

Oponentský posudek na bakalářskou diplomovou práci Kristýny Pokorné: Morfologická a molekulární variabilita, rozšíření a ekologie druhů *Lewinskya affinis* a *Lewinskya fastigiata*

Autorka se zabývá problematikou odlišení dvou taxonů mechů čeledi Orthotrichaceae, které byly v minulosti nejčastěji považovány za jeden druh. Je třeba ocenit, že autorka se přímo pustila do analýzy dat získaných sběrem vlastního materiálu. Zejména morfometrický přístup zahrnující větší množství zkoumaného materiálu je v taxonomických studiích mechorostů v dnešní době spíše opomíjený. Je to dáno časovou náročností měření morfologických struktur, které je často nahrazováno molekulární analýzou. Morfologická data ale mají nezastupitelnou a zcela zásadní roli pro praktické aplikace (determinační literatura). Zpracování a diskuze morfologických dat je kvalitní, protože autorka zároveň využila i molekulární data, má její přístup potenciál na robustní i prakticky použitelné závěry. Autorka měla svým způsobem ulehčenou práci, neboť problematika okruhu *L. affinis* byla v posledních dvou letech intenzivně studována pracovní skupinou B. Vigalondo – to není výtka, snižující cenu této bakalářské práce, autorka ale mohla dostupné nové informace lépe a efektivněji využít. Některá data jsou bohužel neúplně prezentována – není např. uvedeno, ze kterých konkrétních lokalit pocházely položky použité pro morfometrickou a molekulární analýzu, nebo četnost zastoupení obou druhů na jednotlivých studovaných lokalitách. V práci se vyskytují občasné překlepy, nepříjemnější jsou ale nepřesné formulace/interpretace dostupných dat.

I přes výše uvedené výtky práce splňuje požadavky kladené na bakalářské práce, doporučuji ji k obhajobě a navrhuji hodnocení velmi dobře, v případě kvalitní obhajoby výborně.

K práci mám následující připomínky a otázky:

Úvod

Autorka uvádí, že komplex *L. affinis* je pravděpodobně parafyletický. Na základě čeho tak soudí? (citovaná práce Vigalondo 2019 komplex za parafyletický nepovažuje).

V sekci 1.2 je stručný popis sekvenačních markerů používaných v systematice mechorostů. Citelně zde ale chybí markery použité Vigalondo 2019 přímo pro okruh *L. affine* (jsou zmíněny až v metodice).

Metodika

Autorka pro vyjádření vlhkostních podmínek stanoviště použila kritérium přítomnost blízkého vodního zdroje vzdáleného do 30 m od sběru. **Nehrozí, že byly opomenuty menší toky (nezaznamenané na daném mapovém podkladu), nebo významné vodní zdroje lehce přesahující vzdálenost 30 m? (např. řeka ve vzdálenosti 40 m apod.)**

V metodice získání molekulárních dat (2.3) autorka uvádí, že studované taxony se odlišovaly ve všech 4 úsecích použitých Vigalondo 2019. V citované práci ale netestovali každý úsek samostatně, použili fylogenetickou analýzu všech 4 úseků spojených do jedné matice. **Zkoušela autorka porovnávat rozlišení *L. affinis/L. fastigiata* pro každý jednotlivý úsek z citované práce? A proč se rozhodla právě pro úsek rps4, který má nejnižší variabilitu?**

Výsledky a Diskuse

Vyhodnocováním morfologických dat autorka narazila na problém, že v datasetu je z celkového počtu 292 položek pouze 18 položek přiřaditelných k *L. fastigiata* (plus 18 položek přechodných). **Má autorka nějaký návrh, jak pozměnit strategii samplingu, aby posílila zastoupení (vzácnější) *L. fastigiata*?**

Již porovnání předběžné determinace s ověřením druhové příslušnosti podle DNA sekvencí odhalilo problémy se spolehlivostí morfologické determinace. Autorka proto použila diskriminační analýzu pro konstrukci modelu, který kombinuje morfologické znaky tak, aby co nejlépe odpovídaly molekulární identifikaci. **Protože molekulární determinace byla provedena pouze u 17 vzorků, odhalené morfologické**

determinační znaky nemusí být zcela robustní. Měla by autorka nějaké jednoduché řešení, jak tento problém překonat?

Proč nejsou v Příloze 1 jednoduše uvedeny lokalizace sekvenovaných a měřených položek? Je to poměrně zásadní informace, čtenář tak nemá představu, odkud vlastně pocházely analyzované položky, jak probíhal jejich výběr a zda je reprezentativní (nepochází z nahlučených lokalit), a také jaké bylo rozšíření obou taxonů na lokalitách.

Položky sekvenované na atpB-rbcL mají odlišné označení v Obrázku 9, v Příloze 1 a v Příloze 2. Vzhledem k významu samotné možnosti porovnat odpovídající si morfologická a molekulární data je třeba dbát na jednoznačnou identifikaci položek. Dále, vzhledem k tomu, že *L. affine* (20051a) a *L. fastigiata* (20051f) mají stejné herbářové číslo, nejedná se o další směšnou položku?

V Příloze 1 není uvedeno, že by 2 položky sekvenované na úsek atpB-rbcL (38f-kp a 45a-kp) byly zařazeny do morfologických zkoumání – jak tedy byly determinovány? Vzhledem k tomu, že úsek atpB-rbcL byl sekvenován jen u dalších 3 položek, není tím zpochybněna použitelnost jeho variability pro rozlišení obou taxonů?

V Diskusi 4.1 autorka uvádí, že 'rozlišení druhů na základě sekvenace úseků atpB-rbcL a rps4 funguje u rostlin z ČR, ale že by bylo třeba molekulární variabilitu obou druhů studovat na širším areálu' - tato formulace není přesná, použitelnost obou úseků se patrně liší:

A) Jak hodnotí úsek rps4, který byl Vigalondo 2019 sekvenován u dalších 27 položek obou taxonů (a jsou již tedy dostupná data z širšího areálu)?

B) Variabilita sekvenované části úseku atpB-rbcL je lokalizovaná v poly-A regionu, tzv. chloroplastovém mikrosatelitu. Jde o rychleji mutující oblast, ve které nové haplotypy vznikají inzercí/delecí báze (v tomto případě A), a není vyloučené, že i u nepříbuzných vzorků mutacemi vznikne stejný stav znaků. Autorka poukazuje na to, že 1 vzorek *L. affinis* (patrně MH275431, Španělsko, BV015) a 1 vzorek *L. fastigiata* (patrně MH275432, Turecko, BV016) se v počtu A zcela shodují, mají 4 delece. Informace o tom, že se tyto zahraniční vzorky obou taxonů v atpB-rbcL shodují, je poměrně zásadní. Stejnou sekvenci jako její vzorky *L. fastigiata* dále mají také vzdálenější taxony *L. rupestris* (MH229758, KT804374) nebo *L. speciosa* (MH229667). Jak tedy autorka hodnotí použitelnost úseku atpB-rbcL pro rozlišení jejích taxonů – je opravdu spolehlivý? (a je spolehlivý i pro rostliny z ČR?) Tímto nechci kritizovat autorku za analýzu atpB-rbcL, je chválné, že zkoušela více markerů, je ale nutná obezřetnost při interpretaci dat.

Kapitola 4.3 - autorka zjistila, že *L. fastigiata* rostla vždy v prostředí s blízkým zdrojem vody, to odporuje závěrům Vigalondo 2020, která naopak pro tento taxon uvádí sušší, izolovaná a více exponovaná stanoviště. Autorka tento rozpor nediskutuje, nemohla by kromě samotné přítomnosti vodního zdroje hrát roli také exponovanost stromů?

Závěr

Autorka uvádí, že druhy nevykazují na našem území vnitrodruhovou variabilitu analyzovaných sekvencí. Je toto zjištění robustní? (u úseku atpB-rbcL bylo sekvenováno pouze 5 položek).

V Č. Budějovicích 10.1.2021



Mgr. Jirí Košnar, Ph.D.