

## Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci

### ***Bc. Alžběta Férová: Reprodukční mechanismy apomiktických a sexuálních druhů kapradin***

---

Magisterské práce Alžběty Férové se zabývá některými aspekty reprodukce kapradin, zejména klíčením výtrusů a vývojem gametofytů v kultivaci, a srovnává průběh klíčení a růstu u sexuálních a apomiktických druhů a jejich kříženců. Součástí práce je i rozsáhlá rešerše zaměřená na tato témata. V druhé části je porovnávána ploidie gametofytů a z nich rostoucích sporofytů, s cílem identifikovat rostliny, u kterých dochází ke změnám v ploidii. Témata jsou aktuální a zcela zapadají do výzkumu kapradin na PŘF JU.

Úvodní rešerše je založená na nadprůměrně velkém množství pramenů a je velmi detailní, pokud jde "technické" záležitosti: co všechno ovlivňuje klíčení výtrusů, tvorbu gametangií, atd. (médiu, osvětlení, teplota, atd.). Celkem nepochybuji, že zahrnuje všechny dostupné relevantní zdroje, včetně mnohých hůře dostupných. Toto je nepochybně velký klad předložené práce. Na druhou stranu je rešerše přehledem jednotlivých výsledků, chybí mi určité shrnutí a propojení informací. Bylo by důležité i pro metodiku – např. jak dlouho trvá klíčení výtrusů u různých druhů (průměr, rozptyl hodnot), na základě čehož bylo pro pokus zvoleno sledování po X týdnů... Vzhledem k zaměření rešerše mi i některé nadpisy (např. 3.1 Faktory ovlivňující reprodukční mechanismy kapradin) poněkud nadnesené. Za tím bych spíš čekal obecné informace o původu apomixie u kapradin (jak často vzniká, proč, které faktory to ovlivňují, atd.), o čemž práce není. Na některé obecné informace, které mi v rešerši nejvíce chybí, se zeptám na konci tohoto posudku.

První část práce se týká klíčení výtrusů a vývoje gametofytů. Byl testován vliv stáří výtrusů a jejich zaslání poštou (což je poměrně originální proměnná, ale proč ne, je to inovativní pohled). Již v této části se setkáváme s problémy, které se pak mnohokrát opakují. Uvádí se, že u druh X klíčil nebo neklíčil, kolik % výtrusů klíčilo, atd. Bohužel pro většinu druhů byly k dispozici výtrusy z jediné rostliny. To je pochopitelné vzhledem k časové náročnosti pokusů, ale tento fakt by měl být při interpretaci výsledků (tj. minimálně v diskusi) opakovaně zdůrazněn. Čili nikoliv že druh X neklíčí, ale že neklíčily výtrusy konkrétního jedince daného druhu. *Nakolik je jeden jedinec reprezentativní? Lze to alespoň trochu odhadnout z těch druhů, u kterých bylo studováno víc jedinců – jaká byla mezi jedinci variabilita?* Jinak řečeno, nemohou individuální rozdíly stát za neúspěchem klíčení některých druhů (tj. kdyby byla k dispozici jiná rostlina, dopadl by pokud jinak)? *A poslední – byla doba 4 týdnů dostatečná, netrvá u některých druhů klíčení déle?* Odpověď na tuto poslední otázku mohla dát rešerše – to je právě propojení informací zmiňované výše. Podobné interpretační problémy se opakují i v dalších částech práce, kde byl posuzován tvorba laterálního meristému, gametangií a sporofytů, to zde již nebudu opakovat.

Pokud jde o statistické vyhodnocení, zde je bohužel spousta nejasností (u obhajoby prosím o odpověď na ty zvýrazněné kurzívou). Uvádí se různá data v %, ale není jasně řečeno, co je základem. *U klíčení výtrusů bych očekával, že jsou uvedena kumulativní % (a do statistických testů vstupuje stav na konci pokusu, je to tak?)* Nicméně např. u tvorby gametangií se mluví o tom, že u některé skupiny dochází v některém týdnu k poklesu – co jsou % zde? *Je to procento gametofytů zbylých po odstranění gametofytů zkoumaných v předešlém týdnu? A co jsou % u sporofytického potenciálu?* Použití zobecněných lineárních modelů (GLM) s binomickým rozdělením je obecně správně, ale konkrétní provedení není dostatečně popsáno. V modelech s více proměnnými je nutné specifikovat, jak přesně byly testovány (každá zvlášť nebo ve společném modelu, pokud ve společném, v jakém pořadí?) U těchto dat lze očekávat tzv. overdispersion, bylo toto zohledněno? Předpokládám, že ne – ale pak jsou ale výsledky testů nepřesné (příliš optimistické, pravděpodobnost chyby prvního druhu může být výrazně vyšší). *V obrázku 2 (klíčivost výtrusů 4. týden) jsou data překvapivě proložena přímkou – proč, když byl počítán GLM? Podobně v obrázku 23 (sporofytický potenciál), zde navíc není jasné, co jsou vynesené body, a minimálně závislost pro apomikty je na první pohled nelineární.* Poslední technická otázka se týká testování rozdílů mezi

způsoby reprodukce (sexuálové, apomikti, kříženci) v časovém průběhu tvorby anteridií, archegonií pomocí metody RDA. To je poměrně neobvyklé – a v metodice mi zase chybí nějaká úvaha o tom, že takto postavený test má smysl, případně citace nějaké práce, kde tato metodika byla použita (pokud neexistuje, rozhodně tím nechci říct, že nový nápad je *a priori* špatně). *Zase – co byla studovaná procenta, jsou hodnoty pro jednotlivé týdny nějak spojené (jak by byly např. u kumulativních procent)?*

Poslední část práce se týká vyhodnocení ploidie gametofytů a sporofytů, zjevně s cílem (a) potvrdit apomixii (ploidie sporofytu je stejná jako ploidie gametofytu) a (b) nalézt rostliny, které mají sexuální proces. Metodicky situaci komplikuje fakt, že pro část druhů (kde byly k dispozici pouze výtrusy a z nich vypěstované gametofyty a sporofyty) není známa relativní velikost genomu mateřské rostliny, takže musíme předpokládat, že majoritní signál jí odpovídá. Toto nepovažuji za problém, ale mělo by to být diskutováno. Byly použity dva standardy, což je u tohoto množství taxonů zcela pochopitelné – *ale chybí informace, jestli byly výsledné hodnoty relativní velikosti genomu přepočítány na jeden z nich, pokud ano, na který?* Bohužel mám vážné pochyby o vyhodnocení cytometrických dat – a tedy o všech interpretacích těchto výsledků. Software použitý k analýze (Flowing software) neznám, ale podle dostupných manuálů jde o software umožňující rychlou analýzu mnoha vzorků podle přednastavených a v rámci jedné datové sady neměnných parametrů. To je pro data v této diplomové práci naprosto nevhodné. Znamená to, že musel být definován *gate* (rozsah hodnot pro pík vzorku a pík standardu) – jenže tyto pozice nejsou u použitého cytometru zcela neměnné, jsou zde drobné posuny mezi vzorky, a zároveň vzorky kapradin (a zejména gametofytů) mají často poměrně intenzivní pozadí a píky jsou tvořeny poměrně málo částicemi. V této situaci, pokud je *gate* velmi úzký (přesný pro definující vzorek), nemusí obsahovat příslušný pík u jiných vzorků (posun pozice), pokud je definován široce (aby pík vždy obsahoval), zahrnuje vždy zároveň i pozadí. Podle mého názoru je u těchto konkrétních dat nutná korekce nastavení specificky pro každý vzorek. *Není právě zvolený způsob analýzy důvodem někde velmi vysokých koeficientů variance (tabulka 2 a 3) i „hodnot s odlišnou velikostí genomu“?* V tabulce 2 je u některých taxonů obrovský rozptyl relativních velikostí genomu a související vysoké směrodatné odchylky (*Dryopteris affinis*, *D. borreri*, *Doodia caudata*; u *D. affinis* je rozdíl max a min zhruba 7.5-násobný!) – a přesto jsou tyto taxony zjevně považovány za nevariabilní, nejsou nijak komentovány. *Prosím o komentář.* Podobně to platí pro vzorky s udávanou variabilitou – *skutečně tam byla, skutečně jsou poměry vzorek/standard při přesném („ručním“) takové, jako je uvedeno?* Rozhodně by bylo u těchto případů ukázat konkrétní histogram (*prosím alespoň o jeden příklad u obhajoby*).

Kromě výše uvedených v podstatě technických otázek mám ještě následující obecnější:

- Testy zaměřené na stáří výtrusu a přesun poštou zahrnují velmi různé taxony. Bohužel pro většinu z nich neexistují opakování a neexistují všechny kombinace (tj. výtrusy daného taxonu mají pouze určité stáří a pouze určitý způsob zacházení). Lze v tomto případě oddělit vliv studovaných faktorů a vliv taxonu jako takového (každý se může chovat jinak)? Nemohl tento fakt ovlivnit i testy apomikti vs. sexuálové? Podle tabulky 1 byly vzorky sexuálů většinou mladé (pouze tři jsou starší než 2 roky), zatímco u apomiktů je značný rozptyl.
- Jedna ze studovaných charakteristik byla tvorba laterálního meristému. Z práce mi však není jasné, proč je to důležité, co to vypovídá o životním cyklu a reprodukci daného taxonu. Prosím o objasnění u obhajoby.
- Mezi literaturou a výsledky této práce je jeden zajímavý rozpor. Výsledky této práce ukazují, že pokud apomikti tvoří archegonia, jsou tato pravděpodobně nefunkční (jinak řečeno, pokud mají funkční gamety, tak samčí). Zároveň jsou citovány studie, které naznačují, že pro některé taxony/křížence by apomiktický taxon mohl být mateřský. Máte nějaké vysvětlení? Co je obecně známo o dědičnosti apomixie u kapradin?
- V práci postrádám celkové shrnutí. Jak se mohou zjištěné závislosti projevovat v přírodě (např. pokud jde o úspěšnost apomiktů na úrovni lokálních populací, celkového rozšíření, intenzity hybridizace, apod.).

Pokud jde o formální stránku, předložená práce má obvyklou strukturu a je psána srozumitelně, i když některé obraty a formulace jsou jazykově kostrbaté (za všechny např. nadpis 5.2 Revize gametangií u apomiktů v literatuře); pravopisných chyb a překlepů je málo, ale najdou se. Neobvykle působí zbytečně široký levý okraj, stejně tak je neobvyklé číslování tabulek římskými čísly. Občas se vloudila laboratorní hantýrka, která by v psaném textu neměla být – např. výraz petriska (navíc s malým p). Některé formulace jsou nepřesné, což trochu vadí zejména v metodice, ale většinou se dá pochopit, co autorka myslela – např. na straně 28 se na začátku kapitoly 4.3 uvádí, že ploidní úroveň byla zjišťována u 18 rostlin, ale přitom jde o potomstvo 18 rostlin a vzorků bylo několik set. Pokud jde o citace literatury, mají jednotný formát a neobjevil jsem chybějící citace (chválím! i když jsem vzhledem k množství nekontroloval všechny), pouze použití *and* (např. Bicknell and Koltunow 2004) v českém textu působí zvláštně.

Shrnutí. Magisterská práce Alžběty Férové je zaměřena na zajímavou část reprodukce kapradin a přináší originální data, která, předpokládám, budou časem publikována. Pokud jde o množství odvedené práce v kultivacích i pokud jde o množství prostudované literatury, je tato práce nadprůměrná. Na druhou stranu, text je v určitých místech nedotažený a nejasnosti jsou i ve zpracování dat a jejich statistickém vyhodnocení. Z těchto důvodů navrhuji při zdařilé obhajobě klasifikovat předloženou práci stupněm **velmi dobře**.

V Českých Budějovicích, 17. 5. 2021

Petr Koutecký