

Oponentský posudek na disertační práci

Jan Chlumský: Dispersal, distribution and genetic diversity of *Melampyrum subalpinum* group

Předložená disertační práce se zabývá zejména genetickou variabilitou, zeměpisným rozšířením a strategiemi šíření semen v taxonomicky komplikovaném a fytogeograficky zajímavém okruhu *Melampyrum subalpinum* v Rakousku, České republice a na Slovensku. Práce je členěna do 7 kapitol; základem jsou dva publikované články v impaktových časopisech, jeden dokončený manuskript (jistě uplatnitelný v kvalitním časopisu) a jeden česky psaný článek v domácím recenzovaném periodiku (autorský podíl J. Ch. je vždy jasně uveden).

Celkově považuji práci za zdařilou. Zvolené téma je velmi zajímavé, je součástí dlouhodobějšího studia rodu *Melampyrum* a „rhinanthoidní linie“ čeledi Orobanchaceae na katedře botaniky Přírodovědecké fakulty JČU. Cíle jsou jasně formulované a ve většině případů se je podařilo splnit. Metodické přístupy jsou vhodně zvolené, zahrnují využití molekulárních markerů, průtokovou cytometrii (stanovení velikosti jaderného genomu), v menší míře i morfometriku a terénní pokusy zaměřené na interakce mezi mravenci a dvěma druhy rodu *Melampyrum*. Získané výsledky jsou zajímavé, v některých případech i překvapivé a umožňují nové pohledy na proměnlivost ve zkoumané skupině černýšů. Po formální stránce nemám k práci námítky.

Chapter I – General introduction

Autor představuje základní myšlenky glaciální a postglaciální dynamiky areálů, zejména často diskutovanou otázku glaciálních refugií a hlavních migračních proudů během rekolonizování území po ústupu ledovce; pozornost věnuje i s tím spojeným diferenciačním a speciálním procesům (zejména alopatrické speciaci související s fragmentací původně souvislých areálů) a významu poznání způsobů šíření jednotlivých zkoumaných druhů.

Kapitola je dobře zpracována, poskytuje základní vhled do problematiky. Nicméně bych si ji představoval poněkud obsáhlejší a podrobněji zpracovanou; postrádám např. zmínku o přežívání na nunatacích v nejvyšších středoevropských pohořích (i když je tato teorie v poslední době spíše opouštěna). Některá tvrzení nepovažuji za zcela správná, např. (str. 4) „The holocene phylogeography of trees became well explored over time and detailed studies of other groups started to emerge (...), however *studies focused on herbs are still rather rare* – pozornost byla věnována např. druhům s arкто-alpínským rozšířením, cirkumpolárním druhům, v menší míře i evropským „stepním“ druhům.

Chapter II – Introduction to the studies group *Melampyrum subalpinum*

Rozsahem přiměřené a v podstatě vyčerpávající představení zkoumané skupiny; postrádám jen aspoň krátkou zmínku o postavení *M. subalpinum* v rámci příbuzenského okruhu *M. nemorosum*. V závěru kapitoly jsou představeny hlavní testované hypotézy.

Chapter III – Rozšíření černýše českého (*Melampyrum bohemicum* v České republice a na Slovensku – revize po čtyřiceti letech

Česky psaná publikovaná studie podrobně shrnující rozšíření *M. bohemicum* (ve zde přijatém pojetí *M. subalpinum*) v uvedeném území, zaměřená (jak napovídá i titul) zejména na zhodnocení současného stavu lokalit a srovnání s podobně zaměřenou Hadačovou prací z roku 1966. Práce má tradiční formu, uvítal bych rozsáhlejší diskusi k výskytům v okolí Olešnice u Kunštátu na Českomoravské vrchovině, zajímavým geograficky i stanovištně.

Chapter IV – Roles of species-preferential seed dispersal by ants and endozoochory in *Melampyrum* (Orobanchaceae)

Autoři zjistili, že mravenci druhu *Formica polyctena* dávají přednost semenům *Melampyrum pratense* na úkor semen *M. subalpinum*, což by mohl být jeden z důvodů menší početnosti populací i značně ostrůvkovitého areálu druhého ze zkoumaných černýšů. Součástí studie jsou i menší pokusy prokazující možnost endozoochorního šíření a sledující vzdálenost na kterou jsou semena šířena mravenci. Nemám námítky, jde o zajímavou a metodicky vhodně zpracovanou problematiku, související s hlavní linií disertační práce.

Chapter V – Is genetic diversity congruent with morphological diversity across the distributional range of *Melampyrum subalpinum* group (Orobanchaceae)?

Studie je zaměřena na poznání celkového patternu genetické variability u *M. subalpinum* a srovnání genetické variability morfologicky variabilních alpských populací a na jedné straně a morfologicky poměrně uniformních populací v České republice a na Slovensku (central-marginal concept). Součástí práce je i jednoduchý pokus zaměřený na zjištění způsobu reprodukce (autogamie vs. alogamie).

Testování způsobu reprodukce bohužel probíhalo pouze na rostlinách z jedné populace a výsledky nelze zobecňovat na celý druh (což i autoři diskutují v souvislosti s hodnotami F_{IS}); na druhou stranu takhle postavený pokus stejně ukazuje jen potenciál pro autogamii, nikoliv reálný podíl autogamie v přírodních populacích.

Ačkoliv by se mohlo namítnout, že používání izoenzymů patří do minulého století, pro řešení zde položených otázek je považují za vhodný marker. Zpracování dat je standardní a odpovídající tomuto markeru. Zajímavé jsou výsledky UPGMA analýzy, kde některé populace z geograficky izolovaných a geneticky zřejmě jinak dobře diferencovaných areálů spadají do jiných shluků (např. ZehrB, SastB), sesterská ke všem ostatním je pak rakouská populace PeutA. V Diskusi bohužel těmto populacím není věnována pozornost, naopak je možná až přespříliš rozebírána otázka převažujícího způsobu reprodukce (na základě hodnot F_{IS}).

Výsledky jinak považují za zajímavé, v podstatě potvrzující central-marginal koncept a podporující řazení českých, slovenských a rakouských populací k jednomu druhu.

Chapter VI – Disentangling the evolutionary history of *Melampyrum subalpinum* agg. (Orobanchaceae) in Central Europe

V podstatě fylogeografická studie, poněkud netradičně postavená na třech nekódujících úsecích cpDNA a jednom single copy genu, doplněná o cytometrické stanovení velikosti jaderného genomu a jednoduchou morfometriku. Výsledky jsou zajímavé, ukazují určitý geografický pattern genetické variability, současně ale i do jisté míry popírají předpoklad snížené genetické diversity u z hlediska celkového areálu okrajových českých a slovenských populací; za důležité považují i zjištění, že slovenské populace mají ve srovnání s rakouskými a českými menší velikost jaderného genomu (což bohužel není následně příliš diskutováno). Celkově považují práci za zajímavou a přínosnou, mám ale několik námitek.

Nedotažená je morfometrická část, zcela chybí alespoň grafické znázornění popisných statistik (krabicové grafy), alespoň informace o tom, zda některé znaky nejsou korelované (čekal bych to), kromě PCA by se daly udělat ještě další analýzy.

Doporučoval bych aspoň zkusit jednoduchou fylogenetickou analýzu molekulárních dat (v PAUPu a MrBayesovi). Chápu, že v článku nejde přímo o fylogenezi, mohlo by to ale podpořit nebo upřesnit některé závěry vyslovené na základě TCS sítě.

V textu je na několika místech zmiňovaná historická introgrese ze strany *Melampyrum nemorosum* na základě sdílených alel nebo haplotypů. V přehledu zkoumaných populací ale *M. nemorosum* není – jde o souběžně prováděné a zatím nepublikované analýzy? A mimochodem,

M. nemorosum nem... je o současně prováděné a zatím nepublikované analýzy. A mimochodem, může probíhat křížení mezi *M. subalpinum* a *M. nemorosum* i v současnosti? Ví se něco o fertilitě případných hybridů?

Chapter VII – Conclusions

Výstižné, dobře napsané, jen mně tam chybí nějaká vhodná závěrečná věta.

Pro diskusi navrhuji následující otázky:

1) V poslední době někdy zaznívá názor, že fylogeografie je už „myšlenkově vyčerpaná“ a další práce jsou v podstatě jen opakováním toho, co tu už bylo, jen na jiném druhu/skupině. Jaký na to máte názor? Je fylogeografie opravdu „mrtvá“, nebo některé v poslední době zaváděné metodické přístupy/markery (jaké to jsou?) mohou přispět k jejímu zmrtvýchvstání? Jaký máte názor na přednosti a nevýhody těchto markerů (ve srovnání s tradičně používanou AFLP nebo analýzou mikrosatelitů)? Uvažujete o využití některé z „nových“ metod ve Vaší další práci?

2) V práci je na více místech zmiňována tzv. Thermenlinie, velmi často rozebíraná v zejména rakouské fytoogeografické literatuře. Jaký je její význam z hlediska mikroevolučních procesů u vyšších rostlin?

3) Významná arela *M. subalpinum* se nachází na slovenském Záhorí. Jaký tu byl vývoj vegetace v pozdním glaciálu a holocénu s ohledem na možnosti přežívání tohoto druhu?

4) U některých rakouských populací rostlin označovaných jako „širokolisté *M. subalpinum*“ byla potvrzena (dávna) hybridizace s *M. nemorosum*, s tím že *M. subalpinum* byla ve většině případů mateřská rostlina. Je to (směr křížení) možné nějak interpretovat? (obecně je na to několik teorií, přiznávám ale že jsou i věci, které zkrátka interpretovat nejde...).

5) Jak předložená studie přispěje k řešení problematiky celé skupiny *Melampyrum nemorosum*? Jaké jsou již známé nebo předpokládané evoluční mechanismy v této skupině? A jaký je současný stav poznání variability na Balkánském poloostrově?

I přes některé námitky považuji práci za velmi zajímavou a přínosnou, rozšiřující nejen znalosti o zkoumané skupině černýšů, ale poskytující i obecná data s přesahem do fytoogeografie, florogeneze a vegetační historie střední Evropy a v neposlední řadě i do mechanismů šíření diaspor. Jsem přesvědčen, že splňuje požadavky kladené na tento typ práce a doporučuji ji k obhajobě.

V Průhonicích, 22. 6. 2016


Mgr. Jindřich Chrtek, CSc.

Girona, 23 May 2016

To whom it may concern.

Review Phd thesis: Dispersal, distribution and genetic diversity of *Melampyrum subalpinum* group, by Mgr. Jan Chlumský.

This thesis has three main objectives: disentangle the diversity of the *Melampyrum subalpinum* group, evaluate the relevance of the two seed dispersal systems (myrmecochory as a short dispersal system and endozoochory as a long dispersal system) and propose an explanation for the distribution and Holocene migration of *Melampyrum* and others myrmecochorous plants.

I think the last sentence in chapter 4 (page 66) or the same last sentence about chapter 4 in the conclusions it's a good sentence that summarizes the findings obtained in the *Melampyrum* seed dispersal study conducted in this thesis. That is: "Endozoochory can offer an elegant explanation for the long-distance migration of some myrmecochorous plants during the Holocene period or in the event of the loss or formation of new favourable habitats". I agree with the author this is an elegant explanation that help to solve an important question.

This thesis represents novel information, with adequate data collection, analysis and discussion. It's well written and the author is very careful with comments on their results. The tables and figures are clear and informative.

Some points that should be considered:

One about methods used in chapter 4 (seed dispersal by ants and endozoochory). The author used a fluorescent dactyloscopic powder to cover the seed and estimate the dispersal distance achieved by the removed seeds. Have these powder any interaction in the seed dispersal process? What do you think about to compare some dispersal by ants events measured with seeds with and without fluorescent powder?

What was the final fate of seeds removed by ants? Inside the nest, outside the nest after elaiosome removal... That's important to know if the ants provided safe sites to germinate and emergence of juveniles and also know the global role of ants in this ant-plant interaction case.

And a final point is if you have any idea about the potential attractively of ants to the seeds that passed by the endozoochory process? Is it possible that the ants have any final role or a final dispersal of seeds from faeces of cattles?

Universitat de Girona
Departament de Ciències Ambientals

Finally, I want to congratulate the author and the supervisor of this thesis for the great work and results obtained.

Thanks a lot to have the opportunity to review this Ph D thesis.

Sincerely,



Dr Crisanto Gomez

Professor of Zoology
Department of Environmental Sciences
University of Girona