

Oponentský posudek diplomové práce Bc. Jitky Bradáčové  
"Aspekty reprodukční biologie mechu *Helodium blandowii*"  
předkládané k obhajobě na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

Předkládaná diplomová práce se zabývá studiem reprodukční biologie, populační genetiky a okrajově rovněž populační dynamiky ohroženého druhu mechorostů *Helodium blandowii*, jenž reprezentuje ze středoevropského hlediska vzácný a ohrožený biotop rašelinišť. Ačkoli nejsem bryolog, výsledky práce, zejména část zabývající se genetickou variabilitou druhu, mi přijdou zajímavé a s velkým potenciálem pro navazující výzkum. Podrobnější posouzení významu práce pro výzkum v oblasti bryologie ale ponechám kolegům bryologům a zaměřím se spíše na metodické, stylistické a obecně biologické otázky.

Samotná práce bohužel trpí celou řadou formálních nedostatků, které svědčí o překotnosti, s jakou vznikala, a kterým by bylo možné zabránit, vyšetřila-li by si autorka více času na závěrečnou kontrolu. Nejvíce je to asi vidět na seznamu citované literatury, kdy jedna v textu citovaná práce zde chybí (Ares et al. 2014 [s. 8, ř. 5]) a naopak některé práce ze seznamu literatury nenalezneme v textu (Goldberg & Mogensen 2006, Sabovljević et al. 2008). Nejednotné je rovněž psaní velkých písmen v holandských předponách "van der", chybné je uvedení citace Albrecht et al. (2003) v seznamu literatury (kde je potřeba vždy vyjmenovat všechny autory a ne psát "Autor et al.") a nesprávná je citace práce Koressaar et al. (2007), kdy správně má být Koressaar & Remm (2007), jelikož se jedná jen o dva autory (s. 24, ř. 11), či zdvojení citace Parsons et al. (2007) v seznamu literatury.

Nutno však podotknout, že kvapnost a dopisování na poslední chvíli jsou obvyklými nešvary většiny diplomových prací, které nijak neovlivňují kvalitu výstupů, a jejich význam pro hodnocení předkládané práce by se proto neměl přeceňovat. Autorku je naopak potřeba pochválit za naprosto minimální výskyt překlepů a pravopisných chyb, což je jev u (nejen) diplomových prací stále vzácnější...

V Úvodu mi jako celkem zdařilé přijdou úvodní kapitola o příčinách ohrožení rašelinišť v Evropě a o stavu poznání ohrožených hnědých mechů a první kapitola 1.1 (mylně číslovaná jako 1.2) charakterizující studovaný druh *Helodium blandowii*. Ostatní tři kapitoly Úvodu však dobrý dojem poněkud kazí. V každé z nich je rozebrán nějaký obecný problém týkající se mechorostů, nikde však tyto otázky nejsou dány do souvislosti se studovaným druhem či studovaným biotopem. Čtenář se tak sice dozví, že vegetativní částice mechorostů mohou přenášet hraboši a křečci či že povrch tobolky mechorostů lze snadno dezinfikovat, ale důvod, proč zde tato fakta autorka zmiňuje, již zůstává čistě na jeho fantazii. Jediná trochu relevantnější informace je, že hnědé mechy bývají oproti rašeliníkům při obnově rašelinišť neprávem opomíjeny. Bystrý čtenář si sice nejspíše domyslí, že všechna tato fakta jsou zde zmiňována proto, že autorka plánuje zkoumat nepohlavní rozmnožování, regeneraci a genetickou strukturu studovaného druhu *Helodium blandowii*, ale bylo by dle mého názoru lepší na konec každé kapitoly zařadit odstavec, který rozebere danou problematiku v kontextu hnědých mechů či přímo studovaného druhu. Zvláštní pozornost by si pak podle mě zasloužily poslední dva odstavce kapitoly 1.4 "Genetická struktura populací mechorostů", kde se autorka snaží shrnout molekulární metody používané pro studium populační genetiky mechorostů. Stávající struktura těchto odstavců je taková, že autorka postupně zmiňuje několik málo metod genetických analýz a k nim vždy zmíní jednu dvě práce a tu a tam nastíní nějaké výhody či nevýhody té které metody, ovšem výsledek je dosti polovičatý. Mnohem přínosnější by bylo přehled populačně-genetických metod používaných u mechorostů rozšířit, případně doplnit větším množstvím příkladových prací, a hlavně jasně formulovat výhody a nevýhody dané metody pro studium mechorostů a nakonec zdůvodnit, proč autorka pro studium svého druhu zvolila právě metodu SSR.

Za největší problém celé práce však považuji kapitoly Metodika a Výsledky. Popis metodiky v každé odborné práci by měl být takový, aby byl podle něj kdokoli schopen dané analýzy či experimenty zopakovat, což zde však splněno není. Popisy prováděných experimentů jsou ledabylé a vysvětlení statistických testů nedostatečné. Konkrétně:

Kap. 2.2.1 "Regenerace úlomků větviček v terénu" – Ačkoli autorka vcelku srozumitelně vysvětluje, jaké typy lineárních modelů bylo potřeba použít pro vyhodnocování toho kterého typu dat, srozumitelný popis toho, jaké proměnné byly v kterém modelu použity, chybí. Z předchozího textu sice čtenář vytuší, že závislou proměnnou byl v jednom případě počet rostoucích lodyžek a v druhém případě jejich průměrná délka, jaké proměnné byly ale použity jako nezávislé? U prvního testu je v textu pouze uvedeno, že jako kategoriální nezávislá proměnná byl použit čas. U druhého testu je zas pouze uvedeno, že číslo čtverce bylo použito jako faktoriální nezávislá proměnná s náhodným efektem. Znamená to snad, že v prvním testu nebyl zahrnut vliv čtverce a ve druhém testu že nebyl testován vliv času? Jelikož v metodice je uvedeno, že do jednoho gapu byly umístěny větvičky o délce 1 cm a do druhého o délce 0,5 cm, lze předpokládat, že délka větviček v testech rovněž vystupovala jako testovaná proměnná, o tomto však v metodice není ani zmínka. Část pravdy čtenář sice odhalí pohledem na tabulky s hodnotami statistických testů v kapitole Výsledky, ale to už je pozdě, toto má být napsáno v metodice. Jako blesk z čistého nebe pak působí



informace o tom, že byl testován vliv hladiny podzemní vody na růst úlomků. Proč toto není zmíněno v cílech práce? Naopak naprosto zbytečně je v metodice rozebíráno, kolika jak barevnými kolíky autorka vytyčovala pokusné plochy.

V kap. 2.2.2 "Regenerace v klimaboxu" je čtenářova psychická odolnost zkoušena hned ve třetím odstavci, kde autorka uvádí, že z každé lodyžky byl odstřižen "1 cm koncové části lodyžky zbavené větví, 1 cm postranní větvičky s koncovou částí, 0,5 cm koncové části postranní větvičky a 0,5 cm postranní větvičky bez koncové části". Postavení jednotlivých částí na lodyžce je sice znázorněno na obr. 9, ale používání podobných komplikovaných výrazů rozhodně neprospívá čitelnosti textu. Pro příště bych doporučoval odkazovat na podobné pojmy pod zkratkami, tedy např. tak, jak je použito u obr. 21. K dokonalosti pak čtenářovu zmatenost dovede věta na konci str. 17: "Tímto postupem byly porovnány délky všech typů úlomků v prvních třech měřeních, úlomků větvíček v prvních třech měřeních a 0,5 cm dlouhé fragmenty větvíček ve všech čtyřech měřeních." Proč byly dělány tři testy pro jeden typ dat? A proč byly některé typy úlomků sledované po dobu čtyř měření a některé jen po dobu tří? To se čtenář nedozví... Rovněž by bylo vhodné hodnoty všech statistických koeficientů zaokrouhlit na jednotný počet desetinných míst a nesmyslné hodnoty typu  $p = 7,466 \cdot 10^{-12}$  přepsat na  $p < 0,001$ .

Kap. 2.2.3 "Růst předpěstovaných lodyžek v terénu" víceméně opakuje nešvary z kap. 2.2.1. Čtením těchto kapitol otrlého čtenáře už ani nepřekvapí, že kromě konstatování, že čas byl zařazen jako kategoriální proměnná, se o uspořádání statistických testů nedozví zhora nic.

Kap. 2.4 "Genetická struktura populací" je naproti tomu psána vcelku přehledně a čtivě. Jako drobnou výtku bych jen zmínil, že v části věnující se vývoji SSR markerů by bylo vhodné metodiku více rozvést (např. z jakého vstupního množství DNA byla vytvořena obohacená knihovna, jaké sondy byly pro to použity, kolik readů se podařilo získat apod.). Zmatek rovněž panuje v označování fixačního indexu, který, byl-li počítán se zahrnutím stepwise mutačního modelu, měl by být označován  $R_{ST}$ , nikoli  $F_{ST}$ , v textu jsou však obě dvě označení náhodně promíchána. Matice genetických vzdáleností pro PCoA pak byla nejspíše počítána tzv.  $(\delta\mu)^2$  distancí, což není to samé jako  $R_{ST}$  statistika, tento pojem ale nikde v textu zmíněn není.

Autorku je potřeba naopak výrazně pochválit za provedení kapitoly Diskuze, která je opravdu diskuzí, tedy ne pouhým shrnutím zjištěných faktů, nýbrž rozebráním jednotlivých výsledků ve světle jiných studií a pokusem o interpretaci zjištěných skutečností. Toto je jev v mnoha diplomových pracích nevidaný a do značné míry neguje špatný dojem z předchozích kapitol předkládané práce.

Předkládaná práce, dle mého názoru, splňuje požadavky kladené na diplomovou práci, a to včetně publikovatelných výsledků (už teď zde vidím data na minimálně dva impaktované články, což stále ještě není u diplomových prací standardem), a proto ji rozhodně **doporučuji k obhajobě**. Vzhledem k výše zmíněným nedostatkům však doporučuji práci klasifikovat stupněm **velmi dobře**, a to pouze v případě úspěšné obhajoby a uspokojivého zodpovězení následujících konkrétních otázek:

- 1) Mohla by autorka uvést jasný a srozumitelný přehled všech použitých statistických testů? Ke každému testu je nutné uvést nejen, jakým modelem byl počítán, ale konkrétně, jaké proměnné vystupovaly jako vysvětlované, jaké jako vysvětlující, jaké mezi nimi byly interakce, měly-li náhodný či pevný efekt a jak byly případně transformovány. Osobně bych rovněž ocenil uvedení konkrétních příkazů, kterými byly testy počítány, či originálních výstupů z programu.
- 2) Autorka uvádí, že pro statistické analýzy musely být vyřazeny plochy, kde zkoumaný druh v průběhu pokusu vymizel. Tento krok mi přijde logický v případě měření délky lodyžek, nevidím však důvod plochy s nulovými hodnotami vyřadit tam, kde byly zjišťovány změny počtu lodyžek. V tomto případě mi naopak přijde, že dochází ke ztrátě dat a zkeslení výsledků. Proč se autorka k tomuto kroku rozhodla? A mohla by uvést výsledky testů spočtené bez vyloučení nulových hodnot?
- 3) Fascinuje mě použití jednonukleotidové repeticity v SSR lokusu AC9. Jelikož vím, jaké jsou obtíže se čtením sekvencí s výskytem delších polyN úseků, zajímalo by mě, jak se to dařilo autorce. Mohla by autorka předvést originální sekvence tohoto úseku, pokud možno reprezentující různé alely?
- 4) Ve výsledcích PCoA zaujme, že jedna ze skandinávských populací (O3) je geneticky blíže populacím českým než ostatní skandinávské populace a zároveň česká populace S se klastruje s populacemi skandinávskými. Autorka se tyto rozpory v textu snaží svalit na nedostatečné množství dat či homoplázií. Mohla by se zamyslet nad tím, není-li možné jiné vysvětlení, a případně ho prezentovat? Bylo by možné vedle PCoA diagramu znázorňujícího 1. a 2. osu rovněž ukázat 1. a 3. osu a ukázat oba dva diagramy rovněž pro genetické vzdálenosti mezi jedinci?

Mgr. Pavel Kúr



## Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Jitky Bradáčové (České Budějovice 2014)

Autorka Jitka Bradáčová předložila diplomovou práci „**Aspekty reprodukční biologie mechu *Helodium blandowii***“. Práce se na 66 stranách (+ 24 stranách tištěných příloh) věnuje v první části sledování regenerace druhu *Helodium blandowii* z vegetativních fragmentů v manipulativních pokusech ex situ a in vitro a v druhé části zkoumá populační genetickou strukturu druhu pomocí studia mikrosatelitů. Autorka se zaměřila na všechny recentní populace v ČR (5 lokalit), ke kterým pro účely studia populační struktury připojila vzorky ze severní Evropy. Design a vývoj vhodných mikrosatelitních primerů je součástí práce. Primární data autorka statisticky zpracovala pomocí zobecněných lineárních modelů, Kruskal-Wallisova testu a standardních postupů populační genetiky (počty alel, indexy diverzity, AMOVA, genetická diferenciace, PcoA, korelace genetické a geografické vzdálenosti, autokorelační analýza). Konkrétní typy analýz jsou dobře zvoleny vzhledem k charakteru dat.

Struktura práce je přehledná, obsahuje všechny standardní části. Autorka byla schopna jasně formulovat cíle práce. Práce je psána spisovným kultivovaným jazykem, drobné překlepy a chyby formátování se vyskytují vzácně. Práci doprovázejí četné grafy a tabulky. Text je srozumitelný, i když místy je náročné sledovat autorčinu nit myšlenek a orientovat se ve výsledcích, vzhledem k velkému množství dělaných testů.

Autorka ve své práci ukázala schopnost zpracovávat informace z odborné literatury, pronikla do problematiky zakládání a vyhodnocování transplantačních experimentů a do studia DNA mechorostů. Studovaná literatura je obsáhlá a zahrnuje práce v českém, anglickém, ruském i německém jazyce. Použité literární zdroje jsou více než dostatečné. Literární rešerše je zpracována precizně a srozumitelně vysvětluje pozadí potřebné pro pochopení studované problematiky, diskuze je dostatečná, zohledňuje nejnovější studie na související témata a odpovídá standardům vědecké práce.

Předkládanou práci považuji za velice zdařilou, autorka dokázala pomocí zvolené metodiky detailně prozkoumat témata, která si zvolila a vnést nové informace do této problematiky. Autorka prokázala schopnost samostatné vědecké práce a syntézy výsledků.

Práci jednoznačně doporučuji k obhajobě. Navrhuji hodnocení **výborně**.

K práci mám dále tyto dotazy do diskuze:

1. Jak často je druh v ČR plodný? Myslíte, že by bylo vhodné se zabývat i schopností spor klíčit či frekvencí tvorby sporofytů, abychom získali celkovou představu o schopnostech druhu se rozmnožovat? Jaké nové informace bychom tím mohli získat?
2. Podle čeho jste zvolila velikost fragmentů? Rozdíl mezi 0,5 cm a 1 cm mi přijde vzhledem k velikosti rostliny téměř zanedbatelný.
3. Větvičky do pokusné plochy jste vsypala náhodně nebo byly fragmenty poté nějak rozmístěny, aby se nepřekrývaly a byl zajištěn jejich dostatečný kontakt se substrátem?
4. Dokáže rostlina regenerovat i z ulomených samostatných lístečků?
5. Jaký vliv mělo na fragmenty trvalejší zatopení na plochách s vysokou hladinou vody?
6. Prosim vysvětlete lépe důvod pro zařazení času jako kategoriální proměnné.
7. Jaký důvod máte pro rozšíření zkoumaných typů fragmentů kultivovaných v klimaboxech? Nestačilo by vzhledem k cíli (porovnat jejich růst s terénním pokusem) použít pouze fragmenty 0,5 cm a 1 cm z lodyžek? Přineslo zkoumání dalších typů fragmentů nějaké rozšiřující informace? Shrňte nejdůležitější rozdíly mezi regenerací fragmentů v klimaboxech a terénních plochách.
8. Proč jste zvolila velikost čtverce pro sledování dynamiky porostu velikost 2x2 m? Nebylo by lepší vybrat jednotlivé trsy, které se vejdou např. na A3, což by umožnilo přesnější



- zakreslení a udělat více opakování?
9. Ve výsledcích je měření 100 rostlin průtokovou cytometrií, avšak v metodice o tom nenacházím ani zmínku.
  10. PcoA – oddělení severských populací versus české na první ose mi nepřijde příliš přesvědčivé, napadá Vás jiný důvod rozdělení? Pokud by člověk vynesl do grafu jednotlivé vzorky – tvořily by oddělené shluky pro jednotlivé lokality?
  11. Které druhy jsou hlavními konkurenty druhu *Helodium blandowii*?
  12. Příloha 2 – „Počet“ znamená množství žijících či počet rostoucích fragmentů? Jde mi o pochopení, když v jednom měření je počet 0 a v dalším 5, zda se objevily nové fragmenty, které tam dosud nebyly nebo to jsou ty ze založení pokusu, které začaly růst.
  13. Jaký máte názor na spontánní schopnost druhu regenerovat v přirozených podmínkách – uvádíte, že růst druhu je závislý na kompetici s ostatními druhy, avšak volných gapů se v dobře zavodněném rašeliništi vyskytuje minimum, zvláště pokud je v iniciálních stádiích růstu ostatními druhy přerůstán. Má tedy šanci se nějak samovolně šířit a rozrůstat?
  14. Jak si dokážete představit praktickou aplikaci zjištěných výsledků? Bylo by možno na základě těchto pokusů vytvořit metodiku pro návrat druhu do našich rašelinišť?

Minoritní poznámky, na které není potřeba reagovat:

15. Definice termínu „gap“ se vyskytuje až po několikerém použití tohoto termínu – vhodné dát hned k prvnímu výskytu.
16. Běžnější způsob odkazování na tabulky a obrázky je (Obr. XX) (Tab. XX) bez „viz“.
17. Identifikaci lokalit do popisku bych přidala tam, kde je tato informace zásadní pro pochopení obrázku či tabulky (např. Obr. 34, 35, 37, či alespoň první z nich), aby čtenář nemusel složitým listováním někde na začátek hledat příslušnou tabulku s popisky.
18. Diskuze obsahuje velice obsáhlé množství studovaných zdrojů. Nemyslím, že je nutné všechny zmiňovat, např. nenacházím důvod podrobněji řešit tropický druh *Acanthorrhynchium papillatum*, který patří do jiné taxonomické i ekologické skupiny.
19. V některých pasážích diskuze bych volila spíše krátkou syntézu výsledků citovaných prací než detailní rozbor co kdo zjistil (např. p. 48 ods.1).
20. V seznamu literatury je 2x uveden Parsons et al. (2007).
21. Informaci o přítomnosti detailnější přílohy je možné vložit i do textu (Příloha XX) – čtenář se může rovnou podívat do rozšiřujících dat (např. na jednotlivé obrázky u sledování dynamiky porostu).
22. Příloha 5 a 6 nepřehledná – chybí vysvětlivky co je délka 1–4, kódy člověk musí zpátky dohledávat a pokud si to nepamatuje tak ani neví kde, ... – doporučuji tvořit spíše „samovysvětlující“ tabulky, kde v popiscích člověk nalezne vše potřebné pro pochopení obsahu tabulky.

9.1.2015

Mgr. Eva Mikulášková. Ph.D.  
Ústav botaniky a zoologie  
PřF, MU Brno