

Posudek oponenta na diplomovou práci
Jméno oponenta: <i>RNDr. Libor Mrnka, Ph.D.</i>
Datum: <i>9.9.2013</i>
Autor: <i>Tereza Lukešová</i>
Název práce (AJ): <i>The role of DSE (Dark Septate Endophytes) in plant communities in forest ecosystem</i>
Název práce (ČJ): <i>Role DSE (Dark Septate Endophytes) v rostlinném společenstvu lesního ekosystému</i>
Cíle práce 1. How do selected members of DSE influence host plants typical for temperate forest ecosystem? 1.1 Are the selected DSE species able to colonize all three forest plant species (<i>P. abies</i> , <i>B. pendula</i> and <i>V. myrtillus</i>)? 1.2 What are colonization patterns of selected DSE in roots of <i>P. abies</i> , <i>B. pendula</i> and <i>V. myrtillus</i> ? 1.3 How do different DSE influence growth of <i>P. abies</i> , <i>B. pendula</i> and <i>V. myrtillus</i> ? 2. Is there a bidirectional flow of nutrients between selected DSE and host plants typical for temperate forest ecosystem? 2.1 Do selected DSE species enhance biomass of <i>P. abies</i> , <i>B. pendula</i> and <i>V. myrtillus</i> ? 2.2 How do selected DSE species influence nutrient uptake of <i>P. abies</i> ?
Struktura (členění) práce Rozsah práce (počet stran): <i>85</i> Je uveden anglický i český abstrakt a klíčová slova? <i>ano</i>
Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, seznam literatury) <i>velmi vysoká (text je standardně rozčleněn na oddíly a odstavce, schematické nákresy jsou excelentní, fotky velmi kvalitní, obrázky přehledně uspořádané a označené, barevné ladění vkusné, seznam literatury přehledný)</i>
Logická stavba a jazyková úroveň práce <i>DP je standardně členěná s logicky navazujícími částmi, jazyková úroveň práce je dobrá (autorka napsala práci v AJ)</i>
Literární přehled: 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, autorka cituje 127 prací; publikace jsou relevantní a aktuální</i> Jsou literární zdroje (včetně obrázků) v práci správně citovány? <i>ano</i>
Materiál a metody: Šíře použitých metodik: <i>adekvátní, byť nepříliš široká (in vitro symbiotické systémy, mikroskopické techniky sledování kolonizace, práce s růstovými médii a očkováním hub v aseptických podmínkách, značení radioaktivními i stabilními izotopy, jejich detekce a vyhodnocení /pod patronací Dr. Johnsona z University of Aberdeen/)</i> Odpovídají popsané metody prezentovaným výsledkům? <i>ano</i> Jsou metody srozumitelně popsány? <i>ano (drobné výhrady jsou uvedeny dále v připomínkách)</i>
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? <i>ano, kromě experimentů 3 a 4, kde není cíl explicitně uveden (resp. je omezen na název)</i>

Je dokumentace výsledků adekvátní? *ano*

Je množství provedených experimentů dostačující? *ano, z hlediska běžného rozsahu DP, částečně z hlediska zodpovězení cílů/hypotéz DP*

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? *ano*

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? *ano*

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? *jsou pouze slabě nastíněny*

Závěry (Souhrn):

Jsou závěry podložené výsledky? *Do určité míry. Ačkoli autorka sama pozorovala u několika DSE hub (AAP, PF-GL, PF-HE) signifikantní vnitrodruhovou variabilitu v odpovědi hostitelské rostliny na kolonizaci daným DSE izolátem, a vedle toho variabilitu mezidruhovou, v závěru píše, že „Interspecific variability thus does not explain the inconsistency of results in the DSE research with respect to host plant responses; it seems that the true reason is in different combinations of particular DSE strains with particular host plants.“ Domnívám se, že práce autorky naopak potvrzuje, že jak vnitrodruhová tak mezidruhová variabilita se na nekonzistentnosti výsledků s DSE houbami podepisuje. Nekonzistentnost výsledků je určitě závislá i na hostitelské rostlině a kombinaci genotypů hostitel × mykobiont, jak píše autorka, a potvrzují to i jí uváděné a další recentní metastudie (Mandyam a kol. 2012, Mayerhofer a kol. 2013, Newsham 2011). Tyto studie také identifikují jako významný zdroj nekonzistence výsledků rozdílné experimentální podmínky u použitých studií. Autorka v závěrech také uvádí, že byla schopná prokázat transport živin do rostliny zprostředkovaný DSE. Odvolává se tu patrně na výsledky experimentu 3, kde byl zaznamenán u jednoho smrkového semenáčku transport značeného P do nadzemní části. Jak rozvádím v připomínce 4a, nepovažuji uspořádání experimentu 3 za zdařilé a toto pozorování za důkaz že P byl transportován do semenáčku DSE houbou.*

Jsou výstižně formulovány? *Částečně, viz výše*

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Předložená diplomová práce je relevantním a aktuálním příspěvkem k studiu DSE hub a jejich ekofyziologické role v ekosystému lesa mírného pásu. Ukazuje schopnost autorky odpovědět na současně řešené otázky adekvátním (byť ne bezchybným) způsobem experimentálně a získané výsledky smysluplně vyhodnotit a diskutovat. Definovaných cílů bylo částečně dosaženo, konkrétní výhrady k experimentům a jejich hodnocení jsou uvedeny níže v otázkách a připomínkách. Celkově hodnotím diplomovou práci Terezy Lukešové jako odpovídající požadavkům na DP kladeným a doporučuji ji k přijetí.

Otázky a připomínky oponenta:

Své otázky a připomínky dělím na závažnější a podružné a jsou uvedeny ve sledu odpovídajícím struktuře DP. Jejich poněkud delší výčet je adresován primárně autorce s cílem poskytnout jí zpětnou vazbu a pomoci jí zlepšit její další badatelskou práci.

Závažnější připomínky a otázky

1. Autorka v úvodu (str. 13) uvádí mezi hypotézami testování životní strategie DSE hub, přičemž na základě známosti literatury předpokládá jejich fungování v rámci mutualisticko-parazitického kontinua. Cíle práce ovšem testování této hypotézy odpovídají pouze částečně. Její ověření by vyžadovalo provést větší počet experimentů zaměřených na sledování odpovědi hostitelské rostliny inokulované různými DSE houbami na gradientu prostředí, přičemž by sledováno mělo být více parametrů než jen nadzemní a podzemní biomasa (např. procento přežívání, růstové

parametry včetně LAI, příjem živin, intenzita fotosyntézy, sledování markerů obranné reakce rostliny, případně další jako architektura kořenového systému aj.), a vliv stresových faktorů (nabízí se zejména nedostatek vody nebo přítomnost těžkých kovů). S ohledem na obecný význam jasně definovaných hypotéz a cílů řadím tuto výhradu mezi závažnější, byť byla snadno řešitelná pregnatnější formulací hypotéz a cílů nebo přizpůsobením experimentů.

2. V rámci definovaných cílů se autorka snažila ověřit vliv vybraných DSE hub na hostitele, ale ve zkoumaných parametrech se ve většině případů omezila na biomasu a kolonizaci kořenů. Skutečnost, že v řadě experimentů nebyla provedena analýza živin (N, P, K, potažmo Fe, Ca a Mg) považuji za poměrně závažný a s ohledem na hypotézu 2 těžko pochopitelný experimentální nedostatek.
3. Autorka uvádí v abstraktu a diskusi (oddíl 5.2.4.), že se DSE houba *Acephala macrosclerotiorum* (AMA) s hostitelem *Picea abies* chovala jako slabý parazit. Ačkoli výslovně nezmiňuje, co jí k tomuto závěru vede, dává ho do souvislosti s výsledky experimentu 4, kde naměřila nižší obsah dusíku v nadzemní biomase smrkových semenáčků inokulovaných AMA ve srovnání s neinokulovanými semenáčky. Přitom není zřejmé, zda to bylo způsobeno větším vzrůstem kontrolních rostlin nebo jejich obohacením ^{14}N . Pokud jde o koncentraci dusíku ^{15}N , autorka uvádí, že se mezi kontrolními a inokulovanými rostlinami nelišila. Podobné pozorování učinili u arbuskulárně mykorhizní houby *Glomus fasciculatum* Tobar a spol. (New Phytol. 126:119-, 1994), kteří nepozorovali rozdíl v obohacení rostlin ^{15}N u mykorhizní a kontrolní varianty za nestresových podmínek. To ukazuje, že ani mykorhizní houby nezvyšují transport N hostiteli za všech okolností. Otázkou je, v jakém případě živinové disbalance je již oprávněné mluvit o parazitismu? Jak by autorka např. vyhodnotila situaci, kdyby u N pozorovala u inokulovaných rostlin pokles a u P nárůst koncentrace či obsahu těchto prvků? V této souvislosti bych rád odcitoval pasáž z článku N. Johnson a kol. z r. 1997 (New Phytol 135:575-) "*Some studies reporting "parasitic" effects of mycorrhizal fungi were conducted in extremely simplified experimental systems, or were a result of a single season of research. It is possible that when systems are more thoroughly studied at larger spatial or temporal scales, interactions that originally appeared parasitic might become commensal or mutualistic.*" Jak už jsem zmínil v připomínce v bodě 1), otázka parazitismu-mutualismu by si vyžadovala důkladnější přístup. Autorka buď nevhodně naformulovala první hypotézu *post hoc* nebo ji sice definovala *ad hoc*, ale potom si nezvolila k jejímu testování adekvátní experimenty. Trochu překvapivě neuvádí autorka jako doklad možného parazitismu přítomnost AMA (podobně i PHE) v stéle kořenu pozorovatelné na obr. 10. Byla kolonizace stéle pozorována pravidelně?
4. K experimentu 3 mám několik otázek. S ohledem na primární záměr experimentu, jímž bylo (jak předpokládám, ačkoli to není explicitně uvedeno) prokázání transportu ^{33}P houbou do rostliny, mi není jasné:
 - a. Proč byly kontrolní rostliny pěstovány spolu s nekontrolními v jedné petriho misce a oddělování myceliálního a difúzního transportu bylo řešeno různými řezy namísto toho, aby byly rostliny pěstovány odděleně a oddělen byl i kompartment s kořeny a houbou jako tomu bylo později v experimentu 4? Použité uspořádání podle mého soudu k zodpovězení otázky po účasti houby na transportu ^{33}P nevede, protože izotop se difúzí mohl dostat a dle obr. 14 dostal i za oblasti oddělené řezy, odkud ho rostliny mohly vstřebávat jak kořeny tak mycéliem! Nevidím tedy funkční rozdíl mezi kontrolními a ostatními rostlinami a značení "nekontrolního" semenáčku izotopem ^{33}P v daném systému nepovažuji za jednoznačný důkaz, že se na něm podílelo

mycélium *A. macrosclerotiorum*.

- b. Není zvolená doba 21 a 26 hodin krátká s ohledem na to, že došlo k slabému značení pouze u jednoho semenáčku? Podle metodiky (3.3.4.) byla data měřena i po 45 hodinách, ale výsledek tohoto měření v DP není. Proč?
 - c. Na str. 49 je uvedeno, že na základě výsledků pilotního experimentu byl designován exp. 5. Patrně zde měl být uveden experiment č. 4, ačkoli ani vůči experimentu 4 není experiment 3 experimentem pilotním, protože není zřejmá souvislost, jak jeho výstupy mohly posloužit návrhu experimentu 4 (jiný izotop, jiná detekce, jiné podmínky pěstování rostlin apod.).
5. Výsledky experimentu 4. nejsou dostatečně a srozumitelně popsány (viz str. 50-53).

Autorka

- a. neuvádí žádná biometrická data, dle kterých by bylo možné posoudit vliv inokulace AMA na růst hostitele,
- b. neuvádí procentuální kolonizaci kořenů, takže čtenář neví, zda kolonizace AMA byla marginální nebo zda se týkala většího podílu kořenů. Přitom např. u arbuskulárně mykorhizní houby *Glomus mosseae* byl transport ^{15}N hostiteli přímo úměrný míře kolonizace /Ames a kol 2006 New Phytol 95:381-/,
- c. neuvádí, jaké bylo živinové složení použité směsi rašeliny s vermikulitem a jak velký objem celkového dusíku přísad dusičnanu amonného představoval,
- d. neuvádí, proč nebyl izotop ^{15}N měřen ve sklerociích, když tam byl měřen izotop ^{13}C ,
- e. neuvádí, na základě čeho byl zvolen odběr po 24h od značení rostlin ^{13}C , ani zda má nějaký pozitivní doklad, že došlo k úspěšnému proznačení rostlin (např. detekcí ^{13}C v kořenech rostlin),
- f. neuvádí, zda byla půda z kořenových kompartmentů odebírána jako "bulk soil" nebo preferenčně z oblasti rhizosféry.

Kladu si dále otázku proč se autorka rozhodla použít jako zdroj značeného ^{15}N pouze dusičnan amonný, při jehož vstřebávání nejsou rostliny na houbě nijak závislé. DSE houby mají dobré saprotrofní schopnosti a považoval bych za vhodné použít v experimentu jako variantu také nějakou organickou ^{15}N značenou sloučeninu. Je známé, že různé skupiny mykorhizních hub se ve využití různých zdrojů N liší (Michelsen a kol. 1996, Oecologia 105:53-). Ostatně i metastudie citovaná autorkou (Newsham 2011) uzavírá: „*The analyses here suggest that DSE enhance plant performance under controlled conditions, particularly when all, or the majority, of N is available in organic form.*“ Zmínka, že koncentrace ^{15}N se významně u kontrolních a inokulovaných rostlin nelišila, zatímco celkový obsah dusíku byl u kontrolních rostlin vyšší, nasvědčuje buď větší biomase kontrolních rostlin nebo větší koncentraci ^{14}N u kontrolních rostlin. Odpovídá něco z toho realitě? A poslední otázka k tomuto experimentu... Měřila autorka pH půdního substrátu? Některé houby jsou schopné pH výrazně snížit (zejména v uzavřeném systému jako je ten použitý autorkou), což se může následně odrazit na koloběhu dusíku v systému (např. sníženou či zvýšenou volatilizací).

Podružné otázky a připomínky

1. Autorka používá v DP "thesis" i "Thesis", a "dark septate endophytes" vedle "Dark Septate Endophytes" ...je namístě toto ujednotit
2. Při definici cílů na str. 14 je jako cíl 2.1. uvedena otázka "2.1 Do selected DSE species enhance biomass of *P. abies*, *B. pendula* and *V. myrtillus*?" Ovšem to nekoreluje s hypotézou 2, která se ptá po ovlivnění příjmu živin. Spíše náleží tento

bod řadit mezi cíle korespondující s hypotézou 1. K nepříliš vhodné definici hypotéz jsem se již vyjádřil výše.

3. V oddíle 2.2. (str. 16) autorka uvádí: "*Such definition identifies as endophytes fungi performing different life strategies such as mutualistic, parasitic, saprobic or even exploitive*". Chci se zeptat, v jakém smyslu zde používá slovo "exploitive", když do "exploitive" strategie patří třeba právě ta parazitická?
4. Autorka na str. 16 píše "*Although the mycobionts can vary in many characteristics all the endophytic interactions have in common the provision of nutrients and a buffer from environmental stresses and microbial competition (Schulz & Boyle, 2005)*" Toto tvrzení jsem ve zmíněné publikaci nenalezl a není podle mne správné. Např. v poskytování živin jsou mezi endofyty (autorka se v DP přiklonila k širšímu pojetí endofytů zahrnujících i parazity a mykorhizní houby) značné rozdíly a podobně to platí i pro další zmíněné oblasti
5. Znění věty ze str. 19: "*ErMF belong mostly to Ascomycota and Sebaciniales although sheathed ericoid mycorrhizal colonization formed by fungus belonging to Basidiomycota was also observed...*" může vzbuzovat u nezasvěceného čtenáře dojem, jakoby Sebaciniales nepatřily do Basidiomycot.
6. Jako zdroj dusíku je na str. 38 uveden (NH₄)(NO₂). Jednalo se opravdu o dusitan a byly ¹⁵N značeny oba ionty nebo pouze jeden? Pokud to druhé, který? A je použití závorek v chemickém vzorci ať už u dusitanu či dusičnanu běžné?
7. Autorka uvádí na str. 47 ve výsledcích, že "*The Group 1 consists of A. applanata, A. macrosclerotiorum and isolates PFGL-1 and PF-SU-2 and is not statistically different from the positive mycorrhizal control....*" Mezi izoláty řazenými do skupiny 1 figuruje i PF-SU-2, který se významně neliší od žádného jiného izolátu. Jeho řazení do sk. 1 je tudíž dle mého soudu diskutabilní, neboť by stejně dobře mohl být řazen do sk. 2. Ostatně pro to, aby se dalo rigorózně mluvit o skupinách, bylo by třeba provést analýzu dat některou z metod mnohorozměrné statistiky.
8. Proč není na obr. 20 (str. 54) uvedena i kolonizace houbou PIN9, když tato varianta byla v experimentu použita a fotky kořenových řezů i data z biomasy od této varianty uvedeny jsou (obr. 21, 22 a 23)?
9. Na str. 56 je odkaz na neexistující tabulku č. 23. Jde patrně o záměnu za obr. 23 na str. 57
6. Nevím, zda u škály uvedené na ose y u obr. 22 (str. 56) není chyba, protože podle uvedených hodnot by vážila nadzemní biomasa kontrolních semenáčků necelé 3mg! Je možné, že semenáčky byly takto mikroskopické?
10. Proč je u nadzemní hmotnosti uváděna sušina (DW), zatímco u kořenů čerstvá hmotnost (FW), viz obr. 12 a 13 (str. 46 a 47), 22 a 23 (str. 56 a 57)?
11. Na str. 60 v oddíle 5.1.2. autorka popisuje úskalí přístupu *in vitro* a sterilizace rašelinných substrátů autoklávováním, při němž může docházet k tvorbě látek s negativním efektem na rostliny. Aby tento problém vyřešila, použila směs s vermikulitem. U vermikulitu se uvádí vysoká schopnost sorpce vody i živin, takže jeho použití vidím jako vhodné, nicméně obejít tvorbu toxických rozpadových produktů rašeliny lze i sterilizací γ -zářením. Systém rašelina - vermikulit je živinově chudý pokud jde o makroprvky typu N, P, K. S ohledem na vysokou mortalitu semenáčků, kterou autorka zmiňuje a malou akumulaci biomasy zřejmou z grafů je otázkou, zda nebylo vhodnější použít raději přesátou a γ -zářením sterilizovanou lesní hrabanku nebo jiný živinově bohatší (nikoli však příliš bohatý) substrát.
12. Na str. 61 autorka uvádí, že kvůli problémům s klíčením semen přešla z MMN média na WA médium. Je otázkou, zda není lepší zkoušet pro klíčení semen namísto médií používaných spíše pro pěstování hub média vhodná pro rostliny (např. ½ MS).

13. Autorka uvádí na str. 63, že „*Formation of hyphal loops observed in the Experiment I can signify that there is an “effort” to enhance nutrient adsorption surface, which can imply, if bidirectional, a sign of a mutualistic symbiosis*“ Ačkoli je to formulováno opatrně, je třeba říci, že samotná tvorba smyček hyf v kořenových buňkách hostitele na mutualistickou symbiózu neukazuje, neboť je tvoří i parazitické houby.
14. Práce obsahuje drobné jazykové chyby a překlepy (enophyted str. 13, hypothesis místo hypotheses str. 13, on root the surface str. 45, form/from na str. 50, molecular methods of molecular detection na str. 61 aj.), což ale považuji za marginální záležitost

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: