

Review of the master degree thesis entitled „Germination Ecology in Orchids“

submitted by **Tamara Malinová, Bc.**, Faculty of Science, University of South Bohemia,
České Budějovice, Czech Republic.
(under supervision by Dr. J. Jersáková and Prof. M.-A. Selosse)

The reviewed study, being focused on initial life stages of *Epipactis* spp. plants, represents excellent insight into the very early phases of protocorm development and colonization by mycorrhizal as well as saprotrophic and possibly pathogenic fungi. The author had to accumulate, read and understand considerable volume of the literature, which is obvious from both main parts of the thesis.

The first part is a manuscript, probably prepared for publication, the second is a reprint of the article already published in the *New Phytologist*. Such an excellent output is very uncommon as a part of the master thesis. Since the second part, as being published in prestigious international journal, leaves almost no room for criticism, I only can present comments to it and rather concentrate my effort to the first part.

The first part summarizes the results of extensive outdoor observations on factors affecting germination of tiny orchid seeds. This work relies upon to analysis of DNA extracted from roots and protocorms and identification of fungal species/taxa colonizing these structures is performed using sequencing and comparing the data with existing sequences of determined fungi. This is modern and advanced approach.

One point in the description of storage of plant material is strange. It is stated (part I, pg. 8) that: „*Both the mycorrhizal seedlings and root pieces were stored for transportation reasons in 55% ethanol up to 3 weeks, before recovering them for molecular analyses.*“. I would be precautious in using this method of sample storage since ethanol precipitates various components of cytoplasm, often forming insoluble particles which may trap DNA and prevent its successful extraction. Moreover, some undesirable specificity may be introduced into the extraction procedure when ethanol is used as storage protectant, favorizing extraction from some organisms. I would prefer storage of intact samples at -20 °C.

As one can learn from the title of the Part I, the ambition of this work was to observe a coherence between adult orchid plants habitat preferences and habitat soil conditions necessary for seed germination as well as protocorm development. There are many soil parameters which can affect seed germination and the presence of suitable symbiotic fungi may be very important one as it is suggested by some authors cited in the thesis - various components of soil microflora can trigger the germination but only some of them support protocorm development.

Unfortunately, this crucial hypothesis could not be verified at the studied localities since „*the groups (of seed pakets) were placed randomly within a study site, but always near an adult Epipactis plant*“ (Part I, pg. 5), leaving habitat space distant from orchid plants out of the scope of interest. If the seeds would be germinated also in spaces not colonized by orchid plants, the effects of habitat character could be partially separated from the effects of orchid mycobionts. In the light of the presented results (association of *Epipactis* species with particular tree species dominating the habitat, Fig. 2A), this approach could be very interesting.

In general, the results of the study are correctly presented and discussed.

The author is trying to avoid the use of the term “orchideoid mycorrhizal symbiosis” as specific mode of coexistence of fungi and orchidaceous plants. Why? This term is well

defined and supported by morphology and physiology of the association. Many fungal taxa detected by the author may be orchideoid mycorrhizal fungi.

Even though it is not expressed explicitly, the work tends to break persistent mycological dogma which dictates basidiomycota as the only group of fungi forming orchideoid mycorrhizal symbiosis. This might be mentioned in Discussion. As seen in Table 4, ascomycota belonging mainly to ectomycorrhizal genera *Tuber* and *Genea* are frequently detected in protocorms and adult plants. The presence of *Tuber* and *Genea* spp. in very small protocorms strongly supports their orchideoid mycorrhizal status. However, the mycorrhizal status of these fungi in orchideoid mycorrhizal symbiosis must be verified in an inoculation experiment at best. Until their ability to form the structures typical for orchideoid mycorrhizal symbiosis (hyphal pelotons with characteristic senescence cycle) is not confirmed, they have to be taken as "putative" symbionts. This my attitude is reasoned by the ability of e. g. *Tuber* spp. to colonize the roots of non-host plants and act as parasites.

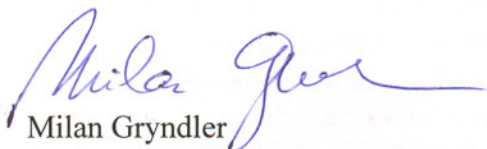
I cannot agree with the statement "... *sampling of 50 clones, which is supposed to be sufficient for detection of complete fungal spectrum in environmental soil samples ...*" (pg. 18, 2nd paragraph, 2nd sentence), which is really far from the reality. The sampling intensity, necessary to cover e. g. 90% of ectomycorrhizal fungal species present at a locality always depends on the degree of dominance in the community and may reach several thousands of detections.

Figure 2A (pg. 11) presents ordination plot of the linear discriminant analysis. This method is not mentioned in Materials and Methods.

Table 4 (pg. 15) does not contain the data from the site P2. Why?

The second part of the thesis summarizes the ecological consequences of orchid seed dispersal, the role of fungal symbionts being mentioned as one of the factors constituting "safe sites" for orchid recruitment. It has been published as a "commentary" in the "Forum" section of the New Phytologist and represents a short review of the literature. This article is compatible with the first part of the thesis.

In conclusion, I found the submitted master degree thesis as very interesting and innovative, confirming the scientific capabilities of the author. **I can propose to classify it as excellent (klasifikační stupeň výborně).**



Milan Gryndler
Institute of Microbiology ASCR, v.v.i.
Václavská 1083
142 20, Prague 4
Czech Republic

Prague, 15. 01. 2009

Oponentský posudek na magisterskou práci

Tamara Malinová

Germination ecology in orchids

Magisterská práce Tamary Malinové je psána ve (velmi dobré) angličtině a skládá se ze dvou částí. První část je klasický, do tisku připravený článek, druhá část je již publikovaný článek z časopisu *New Phytologist*, kde prvním autorem je školitelka, druhým Tamara Malinová.

Práce má vysokou úroveň. Sama publikace v prestižním *New Phytologist* je toho důkazem, ale i o prvním článku (který je jádrem magisterské práce) předpokládám, že bude přijat do tisku ve velmi slušném časopise, předpokládám, že autoři plánují nabídnout článek také do *New Phytologist* (je to tak?). Práce má vysokou formální úroveň, je psaná dobrým jazykem a velmi srozumitelně, má dobrou formální úroveň, včetně správně citované literatury.

První část je jádrem celé práce, a prezentuje výsledky velmi zajímavého experimentu, studujícího klíčení druhů rodu *Epipactis* v různých lokalitách. Dokazuje autorčinu schopnost experimentálně pracovat v různých oborech (od terénních experimentů po molekulární laboratoř, i relativně složitě statistické zpracování dat). K této části mám následující dotazy a připomínky (na připomínky psané kurzívou nevyžadují odpověď).

Analýza snímků z národní fytoecologické databáze. Počty snímků obsahujících jednotlivé druhy r. *Epipactis* jsou překvapivě nízké. Předpokládám, že to nejsou všechny snímky s danými druhy z databáze. Jak byly snímky vybrány?

Str. 10 Asi bych kontrastům, tak jak byly počítány, neřikal post-hoc. Já bych je interpretoval jako plánované kontrasty.

Obrázek 2, str. 11: Myslel jsem, že LDA se počítá v CANOCO programu jako CCA, kde odpovědi jsou „dummy variables“, označující jednotlivé kategorie. Takže vlastně pro obrázky 2A, B je použita stejná metoda. Proč se jednou nazývá LDA, a jednou CCA. Nebo je tam nějaký rozdíl, kterého jsem si nevšiml?

ANOVA na str. 12 – prosím o vysvětlení – vztahuje se k poslednímu odběru? Je to jednocestná ANOVA, nebo i nějak odráží vliv lokality? Po srovnání se str. 13 a ANOVami tam si myslím, že to byla dvoucestná ANOVA. Možná by bylo přehlednější dát výsledky společně do jedné malé tabulky. Mě by pak zajímala i interakce (nějak „ošetřená“, abych za nulový model mohl považovat multiplikativitu, ne aditivitu).

Str. 14 a jinde. Preferoval bych notaci typu $F_{1,36} = 1.36$. $P=0.29$ (nikoliv $P<0.29$), at' už u ANOVy, nebo u permutačních testů v případech, kde se jedná přímo o hodnotu P . $P<$ něco se obvykle píše v případě průkazných výsledků, a ono něco bývá 0,05, nebo 0,01, případně nějaká velmi malá hodnota u vysoce průkazných testů

Str. 16 – neprůkazné výsledky permutačních testů. Zvlášť v prvním případě (semenáče *E. atrorubens* a *E. Helleborine*), by bylo dobré vědět, kolik bylo vlastně vzorků, a jestli byly

užity permutace uvnitř bloků (tedy design based, které dávají slabší test), nebo model based. Takhle nízká hodnota P říká, že by člověk měl být při interpretaci neprůkaznosti opatrný, zvláště pokud byl počet vzorků malý. Podobně, v porovnání hub u semenáčů a dospělých rostlin (poslední odstavec výsledků) – řada rodů je jen u jednoho z vývojových stádií, ale výsledky jsou neprůkazné. Proč?

Str. 17 “We did not detect any common rule...” – je to sice pravda, ale zní to tak trochu, jako že jsme nenašli nic, a může to mít špatný vliv na recenzenty v časopise. Já raději píšu, že vztah byl “idiosyncratic”, což znamená totéž, ale recenzenti to lépe snášejí.

Str. 17. – Pokud se uvažuje o možné “inbreeding depression”, pak by bylo užitečné znát, jak velké byly zdrojové populace semen.

Několikrát zmiňovaná úzká specializace *E. atrorubens*. – Podle mých zkušeností nemá druh tak úzkou niku, potřebuje světlo a nějaké vápno, jinak se najde leckde. Znam ho např. i z tzv. Cíňáku na hřebenech Krušných hor, v místě zbořeniště bývalé nacistické továrny z druhé světové války, kde se zřejmě trochu vápna na zbořeništi našlo, v okolí je převážně smrkový les, ale rostlina sama byla na světlém místě ve zbořeništi. Myslím, že podobné údaje jsou i z jižních Čech. Pokud se pamatuji z Alp, tak nepotřebuje ani les, najde se na vápencových skalách – pokud les, tak velmi řídký. Proto je v ordinačním diagramu vázán na borovici, která je vždy řídká, ale myslím, že by byl i v řadě snímků bez stromového patra. Na druhou stranu je pravda, že ekologická valence *E. helleborine* je ještě širší.

Druhá studie je publikovaným článkem v *New Phytologist*, příspěvkem který byl publikován v části FORUM, a je diskusním příspěvkem spojeným s „mini-review“. Přestože se jedná o článek relativně krátký, považuji jej za důkaz schopnosti „dělat vědu“ – tj. zasazovat experimentální výsledky, ať už vlastní, nebo přejaté, do širších souvislostí, a diskutovat s ostatními autory studujícími danou problematiku.

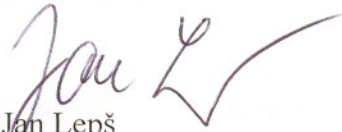
K této části mám připomínky:

orig. str. 238 – Kolik je mediánová vzdálenost. Víím, že pouze citujete cizí zdroj (4-7 m), nicméně podle mého názoru je problém všech podobných studií, že nejsou známa (v podstatě nelze zjistit) individua mimo lokalitu, popř. ve velkých vzdálenostech od lokality. Domnívám se, že u orchidejí takových individuí může být relativně hodně. Jaký je názor autorky?

Fig. 2b – uvítal bych měřítko k obrázku.

Podle mého názoru práce dokazuje vědecké schopnosti autorky, které se předpokládají spíše v PhD, než v magisterském stupni. Zvláště oceňuji kvalitně připravený experimentální článek do tisku, i publikovaný diskusní příspěvek. Práci jednoznačně doporučuji k obhajobě, a hodnotím známkou výborně.

V Českých Budějovicích, 17.1.2009


Jan Lepš