

Posudek disertační práce Michala Sochora:

Diversity, phylogenesis and evolutionary mechanisms in the genus *Rubus*

Agamický komplex *Rubus* subgen. *Rubus* náleží k tradičně intenzivně studovaným skupinám temperátní flóry. Komplexních biosystematických prací je však dosud nemnoho, a proto považují předkládanou disertační práci za velmi podnětnou a cennou. Její význam ještě zvyšuje skutečnost, že byla do "samplingu" zahrnuta oblast Kolchidy.

Předložená disertační práce sestává ze dvou článků ve vysoce kvalitních impaktovaných časopisech a submitovaného manuskriptu. Dílčím studiím (resp. manuskriptům) předchází obecný úvod (Introduction), ve kterém jsou shrnuty nejpodstatnější informace o apomiktickém způsobu rozmnožování (výhody vs. nevýhody, systematika agamických komplexů, geografická partenogeneze) a o rodu *Rubus* jako modelové skupině (vnitřní členění a evoluční mechanismy).

Oddíl vlastních vědeckých publikací je uveden článkem zaměřeným na fylogenezi skupiny. Výsledky jasně vyzdvihují evoluční roli hybridizace. Pozoruhodnou dedukcí je i odhad stáří některých hybridogenních linií (starší než poslední glaciální cyklus).

Následující článek (manuskript) je zaměřen na fylogeografickou problematiku sexuálního *Rubus ulmifolius* agg. a odvozených polyploidních linií. Výsledky jasně naznačují význam mediteránních refugií pro diploidní zástupce. Za zásadní zjištění považují relativně výraznou izolaci západních a východních linií, což jasně snižuje možný význam dálkového přenosu. Pozoruhodné je i odhalení asymetrické (jednosměrné) hybridizace v případě kavkazské skupiny polyploidů. V neposlední řadě je v práci názorně potvrzen význam apomiktů jako "časových konzerv" zahrnujících jinak vyhynulé genomy.

Závěrečná publikace se soustředí na pionýrský biosystematický průzkum ostružiníků kolchidské oblasti. Výsledky odhalují poměrně výrazné odlišnosti v povaze evropských a kolchidských druhů. Pozoruhodná je zejména relativní stabilita studovaných taxonů, tj. jasné rozdělení na 2x sexuální a 4x obligátně pseudogamické linie. Dokonce i v rámci analýzy reprodukčních mechanismů (FCSS) nebyla zachycena výrazná variabilita. Výsledné "pattern" analýzy haplotypů nekorespondovalo s morfologickou variabilitou, což ale nemusí být pro uniparentálně děděný "marker" v rámci retikulární hybridogenní skupiny překvapivé. Současně bylo nečekaně malé procento haplotypů sdíleno mezi ploidiemi.

Výsledky předešlých článků jsou shrnuty ve stručném a uceleném závěru.

Formální úroveň práce

Formální stránka práce je velmi dobrá. V textu se vyskytuje minimum překlepů a dalších chyb. Úroveň obrazového materiálu je rovněž zdařilá. Ocenění si zasluhuje i jednotné formátování jednotlivých článků. V neposlední řadě je třeba vyzdvihnout i jazykovou stránku práce, která je, dle mého soudu, velmi slušná a její úroveň v rámci jednotlivých oddílů nekolísá.

Otázky

Na několika místech se v práci vyskytly spekulace ohledně migrací a refugií během posledního glaciálu. V případě *R. ulmifolius* agg. jistě není o čem diskutovat, ale u polyploidních taxonů by mě zajímal autorův názor na rozšíření během glaciálu i mimo tradiční refugia, tj. alespoň Západní Karpaty a perialpínské oblasti. Vždyť o existenci plnohodnotných refugií temperátního lesa např. v Z. Karpatech přinesla důkazy řada palynologických prací a některé novější fylogeografie.

Třetí publikace využívá data o ploidní úrovni a z uvedených poměrů vyplývá, že se u kolchidských druhů vyskytuje nezanedbatelná variabilita ve velikosti genomu. Zkusil autor (i přes nekompletní data), zda mají jednotlivé poměry nějaké interpretovatelné "pattern" (např. vztáhnutím k fylogenezi)?

Jaké jsou dle autora nejvýznamnější nezodpovězené otázky soudobé batologie a jakým způsobem by je řešil?

Závěrečné hodnocení

Vytčeným cílem práce bylo přispět k pochopení evoluce apomiktických komplexů na širší geografické škále a objasnit vztahy a evoluční mechanismy mezi různými skupinami evropských a kavkazských ostružiníků. S potěšením musím konstatovat, že se autorovi rozhodně k pochopení evoluce apomiktických komplexů a zejm. ostružiníků přispět podařilo! Práci jako celek považuji za mimořádně zdařilou a vřele ji doporučuji k obhajobě.

V Praze dne 6. 10. 2016



Mgr. Tomáš Urfus, Ph.D.

Oponentský posudok na PhD prácu Michala Sochora:

Diversity, phylogenesis and evolutionary mechanisms in the genus *Rubus*

Predkladaná dizertačná práca sa zaoberá fylogenezou a evolučnými procesmi, konkrétne medzidruhovým krížením, polyploidiou a apomixiou, ktoré viedli k obrovskej taxonomickej diverzite tohoto rodu. Ciele práce rámcovo zahŕňajú:

- 1, objasnenie fylogenetických vzťahov medzi di- a polyploidnými taxónmi podrodu *Rubus* v Európe (vrátane južného Kaukazu);
- 2, načrtnutie fylogeografickej štruktúry u diploidného okruhu *R. ulmifolius* / *R. sanctus*;
- 3, výskum cytotypovej, genetickej a reprodukčnej diverzity zástupcov podrodu *Rubus* na južnom Kaukaze.

Autor na splnenie cieľov použil celú škálu metód od zberu rastlinného materiálu naprieč Európou a J Kaukazom, cez prietokovú cytometriu, Sangerovo sekvenovanie chloroplastovej DNA a klonovaných nukleárných ITS úsekov, PCR-RFLP ITS úsekov, po SNPs genotypifikáciu s použitím mikrosatelitových lokusov a modelovanie klimatickej niky študovaných taxónov v troch obdobiach holo- a pleistocénu.

Po formálnej stránke je práca členená na štyri kapitoly, z ktorých prvá predstavuje všeobecný teoretický úvod a ďalšie tri 2 publikované rukopisy a jeden rukopis zaslaný do redakcie časopisu *Molecular Ecology*. Na konci je uvedený prehľad citovanej literatúry a ako aj doplňujúci tabuľkový a obrazový materiál k jednotlivým rukopisom. Je nutné podotknúť, že aj úvodná kapitola práce je písaná v jazyku anglickom.

Za najvýznamnejšie výsledky práce možno považovať tie, ktoré už boli publikované v dvoch periodikách s vysokým impakt faktorom a to najmä prvý náčrt fylogenetických vzťahov v podrode *Rubus* s determináciou 6 diploidných recentných, neznámych, alebo vyhynulých diploidných taxónov, ktoré dali základ celej škále polyploidných (mikro)druhov, ako aj objasnenie cytotypovej a genetickej štruktúry a spôsobu rozmnožovania doteraz málo známych kolchidských zástupcov.

Ak by som mal zhodnotiť celkový obsah práce, musím vyzdvihnúť, že uchádzač použil celú plejádu postupov na zodpovedanie si položených otázok a dosiahol pozoruhodné výsledky, ktoré posúvajú naše poznanie o evolúcii rodu *Rubus* dopredu. Na druhej strane, kvalitu celkovej práce znižuje zaradenie zrejme ešte neakceptovaného rukopisu, ktorý si podľa môjho názoru vyžaduje ešte pomerne dosť práce, počnúc definíciou jasných hypotéz, cez opravu nedôsledne vysvetlených metód až po samotnú interpretáciu výsledkov. Nielen v tomto rukopise, ale aj v dvoch publikovaných rukopisoch som sa stretol s pasážami, o ktorých nepochybujem, že im autor rozumie a vie, čo chcel nimi povedať, pre čitateľa, sú však ťažšie pochopiteľné.

Predložená dizertačná práca Michala Sochora, napriek týmto výhradám, ktoré sú podrobnejšie rozpísané nižšie, spĺňa obsahové a formálne kritériá PhD práce a preto ju odporúčam k obhajobe.

V Prahe, 5. októbra 2016

Patrik Mráz

Patrik Mráz

Patrik Mráz

Hlavné dôvody:

1. Ciele rukopisu sú definované veľmi vágne, bez žiadnych *a priori* postulovaných hypotéz a očakávaní, pričom pre fylogeografické práce to určite možné je. Ako by mal vyzerat' pattern v diploidných populáciách na území, kde sa vyskytujú dlhodobé, resp. ktoré boli recentne kolonizované? Ako by mala vyzerat' genetická štruktúra polyploidných populácií? Budú sa líšiť od seba polyploidné sexuálne sa rozmnožujúce populácie od polyploidných apomiktických?
2. Namiesto štandardnej populačnej úrovne, kde očakávame tok génov medzi jedincami tejto populácie, autor používa úroveň regiónov. Z textu nie je zrejmý dôvod a ani kritérium rozdelenia do regiónov (s výnimkou polyploidov). Z textu nie je zrejmé ako sa dané regióny líšia veľkosťou a či tento faktor môže ovplyvniť genetickú štruktúru študovaných „populácií“.
3. Veľkosť analyzovanej vzorky je, vzhľadom na geografické rozšírenie a vzhľadom na to, že sa jedná o fylogeografickú prácu, pomerne skromná (116 jedinov) a navyše veľmi fragmentovaná (mnohé regióny neboli do zberov zahrnuté). Mohol by autor zobrazit' celkové rozšírenie diploidných taxónov v Európe (vrátane Kaukazu a Turecka) a celkové rozšírenie polyploidov a kontrastovať to s intenzitou zberu tu zahrnutých vzoriek?
4. Z textu nie je zrejmé z akých databáz boli získané dáta o rozšírení potrebných na modelovanie ekologickej niky, a či niekto kontroloval správnosť určenia.
5. Tabuľka č. 1. Z nadpisu nie je zrejmé akého markeru sa týka. Z kontextu sa zrejme jedná o SSRs. Hodnotené populácie boli cytotypovo čisté? Jedná sa o diploidy alebo polyploidy? Opäť len z kontextu usudzujem, že sa asi jedná o diploidy.
6. Nie je jasná ani analýza dát v Metodike na str. 40. Opäť len z kontextu usudzujem, že sa jedná o SSRs.
7. Až z výsledkov sa čitateľ dozvie, že 148 mikrosatelitových alel bolo určených **najmä** („mostly“) na základe jednonukleotidových polymorfizmov, pretože dĺžkový polymorfizmus vraj bol veľmi nekonzistentný a predstavoval väčšinou homoplázie. V časti Metodika toto malo byť podrobne rozobrané a vysvetlené ako nekonzistentné to bolo. Patrí to jednoznačne do metodiky. Tiež nerozumiem, či tie alely boli určené len na základe nukleotidových polymorfizmov alebo aj na základe dĺžky (viď **najmä**). Bol to teda hybrid nukleotidov a dĺžky? Koľko alel bolo determinovaných na základe SNPs a koľko na základe dĺžky? Mali SSRs alely, ktoré mali rovnakú dĺžku aj variabilitu v nukleotidoch? Nakoniec tie SSRs, resp. SNPs?, boli kodované ako prítomné a neprítomné alely? Bola do úvahy braná aj ploidia a dávka alel? O tomto sa čitateľ z Metodiky nedozvie nič ...
8. Polyploidné (vrátane apomiktických) a diploidné populácie boli hodnotené spolu v rámci programu Structure? Ak áno, ako boli nadefinované východiskové predpoklady? Mohol by autor ukázať grafy pre DeltaK a graf pravdepodobnosti K pre K=4 a K=8? Je zvláštne, že ako najlepšie vyšlo hodnotenie skupín, ktoré stoja dosť ďaleko od seba (4 vs 8).
9. Na základe, čoho bol zostavený PCoA plot (aký marker) a patria sem všetky a analyzované jedince, alebo len diploidné? Ak len diploidné, boli nejako hodnotené polyploidné jedince a ak, tak ako?
10. Začiatok diskusie sa začína diskutovaním o homoplázií SSRs markerov s tým, že dáta poukazujú na veľkú homopláziu. Problém tohoto vyhlásenia spočíva v tom, že čitateľ si to nemá ako overiť, nie je tu uvedené nič bližšie.

A review of the thesis

M. Sochor (2016): Diversity, phylogenesis and evolutionary mechanisms in the genus *Rubus*

Předložená práce je rozumně složena z obecného, zastřešujícího úvodu a tří vzájemně propojených článků, z toho dvou publikovaných a jednoho odevzdaného do redakce, vše v solidních časopisech.

Ačkoliv obvykle nepoužívám servítky při hodnocení disertací, zde musím zahájit pochvalou: Předložená práce nevykazuje podstatné nedostatky, vychází z vyvážené mixtury dobře charakterizovaného a dokumentovaného materiálu a vhodných, soudobým možnostem odpovídajících metod. Členění práce je logické, kapitoly vzájemně navazují. Výsledky jsou v řadě ohledů pozoruhodné, nové a i obecně významné. Jazyk prací je velmi solidní, překlady vzácné, obrazová a tabelární dokumentace přiměřená a celkem přehledná. Práce, na rozdíl od mnohých jiných, skutečně splňuje to, co si v úvodu klade za cíl. Autorův podíl na předložených článcích je zjevně majoritní, a je zjevné, že dokáže těžit z rozsáhlých zkušeností vedoucího práce a konsultanta. Sdělením, že jsem spokojen, bych mohl posudek uzavřít. Přesto bych chtěl několik poznámek a dotazů přidat:

1. Pokud bych skutečně chtěl nalézt nedostatky, pak je hledám (protože se jedná o jednotlivé články) v nevyřčených nebo nedokonalých metodických zásadách. V první řadě, u prvního a druhého článku (kap. 2 a 3), se jaksi automaticky předpokládá, že materiál skutečně má převažující reprodukční vlastnosti odvoditelné od jiných údajů (ploidie, literární údaje). V metodických kapitolkách těchto článků se o zjišťování reprodukčního způsobu vůbec nehovoří.

Reprodukční způsob u rodu *Rubus* je výrazně dynamičtější než u mnoha jiných rodů s výskytem aposporie. Quasisporie (jakési váhání mezi apo- a diplosporí, kdy odlišení iniciály, ESMC a blízkých somatických buněk nucellu je ztíženo intermediárními jevy), kompetice mezi meioticky a aposporicky vzniklými zárodečnými vaky, která probíhá od úrovně semeníku, přes květ, jedince až po populaci, a to i v závislosti na vnějších podmínkách, variabilní projevy pseudogamie atd. To jsou všechno faktory, které by autora měly přimět k tomu, aby konkrétní rostliny či diaspory náležitě charakterizoval z hlediska dominantního a vedlejšího způsobu rozmnožování. Koneckonců, ze stejné laboratoře pochází výborná práce o reprodukci ostružiníků (Šarhanová et al. 2012).

To je celkem solidně provedeno na materiálu ve třetím článku (kap. 4), který se věnuje tzv. kolchidským ostružiníkům a který představuje dobrý model pro experimentální zpracování obtížného rodu v taxonomicky nedokonale prozkoumaném území.

Kompetice mezi zárodečnými vaky různého původu by pak měla být zmíněna všude, kde embryogeneze nečekaně často následuje po oplodnění megaspory; ač je tento jev v daném kontextu neobvyklý, ve světle výše uvedených vlastností ostružiníků by neměl být označen jako překvapivý.

K tomuto tématu mi schází nějaká shrnující kapitola v obecném úvodu, tam by se skvěla, a podrobnější srovnání s jinými, podobnými modely, jako je *Potentilla*.

2. Dotazy:

U diplosporického systému rodu *Taraxacum* jsou rodičovské taxony hybridogenů obvykle neznámé, nebo jen ojediněle se na ně dá usuzovat. Plástem navíc vykazuje jen minimální variabilitu. Jakou metodu by autor zvolil pro rekonstrukci evolučních vztahů u pampelišek ?

Spoléhá se autor při studiu ostružiníků na taxonomickou charakterizaci materiálu jinými experty (či spíše expertem) nebo je schopen si alespoň do jisté míry utvořit i vlastní obrázek ? To by mohlo být důležité při vhodném samplingu v územích s nejasnou taxonomií a populační strukturou, jako je právě Zakavkazí.

Závěr:

Úspěšná obhajoba disertace se skládá ze tří, dle mého soudu víceméně rovnocenných částí, tj. presentace práce, samotné diskuse (= dissertatio) a psané práce. K tomuto třetímu bodu mohu uzavřít, že pan M. Sochor předložil práci, která dokládá jeho schopnost samostatně vědecky pracovat, náležitě interpretovat výsledky a přehledně je prezentovat v podobě publikací; jeho práce je výborným podkladem pro udělení hodnosti *Philosophiae doctor*, pokud budou splněny další podmínky a náležitosti. Práci plně doporučuji k obhajobě.

Jan Kirschner

Jan Kirschner, August 26, 2016