



**Oponentský posudek diplomové práce studentky Zuzany Vlčkové: „Reprodukční izolace diploidů a tetraploidů druhu *Vicia cracca* a možnosti evoluce tohoto agregátu“**

Vypracovala RNDr. Jana Jersáková, PhD.

Předložená práce se zabývá reprodukčními bariérami polyploidního druhu *Vicia cracca* a nastiňuje možnosti výzkumu evoluce daného agregátu. Práce je členěna do standardních kapitol a vlastní text bez literatury a příloh má rozsah 49 stran. Z hlediska celkového shrnutí předložené práce studentka sesbírala zajímavá data, ale kvalita práce utrpěla mnoha níže uvedenými formálními a obsahovými nedostatky. Text na mě působí dojmem, že byl zpracován na poslední chvíli a proto obsahuje řadu nekonzistencí a nedopracovaných částí. Autorka projevila v úvodu i diskuzi vcelku dobrou orientaci v literatuře týkající se reprodukční izolace polyploidních rostlin, ale vzhledem k její omezené existenci měla sáhnout i po jiné literatuře týkající se reprodukčních bariér sympatrických nepolyploidních druhů. Vytyčené cíle práce týkající se hybridizace *in situ* zůstaly nesplněné a z práce se nedozvíme, proč se tak stalo. Diskuze pak diskutuje jen část zjištěných výsledků. Předloženou práci doporučuji k obhajobě a celkově bych ji hodnotila stupněm dobře.

**Úvod** práce je členěn na dvě části. První se zabývá popisem reprodukčních bariér, které dělí na prereprodukční (před opylením) a postreprodukční. Pokud ovšem za generativní reprodukci rostlin považujeme tvorbu semen a tedy vznik zygoty, nelze prereprodukční bariéru ukončit procesem opylení, nýbrž procesem oplození. Bylo by vhodnější, kdyby autorka zvolila jasně vymezené termíny pre- a postzygotické bariéry, čímž by se vyhnula nekonzistenci v přiřazení konkrétních bariér k jednotlivým typům. Např. v obr. 1 má uvedenou mechanickou izolaci tvořenou stavbou květů až za opylením, tato bariéra ale brání přenosu pylu, působí tedy před opylením. Autorka v kapitole popisuje funkci a význam jednotlivých bariér, ne vždy se ale drží správného členění. Např. uvádí sílu potřebnou k otevření květu jako jednu z bariér odděleně od stavby květu, přestože se obě řadí k mechanické izolaci.

Autorka v literární rešerši používá více méně veškerou dostupnou literaturu týkající se reprodukční izolace u polyploidních rostlin, avšak málokdy se ji pokusí nějakým způsobem syntetizovat, generalizovat. Např. u fenologie polyploidních druhů se dozvíme, jakých výsledků jednotlivé studie dosáhly, ale nedovíme se, zda panuje nějaký obecný trend v tom, že by např. vyšší ploidie kvetly obecně později. *Dá se nějaký takový obecný trend z fenologie polyploidů odvodit?*

Autorka zmiňuje existenci prostorové izolace, ale nijak dál s ní v úvodu nepracuje. Myslím, že by bylo vhodné popsat primární a sekundární vznik hybridních zón. Např. Petit et al. 1999 ve svém review v TREE kvantifikují prezygotické mechanismy u různých druhů a ukazují, že prostorová izolace je stejně častá jako fenologická izolace. *Jakým způsobem vznikají hybridní zóny u polyploidních rostlin nejčastěji, tj. primárně či sekundárně?*

U popisu chování opylovačů autorka předkládá výsledky různých studií, ale *co tedy vybízí opylovače k tomu, aby se choval nenáhodně? Jaké květní signály mohou podpořit vznik etologické izolace?* Studii Husband & Schemske 2000 by bylo vhodnější nahradit studií

Kennedy et al., která dospěla k podobným závěrům, ale mimo jiné kvantifikovala přenos pylu mezi cytotypy a vysvětlila proč opylovači častěji navštěvují 4x – spektrum opylovačů bylo shodné, ale různí opylovači vykazovali různou míru věrnosti cytotypu.

Celkově bych si úvod představovala lépe strukturovaný, jdoucí více k meritu věci bez zbytečné omáčky, na kolika jedincích bylo co měřeno. Autorka také mohla sáhnout po literatuře týkající se reprodukčních bariér mezi sympatricky rostoucími nepolyploidními druhy, která by se jí hodila např. v části o nektaru či asortativním chování opylovačů.

Druhá část úvodu se věnuje *in situ* hybridizaci, jakožto metodě vhodné ke zjištění evolučního původu druhů v agg. *V. cracca*.

**Metodická část** je napsaná srozumitelně, přesto k ní mám několik poznámek. Např. při pozorování opylovačů obvykle uvádíme souhrnný počet hodin, po které bylo pozorování prováděno; kapitola Produkce a složení nektaru by měla vynechat v názvu složení, protože tím se autorka vůbec nezabývala; u kapitoly Velikost pylových zrn není jasné odkud autorka vzala materiál; podobně u kapitoly Umělé křížení není jasné, kde byl pokus proveden. *Do jaké míry se mohla při ručním křížení různých populací projevit outbreední deprese?* U *in situ* hybridizace chybí informace o tom, pod čím se prohlíží připravené preparáty.

U analýzy dat chování opylovačů mám výhrady ke zpracování dat. Autorka použila pokus s pravidelným rozmístěním cytotypů a kvantifikovala počty přeletů mezi ploidiemi. Jak sama správně uvádí v diskuzi, tohle uspořádání může vést k nadhodnocení přeletů mezi různými cytotypy, což se také zjevně v její práci stalo. V takovém případě měla vydělit počet mezicytotypových přeletů 2, čímž by zjistila, že se jejich počet neliší od přeletů mezi stejnou ploidií. Autorka v diskuzi píše, že by bylo vhodné v novém experimentu zajistit stejnou vzdálenost mezi cytotypy. *Jak by takový pokus vypadal?*

Vhodnější přístup ke sledování a vyhodnocení dat chování opylovačů je práce s jednotlivými jedinci hmyzu, u kterých sledujeme sekvenci navštívených rostlin. Z takových dat můžeme zjistit věrnost konkrétních jedinců, tj. frekvenci přeletů mezi cytotypy a v rámci cytotypů, a jejich vliv na přenos pylu. Domnívám se, že autorka taková data nasbírala, ale plně nevyužila jejich potenciál. Např. autorka zjistila u čmeláků a pískorypek preference pro jeden či druhý cytotyp, ale už se nepodívala na to, jak moc specifictí byli jednotliví jedinci ve svých přeletech a jak často docházelo k přenosu mezi cytotypy. Čmeláci z jednoho hnízda často navštěvují odlišné druhy rostlin, protože se mezi sebou nedomlouvají o potravní nabídce jako včely. Pokud má autorka řadu pozorování pro každého jedince, mohla spočítat index preference/věrnosti pro každého z nich a ty pak statisticky vyhodnotit.

Na straně 30 autorka prezentuje hypotézy 5 a 6. *Jak se tyto dvě hypotézy od sebe liší?*

**Výsledky** jsou prezentovány celkem přehledně s drobnějšími formálními nedostatky v popisu tabulek. V metodice si autorka vytyčila u chování opylovačů 6 očíslovaných hypotéz, ve výsledcích čísluje jen tři z nich. *Čím si autorka vysvětluje větší záchyt 4x semenáčků u 2x rodičů v roce 2011 než u jejich semen?* U pokusu s umělým křížením píše, že se pokus nepodařil, protože po opylení nevznikla žádná semena. Autorka se mohla pokusit identifikovat důvody, proč žádná semena nevznikla. *Špatně rostliny opylovala?* V metodice autorka píše, že plody sebrala a analyzovala průtokovou cytometrií, což je v rozporu s tím, že se žádná semena nevyvinula. Autorka v rámci výsledků prezentuje jeden roztlak chromozomů s tím, že zbytek práce na hybridizaci *in situ* je v optimalizaci. Vzhledem k tomu, že autorka nepopsala ani ve výsledcích ani v diskuzi, o co všechno se pokusila, co nefungovalo a jak by se to pokusila řešit, nezbyvá než hodnotit vytyčené cíle diplomové práce týkající se této metody jako nesplněné.

V **diskuzi** mi chybí už výše zmíněné části týkající se nepovedeného ručního opylování a *in situ* hybridizace, které by nastínily proč se pokusy nepovedly a jak je optimalizovat. Autorka sice píše, že postup *in situ* hybridizace upravila, ale nedozvíme se jak. Také zde zcela chybí

diskuze k analýze ploidy semen a semenáčků, která by se týkala postzygotických mechanismů a mechanismů vzniku hybridů a aneuploidů.

Autorka studovala fenologii cytotypů v jedné umělé populaci. *Do jaké míry tohle pozorování odpovídá tomu, co viděla v přírodě?*

U chování opylovačů autorka zmiňuje, že se čmeláci a pískorypky nechovali náhodně. To se však stalo pouze v jedné populaci ze dvou. Autorka své výsledky dává do kontrastu s prací Jersáková et al. 2010, ale v této studii byly indexy preference a věrnosti počítány nejprve pro každého jedince opylovače zvlášť a poté testovány – viz moje připomínky ke zpracování dat.

Pro další výzkum autorka nabízí sledování času opylovače na květu. *Může autorka sdělit, jaké zajímavé informace by tímto získala a co by z nich mohla vyvodit?*

Dále navrhuje počítání kvetoucích květenství na rostlině každý pozorovací den. *Čím se tento návrh liší od toho, co prováděla autorka v této studii?*

Autorka našla větší množství nektaru u 4x rostlin v rámci jednotlivých květů. *Může samotné množství nektaru ovlivňovat asortativní chování opylovačů, když se oba cytotypy morfologicky téměř neliší? Jaké rizika s sebou zvýšené množství nektaru nese?*

**Závěry** trpí opět nevhodným členěním typů bariér, kdy řadí mechanickou izolaci do postreprodukčních bariér. Závěry diskutují důvody omezeného vzniku triploidů s literaturou, což by se mělo dít v diskuzi, kde právě tato problematika zcela chybí. Autorka píše, že vývin triploidů omezují bariéry gametické izolace či snížené vitality zygoty či semenáčku. *Navrhla by autorka způsob, jakým by se mohla podívat na to, zda ke gametické izolaci dochází?*

Další formální nedostatky:

- Autorka mohla také zmínit novou studii Gao et al. 2014 v Plant Biology ukazující dvojnásobné množství nektaru u 4x než 2x.
- Anglický termín review lze přeložit českým slovem literární rešerše.
- Několikrát v textu je chyba ve jméně autora Schemske (např. str. 8, 10).
- Větu nikdy nezačínáme zkratkou latinského názvu.
- Tabulky 5 a 6 – nejsou konzistentní z hlediska velkých písmen na začátku slov
- U analýzy reprodukční izolace autorka prezentuje vzorec s parametry A a C, ale nikde není patrné, co tyto parametry znamenají.
- Popisy tabulky 9 a 10 výsledků chování opylovačů nejsou samovysvětlující – test selekce cytotypů a atraktivity cytotypů není jasný. Autorka mohla použít své číslované hypotézy nebo test více vysvětlit.
- Tabulka 13 – přehozené popisky v horním řádku, nejprve mají být o a pak e
- Grafy – špatně čitelné, rozmazané
- Literatura – v citaci Simpson a Neff 1983 chybí název kapitoly

V Českých Budějovicích dne 26.8.2014

