

Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

PROTOKOL O OBHAJOBĚ DISERTAČNÍ PRÁCE DSP

Jméno studenta: Ing. Tereza KÁVOVÁ
Narozen(a): 17. 6. 1988 v Táboře
Studijní program: Biotechnologie
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
Forma studia: Prezenční
Školící pracoviště: KSPR ZF JU v Č. Budějovicích
Datum a místo konání zkoušky: 26. 4. 2019, ZF JU v Českých Budějovicích
Zkušební termín č.: 1.

Název disertační práce:

Populačně genetické aspekty rostlinných invazí: studie genetické a cytotypové variability u invazních a nativních populací *Phalaris arundinacea* L. a *Myriophyllum* sp.

Výsledek obhajoby:

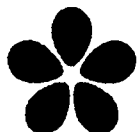
Prospěl (a)

Neprospěl (a)

Zkušební komise:

Podpis:

Předseda:	prof. Ing. Radovan Pokorný, Ph.D.; Mendelova univerz. v Brně, AF	
Členové:	doc. RNDr. Jana Řepková, CSc.; Masarykova univerzita v Brně, PřF	
	doc. Ing. František Hnilička, Ph.D.; ČZU v Praze, FAPPZ (oponent)	
	doc. Dr. Ing. Pavel Vejli; ČZU v Praze, FAPPZ (OPONENT)	
	Ing. Miroslav Klíma, Ph.D.; VÚRV Praha	
	Ing. Martin Žabka, Ph.D.; VÚRV Praha	OMUVE N
	prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích	
	prof. RNDr. Hana Čížková, CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích (oponent)	
Oponent:	prof. Mgr. Bohumil Mandák, Ph.D.; ČZU v Praze, FŽP	NENÍ ČLEMEM
Školitel:	prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.; ZF JU v Českých Budějovicích	



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

OBHAJOBA DISERTAČNÍ PRÁCE DSP PROTOKOL O HLASOVÁNÍ

Jméno studenta: Ing. Tereza KÁVOVÁ
Narozen(a): 17. 6. 1988 v Táboře

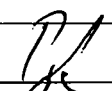
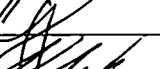
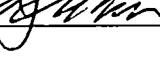
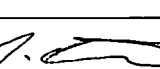
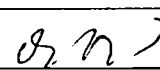
Studijní program: Biotechnologie
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
Forma studia: Prezenční

Výsledek hlasování:

Počet členů komise: 8 počet přítomných členů komise: 7
počet platných hlasů: 7 kladných: 7
záporných: 0
počet neplatných hlasů: 0

Zkušební komise:

Podpis:

Předseda:	prof. Ing. Radovan Pokorný, Ph.D.; Mendelova univerz. v Brně, AF	
Členové:	doc. RNDr. Jana Řepková, CSc.; Masarykova univerzita v Brně, PřF	
	doc. Ing. František Hnilička, Ph.D.; ČZU v Praze, FAPPZ (oponent)	
	doc. Dr. Ing. Pavel Vejř, ČZU v Praze, FAPPZ (OPONENT)	
	Ing. Miroslav Klíma, Ph.D.; VÚRV Praha	
	Ing. Martin Žabka, Ph.D.; VÚRV Praha	
	prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích	
	prof. RNDr. Hana Čížková, CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích (oponent)	

Otázky od oponentů- Prof. RNDr. Hana Čížková, CSc.

1)Veškerý popsáný výzkum byl proveden jako součást týmových projektů za spolupráce s renomovanými odborníky v ČR i v zahraničí. Z kvality disertace je zřejmé, že její autorka plně využila příležitost k vědeckému růstu, která se jí tak naskytla. Nicméně v disertacích tohoto typu se obvykle uvádí přehled činností, které disertant provedl sám, nebo na nichž se podílel. Prosím autorku, aby takový stručný přehled na obhajobě přednesla.

- AMVIS LH11039 „Srovnávací studie agresivních invazních amerických a původních agresivních a neagresivních evropských populací chřastice rákosovité (*Phalaris arundinacea*)“. - člen řešitelského týmu.
- LH - KONTAKT II 12099: Je polyploidizace spouštěcím mechanismem invazivního chování vodních rostlin? Příběh stolístků. - člen řešitelského týmu
- GAJU 109/2015/Z: Genetická a cytogenetická variabilita stolístku *Myriophyllum sibiricum*. Odlišují se populace v nativním a invazním areálu druhu?-Hlavní řešitel

Samostatné prezentace výzkumu na konferencích:

Kubátová, B., Trávníček, P., Prančl, J., Kávová, T., Hrdinová, M., Mandáková, T., Anderson, N. O., (2015) Is invasiveness of *Myriophyllum* L. (Haloragaceae) triggered by polyploidization? Ploidy Level Variation and Genome Size in the USA and Europe. SWS Annual Meeting 31.5-4.6, 2015, Providence, Rhodes Island, USA.

Kávová, T., Kubátová B. Trávníček, P. Prančl, J., Anderson, N.O. Ploidy Level Variation and Genome Size in genus *Myriophyllum*. PopBio, Halle/ Saale, Germany, 18-20.5.2017

Kávová, T., Kubátová B. Trávníček, P. Prančl, J., Anderson, N.O. Cytotype and molecular variability of *Myriophyllum* L. 2nd World Biotechnology Congress, Sao Paulo, Brazil, 4-5.12.2017

Účast na jiných projektech:

Čítek J., Večerek L., Hanusová L., Samková E., Hanuš O., Křížová Z., Kávová T., Jelínková I., Kala R. (2018): Genetické polymorfismy pro kvalitu kravského mléka. Certifikovaná metodika. ZF JU České Budějovice-certifikovaná metodika

Kávová T., Nix T., Tonka T., Čurn V. (2017): Identifikace viru šarky pomocí metody FISH. Úroda 12, roč. LXV, vědecká příloha, s. 311-313, ISSN 0139-6013

2)Na str. 38 se píše, že předmětem dalšího výzkumu by mohlo být objasnění původu čtyř sad planě rostoucích genotypů chřastice v USA, které mohou hypoteticky pocházet ze Severní Ameriky. Jaký metodologický postup by disertantka pro takovou studii zvolila?

Ideálně metodický postup založený na celogenomovém sekvenování, tedy přístup označovaný jako populační genomika. Prof. Anderson právě takovýto projekt začíná, a cílem je provést celogenomové sekvenování všech 1800 vzorků *Phalaris* z Minnesoty u nichž jsou k dispozici i fenotypová data z přesného pokusu, a posoudit rozsah genetické variability v rámci všech sledovaných populací na základě NGS dat.

Otázky od oponentů- Prof. Mgr. Bohumil Mandák, Ph.D.

1) Str. 20 – selekční tlak není způsoben genetickým driftem. Jak působí drift, jak selekce a jak hybridizace. Souvisí to spolu nějak?

Genetický drift - Sníží-li se výrazně velikost populace, začne se uplatňovat disperzivní proces, který mění frekvence alel v malých populacích nesystematickými, náhodnými procesy. Proces neúplného náhodného předání genů z jedné generace do druhé se nazývá náhodný posun (genetický drift). V malých populacích v důsledku náhodného výběru vzorku mezi gametami (chyba výběru) dochází ke změnám v četnosti alel (náhodnost evolučního procesu). Čím menší výběr, tím větší je jeho chyba.

Selekce (výběr) - Podstatou selekce je, že se na tvorbě nové generace podílí jen vybraná část rodičů (určité genotypy s žádoucím fenotypovým projevem - vyšší životnost, plodnost, adaptace, užitkovost), aby se rychleji rozmnožily žádoucí geny a nevýhodné geny byly eliminovány. Děje-li se tak působením přírodních faktorů, jedná se o přírodní selekci. Rozhoduje-li o výběru rodičů člověk, jedná se o selekci umělou. Lze rozlišit selekci pozitivní (výběr požadovaných jedinců) a negativní (vylučování nežádoucích jedinců).

Hybridizace – křížení, splynutí gamet dvou rodičovských jedinců, v případě, že jsou geneticky odlišní dochází cestou pohlavního rozmnožování k rozšíření genetické variability.

Souvislost – dostatečně velká populace – heterogenní, genetická variabilita se udržuje hybridizací „členů“ populace, je adaptabilní, tj. při změně podmínek může dojít k přeskupení poměru jednotlivých genotypů (selekce). Při fragmentaci populace a izolaci vzniklých metapopulací dochází ke genetickému driftu, může dojít k výraznému zúžení genetické variability a populace pak ztrácí adaptabilitu, snížení genetické variability může vést i k snížení vitality populace.

2) Str. 21 – rozeznáváme homoploidní a heteroploidní hybridizaci a autopolyploidní a allopolyploidní polyploidizaci. Allopolyploid nemusí mít nutně lichý počet chromosomů a problémy s párováním chromosomů mohou mít jinou příčinu. Jakou?

Při alopolyploidii dochází k zmnožení rozdílných chromozomových sad pocházejících od různých druhů po křížení rodičů. Zatímco u živočišných druhů dochází výhradně pouze k autopolyploidii, u rostlin nalezneme jak autopolyploidní, tak alopolyploidní druhy. Je známo, že polyploidie poskytuje rostlinným druhům větší variabilitu oproti diploidii, která jim umožňuje přizpůsobit se lépe a rychleji podmínkám vnějšího prostředí.

Problémy s párováním chromosomů u allopolyploidů jsou dané

- odlišným počtem chromozomu rodičovských druhů
- v případě stejného počtu pak jejich nehomologií
- nebo poruchami na úrovni regulace genové exprese („špatná komunikace“ mezi geny od obou rodičů)

U sterilního vzdáleného hybrida je možné obnovit fertilitu jeho polyploidizací a polyploidizace ve spojení s hybridizací má proto obrovský význam v evoluci vyšších rostlin, uvažuje se že až 70% kryptosemenných rostlin jsou kryptopolyploidi.

3) Str. 21 – Ellstrand & Schierenbeck (2000) skutečně uvažují o tom, že hybridizace může mít významný dopad na invazní úspěšnost. Nicméně jejich představa je trochu jiná než uvádí autorka práce. Proč je v tomto případě vnitrodruhová hybridizace tak důležitá? Co se vlastně s čím kombinuje tak, aby v sekundárním areálu došlo ke vzniku invazních genotypů? Proč ty samé genotypy nemohou vznikat v areálu původním?

U Ellstrand & Schierenbeck (2000) je dle mého nejdůležitější domněnkou, že ke vzniku úspěšných populací invazních rostlin je potřeba určitý čas a opakované introdukce nepůvodních rostlin – nutný předpoklad pro tvorbu hybridních populací. Ve svém výzkumu poukazují na jev, kde hybridizace předcházela invaznímu chování. Domnívají se, že určité výhody invazním rostlinám poskytuje skutečnost, že neinvestují tolik energie do tvorby trvalých pletiv, nýbrž do pletiv zajišťujících rozmnožování, a že mají více času se stabilizovat než jednoleté rostliny. Více než polovina invazních druhů pocházela z jednoho nebo dvou pro danou lokalitu nepůvodních rodičovských druhů.

4) Str. 24–27 – uvedené molekulární techniky jsou opravdu jen ty základní. Škoda, že autorka nezmínila význam NGS technik pro analýzu populačně genetické struktury invazních rostlin. Jaké modernější než ISSR genetické techniky by autorka navrhovala použít, pokud by začínala pracovat na disertační práci nyní. Jaké mají tyto moderní techniky omezení a jaké výhody, a proč se v současnosti opouští od analýzy populační struktury pomocí technik jako např. RAPD, ISSR či AFLP?

NGS techniky a komparativní genomika (populační genomika) je moderním trendem, který se začíná objevovat i ve studiu invazních rostlin. Tento trend je dán rozvojem sekvenačních technik a jejich zlevněním. Omezení NGS technik může být dáno např. obtížností sekvenování daného druhu „de novo“, ale např. kombinace přístupů Nanopore a Illumina sekvenování mohou tyto problémy překonat.

RAPD/ISSR/AFLP- nestabilita , nízká opakovatelnost a reprodukovatelnost analýz, rovněž rozdíly ve spektrech markerů v závislosti na izolovaném pletivu a podmínkách kultivace. Náročnost technik, možná chyba v lidském faktoru, nižší počet markerů, vyšší cena za marker.

Phalaris arundinacea

5) V případě sběru populací *Phalaris arundinacea* mi není jasné, jak se dají v terénu poznat původní a nepůvodní genotypy. Pokud chce autorka determinovat např. míru introgrese nepůvodních nebo kultivovaných populací do populací původních, jak ví, že skutečně pracuje s čistou populací, kterou pak může porovnávat s populacemi, které byly pod nějakým vlivem zavlečených, nepůvodních, jedinců.

Vycházelo se s dat kolegů z Univ. Minnesota – v rámci jejich předchozích studií byly v oblasti indiánských rezervací v severní Minnesotě nalezeny izolované populace *Phalaris arundinacea*

označené jako původní severoamerické populace. Tyto populace mají i odlišný „fenotyp“ , nevytváří masivní monokulturní porosty, tak jako populace označované jako invazní – populace šířící se podél řek, silnic, zarůstající mokřady – opět tyto populace byly natipovány americkými kolegy. Populace z ČR jsou považovány za nativní. Pěstované genotypy – zahradní, pícninářské kultivary a genotypy používané pro ČOV byly získány od šlechtitelů či genových bank.

Myriophyllum sp.

6) Jak si autorka vysvětluje rozdílné velikosti genomů stejných druhů v Severní Americe a v Evropě? Liší se tyto jedinci morfologicky?

Geografická izolovanost je jednou z hlavních příčin vzniku nových taxonů, takže je to samozřejmě i jeden z faktorů, který po určité době může vést k rozdílné velikosti genomu.

U zmíněných druhů jsme žádné morfologické rozdíly nepozorovali. Je ale třeba uvážit, že jde o rostliny, které mají značnou fenotypovou plasticitu a za druhé některé klíčové znaky nejsou vždy k dispozici (hlavně květy a plody). Na morfometrice pracujeme.

7) Práce týkající se rodu *Myriophyllum* sp. je založena na obrovském množství sesbíraných a analyzovaných rostlin. Je škoda, že nebyla doposud opublikována, protože výsledky jsou velmi zajímavé a kvalitní. Mohla by autorka pohovořit o celkovém taxonomickém konceptu rodu ve světle zjištěných výsledků?

Ohledně taxonomického konceptu. Toto je věc, kterou se chystáme udělat až "nakonec" - po tom, co budeme mít reprezentativní počet jedinců, které zpracujeme cytometricky, geneticky, morfometricky. Dosud neznámou a nepopsanou diverzitu jsme zachytili a chystáme se jí opublikovat.

Pokud se ptáte na celkové členění rodu na podrody, sekce apod. ráda bych poukázala na publikovanou fylogenezi *Myriophyllum* L. (Moody & Les 2007). Naše výsledky na této fylogenezi až tolik nezmění, i proto, že úplně největší diverzita stolístků je v Austrálii a za druhé, že tato studie zahrnuje téměř všechny druhy tohoto rodu.

Otázky od oponentů- doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

1) Které mokřadní rostliny se vysazují jako medonosné a mají schopnost se stát invazními – strana 18?

Mezi medonosné rostliny, které mají schopnost stát se invazními bych zařadila:

Křídlatka japonská, křídlatka sachalinská

Topoly

Kyprej vrbice

2) Můžete blíže charakterizovat, o jaké útočníky se jedná, mezi kterými existuje synergické interakce – strana 16?

Jedná se pouze o hypotézu, kdy uvažuji nad určitou kooperací invazních druhů, která může vést k rychlejší adaptaci zavlečeného druhu, či zvýšení efektivnosti. Touto synergií mohou organismy docílit např. prostoru pro expanzi, vymizení jiného druhu, který jim bránil v expanzi.

3) Na straně 19 definujete populaci a uvádíte, že jedinci populace mimo jiné pocházejí ze společného předka. Můžete toto tvrzení blíže specifikovat?

Toto tvrzení jsem nezvolila šťastně a nepovažovala bych ho za definici populace. Samozřejmě, že populace může vzniknout ze dvou jedinců a tudíž následující generace budou mít společného předka, ale nepovažovala bych to za pravidlo. „Populace je soubor všech jedinců stejného druhu, kteří ve stejném čase existují na stejném místě a navzájem si vyměňují genetickou informaci. Dále uvažujeme, že jedinci se mezi sebou mohou volně křížit”

4) Na straně 19 uvádíte, že mutace vytváří tok genů. Jakým způsobem?

Chápala jsem problematiku toku genů, pohybu genů mezi populacemi, jako evoluční proces, který přináší potencionálně nové alely do populace a tímto charakterem je tento jev obdobný mutaci.

5) Jaký je nejběžnější český ekvivalent anglického termínu „bottleneck effect“?

Efekt hrdla lahve. Dochází k němu při prudkém poklesu počtu jedinců v populaci. Při tomto nečekaném zúžení populace dojde k poklesu gen. diverzity.

6) Jak si představuje míchání populací – strana 19?

Uvádím zde “.....kdy potenciálně úspěšný genetický materiál vzniká nejčastěji smícháním odlišných zdrojových populací, mezidruhovým, či vnitrodruhovým křížením a právě tento pooling vede k vyššímu stupni diverzity.” Za míchání populací si představuji proces, kdy se smíchají dvě geneticky odlišné populace, např. překonají geografické bariéry, a následná mezidruhová, či vnitrodruhová hybridizace může poskytnout žádoucí genetický materiál.

7) Na straně 19 uvádíte dvě protichůdné informace. Nejprve tvrdíte, že rekombinace a křížení jedinců vedou k zvyšování genetické diverzity. Následně pak uvádíte, že toto křížení může vést k homogenizacím. Můžete prosím tato protichůdná tvrzení objasnit?

Ano uvádím, protože tyto situace, dle mého, mohou nastat. Tak jako může nastat obohacení genetické variability, tak může nastat případ, kdy dojde k homogenizaci geograficky oddělených populací.

8) Uveďte prosím, jakým mechanismem genetický drift a hybridizace způsobují selekční tlak – strana 20. Vysvětluji již u prof. Mandáka

9) Na straně 21 zmiňuje problémy se segregací chromozómů do gamet u vzdálených hybridů a uvádíte, že hybrid tento problém řeší zdvojením chromozomové sádky. Skutečně si hybridní jedinec může sám cíleně zdvojit počet chromozómů s cílem stát se fertilním?

Cíleně tento proces navozuje šlechtitel např. při vzdálené hybridizaci a polyploidizaci vzniklých sterilních hybridů. V přírodě může po vzdálené hybridizaci dojít k spontánní „polyploidizaci“ – tvorbou neredukovaných gamet a splnutím těchto neredukovaných gamet.

10) Jak si vysvětlujete vyšší zastoupení apomixie u polyploidních druhů – strana 22?

Při apomixii se rostlina rozmnožuje, aniž by došlo ke splnutí gamet, takže pohlavní proces zcela či do značné míry vymizí. U hybridních polyploidů je poměrně velké riziko, že budou mít sníženou fertilitu, takový druh by za normálních okolností neměl šanci tvořit semena. Apomixie je tudíž způsob, jak i za takových podmínek tvořit semena (mechanismus, který jim pomůže se rozšířit, než by zanikli, protože je zde šance, že např. polyploidní rostlina v moři diploidních rostlin se nemá s kým rozmnožovat; tak volí tuto cestu- např. ješťábník, ostružiník).

11) Na straně 23 uvádíte, že pro studium diverzity jsou využívány zejména DNA polymorfismy. Pokuste se charakterizovat metodický postup hodnocení diverzity na úrovni RNA.

Zvolila bych metodu sekvenování transkriptomu – např. přístup RNA-seq. Při této metodě se místo kompletního genomu zjišťuje sekvence pouze aktivních genů, tedy genů, které jsou v buňkách v danou chvíli přepisovány do mediátorové RNA (mRNA) a překládány do proteinů. Výhoda sekvenace transkriptomů oproti celým genomům spočívá v získání sekvencí genů bez balastní (nepotřebné) nekódující části genomové DNA.

12) Na stranách 25 a 26 charakterizujete polymorfismy jaderné rDNA. Co znamená, že tyto oblasti genomu podléhají koncertované evoluci? Proč lze markery lokalizované v oblasti rDNA použít i u relativně starého biologického materiálu, jako jsou herbářové položky uvedené na straně 26?

Ribozomální jaderná DNA (nrDNA) je v genomu v několika stovkách až tisících kopiích v několika lokusech. Základní stavební jednotka nrDNA je úsek ITS nesoucí geny pro ribozomální DNA. Ribozomální DNA se na potomstvo přenáší biparentálně, tedy potomek nese kopie obou rodičů, které se mohou lišit, což komplikuje fylogenetické analýzy. Nicméně je známo, že tyto kopie se v rámci jedince postupem času homogenizují do jedné sekvence. Tento jev se nazývá koncertovaná evoluce (Elder et Turner, 1995). U hybridních taxonů, kde ještě nedošlo k úplné homogenizaci tohoto úseku je možné (např. pomocí rozklonování) zjistit obě rodičovské varianty sekvence a tím tvořit hypotézy o možných rodičích. Vzhledem k variabilitě tohoto úseku je ITS vhodný především pro studium na mezidruhové a mezirodové úrovni (Krak, 2011). DNA je u herbářových položek často degradovaná (stářím, nevhodným skladováním, použitými postupy konzervace), můžeme ale izolovat a amplifikovat vysoce repetitivní regiony jako je např. rDNA nebo organelové genomy.

13) DNA barcoding je u řady biologických druhů založen na druhově specifických sekvencích mtCox1 genu. V čem spočívají výhody a nevýhody tohoto systému při studiu variability populací?

Mitochondriální DNA se vyznačuje především maternální dědičností a na jejím základě lze určovat např. migrace populací, předky. Nevýhody jsou, že jakmile se v mtDNA objeví mutace, je předávána dál v linii.

14) Dovolím si tvrdit, že v roce 2019 jsou techniky celogenomických sekvenací považovány za běžný nástroj pro hodnocení genomů různých organismů. Proto mě připadá zcela nedostatečné, že tyto typy analýz jsou v literární rešerši zmíněny pouze jedním slovem. Můžete prosím uvést, které techniky NGS jsou používány nebo které by byly vhodné pro hodnocení genomů invazních rostlin?

Sekvenování další generace je vynikající nástroj, který umožňuje sekvenovat buď celý genom, nebo jeho části, které jsou v dané chvíli předmětem studia. Tyto metody umožňují především rychlou a cenově příznivou produkci velkého množství osekvenovaných vzorků najednou. Využívá se principu paralelizace procesu sekvenování, kdy dochází k sekvenování tisíců až milionů sekvencí současně. Nevýhodou však je krátká maximální délka výsledných sekvencí (100-500bází/Sangerova metoda až 1000 bází). Všechny tyto metody se dají využít k vyhledávání mutací, SNP(vyhledávání všech alel daného genu), genotypizaci a mnoho dalšího.

- 454 sekvenování, Ion Torrent, Illumina, SOLiD/ PacBio-SMRT, Nanopore

15) Na straně 38 předpokládáte simulaci stejných podmínek v okolí českých a amerických řek. Byly podmínky skutečně stejné? Jak byla například ověřena shoda půdních a klimatických podmínek?

Simulace podmínek byla myšlena tak, že všechny pěstované rostliny v nádobovém pokusu měly stejné podmínky.

16) Jaké jsou předpoklady pro použití metod ANOVA a GLM při hodnocení variability kvantitativních znaků. Jak byly tyto předpoklady ve Vaší disertační práci hodnoceny a s jakým výsledkem – strana 40?

Jednorozměrná analýza rozptylu (ANOVA) - model analýzy rozptylu je speciálním případem obecného lineárního modelu (GLM). Předpoklady pro použití metody ANOVA: 1. Nezávislé výběry (skupiny) 2. Normální rozdělení dat 3. Homogenní rozptyly uvnitř skupin. Ověření předpokladů: testy normality, test homogenity rozptylů (Bartlettův test, Bartlett-Boxův test). Statistika byla prováděna kolegou Michaelem F. Nelsonem z Univ. Minnesota a já jsem dodala primární data a Michael poskytl zpracované statistiky.

17) Jakým způsobem byly čerstvé rostliny stolítku z celé Evropy odeslány do laboratoře průtokové cytometrie AV ČR v Průhonicích – strany 83 a 84?

Ze sběrů z USA byly rostliny posílány do laboratoře pomocí služby Fedex, stejně tak tomu bylo i u rostlin z VB (zabalené do vlhkého papíru v zipových sáčkách). U sběru ze Skandinávie byly rostliny uchovávány v mobilní lednici, kdy předtím byly řádně očištěny a označeny. Po návratu se z cest, byly okamžitě analyzovány v laboratoři průtokové cytometrie.

18) Jaké byly přibližné cenové náklady na stanovení ploidie u 2650 jedinců rodu *Myriophyllum*?

Cena cytometrické analýzy je v řádu korun za analýzu/ na vzorek. Pokud do ceny nepromítáme pořizovací cenu přístroje.

19) Vysvětlíte prosím termín oktoloidní karyotyp uvedený na straně 94.

Na straně 94 hovořím o stanovení celkem 5 ploidních úrovní-diploidní, tetraploidní, hexaploidní, oktoploidní a nonaploidní. Došlo zde k překlepu. Omlouvám se.

20) Jak dlouho trvala extrakce genomické DNA metodou CTAB u přibližných 6000 vzorků uvedených na straně 96?

6000 vzorků bylo sesbíráno. U každé populace, byly vytipovány 3-4 jedinci, u kterých probíhala samotná extrakce. V současné době je vyextrahováno přes 2500 vzorků a hrubým odhadem to po každém sběru trvalo dva až tři měsíce danou sadu vyextrahovat.

21) V současné době je standardní získané sekvence, které jsou zmiňovány ve vědeckých i disertačních pracích zveřejnit například pomocí databáze NCBI s cílem předložení věrohodných výsledků. Kde byly zveřejněny Vaše výsledky sekvenačních analýz rDNA oblastí či úseků chloroplastového genomu – strana 96?

Nebyly zveřejněny, ke zveřejnění v databázi NCBI dojde.

22) Jaké typy mutací byly charakteristické pro oblasti rDNA? Vzhledem k rozsahu analyzovaných druhů a populací lze předpokládat i výskyt inzerčně-delečních polymorfismů. Jakým způsobem jste vyřešila vyhodnocení těchto polymorfismů při přímé amplikonové sekvenaci?

Nacházel se zde bodový polymorfismus-substituce, inserce, delece jednotlivých bází

U druhu *M. aquaticum* se objevila delece 10 nukleotidů, která byla pro tento druh specifická. Sekvenanční data byla zpracována v programu Geneious, kde byl proveden alignment sekvencí a zde jsem hodnotila kvalitu sekvenace a její vyhodnocení.

Použili jsme postup již dříve využitý pro hodnocení rDNA a cpDNA sekvencí *Phalaris*, *Lythrum*, *Phragmites* a *Gymnadenia*.

23) Na straně 96 se zmiňujete o neexistujícím fylogenetickém stromu – obrázek 12. Jakým způsobem jste ošetřila možné prostorové konformace rRNA, které vznikají transkripcí rDNA regionu? Jakým způsobem bylo provedeno zakořenění stromu? Jaký genotyp byl použit jako „outgroup“?

Možné prostorové konformace v tomto případě nebyly ošetřeny, byla porovnávána pouze sekvenční shoda, pro porovnání struktury rRNA by bylo možné použít např. programu MFOLD. Jako outgroup jsme vybírali stolítkům nejpodobnější taxon a zvolili jsme *Haloragis erecta*.

24) Závěr práce by měl obsahovat jasné odpovědi, které vědecké hypotézy byly potvrzeny či vyvráceny. Tyto závěry by měly být náležitě statisticky potvrzeny. Můžete prosím stručně charakterizovat hodnocení jednotlivých vědeckých hypotéz včetně statistických důkazů?

- Zhodnocení genetické variability komerčních a okrasných kultivarů a původních populací chrastice rákosovité. Rozsah genetické variability u vzorků z Minnesoty (kultivarů i vzorků z invazních populací a extenzivních ploch) je o cca 10% nižší než-li je tomu u českého materiálu.
- Posoudit vhodnost technik ISSR markerů pro odlišení komerčních kultivarů a rostlin z invazních a nativních populací. Ano, je možné využít molekulární analýzu/markery pro hodnocení rozsahu genetické variability? Ano, je možné využít molekulárních markerů. Tyto výsledky byly publikované v obou pracech, týkajících se *Phalaris arundinacea*.
- Liší se nativní a invazní populace stolítků velikostí genomu a úrovní cytotypové variability? Velikost genomu (2C) se pohybovala v rozmezí od 0,41 pg u diploidního *M. humile* ($2n = 14$) do 2,66 pg u nonaploidního *M. sibiricum* ($2n = 63$). Cytotypová

heterogenita byla zjištěna u 4 populací. U všech druhů, zařazených do datasetu, byl určen ploidní stupeň, který byl ověřen karyologicky.

- Je v invazních populacích menší rozsah genetické variability v důsledku „efektu zakladatele“? Je patrné, že rozsah genetické variability u severoamerických populací je výrazně nižší než u populací z Evropy/ČR.
- Stanovit velikost genomu a ploidní úroveň v populacích stolítku pomocí metody průtokové cytometrie. Ano, tento cíl byl splněn, byla optimalizována metoda FCM pro zjištění velikosti genomu a výskytu cytotypů u stolítků.
- Provést analýzu molekulárních markerů a vyhodnotit rozsah genetické variability ve sledovaných populacích chrastice a stolítku. Ano, tento cíl byl splněn -byly provedeny analýzy molekulárních markerů u obou modelových rostlin.

Prosím doktorandku, aby se vyjádřila, jaký byl její podíl (%) na následujících metodických postupech a získaných výsledcích:

- Odběr vzorků- *Phalaris* v terénu 50%, práce v BÚ Třeboň téměř 80%, *Myriophyllum* v terénu- 70%
- Izolace DNA-70%, Cytometrické analýzy 70%
- Optimalizace amplifikace vybraných jaderných a mitochondriálních markerů-50%
- SSR a ISSR analýzy- SSR analýzy 50%, ISSR analýzy 80%
- SSR genotypování-20%
- Příprava vzorků pro sekvenační analýzy-100%
- Korekce a editace získaných sekvencí-40%
- Hodnocení variability vybraných znaků-30%
- Statistické hodnocení molekulárních dat z hlediska populační genetiky-40%
- Statistické hodnocení kvantitativních znaků použitých pro deskripci vzorků-20%
- Fylogenetické analýzy-30%

Zápis z průběhu obhajob doktorských disertačních prací – OR Zemědělské biotechnologie

Tereza Kávová

26.4.2019

Zahájení – prof. Pokorný, představení komise a disertantky, CV, publikace, granty

T. Kávová – prezentace výsledků disertační práce

posudky oponentů:

1. prof. Čížková
2. doc. Vejl
3. prof. Mandák

odpovědi na posudky oponentů:

prof. Čížková – otázky a dotazy oponentky zodpovězeny, oponentka uvedla, že by výsledky měly být publikovány v dalších pracích

doc. Vejl – zodpovězeno, formální připomínka k počtu publikací uvedených v disertaci a formální úpravě českých komentů – bude opraveno v podobě opravného listu

prof. Mandák – dotazy zodpovězeny

vědecká rozprava:

prof. Pokorný – osvětlíte termíny imigrace, emigrace

doc. Vejl – výhody a nevýhody NGS, metodický postup

doc. Vejl – lze zjistit výsledky NGS sekvenování – v případě ještě nepublikovaných a neanotovaných genomů

doc. Vejl – co to je ITS, co to je koncertovaná evoluce

doc. Vejl – co je prvním krokem při fylogenetické analýze, lze analýzu provádět nejen podle sekvence ale i podle struktury RNA?

doc. Vejl – jak se identifikovaly haplotypy? heterozygoti?

Doc. Vejl – znáte mokřadní ptáky?

DOC. Řepková – prováděla se FISH analýza?

prof. Čížková – kde je uložena bionaka sběrů

prof. Čítek – byla sledována závislost velikosti genomu na severojižním gradientu?

doc. Vejl – výhody metody CTAB

Ing. Klíma – proč mokřady řadíme mezi biotopy náchylné k invazi?

disertantka zodpověděla na všechny dotazy, členové komise i oponenti vyslovili souhlas s úrovní odpovědí, do disertace bude vložen opravný list – opraveny formální chyby a doplněn souhlas od spoluautorů a řešitelů projektu s publikováním dat a uvedením podílu vlastní práce

prof. Pokorný – zhodnocení průběhu obhajoby, hlasování