



SLOVENSKÁ AKADEMIA VIED

Botanický ústav

Dúbravská cesta 9
845 23 Bratislava 4
Slovenská republika

tel.: +421 2 59426111
fax: +421 2 54771948
e-mail: botuinst@savba.sk



Oponentský posudok na diplomovú prácu Bc. Jany Bayerovej na tému: „Evolutionary and ecological consequences of polyploidization in *Arabidopsis arenosa* complex in Western Carpathians“.

Predložená práca je zameraná na riešenie vysoko aktuálnej vedeckej témy polyploidnej evolúcie u vybraných, divo rastúcich zástupcov modelového rodu *Arabidopsis*. Autorka v práci rieši problémy evolučnej histórie a diverzifikácie diploidných a tetraploidných línií v rámci *Arabidopsis arenosa* agg. v Západných Karpatoch. Cieľom práce je odhalenie evolučných mechanizmov zodpovedných za morfológickú odlišnosť populácií z alpínskeho pásma a populácií z nižších horských polôh, vplyvu polyploidizácie na kolonizáciu a adaptáciu jednotlivých línií na ekologické podmienky alpínskych biotopov. Z metodologického hľadiska zvolila kombináciu viacerých moderných prístupov využívaných v evolúcii a systematike vyšších rastlín. Konkrétne sa jedná o metódy genetické – RAD sekvenovanie, karyologické – stanovenie ploidnej úrovne pomocou prietokovej cytometrie, metódy multivariačnej a geometrickej morfometriky, experimentálne kultivácie rastlín v environmentálne homogénnych podmienkach, analýzu ekologických a fyto-sociologických dát a v konečnom dôsledku syntetickú analýzu spomínaných prístupov.

Celkový počet populácií/jedincov ako aj ich geografické a ekologické rozmiestnenie v skúmanom území je plne relevantné vo vzťahu k stanoveným cieľom a testovaným hypotézam. Metodologický prístup považujem za excelentný a plne zodpovedajúci najmodernejším trendom v danej vednej disciplíne. Celá štúdia je doplnená množstvom obrázkov, grafov ako aj doplnkových dokumentov. Práca je písaná v anglickom jazyku čo by bolo možné považovať za jej výraznú prednosť, avšak kvalita jazyka po gramatickej, štylistickej ako aj odbojnej stránke je relatívne dosť nízka, v mnohých prípadoch nie je jasné čo chcela autorka danou vetou povedať. Preto musí žiaľ konštatovať, že použitá angličtina zbytočne znížila celkovú úroveň práce. Viaceré nedostatky má práca aj po technickej a formálnej stránke (pre podrobnosti pozri prílohu), okrem častých formátovacích chýb (napr. italic), v práci chýbajú napríklad state venované metodologickým prístupom, t.j. stručné, všeobecné predstavenie metód a zdôvodnenie ich použitia. Pri viacerých metódach chýbajú dôležité detaily napovedajúce o korektnosti prevedenia analýz. V častiach „Výsledky“ a „Diskusia“ sú viaceré výsledky prezentované najmä na obrázkoch, avšak bez dostatočného komentára, ktorý je vo väčšine spomínaných prípadov nevyhnutný. Niektoré interpretácie sú nepresné ba dokonca nekorektné, iné si zas protirečia. Do budúca by som autorke odporúčal riadiť sa heslom „Menej je niekedy viac“, čiže radšej použiť nižší počet metodologických prístupov a analýz, ktoré však budú prezentované a interpretované bezchybne a vedecky korektné.

Záverom konštatujem, že napriek spomínanej kritike práca obsahuje značné množstvo dát a analýz na ktorých získanie a prezentovanie musela autorka vynaložiť nemalé úsilie. Domnievam sa, že po odstránení všetkých spomenutých nedostatkov má práca nemalý potenciál byť publikovaná v prestížnom vedeckom časopise. Prácu preto **odporúčam** na obhajobu a úspešné ukončenie magisterského štúdia.

Otázky na autorku

1. V časti „Methods – Field sampling“ autorka spomína existenciu potenciálnych aneuploidov a triploidov ktoré boli vylúčené prinajmenšom z genetických analýz. Ako boli tieto aberantné cytotypy detegované? Boli počítané aj chromozomálne počty? Alebo boli detegované len pomocou FCM? Nemohlo ísť len o artefakty analýzy vzhľadom k faktu, že jednotlivé orgány môžu obsahovať iné metabolity či rôzne koncentrácie týchto látok? Autorka neskôr totiž v práci uvádza, že na prietokovom cytometri merala rôzne typy (orgány) na živom ako aj konzervovanom materiály. Nespomína však, že by overovala či sú výsledky z rôznych typov materiálu jednoznačne porovnateľné.

2. V rámci morfometrických analýz autorka merala alebo skórovala 25 znakov. Počítala však autorka korelačné koeficienty medzi jednotlivými párami znakov? Ak áno, ktoré korelačné koeficienty použila a prečo? Aké hodnoty dosahovali korelácie medzi jednotlivými párami znakov? Zistila autorka aj vysoké korelácie, ktoré by mohli diskvalifikovať použitie konkrétneho znaku v analýzach multivaračnej morfometriky?

3. V morfometrických analýzach autorka použila hypotézu generujúce metódy (PCoA) a variabilitu znakov prezentovala cez jednoduché boxploty a histogramy. Nepoužila však žiadne hypotézu testujúce metódy, ktorými by mohla testovať potenciálne rozdelenie operačných taxonomických jednotiek do konkrétnych skupín (napr. na základe výsledkov PCoA, či genetických analýz). Tieto by boli veľmi žiaduce najmä pri porovnávacích analýzach na divo rastúcom a kultivovanom materiály. Vie autorka aspoň dodatočne navrhnúť analýzy ktorými by bolo možné testovať rozdelenie operačných taxonomických jednotiek do konkrétnych skupín a zistiť ktoré znaky prispeli najviac k danému deleniu?

4. V diskusii autorka spomína, že tetraploidné populácie pravdepodobne pochádzajú z hybridizácie medzi diploidmi z alpínskeho pásma a diploidmi z údolných populácií (viď Treemix graf). Tiež píše, že túto hypotézu bude nutné testovať pomocou koalescenčnej simulácie (Excoffier et al. 2013). Avšak pokiaľ by tetraploidy boli skutočne potomkami dvoch odlišných línii diploidov, nemalo by byť vidieť aspoň známky genetického premiešania v analýze STRUCTURE (Bayesian based clustering)? Taktiež použitie jednoduchej analýzy (NeighbourNet analyses, Bryant & Moulton 2004 s použitím softwaru SplitsTree ver. 4.10, Huson & Bryant 2006) by mohlo aspoň indikovať prítomnosť hybridizácie, skúšala ho autorka použiť?

Mgr. Marek Slovák, PhD.

Podrobný komentár k diplomovej práci

1. Abstrakt

- pozor na preklepy a korektné použitie výrazov v angličtine (*Arabidopsis* má byť v Italic, Western Carpathians nie je s malým písmenom, characters nie characteristics atď.)
- v abstrakte úplne chýba zhrnutie výsledkov a ich interpretácia!

2. Introduction

- chýbajú autorské skratky za vedeckými menami taxónov, aj keď ich použitie nie chybou štandardne sa tak robí a osobne by som to tiež odporúčal.
- nekorektné označenie geografických celkov v celom texte práce (High Tatras, Western Tatras, Low Tatras, Belanske Tatry Tatras). Voľný preklad geografických názvov sa síce občas používa avšak je nekorektný! Seriózne vedecké práce používajú nasledovnú formu: Vysoké Tatry Mts., Západné Tatry Mts., Veľká Fatra Mts. atď.
- hypotézy nepatria do úvodu ale k cieľom práce.

3. Literature review. Polyploidisation

- ako inak vznikne allopolyploid ak nie hybridizáciou dvoch taxónov?! (autorka na str. 8 druhý odstavec v zátvorke píše : typically following thier hybridisation)
- odsek o *A. arenosa* agg. na str. 9, patrí do časti „ Study group“

Study group

- nikde nie je spomenutá čeľaď kam *Arabidopsis* patrí, chýbajú základné informácie o rode ako aj študovanej skupine *A. arenosa* agg. ako napríklad: areál rozšírenia, počet taxónov, informácie o morfolologickej či genetickej variabilite. Základná morfologická charakteristika je nedostatočná. Úplne chýba informácia o spôsoboch rozmnožovania ktorá má nemalý význam pri interpretácii výsledkov analýz (najmä genetických).
- chýba dôležité vymedzenie skúmanej skupiny populácií, v texte je síce odvolávka na prácu z ktorej autorka vychádza (Kolář et al. 2016), avšak aspoň stručný opis genetickej variability agregátu je pre účely tejto diplomovej práce nepostrádateľný!

4. Methods

- nekorektná terminológia pre vymedzenie študovaného územia! Nazvať populácie z takmer celej centrálnej časti Západných Karpát zahŕňajúce okrem Vysokých, Západných, Belianskych a Nízkyh Tatier napríklad aj územie Slovenského raja, Choča, Muránskej planiny či Strážovských vrchov ako „Tatra populations and surrounding foothills“ považujem za veľmi povrchné a nekorektné. Táto chyba sa vyskytuje naprieč celou prácou!

Prietoková cytometria

- Autorka pre analýzu na prietokovom cytometri použila rôzne časti rastlín, tiež kombináciu konzervovaného ako aj čerstvého materiálu. Overila či sú výsledky porovnateľné?

Morfometrické analýzy

- Zoznam meraných a skórovaných znakov je veľmi neprehľadný (Fig. 4), mal byť prezentovaný v tabuľkovej forme
- autorka presne neuvádza ako boli znaky rozdelené, t.j. kvantitatívne, semikvantitaívne, kvalitatívne atď.
- nie je vysvetlené prečo nemerala znaky na tyčinkách a piestiku?! V prípade plodu (šešule) merala šírku no dĺžku nie, prečo? Skórovala aj farbu korunných lupienkov? Ak nie prečo? Ak áno, hodnotila ho ako viacstavový alebo ako binárny znak?
- autorka mohla použiť pomerové znaky (napr. pomer dĺžky a šírky konkrétneho orgánu, napríklad korunného lupienka apod.), tieto sú vhodné najmä na aspoň čiastočnú elimináciu vplyvu ekologických faktorov na variabilitu. Znaky založené na absolútnych

hodnotách môžu byť v oveľa väčšej miere ovplyvnené ekologickými faktormi. Prečo ich autorka neskúsila použiť?

- Naopak, znaky ako výška rastliny či počet kvetov sú veľmi často odrazom ekologických faktorov (nutričné podmienky, vlaha, oslnenie atď.) a vedú k skresleným výsledkom. Odporúčal by som zvážiť ich použitie!

- Metodologický opis meranie jednotlivých skupín znakov je písaný dosť ťažkopádne, je tam zbytočne veľa podrobností ktoré sú nepodstatné pre čitateľa. Čitateľ sa v texte rýchlo stráca.

Pri analýze tvaru autorka analyzovala len korunný lupienok avšak nikde nevysvetlila prečo si vybrala len tento orgán a ostane nie?

Kultivačné pokusy

Na základe čoho autorka vybrala práve tieto populácie? Ak sa nemýlim tak tam nie je zahrnutá ani jedna populácia z genetickej skupiny „LA“, prečo?

Molekulárne analýzy

- Kvalita DNA extraktu je pri NGS metódach veľmi dôležitá? Kontrolovala autorka čistotu a kvalitu DNA? Ak áno ako?

- Pri konkrétnych analýzach chýbajú citácie!

5. Results

- väčšina obrázkov má nízku kvalitu, nápisy sa nedajú prečítať! Delimitácia skupiny LA je kontroverzná, v texte autorka píše, že je to skupina so špeciálnou ekológiou, vyskytuje sa na vápencoch v lesnom až subalpínskom pásme vo výškach 1552-1953 m.n.m. V tabuľke s lokalitami však žiadna lokalita označené ako LA nemá výšku 1953m, práve naopak mnohé sú pod spodným limitom 1552! Je autorka presvedčená, že nadmorská výška okolo 1900 m je v Karpatoch stále subalpínske pásmo?

- Na obrázku č.7 sú histogramy s variabilitou konkrétnych znakov stiahnutou voči trom ustanoveným skupinám (modrá, zelená červená) vo viacerých histogramoch úplne chýba červená. Prečo?

- Na obrázku č.9 je PCoA na založená na jedincoch (pod obrázkom je ale písané, že sú to populácie! Rovnaká chyba je aj na viacerých iných obrázkoch). Na predošlej strane č. 24 autorka píše, že červená skupina z alpínskeho pásma je DOBRE (well) oddelená od údolných populácií. To ale vôbec nie je pravda!

- V grafe sú vidieť ďalej tkzv. „Outliery“, jedince s výrazne odlišnou variabilitou. Tieto ale deformujú celkové výsledky. Prečo ich autorka nevyľúčila z analýz?

- v molekulárnych analýzach je prezentovaná analýza STRUCTURE, je tam niekoľko výstupov avšak s minimálnym komentárom a vysvetlením. Pre mňa osobne sú tieto výsledky veľmi ťažko čitateľné. Neje mi jasné či sú v diploidoch a tetraploidoch tie isté skupiny ako PCoA napríklad?

- Obrázok 24. Čo je to neighbour-joining network???

- Treemix analýza je zatiaľ nie veľmi známa a používaná bolo by veľmi vhodné o nej napísať viac informácií v statiach Materiál a Metódy ako aj v vo Výsledkoch.

6. Diskusia

Diskusia má viacero častí viac-menej korešpondujúcimi s cieľmi a hypotézami práce, čo hodnotím pozitívne. Avšak opäť angličtina je dosť problematická, často netuším čo autorka chcela povedať. V mnohých prípadoch opätovne opisuje výsledky a tak na samotné vysvetlenia zistených patternov ostalo len minimum priestoru. Prítomné citácie naznačuje, že autorka pracovala s literatúrou čo opäť hodnotím pozitívne.

7. Tabuľka s lokalitami

Chýba nadpis a stručný popis čo v tabuľke je. Nesprávne napísané geografické názvy v druhom stĺpci (chýba diakritika), chýba označenie čo názov predstavuje (obec, dedina vrch atď.). V poslednom stĺpci chýba v dvoch prípadoch nadmorská výška. V stĺpcoch „Locality description“ a „Habitat“ nevidno všetky informácie, navzájom sa prelínajú! Koordináty lokalít nie sú zarovnané a v rovnakom formáte!