

Oponentský posudek magisterské diplomové práce Tomáše Zíbara “Vliv inokulace vybraných ektomykorhizních hub na růstové charakteristiky semenáčků dubu a buku”

Oponovaná diplomová práce (DP) je standardně členěna na 7 kapitol, má 48 stran textu, 10 stran citované literatury a 31 stran příloh ve 4 oddílech.

Kapitola 1 (Úvod) je velmi stručná a v posledním odstavci definuje cíl práce. Pracovní hypotézy nejsou uvedeny. Z kontextu vyplývá, že posláním DP bylo přispět k vylepšení inokulačních a evaluačních metod, používaných při množení listnatých dřevin v lesních školkách.

Kapitola 2 (Literární rešerše) dokazuje, že autor je schopen pracovat s cizojazyčnou literaturou a orientuje se v ní. Obsahuje několik matoucích slovních obrátů a definic – např. nedoporučuji používat definici mykorhizy podle Hawksworth *et al.* (1996), neboť zahrnuje i jinou symbiotickou interakci, endofytismus, a zcela ignoruje zásadní charakteristiku mykorhizní symbiózy, vzájemnou prospěšnost pro zúčastněné partnery. Je zřejmé, že autor dokáže získané informace skládat do logických celků a činit z nich přiměřené závěry.

Kapitola 3 (Metodika) je v některých případech příliš stručná, lze však říci, že všech 5 pokusů by bylo možné po dodatečné konzultaci zopakovat. Jednotlivé pokusy se doplňují a tvoří vzájemně provázaný celek, jejich logická sekvence (a tomu odpovídající číselné označení) však spíše měla být: pilotní Pokusy 4 a 5 – Pokus 3 – Pokus 2 – Pokus 1. Použité metody jsou přiměřené a teoreticky je možné s jejich pomocí dosáhnout vytyčeného cíle. Osobně bych preferoval izolaci mycelia z plodnic namísto spor a minimálně dvojnásobný počet houbových kmenů použitých pro inokulaci. Jak sám autor uvádí, velmi vhodná by byla následná detekce introdukovaných hub v mykorhizních špičkách inokulovaných rostlin. V ideálním případě lze detekci omezit na popis jednotlivých dobře odlišných morfotypů, chybí však zadní vrátka pro případ neideální. Vhodná by byla analýza živin v pletivech inokulovaných rostlin. Toto je míněno jako doporučení do budoucna, které *a priori* hodnotu oponované DP nedevaluje. Nesporným kladem práce je použití sofistikovaných statistických metod včetně vhodně zvolených kovariát v Pokusu 4.

Kapitola 4 (Výsledky) je členěna do 5 oddílů podle provedených pokusů. Pokusy 1, 3, 4 a 5 mají několik společných rysů: absenci růstové odpovědi inokulovaných rostlin, kontaminace saprotrofními, parazitickými nebo neinokulovanými ektomykorhizními houbami, neúspěch inokulace *R. ochroleuca*, výskyt inokulované *L. laccata* i ve variantách, kde nebyla inokulována a obecně nízkou míru ektomykorhizní kolonizace. Jediným pokusem, ve kterém bylo dosaženo dílčích úspěchů, je Pokus 2. Interpretace jeho výsledků je však obtížná: oproti dvěma inokulovaným druhům hub bylo nalezeno 8 různých morfotypů; inokulovaná *R. ochroleuca* nebyla nalezena; *L. laccata* byla nalezena i u semenáčků, kde nebyla inokulována. Inokulace měla průkazný vliv na některé růstové charakteristiky ošetřených semenáčků, z textu je však obtížné zjistit, které varianty se lišily, neboť autor odkazuje na tabulky (TP1.4 a TR1.5) a obrázek (Obr. P1.2), které nejspíš s Pokusem 2 nesouvisí. Z Obr. P1.1b (u kterého je odkaz na Pokus 2) je zřejmé, že např. sušina kořenů se u inokulovaných variant nelišila od kontroly, pod grafem jsou však uvedeny jiné hodnoty F a p, než v Kapitole 4. Na sušinu kořenů z Pokusu 2 odkazuje také Obr. P1.3a, jedná se však o zřejmý omyl.

Kapitola 5 diskutuje dosažené výsledky. Autor se zmínil o všech podstatných zjištěních a snažil se je vysvětlit a zasadit do kontextu publikovaných prací. Je sympatické, že nezastíral neúspěchy a snažil se je analyzovat. Kapitola by mohla být zestručněna.

Kapitola 6 (Závěr) sumarizuje oponovanou diplomovou práci. Vyzdvihuje variabilitu kolonizačního potenciálu *L. laccata*, nalezenou v Pokusu 2, která však není příliš překvapivá. Autor uzavírá, že za účelem zlepšení růstu školovaných semenáčků není inokulace

použitými kmeny *L. laccata* příliš perspektivní, a že druh *R. ochroleuca* pro aplikaci v praxi nelze doporučit.

Rozsah citované literatury (Kapitola 7) odpovídá požadavkům běžně kladeným na DP.

Poslední část DP (Přílohy) je místy redundantní a nepřehledná, dokládá však velké úsilí, vložené do vyhodnocování experimentálních dat a popisu pozorovaných morfotypů.

Porovnáním cílů a výsledků oponované DP lze konstatovat, že se nepodařilo vybrat vhodné mykorrhizní symbionty pro inokulace semenáčků dubu a buku, vliv inokulace na růstové charakteristiky těchto semenáčků byl prokázán pouze částečně a nebylo zjištěno, že by se kompatibilita symbiontů odrážela na anatomii mykorrhiz. Toto shrnutí působí samo o sobě negativně, je však třeba si uvědomit, že i negativní výsledky jsou cenné, byly-li dosaženy v pečlivě naplánovaném, provedeném a vyhodnoceném experimentu. Řadu výsledků oponované DP bohužel nelze vyhodnotit, protože byly ovlivněny množstvím nepostižených nebo nepostižitelných faktorů – jejich interpretace pak zůstala na úrovni nepodložených hypotéz. Nebylo také možné rozhodnout, zda pozorované morfotypy *L. laccata* náležely inokulovaným kmenům. Autor se potýkal s celou řadou nečekaných a proto fatálních komplikací. Některé (napadení padlím, odumření semenáčků, sněhová bouře apod.) snad nebylo možné účinně ovlivnit. Autor DP by však měl uvážit, zda jiným nebylo možné předcházet (vhodnější výběr hub pro inokulaci, pilotní pokusy pro ‘osahání’ rostlinného a houbového materiálu, screening mykorrhizní kolonizace neinokulovaných školkových semenáčků cílových rostlin) nebo je předvídat (kontaminace jinými ektomykorrhizními houbami, nemožnost spolehlivé zpětné identifikace inokulovaných hub).

Při hodnocení DP je třeba vzít v úvahu, že se zabývala komplexním vztahem dvou zcela odlišných skupin organismů, rostlin a hub, a že v daných experimentálních podmínkách není vůbec jednoduché tento vztah metodicky uchopit. Nelze však opomenout výše uvedené nedostatky, které její kvalitu značně snižují. Po pečlivé úvaze navrhuji oponovanou DP přijmout k obhajobě a na základě posuzovaného textu ji hodnotit stupněm “dobře“. V případě, že autor při obhajobě smysluplně zodpoví níže uvedené otázky a zasadí tak nedostatky DP do uspokojivého kontextu, navrhuji toto hodnocení změnit na “velmi dobře“.

v Průhonicích, 16/1/2008

RNDr. Martin Vohník, Ph.D.

Otázky z autorovi DP:

1. Proč byla k inokulacím použita *R. ochroleuca*? Jedná se o late-stage strážáka, který se k aplikačně zaměřeným inokulacím běžně nepoužívá.
2. Proč byly k inokulacím použity kmeny odvozené ze spor a ne z mycelia plodnic?
3. Liší se spektrum volně kolonizujících ektomykorrhizních hub zjištěné v DP od spektra, zjištěného v pracích školitelky DP? [Kavková M *et al.* 2003. Species composition and significance of mycorrhizas in young oak plantations of *Q. petraea* and *Q. robur*. Conference abstract No.184, ICOM 4, Montreal; Kavková *et al.* 2007a Effect of inoculation of oak seedlings with *Paxillus involutus* and *Laccaria laccata*. Comm. Inst. For. Bohem. 23: 82-95 (citováno v DP)]. Pokud ano, co může být příčinou?
4. Podobně zaměřená práce Kavková *et al.* 2007a dospěla v případě použití inokulací u stejných/podobných rostlin k odlišným výsledkům/závěrům. V čem vidí autor příčiny?
5. Jaký je vliv infekce padlí dubového na fyziologický stav školkového dubu? Jsou známy (byť nepřímé) interakce s mykorrhizními houbami?

Posudek na magisterskou práci Tomáše Zíbara: Vliv inokulace vybraných ektomykorhizních hub na růstové charakteristiky semenáčků dubu a buku

Magisterská diplomová práce Tomáše Zíbara se zabývá odezvou semenáčků dubu a buku na inokulaci dvěma druhy ektomykorhizních hub – *Laccaria laccata* a *Russula ochroleuca*. V pěti experimentech se pokusil o inokulaci oběma druhy, přičemž ho zajímal vliv oddělené a společné inokulace, srovnání růstu semenáčků kolonizovaných zvolenými druhy izolovanými ze dvou různých hostitelů, kolonizace zvolenými druhy ECM hub v podmínkách kompetice s přirozenými kolonizátory, efekt množství inokula, a konečně porovnání kolonizace různě starých semenáčků holubinkou hlínožlutou jakožto druhem vyskytujícím se převážně v pozdějších stádiích mykorhizní kolonizace kořenů dřevin. Cíle práce byly: vybrat a izolovat vhodné mykorrhizní symbionty pro inokulace semenáčků dubu a buku, stanovit, jaký je vliv inokulace na růstové charakteristiky těchto semenáčků, a zjistit, jak se kompatibilita symbiontů odráží na anatomii mykorhiz.

Práce má tradiční členění a, bohužel, také řadu tradičních neduhů diplomových prací, vyplývajících především z nedostatku času při dokončování práce. K těmto patří například poměrně velké množství chyb v interpunkci, překlepech a nesprávného pořadí slov ve větách, což na některých místech textu ztěžuje jeho pochopitelnost. Jako příklad může posloužit už název práce na titulní straně, kde je jeden překlep a použití špatného pádu (Vliv inokulace vybranými ...). K formálním chybám lze přiřadit i nejednotnou velikost použitých fontů (Obsah) a neuvedení podkapitol vyšších řádů v Obsahu.

Následují mé poznámky k jednotlivým kapitolám:

Literární rešerše je psána se znalostí problematiky, čemuž odpovídá obdivuhodné množství literatury, kterou autor přečetl (ale ne všechny práce uvedené v textu jsou v seznamu literatury, chybí např. Bidartondo et al. 2005).

- některé práce z poslední doby ukazují, že i vyšší rostliny jsou schopné přijímat organický N, což je v rozporu s tvrzením autora na str. 4.
- obsah kapitoly 2.5.2 "Aplikace inokulace mykorhizních hub" je pouze výčetem, které druhy stromů a hub se v experimentech převážně používaly. Aplikacemi se mnohem víc zabývá kapitola 2.4. Diskrepance může též vyplývat ze špatného očíslování kapitol.

Kapitola **Metodika** působí poněkud neučesaně, přeskakuje mezi obecným popisem použitých metod a popisem jednotlivých pokusů a zdaleka ne všechny důležité detaily jsou v ní uvedeny (na některé čtenář narazí dále v této kapitole, na některé v Diskuzi nebo ho napadnou až při prohlížení Příloh).

- autor uvádí, že osivo buku bylo dosbíráváno na jaře a na rozdíl od podzimního sběru nepocházelo z jednoho rodičovského stromu. Ani u podzimního, ani u jarního sběru se neuvádí, zda se sbíralo přímo ze stromu nebo ze země. V druhém případě hrozí kontaminace osiva přirozenými mykorhizními druhy hub, což by bylo asi ještě kritičtější v případě, že by bylo osivo již mírně naklíčené, s popraskaným osemením (podobná obava se objevuje v Diskuzi na str. 42, druhý odstavec).

- při použití osiva pouze z jediného stromu se sice sníží jeho genetická variabilita (jak uvádí autor), ale zároveň se dost omezí výpovědní hodnota výsledků.
- "sušení listů, kořenů a kmínků semenáčků při 75°C po dobu 24 hodin do konstantní hmotnosti ... s dosušením dalších 12 hodin při 75°C před vážením" je zjevně nesmysl. Jak tedy autor ví, že byly usušeny do konstantní hmotnosti? Zároveň si nejsem jistá, že uvedená doba byla, alespoň v případě kmínků, dostačující.
- u přípravy preparátů na anatomický popis typů mykorhiz je nepřesná formulace, které kořínky byly použity. Autor uvádí "kořínky primární osy", má asi na mysli laterální kořeny prvního řádu. U vyhodnocování mykorhizní infekce pod binokulární lupou není uvedeno použité zvětšení.
- v pokusu 1 je uvedena výsadba do dvoulitrových ("2l") kontejnerů po šesti buňkách. Nešlo spíš o kontejnery se šesti dvoulitrovými buňkami?
- co míní autor formulací "inokuloval jsem semenáčky 15 ml myceliální suspenze po deset dnů po vysazení" (str. 22)? Byla inokulace prováděna opakovaně (kolikrát)? Pokaždé bylo použito 15 ml suspenze nebo bylo toto množství rozděleno mezi jednotlivé inokulace? Nebo proběhla inokulace každého semenáčku jen jednou, ale celá procedura výsadby se protáhla na 10 dnů?
- co míní autor větou "další zpracování semenáčků bylo stejné jako u předchozího experimentu", když šlo o první experiment (str. 22)?
- krásná je formulace "Pokus jsem navrhnul za cílem zjištění ..."☺
- v pokuse č. 5 s *Russula ochroleuca* byly pro inokulaci použity nekolonizované semenáčky z pokusu č. 3. Z toho vyplývají dvě rizika: 1. možnost přenosu hub použitých pro inokulaci v pokuse č. 3, 2. pokud byly vybrány jen semenáčky, u kterých si byl autor jistý absencí mykorhiz, mohl tím pro pokus vybrat genotypy, které byly vůči kolonizaci "odolnější", čímž mohl ovlivnit výsledky celého experimentu.
- pokud mohu soudit, použil autor správné statistické metody

Orientaci ve **Výsledcích** značně ztěžuje zařazení některých grafů a tabulek přímo do textu a jiných do Příloh.

- v textu jsem nenalezla odkaz na tabulky Tab. TR3 a TR6, ani vysvětlení indexů LL a TT.

Diskuzi by velmi prospělo, kdyby byla členěná do podkapitol, takto je jejích 12 stránek velmi nepřehledných a není naprosto jasné, podle čeho se autor rozhodoval při řazení jednotlivých odstavců. Celkově Diskuze vyvolává dojem, že autor shromáždil své poznámky z literatury a některé nápady týkající se proběhnuvších experimentů, ale už neměl čas je kriticky porovnat (jak mezi sebou, tak na stránkách).

- první zmínka týkající se prvního pokusu se objevuje až na 9. straně, celá diskuze začíná dost nečekaně zmínkou míry kolonizace jednoho použitého kmenu ve druhém pokuse.

- co myslel autor větou "biomasa kořenů při použití stejného kmene *Laccaria laccata* vykazovala rychlejší růst sušiny nadzemních částí oproti podzemním (strany 44-45)?

V **Závěrech** mě překvapila věta, že "semenáčky kolonizované *Russula ochroleuca* byly v některých případech i menší než semenáčky kontrolní". Celou dobu jsem totiž žila v domnění, že u žádného semenáčku nebyla kolonizace touto houbou pozorována (rezaměňovat inokulace a kolonizace!).

Přílohy:

- pořadí grafů v Přílohách nejde vzestupně od 1. po 5. pokus, navíc neodpovídá číslo obrázku, na které se odkazuje v textu Výsledků, číslu obrázku v příloze (např. u pokusu 2 je na straně 30 odkaz na Obr. P1.2a, ten se ale týká pokusu 1, atd.). Poněkud matoucí je i promíchání obrázků a tabulek.
- proč jsou u některých grafů uváděny hodnoty statistik a u jiných ne (zdá se, že s průkazností zjištěných rozdílů to nesouvisí)?
- proč jsou v box-and-whisker grafech uvedeny i všechny naměřené hodnoty? Měl k tomu autor nějaký důvod (není to moc obvyklé)? Chtěl tím ukázat, jak nevyrovnané jsou počty opakování v jednotlivých kategoriích?
- proč je v Příloze 4 pod výčtem měřených charakteristik ještě tabulka uvádějící prakticky totéž?

Na závěr bych měla ještě tři dotazy:

1. Proč si autor zvolil druh *Russula ochroleuca* jako jeden ze dvou testovaných druhů, když se pro inokulaci nepoužívá a od počátku se inokulace semenáček tímto druhem bez výjimky nedařila?

2. V průběhu všech pokusů byly semenáčky kontaminovány "všudypřítomnými" mykorrhizními houbami, takže není ani možné říci, zda kolonizující kmene vybraných hub byly opravdu ty použité nebo kontaminující (ať už ze vzduchu, z půdy, na které kontejnery stály, z osiva, nebo z přidávaného nesterilního substrátu). Vzhledem k tomu, že jde o vědecké experimenty a nikoli o (polo)průmyslové podmínky lesnických školek, měly by být zajištěny takové podmínky, aby byla možnost kontaminace minimalizována. Mohl by alespoň při obhajobě nastínit, jak by založil "ideální" pokus, který by umožnil porovnat chování testovaných kmenů bez tak masové kontaminace?

3. Zvažuje autor alespoň do budoucna použití molekulárních metod, které by pomohlo některé nejasnosti ohledně identifikace hub (kolonizujících nebo fruktifikujících) vyřešit?

Po dvojnásobném důkladném přečtení předložené práce jsem na rozpacích, pokud se týče doporučeného hodnocení. Je zjevné, že autor prostudoval velké množství literatury a má na ni a výsledky svých experimentů poměrně vyspělý názor. Na druhé straně práce přímo křičí po důkladném utřídění, dokončení. Pokud tak autor nechce učinit, navrhuji práci hodnotit, v případě dobré obhajoby, jako velmi dobrou.