

## Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci

**Bc. Petr Drahník: Genetická a morfologická variabilita skupiny *Melampyrum nemorosum***

---

Posuzovaná diplomová práce se zabývá taxonomicky složitou skupinou černýše hajního na úrovni střední Evropy a části Balkánu. Jde o extrémně složité téma – přestože na černýše již byla zaměřena doktorská disertace školitele, jen ve skupině *M. nemorosum* zbylo práce nejméně na jednu až dvě disertace další. To je třeba mít na paměti při posuzování této diplomové práce – úplné vyřešení problematiky této skupiny není v silách jednoho magisterského studenta. Nicméně příspěvek této diplomové práce k poznání černýšů je podstatný a jistě bude dobrým základem pro další práci.

Pokud jde o formální stránku, práce má standardní strukturu a úpravu, jazyk je vesměs korektní a i obrázky jsou vesměs výstižné a zdařilé (výjimky komentuji níže). I seznam literatury je celkem jednotně a standardně zpracován (podíl odchylek a nedůsledností je snesitelně malý).

Na práci velmi kladně hodnotím také pokus o komplexní přístup a integraci výsledků více metod (sekvenování DNA, stanovení velikosti genomu, morfometrika) a poměrně velké množství dat.

Tolik chvála. Smutnou úlohou oponenta je ale hledat i nedostatky a upozornit na nejasnosti. A v tomto směru mi student bohužel nechal dost materiálu. Již strukturu úvodu považuji za ne zcela zdařilou. První kapitola se jmenuje „Vymezení rodu“, ale o tom se vlastně nic nedozvíme a spíše se popisuje vnitřní struktura rodu. Poslední odstavec pak zmateně kombinuje členění rodu a vnitřní členění skupiny *M. nemorosum*, což má být až o kapitolu dál. Kapitola o *M. nemorosum* agg. je vysloveně odbytá – sice se zmiňuje členění na podskupiny a jsou vyjmenovány důležité morfologické znaky, ale čtenář se nedozví, jak se skupina jako celek a jednotlivé podskupiny poznají a které druhy patří do které podskupiny, což by bylo vzhledem k dalšímu obsahu práce zcela klíčové. Víím, že student toto zčásti již měl v úvodu své bakalářské práce, ale krátké zopakování a podrobnější přehled taxonů by nebyly na škodu. Naopak další dvě kapitoly (sezónní variabilita a variabilita ovlivněná hostitelem) by klidně bylo možné vypustit, tyto aspekty nejsou v další práci vůbec diskutovány a uvažovány a celá studie je zaměřena jinak. Závěr úvodu popisuje výchozí stav problematiky a letmo seznamuje čtenáře s nepublikovanými (nebo velmi nedávnou publikovanými) daty školitele. Abych jen nekritizoval, musím pochválit, že z úvodu logicky vyplývají na jeho závěr uvedené dílčí cíle práce, což bohužel není ve studentských pracích pravidlem.

Metodika je psána detailně, zejména pokud jde o technické záležitosti, což je třeba pochválit. Postrádám ale podrobnější informace o sekvenovaných úsecích DNA, zejména o jaderných – pouze předpokládám, že jde o nekódující části (introny?) v rámci uvedených genů. Nedotažené je vymezení skupin populací pro další analýzy a jeho zdůvodnění. V případě skupin definovaných podle výsledků molekulárních metod to lze pochopit, i když i tady by stálo za to pokusit se o „objektivní“ definici. V práci jsou ale používány i geografické skupiny a definice ve výsledcích (str. 26; mělo by to být v metodice) je dosti vágní - prosím, uveďte alespoň při obhajobě, jak a proč (!) byly vymezeny, zejména mi není jasné odlišení skupin „Slovensko/Maďarsko“ a „Karpaty“. V morfometrických analýzách překvapí použití pouze rozměrů (a jejich poměrů) listů, listenů, kalicha a koruny – proč nebyly analyzovány odění kalicha nebo třeba zbarvení listenů, které jsou přitom klíčové pro vymezení druhových (pod)skupin a které by jistě výrazně zlepšily rozlišení těchto analýz?

Výsledková část začíná popisem variability chloroplastové DNA. Je definováno 6 hlavních haplotypových skupin – bohužel klíčový obrázek 10 (haplotypová síť) má v tištěné i elektronické verzi tak malé rozlišení, že počet mutací na jednotlivých větvích sítě si lze pouze domýšlet, o čitelnosti popisků ani nemluvě. Již v části o chloroplastové DNA se setkáváme s podle mě největším problémem předložené práce – popisovaná variabilita a obrázky si částečně neodpovídají. Kromě 6 hlavních

skupin (obrázek 10) jsou v textu diskutovány další podskupiny a jednotlivé populace, které ale nejsou nijak znázorněny, a na obrázku 11 je najednou vyneseno skupin osm – a těchto osm skupin je zřejmě rozlišováno i dále ve většině grafů (včetně morfometriky), ale názvy skupin zase nejsou jednotné. Podobně pro jaderný úsek *agt1* je definováno 5 hlavních skupin alel, ale obrázek 14 a 15 jich zobrazují mnohem více (jakési směsné skupiny, které ale nikde nejsou popsány – jde o populace, kde se vyskytovalo více variant?). Prezentace vztahu jaderných a chloroplastových markerů (obr. 12 a 15) je naprosto nepřehledná, vlastně mi není jasné, co má přesně ukazovat. Myslím, že obecně pro všechny mapky platí, že méně by bylo více – tedy radši samostatné mapky pro každou haploskupinu vedle sebe než spojit vše dohromady.

Dále byla analyzována významná variabilita ve velikosti genomu a morfologie, ale prezentace výsledků je zase zcela nepřehledná. Místo vztahu k hlavním cpDNA nebo *agt1* skupinám je analyzována variabilita v rámci nejasně definovaných geografických skupin, uvnitř kterých jsou opět nějak rozlišovány hlavní haploskupiny. S těmi je zacházeno do jisté míry volně (např. redukce 4 molekulárních skupin do tří pro diskriminační analýzu, str. 42) a není jasné, nakolik si stejně nazvané skupiny odpovídají (tj., vypadají např. rostliny „*degenianum*“ nebo „*nemorosum*“ ze skupin „Česko/Rakousko“ a „Maďarsko/Slovensko“ stejně?). I tato část někdy trpí překombinovaným obsahem obrázků, například ordinační diagram (biplot) na obr. 22 by jistě bylo lépe rozdělit na dva, pro pozice populací a znaky zvlášť.

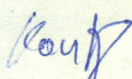
Celkově na mě výsledky dělají dojem, jakoby se student snažil složitou variabilitu celého agregátu *M. nemorosum* uměle „rozškátulkovat“ do nějakých skupin, což ale nejde a výsledkem je těžko uchopitelný chaos.

Kapitola Diskuse byla pro mne celkem zklamáním. Pouhé tři strany jsou vzhledem k výsledkům málo, a to (velmi povrchnímu) srovnání s literaturou je věnována pouze strana první. V diskusi se také dočteme, že výsledky práce jednoznačně ukazují na hybridizaci mezi jednotlivými liniemi a výskyt hybridních zón. Toto je zajímavý a do jisté míry očekávatelný závěr, ale jak se k němu dojde, není z poněkud chaotické výsledkové části zcela jasné – prosím u obhajoby o shrnutí a vysvětlení jak je to myšleno, z jakých dat takový závěr plyne?

Jako téma k obhajobě navrhuji ještě následující zamyšlení nad cpDNA coby hlavním a nejlépe interpretovatelným markerem – něco takového mi v práci také chybí. Je zjištěný počet 217 haplotypů na 2203 bp obvyklý, lze uvést nějaké srovnatelné případy? Je variabilita všech tří sekvenovaných úseků podobná? Poskytují všechny tři podobnou informaci (podobné geografické rozšíření hlavních skupin, apod.)? Pokud ne, čím by to mohlo být způsobeno?

Závěr. Diplomová práce Petra Drahníka jednoznačně splňuje nároky kladené na magisterské diplomové práce a doporučuji ji k obhajobě. Navrhuji hodnocení **velmi dobře**. Práce vyniká množstvím dat a kombinací metodických přístupů. To, že nepřinesla jasné výsledky, je vzhledem ke složitosti tématu pochopitelné. Výhrady mám spíše k práci s literaturou (úvod, diskuse) a zejména k nepřehledné prezentaci výsledků a formální stránce práce (neustálený počet skupin; komplikované obrázky; text a obrázky si neodpovídají - v obrázcích znázorněny i skupiny, které nejsou v popiscích a v textu, a naopak).

V Českých Budějovicích, 16.5.2016

  
Mgr. Petr Kouřil, Ph.D.

**Genetická a morfologická variabilita skupiny *Melampyrum nemorosum***

Hodnotit zdařilost práce by mělo být možné posouzením, do jaké míry byly naplněny cíle stanovené v úvodu. V případě diplomové práce Petra Drahníka je to problém, protože cíle (na str. 12) vymezil převážně ve smyslu použít nějakou metodu nebo sampling. To jsou ale již prostředky vedoucí k naplnění cílů. Vlastní cíle měly být definovány ve smyslu „co má být zjištěno“ nebo „jaké hypotézy budou testovány“. Tím, že tak autor neučinil (resp. učinil jen z menší části), promeškal příležitost přesvědčit v úvodu čtenáře, že motivací k řešení této práce byly zajímavé myšlenky, které stojí za to zkoumat do hloubky. Celkově na mě předložená práce působí dojmem, že autor umí používat různé metodické přístupy generující data, ale poněkud vázne interpretace a syntéza získaných informací. Některá tvrzení se nezdají být pevně podložena, ani autorovými výsledky, ani dřívějšími poznatky jiných badatelů. K tomu přistupuje místy méně pečlivá formální úprava textu, která snižuje jeho srozumitelnost.

Pokusím se svoje dojmy podložit několika konkrétními připomínkami. Očekávám, že otázky, které jsou v těchto připomínkách obsaženy, autor při obhajobě zodpoví.

(1) Vzhledem k tématu práce může mít jméno *Melampyrum nemorosum* více významů – celý okruh *M. nemorosum* agg. (zahrnující kromě druhu *M. nemorosum* i druhy jako *M. subalpinum*, *M. hoermannianum*, *M. velebiticum* aj.), nebo jen druh *M. nemorosum* sensu stricto. Proto měl autor buď všude v textu důsledně za jménem psát buď zkratky „agg.“ nebo „s. str.“, nebo na začátku práce např. definovat, že není-li uvedena zkratka „agg.“, rozumí se tím pouze jeden druh (s. str.). Čtenář by pak nebyl nucen dumat nad tím, co se v konkrétní části textu za jménem *M. nemorosum* vlastně skrývá (např. v 1. větě na str. 25; v poslední větě na téže straně je pro změnu ojedinele použito "*M. nemorosum* sensu lato", přičemž není jasné, zda to má být totéž, co *M. nemorosum* agg., nebo něco jiného).

(2) Anotace shrnuje především informace z úvodu a metodiky práce. S výjimkou sekvenace chloroplastové DNA není uvedeno, jaké hlavní výsledky z analýz vyšly.

(3) Na str. 7 se píše, že geografická vikariance skupin haplotypů *Melampyrum nemorosum* agg. má zřejmě historické důvody a že se dnes původně izolované linie dostávají do kontaktu. **Má autor pro toto tvrzení nějaké zdůvodnění? Jaké historické důvody vedly k vytvoření severní a jižní linie *M. nemorosum* a proč se dnes dostávají do sekundárního kontaktu?**

(4) Na začátku str. 9 autor píše, že mnoho studií dokazuje, že přítomnost více genotypů v populaci je způsobena splynutím izolovaných genetických linií z odlišných glaciálních refugií. **Proč je tedy citována pouze jedna zoologická práce, když je takových studií „mnoho“? Skutečně si autor myslí, že hlavním důvodem pro „přítomnost více genotypů v populaci nebo druhu“ je splývání genetických linií pocházejících z odlišných refugií? Nezaměnil autor pojmy „genotyp“ a „haplotyp“?**

(5) V posledním odstavci str. 9 je uvedeno, že skupiny haplotypů *M. nemorosum* agg. jsou odlišeny "poměrně výrazně". **Nevadí tvrzení o „výrazném odlišení“ skutečnost, že bootstrapové podpory existence těchto linií jsou dosti nízké (jižní linie má podporu 78, severní 54 – viz obr. 4)?**

(6) Pochopil jsem na str. 10 správně, že z jižních populací *M. nemorosum* s. str. mají větší genom jen ty, které rostou ve stejné oblasti jako *M. subalpinum*? Pokud ano, nemělo by se

v předchozí větě psát, že velikost genomu je korelována s rozlišením na severní a jižní linii haplotypů.

(7) Obr. 5 na str. 11 má nesrozumitelnou popisku. Není ani uvedeno, který taxon byl měřen a proč byly měřeny právě populace „Nitra“ a „Buková“. Mělo být také napsáno, že jde o relativní velikost genomu (ne absolutní).

(8) V práci je uváděn pouze počet studovaných populací (str. 14, 18, 20). Nikde není uveden konkrétní počet studovaných rostlin z jednotlivých populací, tato informace mohla být součástí Přílohy 1.

(9) Obr. 7 na str. 21 je nepřehledný. Často není možné rozlišit, kde na sebe 2 různé úsečky navazují a kde se pouze protínají. Číselné kódy znaků jsou nejednotně umístěny (někdy nad středem úsečky, někdy u okraje), takže někdy není jasné, kterému rozměru patří.

(10) V obr. 10 na str. 27 nejsou kvůli malému písmu poznat populace nebo haplotypy, o kterých se v textu na str. 25–26 píše. Nedostatečný je popis obrázku. Mělo zde být napsáno, která barva označuje kterou skupinu haplotypů. Bylo by to vhodnější, než popisovat barevné označení skupin přímo v hlavním textu, jak autor učinil.

(11) Obr. 14 na str. 30 má nedostatečný popis. Ani v textu práce není uvedeno, co znamenají dvoupísmenná označení „SN“, „SW“, „CS“, „CN“. Totéž u obr. 15.

(12) **Obvykle je při studiu blízké příbuzných taxonů problém spíš s nízkou (nebo nulovou) variabilitou sekvenovaného úseku DNA. Čemu tedy vadí vysoká variabilita úseku At103 jaderné DNA (str. 31, poslední věta)?**

(13) V popisu Tab. 8 na str. 33 není vysvětleno, co znamenají pracovní termíny „sample CV mean“, „poměr max“, „poměr průměr“ atd. a co vyjadřuje řádek „variabilita“.

(14) Poslední tři věty na str. 38 patří do metodiky, ne do výsledků.

(15) **Jaký smysl má pro morfologické odlišení haplotypů provádět „separátní analýzy na úrovni jednotlivých geografických skupin“ (str. 42–44, a také první čtyři věty posledního odstavce na str. 46)? Nebude výsledkem takových analýz morfologická definice haplotypů platná jen v určitém geografickém regionu? V jiném regionu se pak pro odlišování těch samých haplotypů budou muset používat jiné morfologické znaky?**

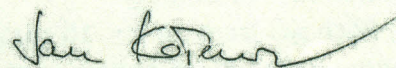
(16) Na str. 45 se píše, že předpokládané oblasti glaciálních refugií se vyznačují výskytem specifických haplotypů a alel *M. nemorosum* agg. **Mohl by autor přehledně zrekapitulovat, které konkrétní oblasti refugií jsou charakteristické výskytem kterých konkrétních specifických genetických skupin?**

(17) **Proč (na str. 46) autor považuje v okruhu *M. nemorosum* agg. hybridizaci za pravděpodobnější zdroj sekvenční diverzity než *incomplete lineage sorting*? Jakou oporu ve svých datech pro tuto domněnku má?**

(18) **Proč je podle autora pomalá migrace druhu podmínkou, aby byl „vhodný pro rekonstrukci evoluční historie“ (poslední odstavec na str. 47)?**

Je třeba ocenit, že autor se ujal řešení náročného tématu, poctivě se mu věnoval a udělal spoustu těžké práce při sběru materiálu v terénu, při morfologických měřeních, v molekulární a cytometrické laboratoři i při statistickém vyhodnocování dat. Odevzdaná práce bezpochyby splňuje požadavky kladené na magisterskou diplomovou práci. Její slabší stránkou je určité nedotažení textu po obsahové i formální stránce. **Doporučuji proto diplomovou práci Petra Drahníka hodnotit stupněm velmi dobře.**

Hradec Králové, 16.5.2016



RNDr. Jan Košnar, Ph.D.