



Oponentský posudek na disertační práci

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

Autor: Ing. Barbora Kubátová
Zemědělská fakulta Jihočeské univerzity
České Budějovice

Cílem předložené disertační práce bylo studium genetické, cytogenetické a morfologické struktury a variability rostlinných populací, a to s využitím metod klasické biologie, molekulární biologie a rostlinné průtokové cytometrie. Kromě tří metodologických přístupů autorka kombinuje také tři různé biologické objekty studia – komplex *Gymnadenia conopsea* (pětiprstka žežulník), populace *Phragmites australis* (rákos obecný) a populace *Lythrum salicaria* (kyprej vrbice).

Po formální stránce je disertační práce velmi pečlivě vypracována. Je rozčleněna do šesti kapitol – souhrn v českém a anglickém jazyce, cíle práce, úvod, závěry a seznam publikovaných prací. Významnou část práce představují přílohy, které sestávají z kopií tří publikací, které již vyšly v mezinárodních vědeckých časopisech (*Aquatic Botany* a *Journal of Biogeography*), a kopií dvou publikací odeslaných do tisku (*American Journal of Botany* a *Molecular Ecology*). U těchto dvou publikací je Ing. Kubátová první autorkou stejně jako u publikace v *Journal of Biogeography*, u publikací v časopise *Aquatic Botany* je spoluautorkou.

Literární přehled prezentovaný v kapitole Úvod je logicky strukturovaný. V první části podává autorka velmi podrobnou charakteristiku všech tří studovaných objektů, která se týká nejen popisu a rozšíření jednotlivých druhů, ale uvádí čtenáře i do konkrétní problematiky, kterou se v souvislosti s uvedeným druhem zabývá. U komplexu *G. conopsea* přitahuje pozornost rostlinných systematiků, populačních genetiků a evolučních biologů zejména taxonomická a nomenklaturická problematika a také genetická a cytogenetická variabilita tohoto komplexu. U *Lythrum salicaria* a *Phragmites australis* jsou pak v popředí zájmu otázky týkající se invaznosti těchto druhů, která je aktuální zejména v oblasti Severní Ameriky. Popisy jednotlivých druhů jsou doplněny velmi pěknými fotografiemi. Druhá část literárního přehledu je věnována jednotlivým metodám použitým v disertační práci – rostlinné

průtokové cytometrii a morfologickým a molekulárním markerům. Zajímavá je zejména konfrontace těchto dvou typů markerových systémů, odrážející častý rozpor mezi systematickými a molekulárními biology. Celý literární přehled je zakončen velmi obsáhlým seznamem citované literatury, který jen potvrzuje, že autorka se opravdu podrobně seznámila se všemi aspekty studované problematiky.

První okruh disertační práce je zaměřen na problematiku komplexu *Gymnadenia conopsea*. Na základě rozsáhlé cytometrické studie (2226 analýz) přináší informace o nově objevených ploidních úrovních v rámci tohoto komplexu (hexaploidi, dodekaploidi) a dokládá sympatrický růst jedinců různých ploidních úrovní. Škoda jen, že závěr práce odeslané do tisku, je spíše jen rekapitulací získaných dat a neposkytuje obecnější shrnutí výsledků, zdůrazňující význam práce v širším kontextu a případné další perspektivy tohoto výzkumu.

Druhý okruh práce je zaměřen na studium populací *Phragmites australis* za použití morfologických a genetických markerů (RAPD, SSR, AFLP a sekvenování cpDNA). 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. 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?

Třetí okruh práce se zabývá analýzou ploidní úrovně populací *Lythrum salicaria*, zejména s ohledem na možnou souvislost s invazním charakterem severoamerických populací. 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?

Závěrem lze konstatovat, že autorce předkládané disertační práce se podařilo překvapivě dobře skloubit několik různorodých témat do jednotně působící práce. Nesplnilo se pouze mé očekávání, že autorka komplexněji propojí všechny tři metodické přístupy alespoň u jednoho ze studovaných rostlinných objektů. Celkově však musím konstatovat, že cíle vědecké přípravy byly v plném rozsahu splněny. Otázky a připomínky uvedené v mém posudku nemají v žádném případě zpochybňovat vysokou úroveň předkládané práce a kvalitních výsledků. V odpovědích na otázky by měla doktorandka ukázat způsobilost vést vědeckou diskusi o řešené problematice. Závěrem konstatuji, že Ing. Kubátová jednoznačně prokázala schopnost samostatně a tvořivě řešit aktuální problémy současné biologie, což dokládá i nadprůměrně vysoký počet publikací vzniklých v souvislosti s předkládanou disertační prací. Doporučuji proto přijetí její disertační práce k obhajobě.

V Olomouci dne 6. června 2008

Ing. Hana Šimková, CSc.

PhD Thesis Review: Application of different methodological approaches in plant population studies, by Barbora Kubátová

Reviewer: Steven Travis, PhD, Associate Professor, University of New England, Biddeford, ME, USA

As a general synthesis, this thesis stresses the usefulness of combining certain methodological approaches in plant population biology, as opposed to focusing on a particular system, process, or conceptual framework. In order to illustrate this methodological approach, three plant species are treated as model systems for investigations ranging from systematics and biogeography to clonal reproduction and invasiveness. One or more focused investigations are presented for each species, either in manuscript form or as published papers.

Overall, the synthesis presented at the beginning of the thesis is very thorough, and demonstrates an impressive depth of understanding on both the population biology of the focal species and the morphological, cytological, and molecular methods utilized in the various investigations. The papers and manuscripts presented are of sufficient quality for publication in peer-reviewed journals that are international in scope. Thus, **I accept the work presented in this thesis as being of sufficient depth and quality for the granting of the PhD degree, and consider it ready for defense.**

I have one major concern regarding this thesis, which pertains to the final investigation of *Phragmites australis* to be presented. In my opinion, this paper does not present a sufficient quantity of new data, nor does it present sufficiently novel findings, to warrant publication on its own. The first two *P. australis* papers to be presented in the thesis (Čurn et al. 2007 and Křiváčková-Suchá et al. 2007) demonstrated quite clearly that morphology does not accurately reflect clonal structure in the two lakes surveyed. The only substantial improvement of the final manuscript over the previous two involves the addition of SSR data, which allows a few additional clones to be distinguished. The cpDNA and FCM results presented in this manuscript do not provide any sort of discriminatory power, and the AFLP data simply provide a finer level of detail in assessing the relationships among clones, although there may be some serious issues with these data that have not been adequately considered (see below). I feel that this paper, or portions of it, should remain in the thesis, but I certainly question whether it warrants publication in a separate journal.

Specific comments related to each of the (unpublished) sections presented in this thesis appear below:

Background section on *Gymnadenia conopsea*:

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?

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?

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

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.

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.

Manuscript on *Gynnadenia conopsea*:

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.

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?

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

On what basis were taxa distinguished in the field?

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.

The number of plants that actually had their chromosomes counted should be stated in the Methods.

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?

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?

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.

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.

The second-to-last paragraph in the section on ploidy variation should be clear in its focus exclusively on *G. conopsea*. The last paragraph mostly rehashes issues discussed in the Introduction and never relates back to the current findings, and so could easily be omitted.

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

The final paragraph on chromosome counts should confirm the agreement between karyotyping and FCM activities.

Background section on *Phragmites australis*:

In section 1.3.2, in reference to the distribution of *P. australis*, its occurrence in America should be clarified as either North America, South America, North and South America, or simply the Americas. Also, at the end of the second paragraph it seems a bit redundant to say that *P. australis* occurs in all eastern states and then in the next sentence to state that it occurs in all states but Alaska and Hawaii.

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

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.

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.

Manuscript on *Phragmites australis*:

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.

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)).

It would seem appropriate to state in the RAPD Analyses section of your Results that these results have been reported elsewhere (i.e., Čurn et al. 2007).

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.

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.

There is really no reason to separate the AFLP results by primer combination in Fig. 2. A combined analysis would be more powerful and informative.

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.

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?

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?

Table 4 is never referenced in the text of the paper.

The first paragraph of the discussion would be more appropriate (in a shortened version) to the introduction, since it is not directly related, either explicitly or implicitly, to the results of the current study. The second paragraph is more appropriate to the discussion, but it too suffers from a lack of proper context. The discussion should focus on the current finds, their relationship with previous work, and how they add to our overall understanding of the topic at hand. As it stands, there is not the merest mention of the current findings in the results.

Background section on *Lythrum salicaria*:

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.

Methods in Plant Population Biology section:

Take care on page 45 not to confuse neutral molecular marker loci with functional genes, since marker-based studies rely mostly on the former.

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.

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.



Prof. RNDr. František Marec, CSc.

¹⁾ Biologické centrum AVČR, Entomologický ústav, Oddělení genetiky

²⁾ Přírodovědecká fakulta Jihočeské university v Českých Budějovicích
Branišovská 31, CZ-370 05 České Budějovice

Tel.: +420-387 775 250 (218, 249, 269); Fax: +420-385 310 354

e-mail: marec@entu.cas.cz <http://www.entu.cas.cz/>



OPONENTSKÝ POSUDEK

na doktorskou disertační práci Barbory Kubátové

Application of different methodological approaches in plant population studies

Předložená práce je založena na analýze variability populací rostlin průtokovou cytometrií a aplikací molekulárních markerů pro řešení taxonomických a populačně genetických otázek. Tyto moderní postupy jsou kombinovány s klasickou morfologickou analýzou rostlin.

Práce je členěna do 6 kapitol, z nichž první – Abstrakt – je psána česky, ostatní anglicky. Po krátkých kapitolách (český abstrakt, angl. souhrn a cíle práce) je čtenář v rozsáhlé úvodní kapitole 4 (67 stran) seznámen s charakteristikou studovaných druhů či druhových komplexů včetně současných znalostí jejich populační biologie. Dále se dozví důvody a motivaci autorky pro jejich studium. U druhového komplexu chráněné a ohrožené orchideje *Gymnadenia conopsea* (pětiprstka žežulík) byly hlavní motivací taxonomické problémy, naopak u dvou invazních mokřadních druhů, kypřeje vrbice *Lythrum salicaria* a rákosu *Phragmites australis*, problematika genetické struktury populací. V této kapitole jsou též detailně popsány použité metodické postupy a kriticky zhodnocen jejich potenciál k řešení výše uvedených otázek a problémů. Celá úvodní část je zpracována přehledně a čtivě a je cenným spisem pro každého, kdo by se chtěl podobnou problematikou zabývat u jiných druhů rostlin. Jako vědecký pracovník zahleděný do hmyzu a mající nepatrné znalosti o rostlinách musím vyzdvihnout srozumitelnost, jakým autorka tuto část sepsala. K této části práce mám následující dotazy.

(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 malém genomu, k-stratégové velké genomy. Je tomu tak i u rostlin? A jak je tomu u rostlin s variabilitou ve velikosti genome mezi či dokonce uvnitř populací? Lez i tam najít podobné korelace?

(2) K podkapitole 2.3.2.2. o dominantních DNA markerech (str. 47-48): jaké je využití AFLP markerů 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.

(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 kapitole 5 jsou shrnuty hlavní závěry jednotlivých studií, tj. závěry rukopisů a publikací uvedených v následující kapitole 6. Tyto závěry jsou sepsány netradičním, ale velmi přehledným způsobem. Autorka uvádí otázky, které si s kolektivem spoluautorů položila na počátku každé práce a ke každé otázce odpověď, získaná provedenými experimenty. Z těchto odpovědí vyplývá, že (i) autorka splnila vytčené cíle a že (ii) studie, které provedla či na kterých se podílela přinesly řadu originálních a cenných poznatků získaných z velkých a reprezentativních souborů dat.

Hlavní část disertace, kapitola 6, je souborem 2 rukopisů postoupených do tisku a 3 prací publikovaných v renomovaných mezinárodních časopisech. Vzhledem k tomu, že prošly či právě procházejí náročným oponentským řízením daleko kvalifikovanějších odborníků na danou problematiku než jsem já, omezím svoje vyjádření k publikacím pouze na některé doplňkové dotazy.

K publikaci 1. **Kubátová**, Trávníček, Čurn, Suda (2008) *Amer. J. Botany* (subm.).

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

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

(5) Vzorky 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 zkresleny těmito zásahy? A existují nějaká srovnávací data populací rákosu u rybníků před a po vypuštění?

K publikaci 3. Suchá, Vávřová, 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?

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?

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

(8) U výsledků měření obsahu DNA kypřeje vrvice, že hodnoty pro $3n$ a $4n$ rostliny odpovídají téměř přesně odpovídajícím násobkům 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“?

Závěr: Předložená disertační práce je minimálně v ČR průkopnickým dílem, které demonstruje přínos zavádění molekulárně-genetických a cytometrických metod pro řešení taxonomických, ekologických a populačně-biologických otázek a přináší nové obecné poznatky o genetické struktuře populací rostlin. Autorka prokázala velké tvůrčí schopnosti, které se projeví nejen ve formulaci výzkumných otázek, ale zejména v zavádění metodických postupů, s jejichž pomocí lze tyto otázky zodpovědět. Práce splňuje všechny požadavky kladené na doktorskou disertační práci a **doporučuji ji k obhajobě.**

František Marec

V Českých Budějovicích, 6. června 2008