ve výsledcích a diskusi vůbec není zmiňován. Jak to plyne ze získaných dat, na čem je toto tvrzení založeno?

Závěr. Diplomová práce Veroniky Schaabové rozsahem i formou zcela vyhovuje a splňuje nároky kladené na magisterské diplomové práce, a proto ji doporučuji k obhajobě. Studentka ve své diplomové práci shromáždila dostatečné množství originálních dat, bohužel ale nevyužila jejich potenciál, pokud jde o interpretaci a diskusi výsledků. Vzhledem k tomu i vzhledem k ne zcela dobré práci s literaturou pak navrhuji hodnocení **velmi dobře**.

V Českých Budějovicích, 12.1.2016


Petr Kouřtecký

-
Drobnější technické připomínky (příloha posudku, u obhajoby neočekávám odpověď):

- složení všech roztoků (isozymy, cytometrie, sekvenování) je vhodnější uvádět v jednotkách koncentrace nezávislé na objemu (molární nebo hmotností či objemová %), než jako recepty pro konkrétní objem
- název „ExoSap“ je laboratorní hantýrka, do odborného textu nepatří, třeba nějak rozepsat („purifikace pomocí enzymů...“)
- tvrzení, že v minulosti se pro isozymovou analýzu používaly škrob nebo agarosa a nyní polyakrylamid není správné, škrobové gely se používají dodnes a polyakrylamid je trochu specifikum českých laboratoří
- u cytometrie nejsou uvedeny koncentrace látek a doby barvení
- uváděné zastoupení GC/AT bází je třeba brát jen jako orientační, nebyly dodrženy všechny podmínky pro přesné měření (opakování měření, příprava vzorku tak, že se připraví jeden vzorek ve větším objemu a následně rozdělí na dva podvzorky pro měření s jednotlivými barvivy); v kontextu práce ale tento výsledek není důležitý
- u isozymů chybí výchozí množství materiálu pro izolaci
- Sørensenův koeficient je definován jako míra podobnosti, jak přesně byl převeden na distanci (použito v analýze hlavních koordinát isozymových dat)?
- str. 21 „sekvenován úsek jaderné DNA (ITS1P-ITS4)“ – správně by mělo být uvedeno „ITS region“ a ne označení primerů, případně je možné vyjmenovat jednotlivé části ITS regionu
- v tab. 12 je zmatené označování signifikance (n.s. – i mnohé další výsledky s konkrétním p jsou nesignifikantní, $p > 0.05$)
- obrázek 20 s alignmentem ITS sekvencí (printscreen předpokládám z programu BioEdit) je velmi špatný, těžko čitelný a nezachycuje celý sekvenovaný úsek ani všechny taxony – mnohem lepší by bylo vytvořit tabulku, která by zahrnovala jednotlivé variabilní pozice alignmentu a pro každý taxon / ribotyp / haplotyp přítomné báze; totéž pro cpDNA
- v přílohách I–III jsou rozpory, u mnoha populací je uváděna plodie, přestože tyto populace podle přílohy nebyly zkoumány průtokovou cytometrií (jak tedy plodie byla zjištěna?) a naopak u některých populací je uvedeno použití cytometrie, ale výsledná plodie chybí
- podle metodiky byly isozymy u všech rostlin odečítány / kódovány jako u tetraploidů, ale v příloze IV je u dvou ze čtyř enzymových systémů použito kódování pro oktoploidy

Oponentský posudek diplomové práce VERONIKY SCHAABOVÉ Variabilita *Calamagrostis phragmitoides* v ČR a srovnání s morfologicky podobnými druhy

Diplomová práce Veroniky Schaabové navazuje na svou bakalářskou práci, v níž řešila morfologickou problematiku a rozšíření druhu *Calamagrostis phragmitoides* v ČR. V předložené práci přidává výsledky z cytometrického studia, výsledků molekulárně-biologických metod a studia izoenzymů.

V rešeršní části práce autorka shrnuje nejdůležitější informace o rodu a postavení studovaného druhu v něm, jakož i dosavadní znalosti o breeding systémech a hypotézy o vzniku studovaného druhu. Cíle práce jsou stanoveny stručně a jasně. Metodická kapitola je dle mého soudu napsána adekvátně. Výsledky jsou srozumitelně strukturovány a dokumentovány vloženými tabulkami a obrázky, průvodní text je dobře osvětluje. V diskuzní části se autorka úspěšně zhostila porovnání svých výsledků s výsledky předcházejících badatelů a s hypotézami, které se vztahují k problému. V závěrečné kapitole srozumitelně odpovídá na otázky formulované v cílech studia

Práce má celkem 51 číslovaných stran, dále přehled použité literatury, který se sestává z 74 titulů, a přílohy, které tvoří 29 stran tabulek s lokalitami a 2 fotografie.

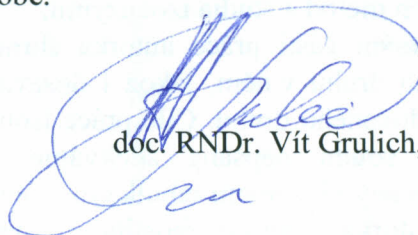
Recenzní připomínky, poznámky a náměty:

- 1) Ze sdělení o celkovém areálu rodu *Calamagrostis* nepřímo vyplývá, že chybí v temperátní zóně jižní polokoule: takto sdělená informace nepostihuje výskyt druhů rodu přinejmenším v nejjižnější části Jižní Ameriky, na Tasmánii a na Jižním ostrově Nového Zélandu (cf. <http://www.gbif.org/>, resp. <http://www.darwin.edu.ar/>).
- 2) K jinak pečlivě úpravě textu připomínám, že je třeba věnovat pozornost rozdělování slov v češtině. Nastavení v použitém editoru to zjevně nezvládá a chybně rozdělená česká slova lze najít na více místech v textu (např. na str. 11, 24, 46, 47).
- 3) Výhradu lze mít k úpravě při psaní skloňovaných číslovek psaných číslicí – čeština nepotřebuje ve skloňovaném výrazu přidávat k číslici koncovku ani s použitím spojovníku (short tilet), jako např. na str. 11 nebo 27 (10-ti, 18-ti, 30-ti), ani bez něj. Tímto nešvarem je v současné době zaplevelen tisk běžných i odborných textů. Navíc je v této záležitosti autorka nedůsledná (cf. str. 11).
- 4) Není žádný důvod psát odkazy na obrázky a tabulky velkými písmeny, např. na str. 27: „*C. canescens* (až 7 %, Tab 8).“
- 5) Na str. 47 jsou zbytečně použita velká písmena v sentenci „neodlišovat Evropské rostliny od Sibirských“.
- 6) Zbytečně je zkracován název kapitoly 6.2 (Odlišení taxonů *C. purp.* agg. a morf. podob. typů).
- 7) Zřídka se v textu objevují slangové výrazy (např. eppendorfka na str. 16).

Závěr:

Předložená práce Veroniky Schaabové považuji za dobrou studii, v níž jsem nenašel závažnější nedostatky. Přináší cenné a seriózní výsledky, které umožní revidovat názory na hybridogenní původ studovaného druhu, které se dosud v literatuře často objevovaly. Oceňuji přehlednou stavbu, zajímavé výsledky i srozumitelný jazyk a nevelké množství typografických chyb, což přispívá k dobrému dojmu z elaborátu. Vytknuté nedostatky nepostihují podstatu. Práci rád doporučuji k obhajobě.

V Brně 12. 1. 2016



doc. RNDr. Vít Grulich, CSc.