



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta

Hodnocení diplomové práce - oponent

| | |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Studijní program: | |
| Studijní obor: | 4106T026 / Biologie a ochrana zájmových organismů |
| Akademický rok: | 2015/2016 |
| Název práce: | Liší se klíčivost vybraných druhů vstavačovitých rostlin na přirozených a obnovených loukách? |
| Student: | Bc. Pavel Sucháček |
| Katedra: | Katedra biologických disciplín |
| Vedoucí práce: | Doc. RNDr. Jana Jersáková, Ph.D. |
| Oponent: | RNDr. Jan Ponert |
| Pracoviště oponenta: | Katedra experimentální biologie rostlin PŘF UK a Botanická zahrada Hl.m. Prahy. |

| | Hlediska | Stupeň hodnocení | | | | | | Nelze hodnotit |
|----|--------------------------------------------------|------------------|---|---|---|---|---|----------------|
| | | A | B | C | D | E | F | |
| 1 | Splnění požadavků zadání | X | | | | | | |
| 2 | Aktuálnost a odborná úroveň práce | X | | | | | | |
| 3 | Práce s daty, informacemi a odbornou literaturou | | X | | | | | |
| 4 | Vhodnost metodiky řešení | X | | | | | | |
| 5 | Využití metod zpracování výsledků | X | | | | | | |
| 6 | Interpretace výsledků, diskuse | | | X | | | | |
| 7 | Formulace závěrů práce | X | | | | | | |
| 8 | Odborný přínos práce a její praktické využití | X | | | | | | |
| 9 | Přesnost formulací a práce s odborným jazykem | | | X | | | | |
| 10 | Formální úprava práce a jazykové zpracování | | | X | | | | |

Hodnocení vyznačte **X** (slouží pro stanovení výsledné klasifikace)

(hodnocení A odpovídá známce 1, B - 1 minus, C - 2, D - 2 minus, E - 3, F - 4)

Konkrétní připomínky a otázky k obhajobě (pro rozšíření lze použít samostatnou označenou přílohu):

Vizte přílohu.

Závěr: Závěrečnou práci doporučuji obhajobě (ANO/NE): ANO

Navrhovaná výsledná klasifikace práce (slovně):

**Výborně či velmi dobře
– podle obhajoby**

(výborně, velmi dobře, dobře, nevyhověla)

Datum

Podpis oponenta

7.1.2016

Příloha k posudku diplomové práce Bc. Pavla Sucháčka na téma „Liší se klíčivost vybraných druhů vstavačovitých rostlin na přirozených a obnovených loukách?“

Předkládaná diplomová práce je vcelku zdařilá a její téma velice aktuální. Musím ocenit dobrou grafickou úpravu i velice nízké množství překlepů. Také je evidentní, že student se tématu intenzivně věnoval a strávil se zpracováním vzorků hodně času.

Na druhou stranu je v práci několik pasáží, které by si zasloužily podrobnější zpracování, a také několik formulací, které nejsou zcela správné. Jistě by práci prospělo, pokud by ji student před odevzdáním ještě znovu důkladně pročetl a tyto nesrovnalosti opravil. Například zkratky jsou vždy správně vysvětleny při prvním výskytu, ale některé z nich chybí v seznamu zkratek. Například OM, OTU, či označení lokalit (př. VL, HV, NPRC...). Nejzásadnější mi připadá příliš stručný popis metodiky molekulární charakterizace hub a příliš stručná diskuze.

Veškerý popis molekulární identifikace hub je obsažen v jediné kapitole. Myslím, že by si zasloužil rozdělení do více kapitol a podrobnější zpracování. V současném stavu je popis velice zhuštěný a místy příliš stručný. Například metoda izolace DNA je popsána pouze názvem zkratkou „CTAB“ a citací (Porebski et al. 1997). To by samo o sobě nevadilo, jenže dotyčná citovaná práce popisuje modifikaci původní CTAB metody pro určitý typ rostlinného materiálu. Autor tedy zřejmě nepoužíval přímo původní CTAB metodu, ale modifikovanou CTAB metodu. Navíc je dále uvedeno pouze to, že pro PCR byl použit 1 µl takto získané DNA. V citované práci je ovšem uvedeno, že lze vyizolovanou vysušenou DNA rozředit ve 100 až 200 µl pufru, takže z popisu v diplomové práci není jasné, jaké množství DNA bylo použito jako templát pro PCR. Dále, primery SP6 a T7 jsou uvedeny pouze těmito názvy. Není uvedena jejich sekvence, ani citace zdroje, takže čtenář neví, jaké primery to vlastně jsou. Není uvedeno, v jakém organismu byly plasmidy pGEM-T namnoženy. Jelikož se ale dále píše o odebrání osmi kolonií, tak patrně v nějakém organismu namnoženy byly. Není uvedeno, jakou metodou byly produkty PCR sekvenovány.

Diskuze je také velice strohá a zasloužila by si lepší zpracování jak po stránce konzultovaných prací jiných autorů, tak po stránce formulace a čtivosti textu. Je to jediná část, která na mne působí dojmem, že byla zpracovávána ve spěchu. Například by zde myslím bylo vhodné zmínit práce Vandepitte et al. 2012 (Recolonization after habitat restoration leads to decreased genetic variation in populations of a terrestrial orchid. *Molecular Ecology* 21, 4206–4215), McCormick et Jacquemyn 2014 (What constrains the distribution of orchid populations? *New Phytologist* 202: 392–400) či práce zabývající se podrobněji klíčením semen a časnými fázemi vývoje protokormů. První dva odstavce kapitoly Diskuze navíc pouze opakují výsledky a necitují jedinou práci.

Další výtky jsou drobnějšího charakteru. Podle abstraktu a také některých dalších částí práce se autor zabývá klíčivostí vybraných druhů orchidejí. V anglickém abstraktu je přitom napsáno „this thesis focused on germination of ... orchid species...“. Anglickým ekvivalentem výrazu klíčivost je germination rate nebo germinability. Českým ekvivalentem slova germination je klíčení. Myslím, že z těchto dvou odlišných termínů by se lépe hodil výraz klíčení. Práce se totiž zabývá nejen samotnou klíčivostí, ale také faktory, které ji mohou ovlivňovat (vysvětlovat). S tím také souvisí, že na str. 12 na počátku kapitoly 1.4.1 uvádíte „Klíčivost orchidejí není proces striktně závislý na mykorhize...“.

Klíčivost vůbec není proces, ale pouze hodnota udávající, jaký podíl semen vyklíčil. Ten proces je klíčení.

Str. 10, 2. řádek 2. Odstavce uvádíte za tvrzením, že vstavačovité mají velmi drobná semena, která neobsahují téměř žádné zásobní látky, citaci práce Hashimoto et al. 2012. Domnívám se, že by bylo vhodnější citovat některou z mnoha prací zabývajících se přímo zásobami v semenech orchidejí, než tuto práci věnovanou primárně studiu rostliny rodu *Pyrola*.

Str. 11, na konci prvního odstavce uvádíte, že byla z orchidejí „izolována řada fungicidních látek, jako jsou například hircinol a orchinol ... které kontrolují rozsah houbové kolonizace (Hu & Huang, 1994)“. Citovaná práce Hu & Huang se však zabývá zcela jinou látkou, proteinem, z jiného a nepříbuzného druhu orchideje a nezabývá se uvedenými látkami. Proto se domnívám, že není správné toto tvrzení dokládat touto prací.

V obrázku 2 převzatém ze zahraničního zdroje bych doporučoval popisky přepsat do češtiny.

V českém textu je zvykem používat české termíny v případě, kdy jsou jako termíny zažité. Proto by se místo slova bandy lépe hodil běžně používaný český ekvivalent proužky. Místo slova whiskers spíše chybové úsečky, místo slova outliers spíše odlehle hodnoty a místo sousloví „box and whisker diagram“ spíše „krabicový diagram“.

V metodice není použita stejná forma textu. Někde píšete „se udělalo“, jinde „jsem udělal“. Například v kapitole 2.3 se to mění nečekaně rychle.

V diskuzi v kapitole 4.1 se zabýváte vlivem vlhkosti na klíčení semen orchidejí a uvádíte „Není také známo, zdali má vlhkost nepřímý vliv na klíčení semen nebo přímý vliv na symbiotickou houbu (Scott & Carey, 2002; Diez, 2007)“. Patrně jste chtěl napsat „přímý vliv na klíčení semen nebo nepřímý vliv zprostředkovaný skrze symbiotickou houbu“.

V kapitole 2.7 píšete, že byla použita „semena ve fázi protokormu“. Myslím, že to není vhodný obrat, protože protokorm vzniká až po vyklíčení semene a není semenem.

Str. 22 a 23: uvádíte latinské jméno *Dactylorhiza viride*, což není správná kombinace. Buď *Dactylorhiza viridis*, nebo synonymum *Coeloglossum viride*.

Str. 23: uvádíte české jméno tořič včelovitý. Správně je v češtině tořič včelonosný. Patrně jste se nechal zlákat slovenským jménem hmyzovník včelovitý.

V práci rozlišujete vyvinutá a nedovyvinutá semena, ale klíčivost vyhodnocujete jako podíl vyklíčených semen ze všech semen (kapitola 2.10). Myslím, že by bylo vhodné vyhodnotit klíčivost také jako podíl vyklíčených semen z dobře vyvinutých semen.

Dále mám na autora práce několik otázek, které mne napadly při čtení textu:

- 1) V úvodu na straně 10 ve čtvrtém odstavci uvádíte, že při vývoji protokormu „dochází k polarizaci a rozvoji meristémů pro kořen a prýt“. Plně souhlasím s polarizací, ale vývoj meristémů pro kořen i prýt mne zarazí. Mohu poprosit o vysvětlení, jak je to u orchidejí se založením prvních meristémů pro kořen a prýt?

- 2) V metodice v charakteristice zájmového druhu *Anacamptis pyramidalis* (kapitola 2.1.1) uvádíte, že „růst nadzemních orgánů začíná v lednu“. Je tomu tak v České republice vždy, a pokud ne, jak je to časté?
- 3) V metodice v kapitole 2.1.2 uvádíte, že *Gymnadenia conopsea* je bylina „s jednou hluboce dvoudílnou hlízou“, kdežto v kapitole 2.1.1 uvádíte, že *A. pyramidalis* je „rostlina se dvěma protáhlými vejcovitými hlízami“. Oba tyto druhy mají ale ve stejné fázi vývoje zcela stejný počet hlíz. Ten je stejný, jako u dalších Vámi studovaných druhů podčeledi Orchidoideae, u kterých jej už neuvádíte. Jaký je tedy správný počet hlíz u těchto orchidejí a jak se mění během roku?
- 4) V metodice v kapitole 2.3 uvádíte, že jste semena rozlišoval do dvou kategorií: I) „semena s plně vyvinutým embryem“ a II) „abortovaná semena (se špatně vyvinutým embryem...)“. Jak jste tyto dvě kategorie odlišoval? Pouze na základě pohledu pod binolupou, nebo i s využitím nějakých sofistikovanějších metod? Pokud jste se rozhodl pouze podle pohledu binolupou, nemohl jste odlišit embrya s pozměněnou (nedovyvinutou) vnitřní stavbou. V takovém případě vaše kategorie nezahrnuje pouze semena se skutečně plně vyvinutým embryem, a proto by bylo vhodné to v práci jasně zmínit.
- 5) V metodice v kapitole 2.5.1 uvádíte, že každý rámeček obsahoval semena dvou druhů v samostatných sítkách. Mohlo to mít na semena nějaký vliv? Mohla v takovém uspořádání semena jednoho druhu ovlivnit semena druhého?
- 6) V metodice v kapitole 2.6 uvádíte, že kategorie 2 zahrnovala klíčící semena, „avšak nemykorhizní“. Jak jste určoval, zda jsou embrya či protokormy skutečně nemykorhizní? Nemohlo se jednat pouze o později vyklíčené exempláře, které již byly mykorhizní, ale ještě nedospěly do pozdější hruškovité fáze vývoje?
- 7) V molekulární části metodiky mne překvapilo použití kitu Plain PP Master Mix pro PCR amplifikaci zájmových úseků, které byly dále použity k sekvenaci. Tento kit obsahuje klasickou Taq polymerázu, která je známa svou poměrně vysokou chybovostí. Jak mohlo využití tohoto kitu ovlivnit získané výsledky?
- 8) Ve výsledcích v kapitole 3.1.2 mne zaujala věta „Test velikosti největšího protokormu získaného z plochy (size_max) vyšel neprůkazně (Tukey HSD test, $p < 0,05$; Tab. VIII).“ V odkazované tabulce ale není uveden Tukey HSD test pro proměnnou size_max. Proč byste tento test prováděl v případě, kdy je rozdíl neprůkazný? Je možné, aby tento test vyšel neprůkazně a přitom v něm vyšlo $p < 0,05$? Jaký test by se k této větě hodil lépe?
- 9) V diskuzi v kapitole 4.1. uvádíte, že dvě dosud publikované studie zabývající se klíčením orchidejí na obnovených či nově vzniklých biotopech dospěly k mírně odlišným výsledkům než Vaše studie a orchideje zde na takových stanovištích vytvářely pokročilá mykotrofní stadia vývoje. Jak se liší těmito autory studované plochy od Vašich ploch? Jaký faktor byste považoval za nejpodstatnější?
- 10) V diskuzi v kapitole 4.2 uvádíte „Protože semena vstavačovitých rostlin potřebují k úspěšnému vyklíčení přítomnost mykorhizních hub (Gryndler, 2004), ...“. Domníváte se, že je toto tvrzení pravdivé ve všech případech? Jak potom vysvětlíte například opakovaně pozorované klíčení semen některých orchidejí v asymbiotických kulturách v čisté vodě?