



Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Mgr. Pavla Kúra: "Biosystematic revision of the *Spergularia echinosperma* complex".

I. Obecný komentář

Pavla Kúra znám od roku 2006. Měl jsem možnost vidět jej vícekrát přednášet na každoročních česko-slovenských setkáních studentů rostlinné biosystematiky a sledovat genezi jeho studia kuřinek. Pavlovy přednášky byly vždy logicky správně uspořádané a v argumentaci přesvědčivé. I když jeho způsob přednesu se může v některých rysech jevit poněkud vzdálený mainstreamové formě, dokáže Pavel, možná i kvůli němu, posluchače opravdu zaujmout a přinutit je hltat každou větu. Navíc z každé jeho přednášky je přesvědčivě cítit jeho zápal pro studovaný problém. Z tohoto důvodu jsem se rád ujal oponentury jeho disertační práce.

Disertace Pavla Kúra sestává ze 7 hlavních částí:

1. částí je stručný úvod shrnující jak studované druhy, tak evoluční mechanismy, které se u nich uplatňují a jejichž taxonomické důsledky byly předmětem disertace; úvodní stať uzavírá výčet cílů práce. (Celkem má tato část 16 stran včetně bohatého seznamu literatury)

2–5. část tvoří články věnované (i) analýze morfologické a cytotypové variability *Spergularia echinosperma* (incl. *S. kurkae*) a *S. rubra*, (ii) vývoji mikrosatelitových markerů pro *S. echinosperma*, (iii) geografickému rozšíření studovaných a příbuzných či ekologicky podobných taxonů v České republice a (iv) molekulární analýze hybridního původu *Spergularia kurkae*, která v návaznosti na cytotypovou a morfologickou analýzu publikovanou v článku 1 definitivně etablovala tento taxon jako dobrý hybridogenní druh (Dohromady mají tyto 4 části 65 stran). Všechny 4 články byly publikované v časopisech indexovaných v databázi Web of Science: 3 články v časopise PRESLIA (současný IF=2.711, patří tedy do Q1 v klastru Plant sciences v rámci databáze JCR); 1 článek v časopise CONSERVATION GENETICS

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav botaniky a zoologie

Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika
T: +420 549 49 1439, E: vslezak@sci.muni.cz, botzool.sci.muni.cz
Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224
V odpovědi prosím uvádějte naše číslo jednací.



RESOURCES (současný IF=0.446, čili Q4 jak v klastru BIODIVERSITY CONSERVATION tak v klastru GENETICS & HEREDITY v rámci databáze JCR).

6. částí je rukopis článku, připraveného k odeslání a věnovaného geografické a morfologické variabilitě uvnitř *Spergularia echinosperma*; článek vyústuje v rozlišení nového poddruhu (Celkem 14 stran).

7. částí jsou stručně formulované hlavní závěry a výsledky disertace (1 strana)

Na všech 7 částech má kandidát rozhodující autorský podíl. U publikovaných článků, stejně jako u rukopisu článku připraveného k publikaci, je prvním autorem, u ostatních částí autorem jediným.

Kromě publikovaných a k publikaci připravených statí, zařazených do disertace, publikoval kandidát ještě další tři práce – dva články v recenzovaných časopisech a jednu kapitolu v knize. Dvě z těchto dalších prací mají rovněž přím vztah k tématu disertace.

II. Diskusní připomínky, otázky a náměty k obhajobě

(1) První kapitoly úvodní části disertace jsou psány „učebnicovým“ způsobem a jejich čtenáři „se vysvětluje“, co je to hybridizace, polyploidie, ... jak vznikají, atd. Chápu-li to správně – má tato kapitola ukázat také vysvětlovací schopnosti doktoranda – to, jak logicky správně a při tom pro čtenáře srozumitelně dokáže vyložit a logicky poskládat excerpovaná fakta o jevech a procesech, jimiž se v disertaci zabývá. **Poznámka 1:** Z tohoto čistě didaktického hlediska považuji za drobný lapsus v argumentaci tu část, v níž je v rámci mechanismů vedoucích ke vzniku polyploidie probíráno somatické zdvojení chromosomů v důsledku mitotických abnormit. Pavel zde podle mne měl uvést, že tyto abnormity se často vyskytují zejména u homoploidních mezidruhových hybridů. Kdyby tak učinil, tak by jeho

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav botaniky a zoologie

Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika

T: +420 549 49 1439, E: vslezak@sci.muni.cz, botzool.sci.muni.cz

Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

V odpovědi prosím uvádějte naše číslo jednací.



následná argumentace, že tímto způsobem vznikl dokonce první dokumentovaný alopolyloid *Primula kewensis*, byla didakticky korektnější, neboť bez odkazu na homoploidní mezidruhové hybridy by pozorný a logicky uvažující, ale vědou nepolíbený, čtenář musel v duchu předchozích odstavců, kde se dozvěděl jaký je rozdíl mezi autopolyploidií a alopolyploidií, na tomto místě očekávat, že somatické zdvojení povede logicky především ke vzniku autopolyploida a ne zrovna alopolyploida, kterým je zde argumentováno. Pokud je čtenář o problému zpraven a ví, že *Primula kewensis* byla před somatickým zdvojením homoploidním hybridem, problém sice neshledá, ale takový čtenář zase nebude takovou stať asi číst ... Jiné logicky správné řešení by zde bylo (i) přidat vysvětlující poznámku pod čarou, z níž by se čtenář dozvěděl, že *Primula kewensis* byla před somatickým zdvojením homoploidní mezidruhový hybrid, nebo (ii) namísto *Primula kewensis* odkázat na nějakého autopolyploida – u těchto dvou řešení by už samozřejmě nebylo třeba uvádět, že abnormality mitotické jsou u homoploidních mezidruhových hybridů častější. (Na tuto připomínku nevyžadují při obhajobě odpověď, pokud bude shledána jako oprávněná, v opačném případě uvítám vysvětlení, v čem se ve svých úvahách mýlím).

(2) V úvodní stati je polyploidie (především alopolyploidie) líčena mj. jako mechanismus, který svému nositeli dává jen samé výhody. Bez ohledu na to, že krytosemenné rostliny podstoupily ve své fylogenezi několik celogenomových duplikací, nemáš přece jen dojem, že vzhledem k tomu, kolik nezávislých polyploidizací lze v druzích nespočetných rodů sledovat v jejich populacích prakticky v reálném čase, by takových cyklů muselo být řádově více? Zejména tehdy kdyby skutečně představovaly jen „vyhlídky světlých zítřků“ o kterých píšeš? Také latitudinální distribuce polyploidů může o evoluční výhodnosti polyploidie leccos naznačovat. Zkrátka považovat polyploidizaci za výhradně pozitivně-adaptivní proces mi přijde dnes přece jen trochu překonané. Existují práce dokazující řadu nevýhod, které polyploidie svým nositelům přináší, zejména v kontextu jejich kompetice s diploidními progenitory. Dokonce ani názor, že v drtivé většině představuje polyploidie slepou uličku evoluce, není dnes raritou. **Otázka 2:** Mohl bys prosím alespoň některé hlavní nevýhody polyploidie, opomenuté v úvodní stati, doplnit aspoň během obhajob nebo, pokud zcela nesouhlasíš s takovýmto pohledem na polyploidii, nějak toto své stanovisko v rozpravě obhájit?

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav botaniky a zoologie

Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika

T: +420 549 49 1439, E: vslezak@sci.muni.cz, botzool.sci.muni.cz

Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

V odpovědi prosím uvádějte naše číslo jednací.



(3) Ve čtvrtém článku byl na základě spolupřítomnosti druhově specifických ribotypů *Spergularia echinosperma* a *S. rubra* identifikován hybridní původ *S. kurkae*; dále byl podle druhově specifických chloroplastových markerů identifikován mateřský druh tohoto hybridogenního druhu, kterým byla *S. echinosperma*. Byl tedy použit jeden jaderný gen, který nebyl zcela druhově specifický, tj. echinospermoidní ribotyp se vyskytoval u 18 % jedinců *Spergularia rubra*, resp. ten rubroidní se naopak vyskytoval 10% jedinců *Spergularia echinosperma* a jeden gen chloroplastový. Postup je korektní, ale při takto nízkém počtu genů chybí v diskusi alternativní evoluční scénář, který mohl dospět ke stejnému patternu v pozorovaných molekulárních datech i bez hybridizace (Incomplete lineage sorting).

Otázka/námět 3: Mohl bys prosím, aspoň během obhajoby tuto alternativní interpretaci vašich dat doplnit a popsat (třeba i graficky v prezentaci), tj. (i) popsat jak alternativní fylogenezi všech tří druhů tak, aby nebyla hybridogenní a respektovala jak fylogenezi ribotypů a zároveň popsat i (ii) trendy změn ve frekvencích (popř. fixacích) ribotypů během této alternativní fylogeneze tak, aby byla v souladu s výsledným recentním stavem detekovaným a popsáním v článku č. 4.

(4) V článku 4 je také diskutován mezidruhový genový tok. Možnosti interpretace výsledků článku 4 tímto směrem poněkud omezuje sampling vzorků *Spergularia rubra*, prováděný pro účely tohoto článku pouze z území společného výskytu všech tří druhů. Nabízí se proto: **Otázka 4a:** Netestovali jste dodatečně přítomnost echinosporoidního ribotypu také v nějakých vzdálenějších populacích *Spergularia rubra*, u nichž lze genetický kontakt se *S. kurkae* alespoň z geografického hlediska vyloučit? **Otázka 4b:** Máš v plánu využít mikrosatelitní markery vyvinuté v článku 2, k analýze mezidruhového genového toku diskutovaného v článku č. 4?

(5) V článku 5 je řešeno rozdělení *Spergularia echinosperma* na dva poddruhy, a to na základě jejich (i) geografické vikariance, (ii) rozdílné barvy osemení a (iii) rozdílu v dalších morfologických znacích (délka plodních stopek, délka listů). To je postup legitimní a v obdobných studiích v minulosti vícekrát použitý. Nicméně v tomto konkrétním případě bylo podle mne korektnější nejprve doložit, že hnědosemenná a černosemenná populace jsou geneticky zcela nebo zčásti izolované. Přeskočit tento krok a analyzovat nejdříve morfologii a geografii totiž nijak nevylučuje ze hry případnou fenotypovou plasticitu, zodpovědnou za potenciálně stejný geografický a morfologický pattern v rámci druhu. Vynechání genetické

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav botaniky a zoologie

Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika

T: +420 549 49 1439, E: vslezak@sci.muni.cz, botzool.sci.muni.cz

Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

V odpovědi prosím uvádějte naše číslo jednací.



následná argumentace, že tímto způsobem vznikl dokonce první dokumentovaný alopolyloid *Primula kewensis*, byla didakticky korektnější, neboť bez odkazu na homoploidní mezidruhové hybridy by pozorný a logicky uvažující, ale vědou nepolíbený, čtenář musel v duchu předchozích odstavců, kde se dozvěděl jaký je rozdíl mezi autopolyploidií a alopolyploidií, na tomto místě očekávat, že somatické zdvojení povede logicky především ke vzniku autopolyploida a ne zrovna alopolyploida, kterým je zde argumentováno. Pokud je čtenář o problému zpraven a ví, že *Primula kewensis* byla před somatickým zdvojením homoploidním hybridem, problém sice neshledá, ale takový čtenář zase nebude takovou stať asi číst ... Jiné logicky správné řešení by zde bylo (i) přidat vysvětlující poznámku pod čarou, z níž by se čtenář dozvěděl, že *Primula kewensis* byla před somatickým zdvojením homoploidní mezidruhový hybrid, nebo (ii) namísto *Primula kewensis* odkázat na nějakého autopolyploida – u těchto dvou řešení by už samozřejmě nebylo třeba uvádět, že abnormality mitotické jsou u homoploidních mezidruhových hybridů častější. (Na tuto připomínku nevyžaduji při obhajobě odpověď, pokud bude shledána jako oprávněná, v opačném případě uvítám vysvětlení, v čem se ve svých úvahách mýlím).

(2) V úvodní stati je polyploidie (především alopolyploidie) líčena mj. jako mechanismus, který svému nositeli dává jen samé výhody. Bez ohledu na to, že krytosemenné rostliny podstoupily ve své fylogenezi několik celogenomových duplikací, nemáš přece jen dojem, že vzhledem k tomu, kolik nezávislých polyploidizací lze v druzích nesčetných rodů sledovat v jejich populacích prakticky v reálném čase, by takových cyklů muselo být řádově více? Zejména tehdy kdyby skutečně představovaly jen „vyhlídky světlých zítřků“ o kterých píšeš? Také latitudinální distribuce polyploidů může o evoluční výhodnosti polyploidie leccos naznačovat. Zkrátka považovat polyploidizaci za výhradně pozitivně-adaptivní proces mi přijde dnes přece jen trochu překonané. Existují práce dokazující řadu nevýhod, které polyploidie svým nositelům přináší, zejména v kontextu jejich kompetice s diploidními progenitory. Dokonce ani názor, že v drtivé většině představuje polyploidie slepou uličku evoluce, není dnes raritou. **Otázka 2:** Mohl bys prosím alespoň některé hlavní nevýhody polyploidie, opomenuté v úvodní stati, doplnit aspoň během obhajob nebo, pokud zcela nesouhlasíš s takovýmto pohledem na polyploidii, nějak toto své stanovisko v rozpravě obhájit?

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav botaniky a zoologie

Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika

T: +420 549 49 1439, E: vslezak@sci.muni.cz, botzool.sci.muni.cz

Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

V odpovědi prosím uvádějte naše číslo jednací.



analýzy by se dalo pochopit, kdyby nebyl nástroj, jak genetickou separaci analyzovat. Ale to není tento případ, protože vhodný nástroj – sada mikrosatelitních lokusů a primerů k jejich amplifikaci – byla popsána a vyvinuta přímo pro druh *Spergularia echinosperma* a publikována již v roce 2014 – v článku č. 2. Nabízí se proto: **Otázka 5a:** Proč nebyly tyto markery dosud použity k analýze genetické separace obou poddruhů? **Otázka 5b:** V jakém je tento probíhající výzkum v současnosti stavu (viz též poznámka v diskusi v rámci článku 5, resp. závěrečná věta General conclusions samotné disertace). V této souvislosti je také zvláštní, že v úvodu disertace – v části Aims of the thesis se uvádí, že článek 5 tyto mikrosatelitní markery využívá, což mi při čtení zmíněného článku poněkud uniklo.

(6) Ve finální části disertace – v „General conclusions“ – mi bez dalšího upřesnění přijdou poněkud protichůdná tvrzení: (i) „*Spergularia kurkae* ... mostly occurs in the absence of parental species“ (incl. *S. echinosperma*) x (ii) „distribution ranges of *S. echinosperma* and *S. kurkae* ... largely overlaps“. **Otázka/námět 6:** Mohl bys prosím toto upřesnění vyslovit při obhajobě.

(7) Jedním ze závažných důsledků polyploidizace může být posun k selfkapatibilitě (myšleno od selfinkopatibility diploidního progenitora), zejména brzy po vzniku polyploida to může být klíčový moment jeho přežití. U *Spergularia kurkae* by proto byl takový scénář případný. **Otázka 7a:** Prováděli jste nějaká srovnání *S. echinosperma* a *S. kurkae*. Pokud ne, **otázka/námět 7b** je: popiš metodu, kterou by se to dalo relativně snadno testovat v kultivaci. **Otázka 7c:** Který z molekulárních markerů by se k tomuto účelu dobře hodil?

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav botaniky a zoologie

Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika

T: +420 549 49 1439, E: vslezak@sci.muni.cz, botzool.sci.muni.cz

Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

V odpovědi prosím uvádějte naše číslo jednací.



III. Závěrečné zhodnocení:

Disertace Pavla Kúra představuje podle mého názoru velmi hodnotný přínos k pochopení taxonomických vztahů *Spergularia rubra* – *S. echinosperma* – *S. kurkae* ve střední Evropě. Počtem publikací převyšuje většinu ostatních disertací v oboru botanika. Kandidát prokázal tvůrčí schopnosti a značné dovednosti jak v metodách molekulárních, cytometrických či morfometrických, tak i v jejich taxonomické interpretaci. Výsledky dokázal efektivně publikovat. Vřele proto doporučuji tuto disertační práci k obhajobě a považuji ji za splňující požadavky k udělení doktorské hodnosti v oboru Botanika.

V Brně 13. dubna 2017

doc. RNDr. Petr Bureš, Ph.D.

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav botaniky a zoologie

Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika

T: +420 549 49 1439, E: vslezak@sci.muni.cz, botzool.sci.muni.cz

Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

V odpovědi prosím uvádějte naše číslo jednací.





Centrum biológie rastlín a biodiverzity

SLOVENSKÁ AKADEMIA VIED



Mgr. Judita Zozomová, PhD.

Centrum biológie rastlín a biodiverzity SAV, Dúbravská cesta 9, SK-845 23 Bratislava

Tel: +421 904 434 770, E-mail: judita.zozomova@savba.sk

Bratislava, 4. 4. 2017

Oponentský posudok na dizertačnú prácu Mgr. Pavla Kúra: *Biosystematic revision of the *Spergularia echinosperma* complex*

Predkladaná dizertačná práca je zameraná na biosystematické štúdium stredoeurópskeho endemita, taxonomicky problematického druhu *Spergularia echinosperma*. Hlavné ciele práce boli vytýčené nasledovne: 1. Zistiť aká je morfológická a cytotypová variabilita a štruktúra druhu *S. echinosperma* a jeho príbuzného druhu *S. rubra*. Preskúmať, či morfológia a veľkosť genómu podporujú existenciu ich domnelého hybridu, *S. xkurkae*. 2. Overiť hybridizáciu medzi druhmi aj pomocou genetických markerov, objasniť pôvod *S. xkurkae* a prípadnú introgresiu medzi druhmi. 3. Vymapovať rozšírenie druhov rodu v ČR. 4. Vyriešiť taxonomický koncept *S. echinosperma* - charakterizovať jeho morfológickú variabilitu a korelácie s geografickým rozšírením a typmi biotopov. 5. Vyvinúť mikrosatelitové markery pre *S. echinosperma* a vyhodnotiť možnosť ich využitia aj v druhu *S. rubra*.

Na riešenie nastolených tém autor použil kombináciu rôznych metodických prístupov, konkrétne, morfometrické analýzy, prietokovú cytometriu (na stanovenie plochnej úrovne ako aj veľkosti genómu), molekulárne markery (jadrová ribozomálna DNA, cpDNA, mikrosatelity – tie len v štádiu vývoja pre budúce použitie).

Práca pozostáva zo všeobecného úvodu, cieľov práce, piatich vedeckých článkov a záverečného zhrnutia výsledkov. Štyri z článkov už boli publikované v rokoch 2012-2016 (v časopisoch *Preslia* a *Conservation Genetics Resources*), jeden je v štádiu rukopisu. Všeobecný úvod je venovaný problematike, ktorá sa bezprostredne týka témy práce. Zahŕňa kapitoly venované polyploidii a hybridizácii, pričom sa autor sústreďuje na spôsoby a procesy vzniku polyploidov a hybridov, tiež na otázku možného ohrozenia vzácnych druhov v dôsledku ich kríženia s príbuznými druhmi, ako aj na metódy detekcie hybridov, najmä použitie rôznych genetických markerov. V úvode ďalej stručne charakterizuje študovaný rod a druh, resp. komplex príbuzných druhov, najmä z hľadiska taxonómie a ekológie. Poukazuje pritom na ich nedostatočné poznanie a nejasnosti, z ktorých vyplynula potreba dôkladnejšieho systematického štúdia.

Článok I (*Preslia*, 2012) sa zaoberá štúdiom morfologickej a cytotypovej variability druhov *S. echinosperma* a *S. rubra* na území ČR. Autori zistili diploidný a tetraploidný cytotyp v rámci *S. echinosperma* a len tetraploidy u druhu *S. rubra*. Dokázali jednoznačné morfológické odlišnosti

medzi týmito dvoma druhmi, ako aj medzi cytotypmi v rámci *S. echinosperma*, a tiež zistili odlišné veľkosti genómu. Autori naznačili, že na základe morfológie by tetraploidy *S. echinosperma* mohli predstavovať hybridy medzi diploidmi tohto druhu a tetraploidmi *S. rubra*, avšak zistená veľkosť genómu tento scenár nepodporuje a v hre zostávajú aj iné možnosti vzniku tetraploidov (napr. autopolyploidizácia). Taxonomické hodnotenie tetraploidov *S. echinosperma* zostáva teda otáznе a bude vyžadovať podrobnejšie štúdium.

V článku II (Conservation Genetics Resources, 2014) autori vyvinuli 16 polymorfných mikrosatelitových markerov pre budúce populačno-genetické štúdium druhu *S. echinosperma*.

Článok III (Preslia, 2016) predstavuje výsledky mapovania výskytu cievnatých rastlín na území ČR a je dielom širšieho autorského kolektívu. Pavel Kúr v rámci neho spracoval rozšírenie druhov rodu *Spergularia*. Obsahom práce sú mapy rozšírenia doplnené o taxonomické a ekologické poznámky k spracovaným druhom.

V článku IV (Preslia, 2016) sa autori detailne venujú hybridizácii medzi druhmi *S. echinosperma* a *S. rubra* s použitím genetických markerov (rDNA, cpDNA). Autori využili metódy priameho sekvenovania, molekulárneho klonovania ako aj metódu použitia druhovo-špecifických (resp. *repeat-specific*) primerov, ktorá umožňuje presne a efektívne zistiť prítomnosť jednotlivých ribotypov v genómoch rodičovských druhov a hybridov. Na základe výsledkov sa jednoznačne potvrdil hybridný (alopolyploidný) pôvod *S. xkurkae* a zároveň naznačil prebiehajúci génový tok medzi *S. xkurkae* a *S. rubra*, avšak nie smerom k *S. echinosperma*. Tento výsledok je zásadný, keďže ukazuje, že genetická integrita vzácneho a endemického druhu *S. echinosperma* nie je bezprostredne ohrozená introgresiou genetického materiálu zo širokorozšíreného druhu *S. rubra*, aj keď rolu môže stále zohrávať kompetícia s alopolyploidom *S. xkurkae*, ktorý má širšiu ekologickú niku a hojnejší výskyt.

Článok V (nepublikovaný rukopis) sa detailnejšie venuje morfologickej variabilite *S. echinosperma* prakticky v celom areáli, t.j. aj na území Nemecka. Autori identifikovali dva morfortypy, geograficky a sčasti aj ekologicky diferencované, ktoré sú tu klasifikované na úrovni poddruhov. Uvažujú tiež o ich možnom vzniku a šírení, avšak na objasnenie evolučnej histórie bude potrebné ďalšie štúdium.

K práci mám nasledovné pripomienky a podnety do diskusie:

- 1) Dizertačná práca predstavuje ucelené dielo, bez ohľadu na to, že výsledky sú publikované vo viacerých článkoch. Preto negatívne vnímam fakt, že ciele práce sú popisované a rozdelené striktne podľa článkov (str. 9). Ciele sú okrem toho naformulované skôr ako popis obsahu jednotlivých článkov, než ako skutočné ciele štúdia.
- 2) Stav poznania študovanej skupiny sa jej štúdiom vyvíja a je preto pochopiteľné, že závery z článku z roku 2012 (článok I) nemusia byť úplne v súlade s novšími zisteniami a interpretáciami (články III-V). V článku I autor totiž uvádza, že druh *S. echinosperma* zahŕňa diploidný aj tetraploidný cytotyp, zatiaľčo v neskorších článkoch sa druh *S. echinosperma* charakterizuje ako výlučne diploidný. Až z kontextu týchto neskorších článkov sa dá tento, na prvý pohľad zjavný rozpor, pochopiť. Tetraploidný cytotyp, uvádzaný pod menom *S. echinosperma* v článku I, je už v ďalších článkoch zjavne

priradený k alopolyploidu *S. kurkae*. Toto však nie je nikde explicitne takto vysvetlené, ani v samotnej dizertačnej práci (napr. v kapitole *General conclusions*) ani v článkoch pri citovaní výsledkov z článku z roku 2012. Pre lepšie pochopenie a prepojenie jednotlivých štúdií by preto bývalo vhodnejšie pri odvolávaní sa na výsledky z článku I priamo uviesť, že ide o tetraploidy najskôr priradované pod *S. echinosperma* a až ďalšie štúdium ukázalo ich alopolyploidný pôvod a totožnosť s už opísaným hybridom *S. xkurkae*.

Podobne sa v článku I používa farba semien ako *a priori* znak diferencujúci *S. rubra* (hnedé semená) a *S. echinosperma* (čierné semená), avšak v článku V je farba semien (opäť čierna a hnedá) určujúca pre odlíšenie dvoch morfortypov v rámci *S. echinosperma* (klasifikovaných ako poddruhy)! Je teda farba semien v druhu *S. echinosperma* variabilná? Nemohol tento fakt negatívne ovplyvniť analýzy v článku I, kde boli rastliny s hnedými semenami považované za *S. rubra*? Alebo bol v článku I teda zahrnutý len jeden morfortyp/poddruh *S. echinosperma*, t.j. ten s čiernymi semenami? V článku I sa tiež spomína ťažko klasifikovateľná Veselsky populácia s tmavohnedými semenami, ktorá vyšla ako morfológicky prechodná. Prečo nebola táto populácia zahrnutá aj v článku V? Predstavuje morfortyp s hnedými semenami, teda subp. *albensis*?

- 3) V článku I v morfometrickom vyhodnotení autor používa diskriminačné analýzy, ktoré pracujú s vopred zadanými skupinami na základe tzv. triedneho znaku. Týmto znakom tu bola zvolená farba semien. Takýto prístup môže byť značne riskantný a viesť až k nesprávnym uzáverom – t.j. ak sa vyberie akýkoľvek morfológický znak na definovanie jednotiek a následné zisťovanie morfológickej diferenciácie medzi nimi (neskoršie zistenia skutočne aj ukázali, že to naozaj nie je vhodný znak, keďže je variabilný v rámci druhu *S. echinosperma*). Preto sa pýtam, prečo autor nepoužil najskôr iné metódy, ako napr. PCA (analýzu hlavných komponentov), na zistenie a ohraničenie skupín, resp. nebral do úvahy iné, nemorfológické znaky (veľkosť genómu, typ biotopu), ktoré boli k dispozícii a dali by sa lepšie použiť na *a priori* definovanie skupín?
- 4) Názov dizertačnej práce je "Biosystematic revision of the *Spergularia echinosperma* complex". Toto označenie "*Spergularia echinosperma* complex" však nie je použité v žiadnom z článkov, ani v úvode práce a nie je teda ani nikde vysvetlené či definované, čo sa myslí pod týmto komplexom. Prečo autor nepoužil koncept druhového komplexu aj v samotnej práci?
- 5) Nesúhlasím celkom s tvrdením, že pre testovanie hypotéz o hybridizácii sú vhodnejšie mnohokópiové DNA markery než jedno- a nízkokópiové (kapitola *Detecting hybridization*, str. 6). Biparentálna dedičnosť mnohokópiovej rDNA je často narušená homogenizáciou kópií v rámci a medzi lokusmi (tzv. *concerted evolution*), čím sa signál hybridizácie môže veľmi rýchlo a úplne stratiť (dokazujú to aj mnohé štúdie), naopak, nízkokópiová DNA si zvyčajne dlhšie zachováva homeologické lokusy v genóme alopolyploida a proces homeologickéj rekombinácie je zriedkavejší a aj ľahšie identifikovateľný. V genóme *S. kurkae* sa síce zachovali v podstate nenarušené ITS ribotypy od oboch rodičov, je to však skôr výnimočné zistenie a nie je možné ho takto zovšeobecňovať. Z metodického hľadiska by som skôr zdôraznila nutnosť použitia viacerých nezávislých markerov pre spoľahlivú a správnu rekonštrukciu hybridného pôvodu.

- 6) V článku II autor vyvinul mikrosatelitové markery pre budúce detailnejšie genetické štúdium druhu *S. echinosperma*. V článkoch IV a V aj stručne odkazuje na prebiehajúce SSR analýzy, v zmysle, že môžu ozrejmiť viac z evolučnej histórie študovaných populácií. Je trochu škoda, že sa nepodarilo zaradiť tieto analýzy aj do dizertačnej práce. Predsa by ma zaujímalo, či má autor už nejaké predbežné výsledky, ktoré by prinášali nové zistenia pre študovaný druh.

Celkovo môžem konštatovať, že riešená téma je aktuálna, nastolené otázky sú relevantné a metodický prístup je vhodný. Práca prináša konkrétne výsledky pre lepšie poznanie študovaného druhu a tiež prispieva k poznaniu procesov hybridizácie a polyploidizácie a ich evolučnému významu. Zároveň ukazuje kam sa bude uberať ďalšie štúdium tohto evolučne zaujímavého komplexu. Skúšobnej odborovej komisii jednoznačne odporúčam prijať túto dizertačnú prácu a po jej úspešnej obhajobe navrhujem udeliť uchádzačovi akademický titul „philosophiae doctor“.

Lolani