

## Zápis z vědecké rozpravy – obhajoba disertační práce Ing. Barbory Kubátové,

ZF JU v Č. Budějovicích, 10.6.2008

---

RNDr. J. Vlasák: Co se udělalo se vzorky *Gymnadenia conopsea*, jsou uchovány a je možné analýzy zopakovat?

- Vzorky jsou uchované ve formě vyizolované DNA v mrazáku a jsou uchované i vzorky listů.

RNDr. J. Vlasák: Poznámka k interpretaci dat – práce a výsledky jsou výborné, další krok bude právě v dalším zpracování a interpretaci dat.

Prof. J. Ehrenbergerová: *G. Conopsea* je cizosprašná nebo samosprašná ? a jaká je variabilita mezi populacemi.

- *G. Conopsea* je cizosprašná, samosprašení je ale možné a i v izolátoru dochází k plnému vývinu semeníků. Variabilita mezi populacemi je velmi vysoká, populace ze Šumavy a Bílých Karpat jsou dosti odlišné, důležité ale je, že se daří odlišit sledované taxony.

Prof. J. Ehrenbergerová: Jaký byl počet stanovišť u rákosu?

- 9 stanovišť bylo na Opatovickém rybníce, 7 na Halámkách.

Doc. J. Diviš: Proč ubývá rákosu?

- Příčiny ubývání rákosu v Evropě nejsou uspokojivě vysvětleny, možné příčiny jsou disturbance lokalit, eutrofizace, nedostatek prostoru pro klíčení a růst dsemenáčků, snižování genetické variability.

## Odovědi na komentáře a otázky oponentů

### Ing. Hana Šimková, CSc.

*Druhý okruh práce je zaměřen na studium populací *Phragmites australis* za použití morfologických a genetických markerů (RAPD, SSR, AFLP a sekvenování DNA). Chtěla bych se zeptat, zda autorka zná ještě jiné typy DNA markerů, které jsou používány ke studiu vnitrodruhové diversity, a může podat informaci o jejich výhodách a nevýhodách.*

Existuje ještě celé řada DNA markerů, které je možné použít ve studiu genetické diverzity, méně z nich pak lze aplikovat u modelů planých rostlin vzhledem k tomu, že o většině z nich není příliš známého o jejich genomu a nelze pak aplikovat markery, které prvotní znalost studovaného genomu požadují. Z těchto DNA markerů také již méně je vhodných pro tak nízkou taxonomickou úroveň studia jako je vnitrodruhová variabilita díky nízkému polymorfismu. Nicméně kromě technik použitých v mé disertační práci vyjmenuji ještě některé známé metody:

RFLP- restriční analýza celkové genomické DNA, dále RFLP markery na jaderné DNA jsou používány jako kodominantní markery v genetické analýze a pro sestavování RFLP map. RFLP analýza chloroplastové DNA (ctDNA) byla prováděna v různých studiích jež se zabývaly zjištěním genetické diverzity – např. fylogenetické a populační studie u andských planých a kulturních druhů brambor. Ve srovnání s metodami postavenými na amplifikační strategii však vyžaduje velké množství čisté DNA, mají požadavky na znalost studovaného genomu, dostupnost sond (značených). RFLP byla první světově používanou metodou pro studium genetické variability respektive diverzity. Celý postup od izolace přes restriční až k hybridizaci je poměrně časově náročný.

PCR-RFLP kombinuje jednoduchost PCR s restričním štěpením amplifikovaného fragmentu. Uplatňuje se na jaderné i chloroplastové DNA.

SNPs - Single Nucleotide Polymorphisms

Systém je založený na polymorfismu jednonukleotidových mutací DNA. Jedná se o polymorfní místa vzniklá záměnou či absencí jednotlivých bází v řetězci jak kódujících tak nekódujících oblastí DNA. Frekvence, stabilita a relativně rovnoměrné rozmístění SNPs v genomu z nich dělá vhodný genetický marker. Tato metoda se pravděpodobně častěji používá u zvířat a v humánní medicíně při odhalování různých chorob. U rostlin může být uplatněna ve šlechtění, populačních studiích, mapování genů, rekonstrukcích evoluce atd. SNPs reprezentují nejčastější typ genetické variability a představují asi 90% všeskerého polymorfismu. Uvádí se, že na každou kilobazi připadnou 2-3 polymorfní místa vzniklá právě jednoduchou mutací. Existuje celá řada metod, kterými se SNPs detekují, mě je známé sekvenování, DNA micro arrays a čipové technologie případně elektroforetická separace (kapilární elektroforéza a separace na agarózových gelech).

ISSR – Inter Simple Sequence Repeat

Jsou modifikací klasické analýzy mikrosatelitů výhodou je použití pouze jednoho jednoduchého primeru. Jedna až tři báze na konci primeru ho ukotví na 3' nebo 5' konci k cílové sekvenci mikrosatelitu. Detekují se na agarózových nebo polyakrylamidových gelech. Reprodukce je vyšší než u RAPD díky delšímu primeru.

Další možnosti jsou analýzy retrotransponů. Byly použity pro identifikaci odrůd, hodnocení diverzity genových zdrojů a populační studie (porovnání planých a kulturních druhů). Metody nejsou zcela propracované vyžadují nutnost získání specifických primerů, ale dobře fungující např. u ječmene, lnu, brambor.

*V souhrnu práce autorka zmiňuje sekvenování ribosomální DNA jako jeden z možných typů nespecifických DNA markerů. Je možné odvodit nespecifický DNA marker z oblasti ribosomální DNA bez nutnosti sekvenování? Byl by takovýto marker vhodný pro analýzu diverzity na vnitrodruhové úrovni?*

Např. technika CAPS markerů – tj. PCR-RFLP např. ITS, nebo různých domén LSU nebo SSU nebo štěpení cp DNA. Existuje celá řada primerů pro různé úseky cpDNA a byla publikována práce zabývající se variabilitou jednotlivých úseků a také vhodností jejich použití (Shaw et al. 2005). Tato technika je ale vhodnější pro hodnocení diverzity mezi taxony, podle vlastních zkušeností se nejvíce jeví jako vhodná pro populační studie a analýzu diverzity na druhové úrovni.

*V práci autorka mimo jiné zjistila, že hexaploidní rostliny vykazovaly intenzitu fluorescence o 2,4% nižší, než by se očekávalo. Jako možné vysvětlení uvádí snížení velikosti monoploidního genomu v důsledku polyploidizace (tzv. downsizing). Byl tento jev popsán i u jiných rostlinných druhů a jaká může být jeho molekulárně-biologická podstata?*

Jedná se o poměrně častý jev u polyploidů a byl podrobně studován v pracích Leitch a Bennett. Je znám u řady druhů např. u pšenice, kotřav, řepky, tulipánů, chrysaném, bříz, pryskyřníků a konečně tento fenomén se objevil také u Gymnadenií zahrnutých do mé disertační práce. Pokud nebudu uvažovat artefakty a chyby cytometrických analýz, může dojít ke snížení intenzity fluorescence v důsledku zmenšení genomu polyploida při jeho vzniku. Zmenšení není na úkor kódujících sekvencí, které jsou většinou single copy genů, ale na úkor repetit a balastních částí genomu, heterochromatinových struktur a podobně.

*Nesplnilo se pouze mé očekávání, že autorka komplexněji propojí všechny tři metodické přístupy alespoň u jednoho ze studovaných rostlinných objektů.*

S oponentkou v podstatě souhlasím a přiznávám, že sama bych byla raději, kdyby každá ze studií zahrnutých v disertační práci kombinovala několik přístupů, ale z časových a finančních důvodů nebyla tato věc v mých silách. Nicméně poslední studie věnovaná rákosu obecnému skutečně je kompilací ne jen řady DNA markerů, ale také morfologických markerů a v neposlední řadě zde byla použita také průtoková cytometrie, byť jen okrajově. V současné době již pracuji na dalších studiích, které stávající práce na Gymnadeniích a *L. salicaria* doplní o další techniky.

## prof. Steven Travis, Ph.D.

*If G. conopsea conopsea and G. conopsea densiflora are the only subspecies in the complex, as implied by the species description, why is G. c. borealis included in the taxonomy section?*

Tento fakt jen dokumentuje složitou taxonomickou a nomenklatorickou problematiku komplexu a nejednotný pohledu různých autorů na chápání druhů. *G.c.borealis* je udávána ze sev. části Britských ostrovů, otázkou je vymezení tohoto taxonu a i to, zda tento taxon nemá paralelu v kontinentální Evropě. Tento taxon je zmíněn zejména kvůli podání vyčerpávajícího přehledu o taxonomické problematice komplexu a také proto, aby nedošlo k opomenutí práce skupiny z Kew Garden, kde je problematika evropských orchidejí (byť někdy s kontroverzními výsledky) dlouhodobě řešena.

*The last sentence of the first paragraph of section 1.2.3 is a bit confusing. Is the conclusion that four cpDNA haplotypes of G. conopsea also differed in terms of one or more microsatellite loci? If so, how many microsat loci were used? Did allelic variation perfectly align with cpDNA variation or was it only partially consistent?*

Tyto závěry jsou citovány z práce Soliva and Widmer (1999): *Levels of cpDNA variation were generally low, even between G. conopsea s.l. and Gymnadenia odoratissima, chosen as an outgroup. Four cpDNA haplotypes were found, which differed only in the number of microsatellite repeats. Their distribution among subspecies of G. conopsea s.l. and G. odoratissima indicates that microsatellite haplotypes have evolved repeatedly, and their occurrence in different taxa thus represents a homoplasy. Floral characters were variable within and among populations and subspecies but did not consistently separate early- from late-flowering populations. A weak separation between subspecies was found in vegetative characters that presumably reflected habitat and competitive differences experienced by early and late-flowering populations.* Citovaní autoři provedli sekvenční analýzu úseku cpDNA a ve studovaném chloroplastovém intronu našli mononukleotidový mikrosatelit, jehož délka byla rozdílná u čtyřech nalezených cpDNA haplotypů. Tyto čtyři haplotypy se tedy lišily jen v daném mikrosatelitu, navíc bylo zjištěno, že tyto haplotypy neodpovídají rozdílným taxonům, pravděpodobně došlo k nezávislému a opakovanému vzniku daného haplotypu u různých taxonů. Gene flow pak byl hodnocen ne na úrovni těchto cpDNA haplotypů, ale na úrovni analyzovaných isoenzymových lokusů.

*Did the work of Dworschak include genetic markers, as is implied by its mention in the genetics section?*

Ne, tato studie je poněkud obskurní a taxony jsou definovány jen na základě subjektivních morfologických a ne zcela správně chápaných fenotypových charakteristik. Tato studie je ale zmíněna jako příklad prací, které jen do dané problematiky vnášejí další nejasnosti.

*The description of Gustafsson and Lönn's work at the top of page 17 is confusing in the sense that early- and late-flowering variants of G. conopsea are apparently being compared to G. densiflora and G. odoratissima, whereas the only discussion of variation in flowering times prior to this has been between the subspecies G. c. conopsea and G. c. densiflora rather than within one of the subspecies.*

Gustafsson a Lönn hodnotí celkem 4 skupiny – *G. densiflora*, *G. odoratissima* (jako outgroup), a časné a pozdně kvetoucí formy *G. conopsea*. Citované výsledky pak jsou v pořádku. Diskuse vedené kolem časné a pozdně kvetoucích typů se týkají jen *G. conopsea* (časné kvetoucí typy pak odpovídají *G. conopsea* a pozdně kvetoucí typy pak *G. montana*, v případě, kdy akceptujeme toto pojetí a nomenklatorické vymezení studovaných taxonů).

*It's not clear why G. c. alpina is being mentioned in the midst of a description of karyology when there is no mention of its chromosome number.*

Počet chromozomů má *G.c. alpina* stejný jako *G.c.conopsea*, v citové literatuře je pak uváděno, že se neliší počtem chromozomů, ale jejich velikostí. Je pravda, že tento odstavec mohl být uveden jak v této kapitole, tak i v kapitole pojednávající o charakteristice druhu.

*It would seem appropriate to mention in the Introduction how different ploidy numbers have tended to correlate with taxonomic distinctions in the species complex prior to undertaking the current investigation.*

Tato problematika právě není zcela jasná. V současné době probíhá masivní studie za účelem zjištění cytotypové struktury populací komplexu pětiprstky. Na základě této studie, molekulárních a morfometrických analýz bude zodpovězeno i na položený dotaz. Zatím je zcela jasné, že *G. densiflora* má  $2n=40$  (v řadě studií a flór není tento údaj správný a toto vede k dalšímu komplikování stavu u popisu a rozlišení taxonů agregátu).

*Some justification should be given for restricting the geographic extent of the study mostly to the Czech Republic and Slovakia. What portion of the overall range of G. conopsea does this region represent? What range of the cytotypic variation? What range of the ecological variation? What range of the morphological variation?*

*G. conopsea* se vyskytuje kromě Islandu v celé Evropě. Zjištěné cytotypy pravděpodobně představují celý rozsah cytotypové variability, řada cytotypů nebyla doposud publikována. Stejně tak studované populace představují (snad kromě populací na přímořských písečných dunách) celý rozsah ekologické variability (vzhledem k tomu, že do studie byly zahrnuty i populace z rakouských Alp, byla postižena i *G.c. alpina* a stanoviště subalpinských luk) a byl detekován i značný rozsah morfologické variability. Tato problematika – cytologická, genetická a morfologická variabilita je náplní probíhající grantu a další připravované publikace.

*Was sampling within sites strictly randomized or simply haphazard? Was there any minimum or maximum spacing between samples?*

Populace orchidejí na řadě lokalit nejsou příliš početné. Některé populace byly vzorkovány celé a získané výsledky kompletně pokrývají variabilitu v populaci. Vícepočetné populace byly vzorkovány na principu náhodného výběru. Minimální a maximální vzdálenosti mezi rostlinami se lišily podle plochy lokality a počtosti populace. V současné době probíhá studie – zaměřená na mikrostanovištní cytotypovou variabilitu, kdy na vybraných lokalitách budou analyzovány všechny nalezené rostliny.

*On what basis were taxa distinguished in the field?*

Tato studie probíhá již delší dobu, na řadě lokalit byl výskyt jednotlivých druhů ověřen, v řadě případů byly ale zjištěné a získané výsledky překvapivé a kromě cytotypové struktury populací je jeden ze závěrů práce možností kalsifikace taxonů na základě specifických flow-cytometrických profilů. V terénu byly taxony identifikovány na základě morfologie a fenologie a předchozích znalostí výskytu taxonů na lokalitách.

*Were plants mixed for flow cytometry based on their proximity in the field? This would seem to be the most efficient strategy, but it could use some clarification.*

De facto ano. Probíhaly analýzy směsných vzorků (po 5) a daná pětice vzorků představovala rostliny, které rostly nejbližší. Na druhou stranu v případě nejasných výsledků byly analýzy prováděny po individuálních rostlinách. Cílem studie nebylo zjistit v jaké vzdálenosti rostou jednotlivé cytotypy, ale jaká je vůbec cytotypová struktura populací. Podrobná mikrostanovištní struktura populace je cílem nyní probíhající studie.

*Some clarification of the method by which ratios were used in the PCA analysis seems warranted. Was it the ratio of each peak to the smallest peak observed within the corresponding histogram, or the smallest peak observed for all samples of the corresponding species?*

Byl použit první oponentem zmíněný způsob – jako výchozí byl použit pík „i“ z analýzy dané rostliny.

*It completely escapes me why multiple peaks were observed for most samples. Is this because the nuclei from multiple samples were bulked? Or were multiple peaks observed even when only a single plant was analyzed? Why would this occur?*

Tato problematika je zcela unikátní a byla zjištěna právě u terestrických orchidejí. Výskyt pík odpovídající hypoduplikovným jádrům, změny ve FCM histogramech během diferenciaci a stárnutí pletiv jsou zcela pravidelné a navíc specifické pro každý taxon. Tento jev není v žádném případě způsoben tím, že byly analyzovány směsné vzorky, tyto výsledky odpovídají analýze individuální rostliny. Ke směsným analýzám bylo přistoupeno až poté, co byla ověřena stabilita histogramů a navíc v případě netypického výsledku byly směsné vzorky reanalyzovány a analyzovány po individuálních rostlinách.

*Peaks i, I, II, and III should be identified in Fig. 1. Also, it might be better to label C as G. conopsea, rather than G. montana, since there's little mention of G. montana elsewhere in the manuscript.*

Souhlasím s připomínkou oponenta. Tato připomínka byla zodpovězena při prezentaci disertační práce.

*Without knowing how Cx values are calculated, I have no frame of reference for interpreting them, but it seems like the different ploidy levels characteristic of G. conopsea would either exhibit identical Cx values or values that increase incrementally. Neither seems to be the case judging from Fig. 3.*

Cx hodnota je počítána jako pocíl C-value a ploidie. Jednotlivé taxony včetně méně běžných cytotypů mají specifické a odlišné hodnoty Cx. Hodnoty Cx jsou popisným ukazatelem a udávají velikost monoploidního

genomu, svůj význam mají zejména při hodnocení velikosti genomu v diploidních-polyploidních komplexech.

*There needs to be some explanation of what the stippled polygons represent in Fig. 4.*

Tyto plochy představují plochy křovité a stromové vegetace, která se vyskytuje na loukách s pětiprstkami.

*Note that there is a researcher at the University of Rhode Island who has been developing microsatellites for Phragmites, and who claims to have observed hybrids between North American and European strains.*

Těmito studii se zabývala Kristin Saltonstall, její práce jsou v mé disertační práci citované, zavedla jak techniky na principu RFLP analýzy, tak i odvodila specifické mikrosatelitové markery pro rozlišení původních amerických a introdukovaných evropských genotypů. Řada amerických autorů, používala jí zavedené metody a přístupy, např. Lambert a Casagrande (Distribution of Native and Exotic *Phragmites australis* in Rhode Island, 2006).

*I am a little uncomfortable with the use of the phrase “phenotypic plasticity” at the bottom of page 25, since the more important issue from the standpoint of population persistence would be that adaptive genetic variation would be lacking in a population consisting of a small number of clones.*

Ano tuto otázku lze chápat a vysvětlit ze dvou pohledů – pohled ryze genetický, kdy populace s malým počtem klonů nemá dostatečnou genetickou variabilitu a není „adaptivní“. Druhý pohled je pak pohledem „klasické“ ekologie (a odpovídá i citované práci), kdy nízká genetická variabilita se projeví v nedostatečné fenotypové plasticitě potřebné pro úspěšnou adaptaci na měnící se podmínky prostředí. Oba tyto pohledy ale mají stejný základ – populace s úzkou genetickou základnou není schopna rychle reagovat na podmínky prostředí a na rychlé změny.

*There seems to be something of a contradiction in the first full paragraph on page 27 where first it is stated that multiple clones distributed along a shoreline may be associated with declining reed populations, but then it is later stated that where multiple clones exist, only clonal diversity will decline, while the overall population is relatively unaffected.*

Tento zdánlivý nesoulad může být způsoben nejednotným pohledem na příčiny ubývání rákosu v Evropě, resp. neznalostí těchto příčin. Existuje řada hypotéz, v posledních letech byly provedeny i studie odhalující míru reálné genetické diverzity v populacích rákosu, ale svoji roli bude hrát i různorodost stanovištních podmínek, historie stanoviště a interakce stanoviště a populace rákosu (genotypové struktury dané populace).

*Because the field sampling protocol is such a critical element in the design of this study, some detail should be given in the methods beyond merely citing an earlier paper.*

Tato připomínka může být věcí diskuse, k citaci předchozí studie nás vedly zkušenosti s publikováním práce Křiváčková et al. 2007.

*The amount of detail used in describing the molecular protocols seems excessive. Unless there were specific details of each protocol that were modified from the references cited, it should be sufficient to simply cite these references and give a list of the specific primers used (Note that Travis and Whester (1995) should be Travis and Hester (2005)).*

Děkuji za opravu citované práce, míra podrobnosti metodiky je rovněž věcí diskuse, oponentem doporučená práce Douhovnikoff & Dodd má obdobný rozsah metodické části.

*In the second paragraph of the Results section on SSR Analyses, as well as in Table 1 (and portions of Table 2), use of the phrase “possible band positions” is confusing – better to simply use “alleles.” Also, it’s not clear what the MAX and MIN rows represent in Table 1 (although they are defined by a footnote in Table 2). Finally, it might be beneficial to note somewhere in Table 1 that the clones were tetraploid, thus explaining why more than 2 alleles were observed in some individuals.*

MAX a MIN hodnoty jsou uvedeny u tabulky 2, děkuji za připomínku a tuto vysvětlivku do rukopisu doplním.

*I am particularly concerned about the validity of the AFLP results, having run (and published – Howard et al. 2008) AFLP’s on *P. australis* using some of the very same primer combinations reported here. I have found there to be no more than 50-60 scorable markers per primer combination in *P. australis*, and have rarely seen more than about 100 scorable AFLP markers per primer combination for any of the numerous plant and animal species with which I have used the AFLP technique. Certainly there are more fragments*

*observable per individual than I actually score – I take a conservative approach and do not score any loci that are difficult to resolve – but given that resolvable AFLP fragments only range over 350-400 bp's, the numbers of markers you have reported would seem to indicate a fragment at virtually every possible position, and this brings into question the potential for loci to exhibit substantial overlap in size, which would tend to result in frequent scoring errors. Also, if you are trying to discriminate among clones using AFLP's, there is a real drawback to using a large number of AFLP markers because they mutate so rapidly. The more markers you use, the more likely you are to encounter a somatic mutation that might mislead you into thinking one clone is actually two (for a detailed discussion of this issue, see Douhovnikoff, V., & Dodd, R. S. 2003. Intra-clonal variation and a similarity threshold for identification of clones: application to Salix exigua using AFLP molecular markers. Theoretical and Applied Genetics 106:1307-1315). Your PcoA results seems to indicate that virtually every sample represents a distinct clone, but I doubt this is the case, and would conclude, rather, that you are either including too many markers in your analysis or that you are including a number of unreliable markers. Including such markers would not necessarily detract from your ability to discriminate among sites if they are sufficiently genetically differentiated, but it will certainly mislead you in terms of the numbers of clones within sites.*

Tato otázka je může být dána citlivostí softwaru použitého pro analýzu dat a skorování píků (AFLP markerů). Použitý software GeneMapper je velmi citlivý, výrazně citlivější než Geographer a umožňuje zobrazení profilu záznamu z kapilární elektroforézy a velmi přesnou a jednoznačnou identifikaci pozice AFLP markeru. Toto je zřejmě příčina, proč byl detekován větší počet píků/alel. Počet primerových kombinací nebyl neobvykle vysoký, obdobné výsledky uvádí v případě *L. salicaria* i Houghton-Thompson. Výsledky jednotlivých primerových kombinací navíc byly obdobné a trend seskupení jednotlivých vzorků byl stejný. V případě, že výsledky byly přepočítány pomocí algoritmu doporučených oponentem, získala jsem výsledky srovnatelné s těmi, které uvádím v disertační práci. Poplace na Halámkách byla velmi diverzní, s vysokou odlišností mezi jednotlivými vzorky (jednotlivé vzorky byly zobrazeny jako individuální klony), populace na Opatovickém rybníce byla opět seskupena do 5 skupin/klonů. Jsem si vědoma těchto omezení a v práci jsem neuváděla počty klonů v populacích po AFLP analýze. Počty klonů byly uváděny po RAPD a SSR analýze, resp. po kombinaci těchto dvou technik. Výsledky po AFLP analýze byly hodnoceny z pohledu vnitřní struktury populace a seskupení do skupin v rámci populace.

*There may be an error in the final sentence of the AFLP analysis results. This sentence states that the Opatovický site appeared genetically more compact than Halámky, but given that the green circles in Fig 3B are indicated as Opatovický, it appears that Halámky is definitely more compact.*

Je konstatováno, že populace na Halámkách nemá vnitřní strukturu a v rámci daného shluku představující tuto populaci jsou rostliny rozmístěny nepravidelně. Na Opatovickém rybníce je celková variabilita populace větší, ale jsou vytvořeny kompaktní shluky rostlin/klonů (často odpovídající geografické lokalizaci porostů). Tyto shluky rostlin se pak jeví mnohem více kompaktní.

*Your SSR markers were clearly weaker than your RAPD markers at distinguishing among clones, yet you seem at times to be drawing the opposite conclusion in your results. For example, based on Fig. 1, it looks as though RAPD's actually revealed about twice the clonal diversity as SSR's, and at Halámky the SSR's only distinguished 7 clones whereas your RAPD markers distinguished 18. Thus, the primary utility of the SSR's would seem to be in identifying a few additional clones that the RAPD's missed, such as the two additional clones identified at Opatovický. This point should be stressed, rather than making too much of the SSR results by themselves. Also, some of the numbers in Table 3 do not seem to make sense. For example, how could the combined RAPD and SSR markers indicate that 3 monoclonal stands existed at Opatovický when the RAPD markers alone had already indicated that only 2 monoclonal stands existed?*

Děkuji za připomínku ohledně hodnocení mikrosatelitů. V případě počtu klonů byly na základě RAPD analýzy identifikovány 3 monoklonální stanoviště, v původní práci byly klony hodnoceny jako velmi příbuzné a další analýzy je identifikovaly jako shodné a tuto skutečnost přehlédla.

*It's not clear how morphology could have been used to further distinguish among clones beyond the level of discrimination already provided by the molecular markers. Does the use of morphology mean that two stems that were genetically identical but that looked different were actually concluded to be representative of two different clones?*

Morfologie nebyla používána pro další hodnocení a rozlišování mezi geneticky identickými klony. Naopak morfologicky homogenní stanoviště byla původně považována za monoklonální. Morfologické charakteristiky byly použity společně s genetickými daty pro komplexní hodnocení daného souboru rostlin.

*It's not clear what the two mechanisms for the spread of invasive species mentioned at the beginning the first full paragraph of page 31 are. Are they? 1) the evolution of invasive properties in situ, or 2) the acquisition of invasive properties through genetic mixing as a consequence of multiple introductions.*

Ano byly míněny tyto dva mechanismy. Mechanismy invasibility a šíření invazních druhů jsou popsány v úvodní literární pasáži, kde jsou diskutovány i jednotlivé hypotézy týkající se šíření invazních rostlin.

*On page 48, it's not clear in the statement about the assumption of equilibrium in estimating of population parameters using AFLP's, exactly what sort of equilibrium is being referred to. This should be clarified.*

Tato problematika je převzata z citované práce Coates and Byrne (2005) - autoři popisují výhody AFLP markerů oproti RAPD technice a porovnávají je s kodominantními markery (mikrosatelity a isoenzymy). AFLP a SSR považují za nejvhodnější DNA techniky pro studium genetické struktury populací, reprodukčních systémů a studia toku genů v populaci. Jako nevýhodu uvádějí právě jejich dominantní charakter – a potíže při odhadu populačně genetických parametrů. Na druhou stranu jejich vysoká rozlišovací schopnost a možnost generovat velké množství markerů je příčinou stále častějšího použití techniky AFLP v analýze rostlinných populací.

*On page 55, it seems that the emphasis is on qualitative rather than quantitative characters at this point, yet most systematics studies based on morphology have certainly focused on quantitative characters.*

Ano.



## **prof. RNDr. František Marec, CSc**

*(1) K podkapitole 2.2.2. o odhadu velikosti genomu (str. 40-41): autorka uvádí, že velikost genomu u rostlin koreluje s řadou morfologických, fenologických i ekologických znaků. Z klasických studií u živočichů je známa korelace s životními strategiemi, konkrétně tzv. r-stratégové mají zpravidla malé genomy, k-stratégové velké genomy. Je tomu tak i u rostlin? A jak je tomu u rostlin s variabilitou ve velikosti genome mezi i dokonce uvnitř populací? Lez i tam najít podobné korelace?*

Podobná teorie existuje i u rostlin. *L. salicaria* patří mezi r-stratégy. V souvislosti s velikostí genomu se také uvažuje o teorii, že invazní rostliny mohou mít menší velikost genomu než rostliny stejného druhu, ale neinvazní, což by mělo u invazních genotypů napomoci odstranit nedůležité např. repetitivní úseky DNA a podpořit jejich rychlou adaptaci na nové prostředí, rychlost generativního cyklu a vytvořit tak podmínky pro masivní invazi. Tato teorie byla také základem pro studii věnovanou cytogenetice v populacích *L. salicaria*, ale vzhledem k tomu, že jednak nebylo možné měřit velikost genomu v absolutních jednotkách a navíc nic nenavědčovalo rozdíly ve velikosti genomu u invazních a neinvazních rostlin *L. salicaria*, byly cíle studie změněny.

*(2) K podkapitole 2.3.2.2. o dominantních DNA markerech (str. 47-48): jaké je využití AFLP marker pro populační genetiku rostlin? U hmyzu se ukazuje, že sice AFLP poskytují rychle velké množství spolehlivých markerů, jejich interpretace pro potřeby populační genetiky je však komplikovaná. Proto se v současné době využívají především ke konstrukci vazebných/chromosomálních map.*

AFLP stále nalézá široké uplatnění v populační genetice rostlin nejen díky výhodám nespecifity toho markeru a s tím související jednoduchosti použití, ale také proto, že se uvádí jako spolehlivé a reprodukovatelné DNA markery.

*(3) K podkapitole 2.3.2.1. o kodominantních markerech (str. 49-51): zarazila mě informace, že nízká variabilita sekvencí chloroplastové DNA je kromě jiného přičítána nižší mutační rychlosti (u mtDNA se naopak uvádí vyšší mutační rychlost díky nižší efektivitě reparačních mechanismů). Čím si autorka vysvětluje nižší mutační rychlost u chloroplastové DNA?*

V této části obecného textu jsem zřejmě udělala chybu a špatně interpretovala citovanou publikaci. Nechtěla jsem tvrdit, že cpDNA je přičítána nízká mutační rychlost, právě naopak díky tomu, že je relativně vysoká, je možné ji dobře používat v genetických studiích. Z vlastních zkušeností se ale domnívám, že není příliš vhodné, především při aplikaci PCR-RFLP, používat tuto metodu na vnitrodruhové úrovni.

*(4) Zajímalo by mě, jak si autorka vysvětluje nízké zastoupení hexaploidů v populacích pětiprstky žezulníku (pouze 1,3%) ve srovnání s vysokým podílem oktoploidů (37,8%)?*

Nízký podíl hexaploidů si vysvětlují přítomností mechanismů, které in situ zabraňují křížení poskytující vznik hexaploidů. Nicméně bylo zjištěno, že hexaploidní rostliny jsou fertillní, mají plně nasazené semeníky a klíčivá semena. Nízký podíl hexaploidů pak může mít příčinu v zabránění klíčení semen v přírodních podmínkách (zmiňovaná vysoká klíčivost 6x rostlin byla zjištěna in vitro), další zábrany pak mohou být na úrovni vývoje protokormů či rostlin. Tato problematika je i náplní dalšího grantového projektu.

*K publikaci 2. Čurn, Kubátová, Vávřová, Suchá, Čížková (2007) Aquatic Botany 86: 321-330.*

*(5) Vzorke pro analýzu populací rákosu z Opatovického rybníka (starší populace) a pískovny u Halámek (mladší populace) byly odebírány jen v jednom roce, 2003. Domnívám se, že pískovna není zřejmě nijak udržovaná, avšak Opatovický rybník podléhá pravidelnému rybářskému managementu, který může představovat relativně velký zásah do populace rákosu. Nemohou být výsledky tzv. starší populace v rybníku zkesleny těmito zásahy? A existují nějaká srovnávací data populací rákosu u rybníků před a po vypuštění?*

Srovnávací studie byly prováděny jen na úrovni morfologických a produkčně-ekologických charakteristik. Dle managementu na Opatovickém rybníku bylo každé dva až tři roky provedeno jeho vypouštění, což mohlo způsobit optimální podmínky pro klíčení semen rákosu a umožnit generativní rozmnožování, ale generativní rozmnožování pravděpodobně není velmi časté vzhledem k tomu, že semenáčky nejsou v regionu nalézání. Klíčivost semen je možná nízká díky infenci houbami, která je v regionu častá. Smyslem studie nebylo porovnání stavu před a po vypuštění (navíc rybník není dlouhodobě letněn a šance, že na krátkodobě obnaženém dně dojde k vyklíčení a uchycení rákosu je minimální), ale hodnocení dobře vyvinutých dlouhodobě sledovaných porostů rákosu. Z dlouhodobého (fenotypového) sledování lze usoudit, že porosty jsou stabilní, bez disturbancí, beze změn jejich charakteru. O to překvapivější byly mé výsledky, které poukázaly na neočekávaně vysokou genetickou diverzitu těchto porostů.

K publikaci 3. Suchá, Vávová, Čížková, Čurn, Kubátová (2007) *Aquatic Botany* 86: 361-368.

(6) V diskusi autoři zmiňují nepublikované údaje, dle kterých byly všechny morfotypy rákosu z výše uvedených lokalit tetraploidní. Z této krátké zmínky mi není jasná motivace ověřování ploidie. Je rákos přirozený tetraploid nebo je v literatuře popsána variabilita v ploidii?

V článku je zmíněno, že ověřování ploidní úrovně robustních morfotypů bylo prováděno, aby bylo možné vyloučit, že jejich mohutný růst byl způsoben změnou v ploidní úrovni. Další analýzy byly prováděny, abychom věděli s jakou ploidní úrovní pracujeme. V ČR jsou doposud známi jen tetraploidi a převládají i celosvětově. Výskyt oktoploidů je udáván např. z dunajské delty. U rákosu je popsána polyploidní série od triploidní po oktoploidní úrpveň. Původní diploidní forma ale není známa. Ve stresových (experimentálních) podmínkách byly získány sterilní diploidní rostliny a vznik této diploidní formy byl vysvětlován jako výsledek cytogenetické reakce na ekologický stres.

K publikaci 4. Kubátová, Čurn (2008) *Mol. Ecol.* (subm.).

(7) Tato studie je evidentně jakýmsi metodickým vrcholem předložené disertační práce, neboť pro srovnání výše uvedených populací rákosu kombinuje všechny metody uvedené v úvodu disertace. Zaujal mě jeden ze závěrů, konkrétně absence korelace mezi morfologickou variabilitou a variabilitou zjištěnou pomocí několika typů DNA markerů. Co je tedy hlavní příčinou morfologické variability? Stanoviště?

Je nutné si uvědomit, že doposud byly fenotypově homogenní porosty rákosu považovány za monoklonální na základě subjektivního stanovení. Příčinou morfologické variability individuálního stanoviště = homogenního porostu rákosu budou 2 faktory: 1/ neznalost genetické struktury porostu, kdy polyklonální porost pak samozřejmě vykazuje vyšší morfologickou variabilitu v okamžiku, kdy nehodnotíme porost jako celek, ale sledujeme parametry u jednotlivých rostlin. 2/ Oponentem uvažovaný vliv stanovištních podmínek, kdy i monoklonální porost může vykazovat určitou míru nehomogenity. V porostu rákosu pak mezi jednotlivými rostlinami a jednotlivými stébly téže rostliny existuje řada konkurenčních a kompetičních vztahů, které utváření konečný charakter porostu.

K publikaci 5. Kubátová, Trávníček, Bastlová, Čurn, Jarolímová, Suda (2008) *J. Biogeography* 35: 167-176.

(8) U výsledků měření obsahu DNA kypřeje vrbice, že hodnoty pro  $3n$  a  $4n$  rostliny odpovídají téměř přesně odpovídajícím násobkem hodnoty pro  $2n$  rostliny, což mimochodem ukazuje na velkou preciznost při provádění měření, u hexaploidních rostlin je však patrná odchylka. Čím si tuto odchylku vysvětlujete? A byly podobné odchylky pozorovány i u jiných „víceploidních rostlin“?

Tato otázka byla ve stejném rozsahu již položena a zodpovězena v odpovědích na otázky Ing. Hany Šimkové, CSc.



# Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

## Zemědělská fakulta

### PROTOKOL O OBHAJOBĚ DISERTAČNÍ PRÁCE DSP

Jméno studenta: **Ing. Barbora Kubátová**  
Narozen(a): 30.9.1978 v Českých Budějovicích

Studijní program: Fytotechnika  
Studijní obor: Speciální produkce rostlinná  
Forma studia: prezenční

Název disertační práce: Application of different methodological approaches  
in plant population studies a

Výsledek obhajoby:

**Prospěl (a)**

~~Neprospěl(a)~~

#### Komise:

	JMÉNO	PODPIS
Předseda:	prof. RNDr. František Marec, CSc., ENTÚ AV ČR (oponent)	
Členové:	doc. Ing. Jiří Diviš, CSc., ZF JU v Českých Budějovicích	
	doc. RNDr. Jaroslav Doležel, DrSc., ÚEB AV ČR Olomouc	
	Ing. Ladislav Dotlačil, CSc., VÚRV Praha Ruzyně	
	prof. Ing. Jaroslava Ehrenbergerová, CSc., MZLU Brno	
	doc. Ing. Miroslav Jůzl, CSc., MZLU Brno	
	doc. RNDr. Jan Suda, Ph.D., AV ČR Průhonice	
	RNDr. Josef Vlasák, CSc., ÚMBR AV ČR	
	prof. Steven E. Travis, University of New England, USA (oponent)	
Oponent:	Ing. Hana Šimková, CSc., ÚEB AV ČR Olomouc	
Školitel:	prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., ZF JU v Českých Budějovicích	

V Českých Budějovicích dne 10.6.2008

