



Charles University, Prague

Faculty of Science

Albertov 6, 128 43 PRAHA 2

IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208

Department of Botany

Benátská 2, 128 01 PRAHA 2

tel. 2 2195 1646

fax 2 2195 1645

e-mail botanika@natur.cuni.cz

<http://www.natur.cuni.cz/~botanika>

Posudek na disertační práci Ester Ekrtové

Předložená disertační práce se skládá z 5 článků, z nichž 3 články jsou přijaty do mezinárodních impaktových časopisů, jeden do lokálního časopisu *Silva Gabreta* a jeden je rukopis pro české periodikum. Formálně tedy práce splňuje podmínky pro disertační práci.

Celá práce se týká biologie a ekologie modelového druhu a předkládaný soubor článků podává ucelený přehled této problematiky. Celá práce obsahuje přehledný úvod představující celou problematiku i závěr přehledně shrnující hlavní výsledky. Celkově považuji práci za kvalitní a doporučuji ji k obhajobě.

Doc. RNDr. Zuzana Münzbergová, PhD.

K práci mám následující otázky:

1. V článku 1 chybí treatment cross polination ze stejné populace. Proč tento treatment nebyl zvolen raději si zvolila treatment cross polination z populace 5 km vzdálené. Jaký toto rozhodnutí mohlo mít vliv na výsledky studie?
2. Proč byl v článku 1 studován vliv treatmentu na počet vajíček? Jaký mechanismus by mohl být za tento vliv zodpovědný?
3. Článek 1 je očividně první ze vzniklých studií. Kdybys měla sběr pro tuto studii naplánovat dnes, co bys udělala jinak?
4. V článku 2 je zmíněno poškození semen na lokalitách. Čím bylo způsobeno?
5. V článku 2 se na straně 56 píše genetic variation within population was expressed as mean square/n-1. Mean square čeho?
6. Výpočet ϕ_{PT} v článku 2 se mi nezdá. Nemá být ve vzorci závorka? Případně prosím vzorek objasni.
7. Bylo by možné objasnit rozdíl mezi PCoA založené na Euklidovské vzdálenosti a na hodnotě ϕ_{PT} použité v článku 2?
8. V článku 2 v diskuzi se rozsáhle mluví o genetickém driftu jako mechanismu vysvětlující velkou diferenciaci populací na sekundárních stanovištích. Níže je zmíněn klonální růst

jako další mechanismus. Můžeš okomentovat jaký je relativní význam těchto dvou mechanismů, z textu to není patrné.

9. Články 2 a 3 jsou si velice podobné. Bylo by možné publikovat článek 2 a ž po článku 3? Jaké jsou unikátní aspekty článku 2? Zkus obhájit článek 2 pro editora časopisu, který četl článek 3 a měl by přijmout článek 2.
10. Strana 100 – The lack of evidence from genetics and reproductive ecology thus actually supports the hypothesis of recent introduction – není jasné jak je to myšleno. Lze to objasnit?
11. Strana 135 – Nejsem si úplně jistá smysluplností obrázku 2 a tabulky 2. K čemu je pro presentovanou studii nutné testovat vliv nadmořské výšky na druhové složení? V tabulce 2 je podle mě důležitý pouze počet semenáčků, který tam zcela zaniká – a je absurdní očekávat, že by měl vliv na druhové složení, jak se píše v popise k tabulce.
12. V článku 4 byla provedena experimentální výsadba a výsev. Ve výsledcích a diskuzi, ale tyto výsledky nedokáží najít. Je možné to nějak komentovat? Které výsledky pocházejí ze kterých dat?
13. V článku 5 se píše, že snímkována byla náhodně vybraná místa, tak aby reprezentovala pokud možno všechny typy vegetace. To není náhodně. Je možno onu náhodnost objasnit, případně to jinak nazvat?
14. V článku 5 se doporučuje management lokalit kvůli ochraně i jiných vzácných konkurenčně slabých druhů. Můžeš uvést příklady, pokud dokážeš tak i živočichů, které též zmiňuješ.
15. Práce obsahuje celkem 5 článků. Který z článků považuješ za nejlepší a proč? Který naopak nejslabší a proč?
16. Představ si, že existuje grantová agentura, která dává projektu pouze nově skončeným doktorandům na pokračování v tématu své disertační práci na dobu 3 let včetně jednoho technika na plný úvazek. Co by jsi naplánovala?

Drobné poznámky

17. V článku 2 se ve statistických analýzách operuje s termínem subpopulations. Před tím se tento termín neobjevuje – doporučuji sjednotit terminologii.
18. V článku 2 v obrázku 5 není jasná popiska. The presence and the number of seedlings are presented by the numbers and symbols. Lze obrázek vysvětlit. Jak se z obrázku odliší plochy bez semenáčků a plochy kde semenáčky nebyly počítány?
19. Interakce year x year v článku 2 nedává smysl. Soudím, že se jedná o neologické značení.
20. Údaje o počtu semenáčků v tabulkách 1 a 4 v článku 4 mi přijdou velmi málo informativní neboť nejsou vztažené na počet ploch.
21. Co je freq(1) a freq(0) u výpočtu genové diversity - strana 90?
22. Strana 95 – přehozené popisky Kr1 a Kr2 ve Figure 3 A vs. B.
23. Článek 2, Table 1 – Foot, né food.



Bratislava, 30. novembra 2012

Oponentský posudok na dizertačnú prácu Mgr. Ester Ekrtovej: Ecology and genetic diversity of *Gentiana pannonica* populations in different geographical and habitat scales

Predkladaná dizertačná práca je zameraná na populačnú biológiu a genetiku horského, prevažne subalpínskeho, druhu *Gentiana pannonica*, s centrom výskytu vo Východných Alpách, ktorý sa ako glaciálny relikvium vyskytuje na Šumave a pravdepodobne nepôvodne aj v Krkonošiach a Jeseníkoch. Študovaný druh je teda špecifický a zaujímavý tým, že má disjunktný areál, je pomerne vzácny, vyskytuje sa v širšom spektre biotopov, ako primárnych tak aj sekundárnych, čo predpokladá odlišnú evolučnú históriu a dynamiku populácií. Hlavnými cieľmi práce a zároveň študovanými okruhmi bolo 1) objasnenie reprodukčných stratégií a zistenie faktorov limitujúcich generatívne rozmnožovanie; 2) charakterizovanie genetickej variability a štruktúry druhu a ich interpretácie vzhľadom k súčasnej disjunktnosti areálu, výskytu v rôznych typoch biotopov ako aj ku klimatickým a vegetačným zmenám od pleistocénu po súčasnosť; 3) detailné preskúmanie výskytu druhu na Šumave, jeho historických zmien a vplyvu človeka.

Riešená téma je aktuálna a v recentnej literatúre málo spracovaná. Kým mnohé alpínske druhy boli pomerne dôkladne študované z hľadiska ich genetickej štruktúry a evolučnej histórie, takéto znalosti o druhoch subalpínskeho a montánneho stupňa v strednej Európe sú nedostatočné. Za zásadnú prednosť predkladanej dizertačnej práce považujem jej komplexný prístup, ktorý spočíva v štúdiu a prepojení viacerých faktorov, ktoré vplyvajú na genetickú štruktúru a evolučný potenciál rastlinných druhov. Autorka berie do úvahy ako dynamiku populácií v minulosti (najmä v spojitosti s klimatickými a vegetačnými zmenami počas pleistocénu a atlantika v holocéne) tak aj súčasný vplyv biológie a ekológie druhu – jeho reprodukčné stratégie, životnú formu, rozširovanie semien, prirodzené generatívne obnovovanie a vplyv človeka. V neposlednom rade práca prináša aj konkrétne poznatky potrebné pre efektívnu ochranu tohto druhu.

Práca pozostáva zo všeobecného úvodu, cieľov práce, piatich vedeckých článkov a záverečného zhrnutia výsledkov. Tri z článkov už boli publikované (dva v CC časopisoch), jeden je prijatý do tlače a jeden v štádiu rukopisu. Všeobecný úvod je venovaný problematike, ktorá sa bezprostredne týka témy práce. Autorka tu predstavuje koncept endemitov a vzácných druhov a ich vznik, približuje procesy, ktoré prebiehajú v malých areáloch a málopočetných populáciách a ich genetické dôsledky, zaoberá sa aj vplyvom rozmnožovania na genetickú štruktúru, a tiež stručne opisuje študovaný druh z hľadiska rozšírenia a ekológie. V záverečnom zhrnutí sumarizuje a prepája výsledky prezentované v jednotlivých článkoch a prináša komplexný obraz dávnejšej a súčasnej dynamiky študovaných populácií horskej panónskej oblasti. Tieto kapitoly sú spracované dôkladne a zároveň výstižne, ilustrujú dobré znalosti a prehľad autorky v danej problematike.

Článok I je venovaný štúdiu vplyvu rôzneho opeľovania na produkciu semien a tým zisťuje spôsob rozmnožovania druhu. Poznanie reprodukčnej biológie je dôležité pre interpretáciu genetickej štruktúry ako aj pre efektívnu ochranu vzácných druhov. Limitujúcim faktorom je tu však to, že štúdia sa obmedzila na jednu populáciu, čo znemožňuje zovšeobecnenie získaných výsledkov, keďže pomer samoopelenia a cudzoopelenia môže byť odlišný v rôznych populáciách a častiach areálu. Bolo by zaujímavé takto porovnať menej a viac početné populácie, geneticky variabilnejšie a ochudobnené, ako aj z rôznych častí areálov. Toto autorka aj sama uznáva a naznačuje v diskusii článku. Jeden z reprodukčných aspektov – výskyt a prežívanie semenáčikov – bol skutočne detailne sledovaný vo viacerých populáciách a priniesol zaujímavé výsledky (články II, IV).

Články II a III sa zaoberajú štúdiom a interpretáciou genetickej štruktúry stanovenej na základe dvoch typov molekulárnych markerov – AFLP a RAPD. V oboch článkoch sa kladú zaujímavé a relevantné otázky (napr. rozloženie genetickej variability v rámci diskontinúálneho areálu, porovnanie variability v primárnych a sekundárnych biotopoch, korelácia s reprodukčnými stratégiami). Dáta sú vyhodnotené správne, interpretácia výsledkov vystihuje podstatu, diskusia je dôkladná, je podaná aj v širšom kontexte. Článok II je však založený na pomerne malom počte populácií (8 populácií) a dát (38 RAPD markerov), teda aj keď načrtáva určitý obraz, výsledky a ich interpretácie je potrebné vnímať ako predbežné. V takomto type štúdií môže byť dôkladné prezbieranie čo najväčšieho počtu populácií a dostatočné množstvo dát kľúčové. Jedným zo zistení bola zreteľne nižšia genetická variabilita v šumavských populáciách zo sekundárnych biotopov, ako aj iné rozloženie variability medzi populáciami a v rámci nich. Avšak tieto rozdiely medzi šumavskými populáciami z primárnych a sekundárnych biotopov už neboli potvrdené v AFLP štúdií (článok III), čo, ako sa domnievam a autorka to taktiež pripúšťa, je práve dôsledok nedostatočného množstva RAPD dát. Článok III prináša podstatne väčšie množstvo dát (367 AFLP lokusov) a aj vzhľadom na vzácnosť druhu je počet (20) a geografické rozloženie populácií primerané. Fylogeografické a populačno-genetické interpretácie sú naozaj zaujímavé a presvedčivé.

Článok IV detailne rieši generatívne rozmnožovanie študovaného druhu, najmä úspešnosť prirodzeného generatívneho zmladzovania sledovaním výskytu a prežívania semenáčikov na prirodzených, primárnych aj sekundárnych biotopoch v Alpách a na Šumave. Na základe vyhodnotenie environmentálnych dát z viacerých lokalít a experimentálneho výsevu a pozorovania prežívania semenáčikov na trvalých plochách autorka zistila ktoré faktory prostredia sú kľúčové pre generatívne zmladzovanie. Tieto zistenia sú zásadné pre poznanie dynamiky populácií ako aj pre ich ochranu.

Článok V podrobne mapuje výskyt druhu v centrálnej Šumave v nelesných enklávach, charakterizuje jeho stanovištia a spoločenstvá a tiež porovnáva výskyt s historickým využívaním krajiny. Autorka zisťuje aký podiel mohlo mať pestovanie druhu a jeho šírenie na antropogénne stanovištia na súčasné rozšírenie a aká je perspektíva dlhodobého prežívania populácií.

K práci mám nasledovné otázky, resp. podnety do diskusie:

- 1) Na vyjadrenie a znázornenie celkovej genetickej štruktúry na základe AFLP dát bola použitá analýza hlavných koordinát (PCoA) (článok III). Skúšala autorka použiť aj niektorú zo zhlukovacích metód (hierarchické zhlukovanie ako napr. metóda spájania

najbližších susedov – neighbour-joining tree, alebo nehierarchické Bayesove (softvér STRUCTURE, BAPS) zhukovanie, príp. tvorbu siete, tzv. neighbour-net); ak áno, aké boli výsledky? Štruktúra v AFLP dátach je často pomerne komplikovaná a prvé dve či tri koordináty PCoA vystihujú len časť celkovej variability. Zhukovacie metódy preto môžu byť užitočné pre komplexnejší pohľad na genetickú štruktúru.

- 2) Napriek značnej snahe sa nepodarilo nájsť variabilitu v sledovaných cpDNA úsekoch (článok III). Toto nie je ojedinelé zistenie; je naozaj známe, že na druhej úrovni môže byť cpDNA značne uniformná a autorka aj uvádza iné, podobné príklady trvácich a dlhovekých (*Carex*, *Lonicera*) druhov. Zaujímalo by ma ale, či by bolo možné porovnanie aj s príbuznými druhmi a rodmi a takto odhadnúť, či táto uniformita je charakteristická pre túto evolučnú líniu (pre ktorú môže byť typická znížená mutačná rýchlosť), alebo je špecifická pre tento konkrétny druh, okrem trvácnosti a klonality snád' aj v dôsledku nejakej dávnejšej genetickej udalosti (napr. bottleneck)?
- 3) Pre zistenie korelácie genetických a geografických vzdialeností (článok II, str. 56) bola vytvorená matica genetických vzdialeností. Tieto genetické vzdialenosti vychádzali z koeficientu, ktorý počíta s priemernou heterozygotnosťou. RAPD metodika však generuje dominantné markery, pri ktorých nie je možné odlíšiť homozygotov od heterozygotov, naraz sa amplifikuje väčšie množstvo lokusov a eviduje sa len prítomnosť a absencia fragmentov. Ako bola teda počítaná resp. odhadovaná heterozygotnosť?
- 4) Získané AFLP dáta dosť jednoznačne podporujú pôvodný výskyt druhu v Krkonošiach. Na základe čoho sa dlhodobo usudzuje, že tieto populácie sú tam nepôvodné? Aký je názor autorky, aká je pravdepodobnosť, že tieto krkonošské populácie nie sú pôvodné, ale pochádzajú z tých častí Álp, ktoré neboli zahrnuté v AFLP štúdiu? Plánuje sa táto alternatívna hypotéza a prípadne ešte aj pôvod populácií z Jeseníkov geneticky overiť?

Celkovo môžem konštatovať, že predkladaná dizertačná práca je výborne spracovaná, autorka splnila vytýčené ciele, využila pritom rôzne metodické prístupy a jej práca priniesla množstvo zaujímavých zistení potrebných pre lepšie poznanie štruktúry a dynamiky populácií horca panónskeho a jeho ochranu. Skúšobnej odborovej komisii jednoznačne odporúčam prijať túto dizertačnú prácu a po jej úspešnej obhajobe navrhujem udeliť uchádzačke Ester Ekrtovej akademický titul „philosophiae doctor“.

Judita Rozmanová