

Oponentský posudek

Disertační práce: „ Použití molekulárních markerů v populační genetice a taxonomii na modelu *Pinus mugo*“

Autor disertační práce: Ing. Martina Beranová

Oponent: Ing. Václav Dvořáček, Ph.D.

Předložená disertační práce se zabývá velmi komplikovanou problematikou využití molekulárně genetických markerů pro determinace hybridních populací rodu *Pinus* se zaměřením na taxonomické druhy *Pinus silvestris* L. a *Pinus mugo* Turra tvořící dle současné taxonomie agregát tří subspecií *Pinus mugo* Turra, *Pinus uncinata* Ramond in Lamarck et De Candolle a *Pinus rotundata* Link. Autorka však hodnotila i další druhy *Pinus pseudopumilio* a *Pinus nigra*. Celkově tak bylo hodnoceno 27 evropských populací rodu *Pinus* v rozsahu od 5-15 jedinců. Obtížnost předložené studie spočívá již ve vlastní biologii kvetení, širokém areálu rozšíření a možnosti vzniku introgresivních hybridů u tohoto rodu. Navzdory dlouhodobým taxonomickým studiím několika generací botaniků a taxonomů se dosud spolehlivě nedaří zmapovat vzájemné vztahy a vazby mezi některými druhy rodu *Pinus* a vytvořit jednotnou taxonomickou nomenklaturu.

Disertační práce je členěna konvenčně na úvod, cíle práce, rešerši, metodický postup, výsledky, diskusi a závěr. Součástí disertační práce je i autoreferát, jež rovněž zahrnuje publikační aktivitu autorky.

Z rešeršní části této práce vyplývá, že si je doktorandka komplikovanosti problematiky vědoma a v textu jsou zásadní „taxonomické konflikty“ mezi jednotlivými autory dobře zaznamenány. Kladně hodnotím v rešeršní části zpracovanou aktuální problematiku hybridizace uvnitř agregátu *Pinus mugo* se specifikací oblastí nalezišť.

Cíle práce byly jednoznačně a srozumitelně specifikovány do 4 okruhů: 1. optimalizovat techniky molekulárních markerů, 2. posoudit míru vnitro- a mezidruhové variability populací, 3. vyhodnotit odlišnost determinovaných taxonů na molekulární úrovni a 4. ujasnit taxonomické a terminologické problémy. Z metodického pohledu vybraný soubor 27 evropských populací, reprezentující 6 taxonů rodu *Pinus*, včetně plánovaných čtyř molekulárních technik dávaly dostatečný potenciál vytyčených cílů dosáhnout. K metodické

části mám pouze jednu připomínku, kdy u charakterizace studovaných materiálů je uváděný jejich počet (str. 40), nicméně ve vlastním hodnocení pomocí molekulárních markerů je hodnocen mnohem menší počet materiálů od každé z populací (5-15). Bylo by tedy vhodné konkrétní počty materiálů za hodnocenou populaci rovněž do kapitoly „Materiál a metody“ uvádět. Proč nebyl počet hodnocených materiálů za populaci jednotný?

Výsledková část je zpracována přehledně. Ke grafické stránce PCO grafů mám několik poznámek. U obr. č. 7 popisující velmi názorně genetickou variabilitu celého testovaného souboru populací by bylo vhodné připojit vedle grafu legendu charakterizující taxon a oblast jeho výskytu (sběru). Rovněž velikost popisků v návazných dílčích PCO grafech bych doporučoval zvětšit (alespoň u sumárních grafů za taxon). Doktorandka bohužel zmiňuje nemožnost aplikace RAPD resp. AFLP metod v důsledku kontaminace materiálů houbami a tak se v práci u těchto analýz omezila pouze na ukázkou výstupu u několika populací, na nichž tak dokládá optimalizaci metody. V tomto případě bych možná doporučoval nebát se do výsledků více rozepsat postup při optimalizaci vlastní metody. Jistě s touto činností strávila autorka významnou část v rámci svých laboratorních hodnocení a takovýto výstup by byl jistě cenný i pro spoustu dalších diplomantů a doktorandů. Zde bych měl dotaz, zda jsou v současné době známy nějaké spolehlivé možnosti resp. postupy jak získat materiál bez této kontaminace?

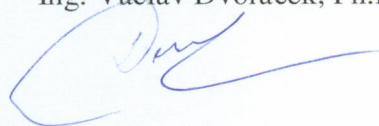
Tato skutečnost pak samozřejmě komplikovala možnou úspěšnou determinaci hodnocených populací a analýzy se musely omezit na trojici po optimalizaci vybraných specifických mikrosatelitních (SSR) markerů vykazující vysokou úroveň polymorfismu uvnitř jednotlivých populací, nicméně s nespécifickou vazbou k určeným taxonům, jež se ve výsledných PCO grafech prostorově překrývaly. Na tomto místě bych měl trochu hypotetický dotaz, zda by v případě hodnocení většího počtu zástupců jednotlivých populací (50 a více – je-li to z pohledu jejich počtu na nalezištích vůbec možné) nebylo možné očekávat alespoň specifičtější frekvenci v pozicích fragmentů u těchto vybraných markerů pro každý determinovaný taxon.

Z poslední výsledkové části práce jednoznačně vyplývá, že nejnadhjnější přínos pro taxonomické studie bude zřejmě až v rozsáhlejší sekvenční genomu s přímým nalezením odlišných oblastí jednotlivých taxonů. K diskusní části práci nemám závažnějších připomínek. Autorka zde komentuje dosažené výsledky a snad jen některé počáteční pasáže mají trochu více rešeršní charakter a zasluhovaly by hlubší konfrontaci s dosaženými výsledky. Závěr práce pak reaguje na vytýčené cíle disertace, jež lze na základě dosažených cílů bez výhrady akceptovat.

Disertační práce Ing. Martiny Beranové přináší podnětné výsledky v oblasti taxonomie rodu *Pinus*. V rámci pracoviště jsou jistě velmi cenné optimalizace u jednotlivých molekulárních technik pro hodnocení těchto materiálů, včetně detekcí rozdílů v sekvencích geonomu u modelově zvolených populací čtyř taxonů. Disertační práce prokazuje zároveň požadovanou vysokou odbornou úroveň doktorandky i její připravenost pro samostatnou vědeckou práci. Proto po úspěšné obhajobě disertační práce doporučuji Vědecké radě ZF Jihočeské univerzity disertační práci schválit a Ing. Martině Beranové udělit titul Ph.D.

V Praze 2. 6. 2008

Ing. Václav Dvořáček, Ph.D.



OPONENTSKÝ POSUDEK

doktorské disertační práce

POUŽITÍ MOLEKULÁRNÍCH MARKERŮ V POPULAČNÍ GEENTICE A TAXONOMII NA
MODELU *Pinus mugo*

Doktorandka: Ing. Martina Beranová
Jihočeská universita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta

Školitel: Prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Jihočeská universita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta

Oponent: Ing. Ladislav Dotlačil, CSc.
Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i., Praha- Ruzyně

Praha
květen 2008

Předložená doktorská disertační práce Ing. Martiny Beranové řeší zajímavou problematiku aplikace genetických markerů ve studiu mezidruhové a vnitrodruhové diversity u borovice a možnosti využití tohoto přístupu v populační genetice a botanické taxonomii. Jde o problematiku, které u nás dosud nebyla věnována taková pozornost, jakou si dle mého názoru zaslouží. Zvolené téma a vlastní přístup k jeho řešení proto považuji za zajímavé a užitečné. V úvodu práce autorka volbu materiálu a účelnost použití molekulárně biologických metod studia populací borovice vhodně komentuje. Cíle práce, tj. ověření vhodnosti různých DNA markerů a jejich využitelnosti pro posouzení mezidruhové a vnitrodruhové variability a taxonomické rozlišení borovic, považuji za dobře zvolené.

O dobré přípravě na vlastní experimentální práci svědčí logicky členěný literární přehled, který na 31 stranách textu pojednává o botanické systematice a nomenklatuře agregátu *Pinus mugo* v rámci podrodu *Strobus*, sestávajícího z druhů *Pinus mugo*, *Pinus uncinata* a *Pinus rotundata*. Rod *Pinus* a jeho jednotlivé druhy autorka dále podrobně analyzuje, včetně biologických charakteristik a areálu výskytu. Další část literárního přehledu věnuje autorka procesu hybridizace u borovic a jejímu významu v evoluci. Popisuje rovněž známé změny genomu v důsledku hybridizace, výskytu abnormalit a popř. vznik nových druhů. Podrobně je pojednána hybridizace uvnitř agregátu *Pinus mugo*, zejména hybridní kombinace *Pinus mugo* x *Pinus rotundata*, jejíž někdy rozsáhlé populace jsou rozšířeny v západních a v jižních Čechách. Vzhledem k rozsahu a variabilitě těchto populací a absenci některé či obou rodičovských forem v areálu výskytu se předpokládá jejich dávný znik. Stejnou pozornost věnuje autorka i hybridním populacím mezi *Pinus mugo* a dalšími druhy mimo tento agregát- např. s velmi rozšířeným druhem *Pinus sylvestris*, který je geneticky a morfologicky relativně vzdálený; jsou uvedeny lokality výskytu v ČR a na Slovensku. V ČR je dále zaznamenán výskyt hybridních populací *Pinus rotundata* x *Pinus sylvestris* a polyhybridního komplexu *Pinus mugo* x *Pinus rotundata* x *Pinus sylvestris*. Většina mezidruhových hybridů v rámci rodu *Pinus* je životaschopná a ve většině případů také relativně fertillní.

V další části je diskutována genetická variabilita v rámci druhů a využití molekulárních markerů pro její studium a charakterizaci. Nejlépe prostudován je nejvýznamnější a nejrozšířenější druh *Pinus sylvestris*. Všechny druhy borovic mají 12 chromozomů, liší se však velikostí genomu. V závěrečné části literárního přehledu autorka popisuje metody molekulárního markerování (PCR, RAPD, AFLP, SSR a sekvenování DNA). Příklady využití DNA markerů u jehličnanů (a specificky u borovic) jsou uvedeny pro SSR markery, příklady využití dalších DNA markerů jsou potom zmiňovány až v diskusi. Zde domnívám, že pro úplnost a vyváženost přinášených informací mohly být stručně zmíněny i aplikace ostatních metod markerování, i když vzhledem k okolnostem nejsou výsledky těchto aplikací v práci uvedeny.

Práce čerpá z 227 literárních pramenů; literární přehled má logickou strukturu a považuji jej za dobře sestavený a dostačující.

Navazující kapitola Materiál a metody přináší přehled 27 studovaných populací na lokalitách v Čechách, na Slovensku, v Německu, Polsku, Rakousku, Švýcarsku, Albánii, Turecku, Bulharsku a Itálii. Studované populace patřily k pěti druhům rodu *Pinus*- *P. uncinata*, *P. rotundata*, *P. mugo*, *P. sylvestris*, *P. nigra* a *P. pseudopumilio* a byly reprezentovány 5 až 52 jedinci (u většiny populací šlo o cca 35 až 45 jedinců). Z populací bylo odebráno 25 – 50 vzorků pro analýzy DNA (tam kde byly k dispozici). Takto širokého experimentálního materiálu bylo možné využít díky návaznosti práce na výzkum prováděný ústavem Sylva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví v Průhoncích. Velmi oceňuji tuto provázanost, která jistě přispívá ke

komplexnosti výzkumu na obou pracovištích. Předpokládám, že takto široký soubor geograficky vzdálených populací byl zárukou existence dostatečné vnitrodruhové i mezidruhové genetické diversity. Diskutovat by bylo zřejmě možné o minimálním počtu jedinců pro efektivní analýzu populace. Pro populaci č. 21 chybí v tabulce údaj o odběru vzorků- který však byl zřejmě proveden (viz analýzy v kapitole „Výsledky“).

Další část metodiky je věnována postupům extrakce genomové DNA a metodickému postupu prováděných analýz DNA markerů (RAPD, AFLP, PCR, SSR, sekvenování DNA) a postupu elektroforézy v agarovém gelu. Pokud mohu jako specialista na poněkud jinou oblast tuto část metodiky posoudit, je zpracována standardně a přehledně. Domnívám se však, že součástí metodiky měl být i alespoň stručný popis použitých metod hodnocení dat a způsobů interpretace výsledků (část těchto informací lze nalézt v kapitole „Výsledky“).

V kapitole „Výsledky“ autorka shrnuje a analyzuje získaná data. Pro RAPD analýzy bylo použito celkem 60 primerů; bylo možné detekovat vysokou variabilitu v rámci populací i mezi populacemi, jak ukazuje přiložený dendrogram (který není řádně popsán). Bohužel byla zjištěna kontaminace houbami a rozhodnutí vyloučit výsledky těchto analýz z dalšího hodnocení považuji za správné. Obdobně tomu bylo s výsledky AFLP analýz, dále nevyužitých ze stejného důvodu. Za pozitivum považuji, že byla optimalizována AFLP a je na pracovišti k dispozici pro další analýzy. Po těchto omezeních se stala základem práce analýza SSR, která využívá specifických markerů a mohla být tedy u vzorků úspěšně provedena. Pro analýzu bylo k dispozici 12 primerových párů; po jejich testování byly vybrány 3 páry, které vykazovaly spolehlivě reprodukovatelné spektrum fragmentů u všech taxonů. Jistě šlo o potřebný a pragmatický krok- který ovšem znamenal snížení rozlišovací schopnosti analýz.

Použité primery umožňovaly identifikovat na agarózovém gelu celkem 20 pozic (SPAG7.14 - 6, PtTx3116 - 9 a SPAC11.6 - 5). Následná hodnocení genetické variability jednotlivých populací z tohoto vycházejí a uvádějí obsazení pozic na elfo- gelech pro jednotlivé primery a analyzované vzorky (Tabulky 4a až 4z). Ke každé analyzované populaci (1 až 27) je uveden komentář charakterizující původ populace, zjištěný stav přítomnosti fragmentů v jednotlivých pozicích a míra amplifikace fragmentů. Domnívám se, že by zde mohl být i velmi stručný komentář k diversitě populace. Pro zhodnocení mezidruhové a vnitrodruhové genetické diversity celého souboru 27 populací byla použita analýza hlavních komponent. Bohužel analýza jednotlivé populace významně neodlišila a (obvykle následující) shluková analýza nebyla proto provedena. Více informací přinesly PCA analýzy genetické diversity jedinců v rámci jednotlivých populací stejného druhu, kde jsou již jisté rozdíly mezi některými populacemi v rámci druhu naznačeny (např. u *P. rotundata* populace odlišnost populací 10 a 14, u *P. mugo* populace 4 oproti 7 a 16, u *P. sylvestris* populace 5 a 8). Více by mohl ukázat výpočet genetických vzdáleností mezi jednotlivými populacemi. Skutečnost že při analýze sloučených dat nelze identifikovat shlukování, nemusí popírat existenci genetických rozdílů mezi populacemi- tyto mohou spočívat spíše v různé frekvenci výskytu alel než v jejich přítomnosti či absenci. Domnívám se že závěr formulovaný na straně 75 že „vnitropopulační (genetická) variabilita je dokonce vyšší než variabilita mezi taxony“ je pouze velmi relativní (jde o různé kategorie dat); jde o součást variability taxonu.

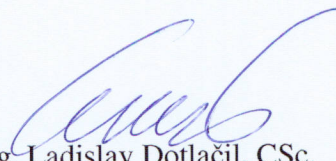
Výsledkem sekvenování ribozomální RNA byla především optimalizace této metody, která je nyní k dispozici pro další využití. Pro ověření metody byly zvoleny 4 populace po dvou rostlinách. Přes potíže s kontaminací DNA hub byly prokázány rozdíly mezi druhy ale i rozdíly

mezi dvěma analyzovanými populacemi *P. rotundata*. Oproti SSR markerům má tato metoda výhody a bude zřejmě dále využita.

V diskusi, která má charakter podrobné literární rešerše, autorka informuje o výsledcích taxonomických studií a nomenklatuře borovic a výsledcích a možnostech využití molekulárních markerů. Závěrem jsou shrnuty vlastní dosažené výsledky analýz SSR a konstatována shoda s prací Monteleone et al., 2006. Závěry jsou formulovány stručně a výstižně.

Doktorská disertační práce Ing. Martiny Beranové přispívá k řešení taxonomických problémů u evropských populací borovic a přináší dílčí poznatky o jejich genetické diversitě. Významným přínosem jsou poznatky metodického charakteru, týkající se aplikačních možností DNA markerů. Dílčí připomínky a dotazy k některým částem práce jsou uvedeny v posudku. Práce je logicky členěna, vyvozované závěry jsou dobře formulovány. Dobrá je i technická úprava. Po formální stránce má práce všechny náležitosti. Dle mého názoru doktorandka prokázala erudici pro vědeckou práci. Vzhledem k uvedeným skutečnostem doporučuji předloženou doktorskou disertační práci k obhajobě, po jejím úspěšném průběhu doporučuji udělení vědeckého stupně PhD.

V Praze dne 3. 6. 2008



Ing. Ladislav Dötlačil, CSc.
VÚRV v.v.i., Praha

Oponentský posudek disertační práce

Doktorand: **Ing. Martina Beranová**
Název práce: Použití molekulárních markerů v populační genetice a taxonomii na modelu *Pinus mugo*
Školitel: Prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Práce předložena na: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta

Disertační práce se zabývá závažným problémem z hlediska vědního, který se zároveň odráží i v lesnické praxi v oblastech specifikovaných v názvu. Téma poskytuje disertantovi široký prostor pro prokázání nabytých teoretických znalostí, získaných laboratorních dovedností a odpovídající prezentaci na očekávané vědecké úrovni. Výběr tématu proto považují za zdařilý počín. Jelikož jsem oponoval také diplomovou práci M. Beranové, mám za to, že její zájem o možnosti řešení některých otevřených otázek taxonomie s využitím soudobých sofistikovaných metod pochází už z té doby.

Práce obsahuje 114 stran, pevně spojených knihařskou vazbou. Barevné nebo černobílé grafy a přehledové tabulky jsou vloženy na patřičná místa přímo do textu. Vnitřní členění odpovídá standardní struktuře vědeckých publikací. Rozsah práce je přiměřený obsahu i formě prezentace, vlastní práce představuje $\frac{2}{3}$ celkového rozsahu. Vyjadřování lze označit jako výstižné a srozumitelné, po gramatické stránce bez větších připomínek, formální stránka je přijatelná. Údaje odpovídají soustavě SI.

Zpracování disertační práce je zaměřeno výhradně na okruh otázek vymezený názvem. V Literárním přehledu lze nalézt citlivě vybrané podklady z domácí i zahraniční literatury k vědním okruhům, které se týkají systematiky rodu *Pinus* L., geografickému rozšíření, otázkám hybridizace, genetické variability a hlavně využití metod molekulárních markerů.

Cíle práce jsou stručně formulovány ve 4 bodech, hypotéza neuvedena. Východiskem a stěžejním pro celou práci se jeví první bod (Optimalizace techniky molekulárních markerů na modelu rodu *Pinus* L. a posouzení vhodnosti vybraných metod).

Materiál a Metody: Vzorkový materiál dodal VÚ v Průhonicích a čítal 25 – 50 položek, patřící k šesti přírodním populacím *Pinus* z různých států Evropy. Jsou tu výstižně popsány použité postupy extrakce genomové DNA, analýzy RAPD, AFLP, SSR, klonování a sekvenování DNA a elektroforézy v agarózovém gelu.

V kapitole Výsledky oceňuji pečlivé zdokumentování výsledků, kterých bylo dosaženo za použití výše uvedených postupů při analýze jednotlivých populací. Utřídění výsledků je přehledné a výstižné, hodnocení možností nasazení jednotlivých metod a limitů použití realistické. Kladně hodnotím kritický přístup v případech kontaminace některých vzorků cizorodou DNA (kontaminace houbami). Prezentace je velice promyšleně propracovaná a přesvědčivá. Lze jen litovat, že do hodnocení nebylo možné zařadit morfologická data, neboť dodatel vzorků morfologická měření pro jednotlivé populace nestačil systematicky zpracovat a dodat. Bez nich nelze přistoupit ke genetickým analýzám.

V kapitole Diskuse se konfrontují dosažené výsledky s údaji povětšinou citovanými ve vstupní kapitole. Kapitola je věcná a obsažná, s podstatnými vývody a souvislostmi. Cizorodá DNA činí metodu RAPD a AFLP k danému účelu nepoužitelnou, jako vhodnější se tedy ukazují mikrosatelity, z nichž byly pro komplexní hodnocení vybrány tři markery. Tato

markery spolehlivě amplifikovaly fragmenty u všech zkoumaných populací. Dále bylo v práci použito sekvenování části genů pro ribozomální RNA u čtyř náhodně vybraných populací. Byly vyřešeny otázky optimalizace, nalezeny vhodné primery a vhodná metoda pro amplifikaci. Sekvenování v případech rozsáhlého překrývání markerů fingerprintů, jak bylo zjištěno u jednotlivých populací, se ukazuje jako postup k danému účelu nejvhodnější, ale také nejdražší.

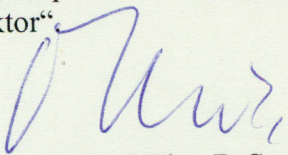
Závěr je stručně a výstižně formulován ve čtyřech bodech. Rod *Pinus* se ukazuje jako jeden z nejvíce geneticky variabilních v celé rostlinné říši. Počet druhů uvnitř rodu zřejmě není pro hodnocení taxonomických otázek hlavním kritériem, důležitějším jsou vzájemné vztahy přírodních populací.

K práci nemám podstatných věcných připomínek. Seznam vlastních publikací disertanta jsem našel v autoreferátu: Ze třech zde uvedených je Ing. Beranová ve dvou případech uvedena na prvním místě autorského kolektivu.

Prohlašuji, že disertační práce splňuje všechny požadavky kladené na tento typ prací podle zák. č. 111/1998 Sb. Proto komisi pro obhajobu při JČU ZF v Českých Budějovicích **doporučuji** práci v předloženém znění přijmout jako podklad k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení jmenované udělit akademický titul „Doktor“.

V Táboře, dne 26. května 2008

..


Ing. Václav Míka, DrSc.
VÚRV Praha, v.v.i.