

- Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Petry Ebermannové **Vybrané aspekty ekologie *Pedicularis sylvatica*.**

Cílem předložené diplomové práce bylo studium některých aspektů biologie poloparazitického druhu *Pedicularis sylvatica*. Jedná se obecně o zajímavé téma, které je v současnosti atraktivní a slibovalo pěkné a publikovatelné výsledky. Bohužel musím hned na začátku konstatovat, že magisterská práce zůstala daleko za svým potenciálem. Na třiceti stranách textu a šesti stranách příloh zpracovává tři dílčí témata (spektrum hostitelů, klíčení druhu a uchycování semenáčů, vliv poloparazitického druhu na společenstvo). Ovšem žádné z nich se autorce nepodařilo pevně uchopit a zpracovat do hloubky.

Obecně považuji za vážný nedostatek práce špatnou práci s literaturou a vlastním textem: neodpovídající názvy kapitol (např. celý první odstavec kapitoly „Vliv na společenstva“ se věnuje haustoriu), nepromyšlená stavba odstavců, myšlenky opakované na několika místech (např. v úvodu vazba poloparazitů na oligotrofní stanoviště), nejasné formulace, nepřilíš přesná interpretace zdrojů, tvrzení nepodložená citacemi (např. mortalita semenáčů ve fázi růžice na str. 1/2), používání nepřilíš vhodných literárních pramenů (pro biotop citován Dostál 1989, zatímco Hrouda in Slavík 2000 není v literatuře vůbec). Jako perličku lze zmínit citace Checklistu (Danihelka et al. 2012). V žádném případě to není literatura dokládající výskyt ostříc na Ohrazení nebo výskyt *Dactylorhiza majalis* na Zubří. Také formulace „Všechny jména rostlin byly upraveny podle Danihelky (2012)“ by se lépe hodila do kulinářské literatury, ovšem kdyby byla gramaticky správně. Za nejzávažnější nedostatek však považuji, že nejsou vůbec citovány práce (bakalářská i magisterská) Marty Petru, která se tématu před lety na katedře věnovala a dokonce ani její článek, který se po zadání *Pedicularis sylvatica* do WOS objevuje na pátém místě v pořadí – Petru M. (2005): Year-to-year oscillations in demography of the strictly biennial *Pedicularis sylvatica* and effects of experimental disturbances. *Plant Ecology* (2005) 181: 289–298. A další článek přímo z Ohrazení: Petru M. et Lepš J. (2000): Regeneration dynamics in populations of two hemiparasitic species in wet grasslands. *Proceedings IAVS Symposium*: 329–333.

Metodická část práce je psána nejasně, řadu informací o metodice se čtenář dozví až ve výsledcích či diskusi, řada důležitých informací zůstává utajena zcela. Proto je můj posudek plný dotazů.

Výzkum hostitelského spektra

Má autorka představu jak daleko a hluboko kořeny studovaného druhu zasahují? Není sonda o poloměru 5 cm příliš úzká? Nelze předpokládat, že ve větší vzdálenosti od rostliny bude na tenčích kořenech počet haustorií vyšší? Do jaké hloubky byly vzorky odebrány? Určuje tuto hodnotu rozměr d, který je uveden až v Diskusi nebo je to jen jiné označení pro poloměr sondy? Kolik sond bylo nakonec rozebráno? Z metodiky plyne, že odebráno bylo 65 sond, avšak ve výsledcích se píše, že ne všechny byly použity pro zjišťování hostitelského spektra. Kdy byly vzorky odebrány, v jaké vývojové fázi a jak velké byly rostliny? Byly zjištěny nějaké rozdíly mezi semenáči a dospělými rostlinami. Jaký byl předpoklad?

Molekulární analýza hostitelů

Jakým způsobem byly vzorky hostitelských rostlin uchovány před izolací DNA i po ní? Byly nějak rychle vysušeny a uchovány v silikagelu, v mrazáku či volně za pokojové teploty? Za jak dlouho byla izolace provedena? V diskusi se dočteme, že doba mezi izolací a amplifikací se výrazně lišila u vzorků z různých lokalit, stejně jako úspěšnost PCR. Proto jsou všechny tyto informace důležité a patří do metodiky.

Nezabýval jsem se sekvenováním takto obtížného materiálu a ani tímto typem barcodingu. Mé zkušenosti se sekvenováním normálních rostlinných vzorků však budí silné podezření, že optimalizaci podmínek PCR nebyla věnována dostatečná pozornost. Z metodiky je jasné, že se testovaly různé primerové kombinace. Testovaly se ale také různé reakční podmínky? Skutečně probíhala PCR chloroplastového i jaderného úseku za stejných reakčních podmínek? Proč se rovnou změnila metoda izolace i testovaný úsek? Nezkoušela se purifikace PCR produktů před sekvenací?

Přesně nechápu, jak úspěšná byla amplifikace vzorků pro vlastní srovnávací databázi. Kolik potenciálních hostitelů v ní bylo spolehlivě osekvenováno? Byly v ní všichni nebo se ani z listového materiálu nepodařilo amplifikovat chloroplastový úsek u čeledi *Cyperaceae*? Píše se o srovnávací databázi J. Košnara. Ta pocházela z jiného projektu? Pokud v ní byly všechny hostitelské druhy, nechápu, proč byl pro sezónu 2015 zvolen jaderný úsek, pro který byla zřejmě vlastní srovnávací databáze velmi omezená.

Nechápu jasně, jakým způsobem byly získané sekvence editovány a srovnávány. Nevím, jak byla aplikována metoda „similarity method Blast“. To, co jsem se dočetl v metodice, však ve mne nebudí důvěru. Práce citované v souvislosti s 97% podobností sekvence se věnují bakteriím a houbám, kde je to pochopitelné. U cévnatých rostlin je však variabilita podstatně nižší a shoda by měla být téměř úplná. Mohla by autorka vysvětlit, jak reálně probíhalo srovnávání? Nerozumím také formulaci, že identifikaci hostitele u málo kvalitních sekvencí umožnila kombinace similarity method a hierarchického klastrování. Jak může být například na základě 90% shody spolehlivě určena *Carex panicea*, když se na lokalitě vyskytuje několik dalších druhů ostřic, které mají pravděpodobně ITS sekvenci velmi podobnou? Pozoruhodně působí také pouze 80% shoda u *Pedicularis sylvatica* nebo 86% shoda u *Anhoxanthum odoratum*.

Srovnání fytoocenologických snímků

Nerozumím srovnání fytoocenologických snímků získaných v okolí odebíraných kořenových sond se snímky z České národní fytoocenologické databáze (ČNFD). Proč tato část není vůbec uvedena v metodice? Jaký byl její smysl? Lze srovnávat kruhové snímky o poloměru 15 cm s normálními fytoocenologickými snímky z databáze? Jaká stupnice byla použita při stanovení pokryvnosti druhů v těchto kruhových snímcích? Stejná jako v dalších experimentech? Nevěřím, že lze odhadovat pokryvnost druhů v rozsahu 1–15% s přesností na 1%. Či snad na to byla vyvinuta nějaká sofistikovaná metoda? Jak byly snímky z ČNFD vybrány? Byly to všechny snímky s *Pedicularis sylvatica* nebo jen snímky určitého společenstva? Která charakteristika ukázala, že je lokalita Zubří podobnější snímkům z ČNFD?

Úspěšnost výsevu

Kdy bylo provedeno odečítání počtu semenáčků na lokalitě Zubří? I pro lokalitu Ohrazení by bylo žádoucí uvést přesný datum a nikoliv jen měsíc. Co jsou hodnoty vynesené do obr. 11 (průměr, medián)? Jak lze vysvětlit, že na lokalitě Zubří nebyl rozdíl průkazný?

Biomasa

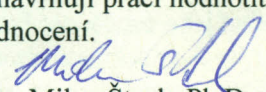
Proč při studiu biomasy nebyl odebrán i všivec? V dalším experimentu byl přímo vyplet, proto nevidím důvod, proč by nebylo možno jeho biomasu odebrat i pro tento experiment. Lze nějak smysluplně interpretovat výsledek, že na ploše se všivcem je biomasy ostatních druhů méně než veškeré biomasy na ploše kde všivec neroste?

Vliv všivce na rostlinné společenstvo – plecí experiment

Podle mého názoru je jediným logickým vysvětlením nezdařeného experimentu nevhodná doba pletí. Kdy byl tento zásah proveden? V metodice to uvedeno není. Je tam napsáno, že experiment byl zahájen v květnu 2014. Má to snad být doba pletí? Pak byla zcela nevhodná vzhledem k době klíčení a vývoje semenáčků, které ještě nemohly být pořádně vidět. Úsměvně působí věty v diskusi, které chtějí vysvětlit neúspěch tohoto experimentu nedostatečnou konkurencí „dalších poloparazitů“ na opomenutý velmi malý semenáček či snazším přehlédnutím semenáčků kvůli roku s větší kohortou.

Co je na obrázku 13 na ose y? Je to skutečně logaritmus pokryvnosti+1? V jakých jednotkách pak byla pokryvnost uvedena?

Závěrem konstatuji, že předložená práce přináší řadu námětů pro studium druhu *Pedicularis sylvatica*. Oceňuji jistě pracnou přípravu preparátů haustorií, jejíž výsledky jsou podle mne nejpřínosnější částí práce. Avšak vzhledem k většímu množství nedostatků a metodickým nejasnostem navrhuji práci hodnotit stupněm dobře. Pouze za předpokladu excelentní obhajoby bych uvažoval o lepším hodnocení.


ing. Milan Štech, Ph.D.
Křenovice, 10.1.2016

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Petry Ebermannové „Vybrané aspekty ekologie *Pedicularis sylvatica*“

Předložená práce se zabývá ekologií poloparazitického druhu *Pedicularis sylvatica*. Autorka v ní identifikuje hostitelské spektrum cílového druhu, zkoumá, jak druh reaguje na narušení porostu a jak ovlivňuje hostitelské společenstvo. Problematika je studována komplexně a inovativními metodami. Čenná a metodicky náročná je zejména identifikace hostitelů, která kombinuje molekulární metody a analýzu anatomie haustoria. Práce je psaná, až na některé výjimky, jasným a srozumitelným jazykem.

Úvod vhodně a stručně zasazuje práci do problematiky a vysvětluje motivaci pro provedení výzkum. Autorka v něm jasně definuje cíle práce. Popis použitých metod je povětšinou jasný, ale některé nesrovnalosti se najdou. Například v kapitole 3.2.6 (str. 12) není jasné jaké pozorování má autorka v první větě na mysli a v kapitole 4.2 (str. 15) není jasný význam první věty druhého odstavce („Několik sekvencí...“). V některých případech jsou informace příliš podrobné. Například v kapitole 3.2.5 není třeba uvádět, že zátky použité ke značení ploch byly pivní. Pro čtenáře je podstatné, že byly kovové a proto dohledatelné detektorem kovu. Získaná data autorka vyhodnotila vhodnými statistickými metodami.

Kapitole výsledky bych vyčetl především to, že začíná metodickými věcmi, které měly být uvedeny v kapitole předchozí. Práce s Českou národní fytoecologickou databází není dříve zmíněna. V obrázku 8 není jasné, co znamená počet sekvencí a jak vypovídá o četnosti haustorií. Tabulka 7 není příliš informativní a závěr z ní je vhodnější uvést v textu práce.

Za nejslabší část práce považuju kapitolu 6 Diskuse. Autorka se zde zabývá především metodickými problémy výzkumu. Tyto informace jsou cenné, ale neodpovídají výše definovaným cílům práce, které jsou teoretičtějšího charakteru. Odborná ekologická problematika se řeší až ve čtvrtém odstavci. Za obzvláště nešťastný považuju první odstavec. Ten se obvykle považuje za jakousi výstavní skříň celé práce. V práci vidím zajímavější výsledky, než popis metodiky, jak odebrat půdní sondu v podmáčené půdě (jakkoliv je to komplikované).

Co autorka považuje za hlavní (odborně ekologický) závěr své práce?

Autorce bych taky na základě osobních zkušeností s příbuzným poloparazitickým druhem *Rhinanthus minor* potvrdil, její závěry, že jednorázové prothání k odstranění poloparazita z porostu nestačí. Lokalitu je potřeba navštívit opakovaně. Dále bych doporučil, pokud autorka bude i v budoucnu sledovat vliv odstranění poloparazita na společenstvo, aby se zaměřila i na biomasu jednotlivých druhů a ne jen na jejich pokryvnost.

Celkově si ale myslím, že autorka odvedla velký kus práce a zvládla řadu velmi odlišných metod. Práci jednoznačně doporučuji k obhajobě a navrhuju ji hodnotit (zejména kvůli nezdařilé diskuzi) stupněm velmi dobře, v případě dobré obhajoby výborně.

V Třeboni 11. 1. 2016,

Ondřej Mudrák