

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci
Jana Nakládalová: Variabilita druhu *Calamagrostis varia*

Předložená diplomová práce se zabývá druhem *Calamagrostis varia*, zejména jeho morfologickou variabilitou, hybridizací a fylogeografií (i když toto slovo se neobjevuje v cílech práce, je zjevně v pozadí otázek týkajících se rozdíly mezi jednotlivými částmi areálu a mezi různými biotopy). Téma bylo určitě vhodně zvolené, druh má docela specifické rozšíření a ekologické nároky, které slibují něco zajímavého. Pro českou botaniku je významný i svojí vzácností, i když nad tímto aspektem by se kolegové z Rakouska nebo Slovenska asi trochu podivili.

Na práci oceňuji široký záběr, kombinující více metod a více typů dat (morfologie, velikost genomu, sekvenování chloroplastové DNA), i dostatečné množství dat – přičemž ze své vlastní zkušenosti vím, jak jsou zdouhavá a nevděčná práce je měření mikroskopických morfologických znaků. Oceňuji rovněž rozsáhlou literaturu a snahu jednotlivé typy dat porovnat a propojit a diskutovat, v tom je právě kouzlo použití více metod. Pokud jde o formální stránku, práce má standardní strukturu, jazyková úroveň je nadprůměrná a celý text je psán s minimem překlepů (obojí chci speciálně vyzdvihnout), pouze některé obrázky se při převodu z Wordu do PDF ocitly jinde, než měly být, a několik drobných chyb a nejednotností je v seznamu literatury. Ale to jsou celkem nepodstatné detaily.

Úkolem oponenta je ale kromě chválení hledat i nedostatky. Především je na práci poznat, že radostné události v osobním životě uchazečky ovlivnily jak práci v laboratoři (chybějící analýzy jaderné DNA, zase ale musím pochválit, že studentka si je tohoto problému vědoma na více místech práce to zmiňuje a nepovažuje to za nedostatek práce), tak samotné psaní práce. Některá místa proto zůstala nedotažená nebo nedomyšlená. V následujícím odstavci uvádím několik příkladů, otázky, na které bych rád slyšel odpověď u obhajoby, jsou označeny kurzívou.

Úvod práce hezky popisuje studovaný rod a druh, jeho rozšíření, morfologii apod. Dále zahrnuje obecná témata (polyploidizace, hybridizace, historie vegetace a fylogeografie), která jsou všechna zcela relevantní vzhledem k tématu práce. Bohužel jsou ale tyto části dosti povrchní, obsahují některá nepřesná tvrzení, ale zejména mi chybí navázání k tématu práce. U polyploidizace je zmíněna problematika paleo- a neopolyploidie (přestože druhý termín v práci překvapivě není, studovaný druh je přitom neopolyploidem), auto- vs. allopolyploidie, atd. Bohužel už se nedozvíme, co z toho se týká studovaného druhu a rodu. *Ví se něco o původu polyploidních třtin (což jsou prakticky všechny), jsou to allo- nebo autopolyploidy?* I pokud se nic neví, mělo to být výslovně zmíněno. V části o hybridizaci jsou značné nepřesnosti, například zde kromě homoploidní hybridizace a polyploidní hybridizace (z kontextu je jasné, že se vlastně myslí vznik allopolyploidů) chybí ještě heteroploidní hybridizace (křížení dvou různých ploidii, bez následného zmnožení počtu chromosomů). Nemohu souhlasit s tím, že homoploidní hybridizace je méně častá (str. 5) – ano, vzácný je vznik nových druhů (reprodukčně izolovaných od rodičů) homoploidní hybridizací, ale tento typ hybridizace jako takový je velmi častý – nakonec s jedním takovým homoploidním hybridem, *C. xacutiflora*, je studovaný druh *C. varia* nejčastěji zaměňován. Stejně tak uvedené mezirodové křížence (str.4-5) lze těžko považovat za samostatné rody. Ale hlavně – v práci se dočteme, že rozsáhlé hybridizační pokusy na rodu třtina prováděl Nygren (1946, 1948), dočteme se, že tetraploidní třtiny jsou sexuální, ale už se nedozvíme, *jestli měl v pokusech i studovaný druh C. varia a pokud ano, jaké byly hlavní výsledky*. Něco málo je zmíněno u popisu druhu, ale v kapitole o hybridizaci mi to chybí. Závěrem úvodu je velmi stručná kapitola Vegetace Evropy v holocénu, která se ale vlastně jen dotýká problematiky glaciálních refugií, a podkapitola fylogeografie, kde jsou uvedeny případy různých studií na rostlinách. Ale opět – *bylo někdy něco děláno na třtinách a (z druhé strany) na druzích, které mají podobné ekologické nároky a rozšíření jako studovaná C. varia a které by bylo možné s výsledky této diplomové práce přímo porovnat?*

Dále se zaměřím spíše na jednotlivé typy analýz a výsledků než na části práce (Metodika, Výsledky, atd.). Pokud jde o cytometrické analýzy, jsou popsány a vyhodnoceny pečlivě. Přesvědčivě ukazují, že *C. varia* se liší od *C. arundinacea* i *C. epigejos*, což by podle některých teorií mohly být její rodičovské druhy, diskuse k tomuto tématu je velmi pěkná. Dobře dokumentované jsou i nečekaná přítomnost hexaploidů a neobvyklá velikost genomu populace z Milešovky. Určitou chybou je jen testování rozdílů mezi skupinami, které (a) chybí v metodice, (b) ve výsledcích není uvedena hodnota testové statistiky (např. t nebo F) a (c) zdá se, že byla použita série t-testů pro každý pár, což není správně (správně je ANOVA s mnohonásobným porovnáním). Chválím, že autorka výslovně upozorňuje na neobvykle velkou variabilitu ve velikosti genomu, a to i při

vylovení „odlehých hodnot“ (mimoходом, tento přístup považuji za velmi nebezpečný, pokud pro vylovení z dat není nějaký objektivní důvod, jakým by byla např. nízká kvalita těchto analýz). Pak se ovšem v diskusi dočteme, že faktory způsobující vnitrodruhovou variabilitu velikosti genomu shrnují Šmarda a Bureš (2010), ale to hlavní zase chybí – *kteé faktory to jsou a zejména, které z nich by mohly hrát roli u studované třtiny (resp. u všech třtin, variabilní jsou i ostatní druhy)?*

Morfometrická analýza dobře dokumentuje relativní uniformnost *C. varia* i rozdíly proti nejpodobnějšímu druhu *C. arundinacea*. Trochu je škoda, že nebyl zahrnut i hybrid *C. xacutiflora*, ale chápu, že na začátku práce při sběru není možné myslet na všechny možnosti. Velmi chválím střízlivou interpretaci dat, tj. že se autorka nesnaží interpretovat všemožné malé rozdíly a drobné skupinky ve shlukových analýzách a PCA, které mohou být do značné míry náhodné. Drobnou chybou je jen popis diskriminační analýzy s postupným výběrem (nejde o hledání nejvýznamnějších znaků odlišující druhy, ale o hledání minimální sady znaků pro odlišení druhů, i některé další znaky mohou druhy odlišovat, jen nejsou kvůli korelacím vybrány) a větší pak neuvedení testování jednotlivých znaků (na str. 27 se píše, že se druhy v jednotlivých znacích signifikantně lišily, ale není uvedeno, jak bylo testováno ani numerické výsledky testů).

Molekulární analýzy chloroplastové DNA sice odhalily nečekaně vysokou variability (pokud jde o počet haplotypů), ale její struktura je těžko interpretovatelná. Což není chyba, to se prostě občas stane. V této části jedinkrát autorka sklouzla k hodně spekulativní interpretaci výsledků – za sebe musím říct, že vezmu-li v úvahu počet vzorků a jejich prostorové rozmístění, tak v datech žádnou fylogeografickou strukturu nevidím. Zároveň mám k metodice a výsledkům molekulárních analýz nejvíce technických připomínek a dotazů. (1) Je velká škoda, že v práci není alignment získaných sekvencí, resp. tabulka zobrazující variabilní pozice pro 22 zjištěných haplotypů. Čtenáři by hodně pomohlo, kdyby se mohl podívat, v jakých mutacích se jednotlivé haplotypy podobají nebo liší. (2) V metodice se píše, že nebyly skórovány indely, které ale mohou být velmi informativní. *Proč nebyly skórovány, o jaký typ variability šlo?* (3) Z kontextu práce je jasné, proč byly analyzovány druhy *C. arundinacea* a *C. epigejos*. *Proč jsou ale do analýz zařazeny druhy C. brachytricha a C. purpurea, které jinak v práci vůbec nejsou zmíněny. Tvoří s ostatními příbuzenskou skupinu? Pokud ano, jak moc je tato skupina v sekvenovaných úsecích odlišná od jiných méně nepříbuzných třtin?*

K molekulárním analýzám mám ještě poslední obecnější dvě otázky:

(1) *Je sdílení haplotypů mezi druhy C. varia, C. arundinacea a C. epigejos nutně důsledkem hybridizace nebo společného původu druhů (tj. ancestrálního polymorfismu)?*

(2) *Jaké jiné typy analýz než parsimonní síť by pro získaná sekvenční data mohly připadat v úvahu?*

Celkově diplomová práce Jany Nakládalové jednoznačně splňuje nároky kladené na diplomové práce, doporučuji ji k obhajobě. Vzhledem k tomu, jak se v mém posudku střídají pochvaly a stesky nad určitou nedotažeností práce, navrhuji hodnotit stupněm **výborně nebo velmi dobře**, podle průběhu obhajoby.

V Českých Budějovicích, 10.1.2021

Petr Koutecký