

## **Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Ondřeje Hejny: “Diverzita ektomykorhizních hub ve vybraných bučinách Blanského lesa”**

Předložená práce se zabývá diverzitou společenstva ektomykorhizních hub (určováno z ektomykorhizních kořenových špiček) ve třech bučinách v Blanském lese na podzim v letech 2012 a 2013, porovnány jsou i dva půdní horizonty. Práce má 73 stran včetně příloh, autor cituje více než 100 publikací a formální členění rovněž splňuje požadavky na magisterskou práci.

Je nutno poznamenat, že studium mykorhizní diversity je časově i metodologicky náročné – nelze se spoléhat na produkci nadzemních plodnic hub, přítomnost i dominance jednotlivých druhů hub je v čase (během roku i mezi lety) i prostoru velmi proměnlivá (je tedy nutný sběr velkého množství materiálu z lokality, což jistě omezuje počet lokalit možných prostudovat v jednom člověku) a materiál je nutno ve velmi krátkém čase zpracovat kvůli změně vzhledu mykorhizních špiček. Autor během dvou let zpracoval 52 a 54 půdních sond a pod binolupou mu prošlo přes 900 (?) mykorhizních špiček (tahle informace v textu chybí, ale lze snad odhadnout z počtů stupňů volnosti v některých testech). Autor rovněž dokazuje, že zvládl různé přístupy k určování identity ECM hub – tedy rozčlenění do morfotypů a určení druhů podle morfologických a anatomických znaků (součástí práce jsou fotografie morfotypů, velká část v současnosti publikovaných prací tuto velmi pracnou část bohužel přeskakuje) a potvrzení příp. přeurenění identity morfotypů pomocí molekulárních metod – PCR, sekvenace a klonování.

K práci mám následující připomínky a dotazy:

**Úvod** – úvod je přehledně členěný a docela čtivý.

- na straně 3 mě překvapilo tvrzení, že 5 rodů z oddělení Glomeromycota tvoří ektomykorhizní symbiózu. Trvá autor na tomto tvrzení?
- str. 3. k druhové bohatosti ECM hub bych rovněž (v případě, že by se chtěl autor tématem dále zabývat) doporučila článek od L. Tedersoo et al. 2010: Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages, *Mycorrhiza* 20: 217-263 a databázi UNITE, kde jsou k nalezení aktualizované informace o ektomykorhizním statusu a nových nálezech ECM hub
- strana 8 či jinde (např. PCR protokol v příloze) – význam zkratk by měl být vysvětlen při jejich prvním použití, což usnadní nezasvěcenému čtenáři snažší porozumění textu (např. PCR cyklus je pochopitelný jen stěží)
- u obrázků převzatých z literatury (Obr. 4 – 6) postrádám detailnější popis, který by objasnil význam různých typů čar či barev
- str. 11, tvrzení, že „... druhová diverzita ECM hub je možná odhadnout na základě druhové diverzity hostitelských rostlin a naopak“ mi přijde přehnané. Přepokládám, že i autoři citovaného článku mluvili spíše o korelacích?
- V závěru úvodu by měly být uvedeny cíle práce a nové otázky, které si práce klade, vyplývající z předchozí rešerše. Hned třetí odstavec úvodu sice poskytuje shrnutí práce, nicméně mohl by autor během obhajoby shrnout, na které nové aspekty ECM diverzity se práce zaměřila?

**Metodika** - metodické postupy, včetně molekulárních analýz, se zdají být dobře zvládnuté.

**Výběr lokalit** – jaké je přibližné stáří studovaných porostů? Ví se něco o kontinuitě bukového porostu na studovaných lokalitách? Přepokládám, že kontinuita ve výskytu dominantní dřeviny může významně ovlivnit druhovou skladbu ECM hub. Může tato ovlivnit nalezené rozdíly mezi lokalitami?



**Sběr vzorků** – jaký je průměr půdních sond použitých k odběru půdních vzorků? Na jaké ploše byly sondy odebírány?

- počty půdních sond odebíraných na lokalitách Švelhán, Kluk a Vysoká Běta se lišily: v roce 2012 bylo odebráno 16, 20 a 16 sond a v roce 2013 20, 14 a 20 sond. Byl nějaký důvod pro tuto nevyrovnanost sběru? V roce 2013 byl počet sond z lokality Kluk téměř o 1/3 nižší než z ostatních. Nebyl by konzistentní odběr 14 či 16 sond ze všech lokalit dostatečný?

**Statistické vyhodnocení** – popis statistického vyhodnocení považuji za málo podrobný – mohl by autor objasnit, co přesně znamená „četnost ECM hub“, tedy proměnná, na které se zakládá většina výsledků? Je sice uveden odkaz na literaturu, ale bylo by správné uvést, jak se nakládalo s daty v konkrétních testech. Co je považováno za nezávislé pozorování vstupující do analýzy?

Dále by mne zajímal názor autora na to, jak jsou použité indexy a tím i výsledky ovlivněné nevyváženým počtem půdních sond? Předpokládám, že lokality s nižším počtem mohou být ochuzeny o vzácné druhy ECM hub. Má autor nějaký návrh, jak tuhle nebalancovanost v analýzách ošetřit?

### Výsledky

Tab.2 – co znamenají dva nepopsané sloupce v tabulce?

str. 32 – věta: „Výsledek z testované nulové hypotézy o nerozdílnosti roků vyšel neprůkazně ( $p < 0.05$ )..“ není moc pochopitelná a měla by asi spíše znít: „nulová hypotéza o nerozdílnosti roků byla zamítnuta...“

proč byla použita ANOVA repeated measurement v např. analýzách s grafy na straně 33, kde se na celém datasetu testoval pouze vliv např. roku či půdního profilu? Co vstupovalo do analýz jako nezávislé pozorování?

Tab7 a Tab 9: použití hvězdičky ve sloupcích s kombinací lokalit či exploračních typů je velmi matoucí a bylo by pro oddělení faktoru porovnávaných Tukey testem lépe použít pomlčku. Hvězdička se obvykle používá pro interakce, jak je použito v Tab.8)

### Diskuze

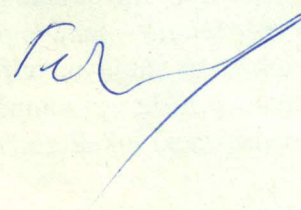
Diskuze je přiměřená tématu a podpořená četnou literaturou a nemám k ní větších výhrad, pouze na str. 44 autor uvádí, že „...nenalezl žádné druhové preference ECM hub a půdních horizontů.“ Analýzu tohoto typu jsem však ve výsledcích nenalezla. Je škoda, že pro tento typ otázek nebyly využity možnosti mnohorozměrné analýzy dat.

Celkově práci hodnotím kladně a nasbíraný dataset je jistě hodnotný a kladně hodnotím práci s literaturou, potenciál sebraného datasetu ale nebyl plně využit a zasluhoval pečlivější statistické zpracování, které v předložené práci působí uspěchaně.

Přes výše uvedené výhrady práci **doporučuji k obhajobě** a v případě kvalitní obhajoby navrhuji hodnotit stupněm **velmi dobře**.

V Českých Budějovicích  
10. 1. 2014

Tamara Těšitelová





<b>Posudek oponenta na diplomovou práci</b>
<b>Jméno oponenta:</b> RNDr. Libor Mrnka, Ph.D. /Botanický ústav AVČR, v.v.i/
<b>Datum:</b> 10.1.2014
<b>Autor:</b> Ing. Ondřej Hejna
<b>Školitelka:</b> Ing. Miloslava Kavková, Ph.D.
<b>Název práce (ČJ):</b> Diverzita ektomykorhizních hub ve vybraných bučinách Blanského lesa
<b>Cíle práce:</b> Nejsou zřetelně definovány. V literárním úvodu autor zmiňuje, že ho zajímá diverzita ECM hub ve stejnověkém bukovém porostu. V závěru pak uvádí, že se snažil identifikovat faktory ovlivňující diverzitu ECM hub.
<b>Struktura (členění) práce</b> Rozsah práce (počet stran): 73 Je uveden anglický i český abstrakt a klíčová slova? <i>ne, pouze stručná anotace</i>
<b>Formální úroveň práce</b> (obrazová dokumentace, grafika, text, seznam literatury) <i>velmi dobrá (text je standardně rozčleněný na oddíly a odstavce, obrázky a grafy přehledně uspořádané a označené, fotografie kvalitní a seznam literatury přehledný)</i>
<b>Logická stavba a jazyková úroveň práce</b> <i>DP je standardně členěná s logicky navazujícími částmi, jazyková úroveň práce je dobrá</i>
<b>Literární přehled:</b> Odpovídá tématu a je logicky členěn? <i>ano</i> Je napsán srozumitelně? <i>ano</i> Jsou použité literární zdroje dostatečné, relevantní a aktuální? <i>ano, autor cituje 114 prací a 4 internetové databáze; literární zdroje jsou relevantní a aktuální</i> Jsou literární zdroje (včetně obrázků) v práci správně citovány? <i>ano</i>
<b>Materiál a metody:</b> Šíře použitých metodik: <i>adekvátní (mikroskopické techniky hodnocení kolonizace, molekulární techniky identifikace ECM hub na základě ribozomální DNA kazety)</i> Odpovídají popsané metody prezentovaným výsledkům? <i>ano</i> Jsou metody srozumitelně popsány? <i>ano (drobné výhrady viz připomínky oponenta)</i>
<b>Experimentální část:</b> Je vysvětlen cíl experimentů? <i>ano</i> Je dokumentace výsledků adekvátní? <i>ano</i> Je množství provedených experimentů dostačující? <i>ano, z hlediska běžného rozsahu DP</i>
<b>Diskuze:</b> Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? <i>ano, byť autor v diskusi zbytečně opakuje řadu výsledků</i> Jsou výsledky porovnávány s literaturou? <i>ano</i> Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? <i>ne</i>
<b>Závěry (Souhrn):</b> Jsou závěry podložené výsledky? <i>Ano</i> Jsou výstižně formulovány? <i>Částečně</i>
<b>Splnění cílů práce a celkové hodnocení:</b> <i>Předložená diplomová práce přispívá k popisu diverzity ECM hub v bukových porostech střední Evropy. Autor v ní prokázal schopnost zvládnout základní i pokročilé techniky související se zpracováním vzorků, jejich mikroskopickou a molekulární analýzou a následným vyhodnocením dat. Získané výsledky byl schopen smysluplně diskutovat se studii jiných autorů. Zda bylo dosaženo cílů nelze jednoznačně posoudit, neboť cíle nejsou v DP explicitně popsány. Pokud jde o popis diverzity ECM hub v dospělém bukovém lese, domnívám se, že zde autor uspěl; pokud jde o určení faktorů ovlivňujících komunitu ECM hub, zde již tak úspěšný nebyl. Neúspěch přičítám zejména zvolenému způsobu</i>



**vzorkování a absenci analýz faktorů prostředí. Výhrady ke konkrétním částem DP uvádím níže v otázkách a připomínkách. Celkově hodnotím diplomovou práci Ing. Ondřeje Hejny jako odpovídající požadavkům na DP kladeným a doporučuji ji k přijetí.**

**Otázky a připomínky oponenta:**

1. Autor zmiňuje obecně pozitivní vliv vyšší druhové bohatosti ECM hub na jejich hostitelské rostliny (str. 10), a dokládá to pracemi Jonssonové a kol. (2001) a Baxter and Dighton (2001). Nicméně práce Jonssonové a kol. jasně ukazuje, že tento vliv je závislý na kontextu (živinové poměry a identita hostitelské rostliny) a může být i negativní. Ani druhá citovaná práce neprokazuje jednoznačně pozitivní vliv zvýšené druhové diverzity na hostitele (*Betula populifolia*). Autoři studie sice pozorovali pozitivní korelaci diverzity ECM hub s biomasou kořenů, ale negativní s nadzemní biomasou. Podobně ani v případě arbuskulárně mykorhizních hub a travního ekosystému se na produktivitě a diverzitě rostlin nepodílela ani tak diversita AMF sama o sobě, jako identita určitých AMF, které byly za daných podmínek schopné podpořit produktivitu rostlin (Vogelsang a kol. 2006 v *New Phytol.* 172:554-)
2. Na stejné straně (10) také autor cituje práci Simardové a kol. (1997) pojednávající o myceliálních sítích vzájemně propojujících různé rostliny (CMN) a umožňující transport asimilátů a minerálů mezi různými rostlinami v rámci jedné CMN. Toto je skutečně pozoruhodný fenomén s mnoha implikacemi pro naše porozumění vzájemných interakcí rostlin a hub (Selosee a kol. 2006 v *Trends Ecol. Evol.* 21:621-), ale nakolik je mi známo, dosud jsou doklady o skutečné funkčnosti takovýchto sítí *in situ* (nikoli v laboratorních podmínkách) skromné a na místě je tudíž zdrženlivost v dedukcích významu CMN.
3. Na str. 13 cituje autor práci Cullings a kol. (2000) coby doklad o užší vazbě listnáčů s konkrétními ECM houbami a naopak spojení jehličnanů s širším spektrem ECM hub. Nicméně v citované práci se mi oporu pro toto tvrzení nepodařilo nalézt.
4. Na téže straně (sekce 1.6.2) autor zmiňuje, že „Některé druhy ECM hub jsou vázány jen na semenáčky, jiné naopak na dospělé stromy.“ Ačkoli různá preference hub vůči hostitelským rostlinám různého stáří (či naopak) je známa, nejsem si vědom toho, že by existovaly druhy ECM hub vázané výhradně na juvenilní stadia rostlin. Prosím o doplnění citace.
5. Za závažný nedostatek DP považuji absenci jasně definovaných cílů, a z toho plynoucí nemožnost posoudit nakolik byly cíle splněny. Jak je uvedeno v sekci 2.1. (Výběr lokalit) na str. 16, vzorky byly odebrány na třech lokalitách v Blanském lese. Tyto se vyznačovaly podobně starým porostem bukové monokultury, praktickou absencí podrostu, podobnou nadmořskou výškou a mírným svahem. Domnívám se, že pro zjištění vlivu různých faktorů prostředí by bylo optimálnější zvolit gradient jednoho či více faktorů a ne vybírat co nejpodobnější lokality. I přes výběr podobných lokalit měl autor provést analýzu těch faktorů prostředí, jejichž vliv považuje potenciálně za závažný (např. půdní analýzy, množství srážek, teplotu, diverzitu rostlin apod.) a poté statisticky testovat korelaci těchto faktorů se změnami komunity ECM hub. Takto byly testovány pouze vliv půdního horizontu, lokality a roku sběru, čímž se autor připravil o možnost zjistit, co přítomnou komunitu ECM hub dále ovlivňuje.
6. Na str. 17 (sekce 2.2) autor popisuje sběr vzorků, z něhož však není zřejmé, jaká byla velikost pomyslné sítě odběrových bodů a tudíž jak byly tyto vzdáleny. Nenalezl jsem také údaj kolik ektomykorhizních špiček bylo celkem analyzováno a jaká byla kolonizace kořenů buku ECM houbami na jednotlivých lokalitách v jednotlivých letech. Prosím o doplnění těchto údajů.
7. Autor zmiňuje dělení půdního horizontu na organický a minerální a uvádí, že vzorky



byly odebírány do hloubky 15 cm (str. 17, sekce 2.2). Byl na zkoumaných lokalitách půdní profil shodný? Jaká byla hloubka organického horizontu? Byla před odběrem vzorků odstraněna vrstva opadu? O jaký půdní typ šlo?

8. Autor v metodice (sekce 2.4. a 2.5, str. 19-23) zmiňuje, že na základě morfologických kritérií mykorhiz a jejich srovnáním s dostupnými databázemi a články rozlišil jednotlivé rody případně druhy ECM hub. Později zástupce mikroskopicky rozlišených morfotypů charakterizoval molekulárně (sekce 2.6.1., str. 23). Chybí informace o počtu sekvenovaných špiček z každého morfotypu. Jak autor řešil situaci, pokud v rámci stejného morfotypu našel na základě molekulární analýzy více druhů?
9. Graf 15 (str. 31) představuje grafické vyjádření části dat zmíněných v tab. 1 a jako takový je redundantní.
10. Autor zmiňuje (str. 32), že před vlastním testováním faktorů s pomocí „ANOVA repeated measures“ testoval, zda data splňují podmínku normality. Testoval také, zda data splňují podmínku homogenity rozptylů?
11. Pod obr. 16 a 17 (str. 33) uvádí autor podrobné hodnoty. Ovšem rozdíly jsou patrné z grafu a jsou doloženy statistické signifikance. Nevidím tedy důvod uvádět přesné hodnoty pod grafem a není to obvyklé. Pokud autor považuje přesné hodnoty za důležité, doporučuji je vložit do grafu nebo prezentovat data formou tabulky, což je nicméně méně ilustrativní pro čtenáře.
12. Autor se vyjadřuje k druhové bohatosti ECM hub a srovnává své výsledky s dalšími studii v ekosystémech bučin (str. 42, sekce 4.1) Dochází k závěru, že nižší počet jím nalezených druhů ECM hub souvisí s odběry vzorků provedenými pouze na podzim. Aby bylo možné posoudit, nakolik použité vzorkování pokrývá přítomnou komunitu ECM hub, viděl bych jako vhodné doplnit výsledky akumulacími druhovými křivkami (rarefaction curves) pro všechny lokality a zároveň pro každou zvlášť. S tím souvisí autorova poznámka na str. 3, kde tvrdí, že "*není v podstatě možné podchytit ani kvalitativně a ani kvantitativně diverzitu ECM hub u vzrostlých stromů*". S tímto tvrzením se neztotožňuji, protože diverzitou ECM hub u dospělých stromů (porostů) se zabývá obrovské množství prací. Autor se patrně snažil poukázat na obtížnost charakterizace ECM společenstva na kořenech vzrostlých stromů, které zahrnují miliony kořenových špiček a celou řadu mikroprostředí okupovaných odlišnými houbami. Velmi silně to podtrhuje potřebu dostatečně rozsáhlého vzorkování a také vhodných statistických metod pro hodnocení výběrů populací. Nicméně práce (např. Stefani a kol. 2009 v Appl. Environ. Microbiol. 75:7527-), jejichž extenzivní vzorkování vedlo téměř k saturaci akumulacími druhových křivek dokládají, že zachytit diverzitu ECM hub u dospělých stromů (porostů) možné je.
13. S ohledem na autorem pozorované odlišnosti v komunitě hub mezi roky 2012/2013 a dominanci houby *Cenococcum geophilum* s deklarovanou odolností vůči stresu suchem v druhém ze sledovaných let, jsou k dispozici nějaká srážková data ze zkoumaných lokalit popř. z blízké stanice ČHMÚ? Může autor diskutovat (např. ve světle jím uváděné publikace di Marino a kol. 2008) nakolik se na odlišné komunitě ECM hub mezi lokalitami mohla projevit různá světová orientace odběrové plochy?
14. publikace Klopatek a spol. není správně abecedně řazena (str. 50)

**Návrh hodnocení oponenta:**

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

