

Posudek oponenta na diplomovou práci
Jméno oponenta: Zuzana Lhotáková
Datum: 7. 9. 2020
Autor: Gabriela Lotová
Název práce: Míra oxidativního stresu jako marker stresové paměti u vybraných genotypů rostlin bramboru <i>Solanum tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i> a ssp. <i>andigena</i>
Cíle práce Cílem práce bylo pomocí vybraných markerů stanovit míru oxidativního stresu v reakci na jednorázové a opakované sucho a chlad u vybraných genotypů bramboru <i>Solanum tuberosum</i> – poddruhu <i>tuberosum</i> (u dvou kultivarů) a poddruhu <i>andigena</i> (u dvou genotypů) – a následně vyhodnotit, zda tyto markery vypovídají o stresové paměti. Hlavní cíl i čtyři dílčí cíle jsou jasně definovány a doplněny pěti hypotézami.
Struktura (členění) práce Práce má 75 stran, je členěna standardně a obsahuje všechny formální náležitosti – český i anglický abstrakt s klíčovými slovy, seznam zkratk a seznam literatury.
Formální úroveň práce Je velmi dobrá: obsahuje přehledné grafy s popisky a výsledky statistických analýz, kvalitní obrazovou dokumentaci experimentálních rostlin, přehledná schémata designu experimentů. Občas je vynecháno dost místa (příklad, celá stránka před závěry), u obrázků někdy popisky „utíkají“ na další stránku. Seznam literatury je v jednotném formátu a všechny položky v něm uvedené jsou též citovány v textu. U citace Caffrey, M., Fonseca, V., & Leopold, A. C. (1988). (<i>m.c.</i>); 754–758.) nejspíš vypadl titul nebo se jedná o specifický dokument – co je to za dokument a co znamená zkratka „ <i>m.c.</i> “ v závorce?
Logická stavba a jazyková úroveň práce Práce je členěna standardně, má logickou strukturu. Oceňuji přehledná schémata experimentálních designů (str. 23 a 24) a přehlednou tabulku plánovaných a nakonec provedených analýz (kapitola 4.1). Jazyková úroveň práce je velmi dobrá, práce je psána srozumitelně literární úvod a diskuse i celkem čtivě. V textu se vyskytují občasné překlepy či nesprávné tvary slov. Autorka poněkud nekonzistentně používá různé zkratky pro míru úniku elektrolytů - v metodické části práce značené EC, následně ve výsledcích a diskusi EL a obě tyto zkratky v seznamu zkratk překvapivě chybí. Naopak běžné chemické vzorce (např. O ₂) mi připadají v seznamu zkratk nadbytečné.
Literární přehled: Literární přehled je logicky členěn, nejprve představuje obecné principy reakce rostlin na stres a pak cílí na abiotický stres z nedostatku vody. Dále je věnována pozornost oxidativnímu stresu a roli reaktivních forem kyslíku jak při vzniku oxidativního poškození, tak v signalizaci. Jsou uvedeny dvě kratší kapitoly zaměřené přímo na stresovou paměť a její mechanismy v případě sucha a nízkých teplot. Závěrem literárního přehledu je představen modelový organismus <i>Solanum tuberosum</i> a jeho poddruhy <i>tuberosum</i> a <i>andigena</i> a jsou vysvětlena východiska pro hypotézy různé odolnosti a různé schopnosti aklimace obou poddruhů. Text je srozumitelný a celkem čtivý, je dobře doplněn dvěma schématy. Citované zdroje jsou dostatečné a relevantní a jsou správně citovány. Logická linka literárního úvodu je jasná, možná by ji lépe potrhlo hierarchické číslování kapitol.
Materiál a metody:

Studentka zvládla kultivaci pokusných rostlin *in vitro* (což bylo provázeno různými obtížemi (četné kontaminace, špatné prorůstání křenů do média či omezené přírůstky biomasy rostlin) tak rostlin *ex vitro* a je si vědoma výhod i nevýhod obou experimentálních přístupů.

Na pokusných rostlinách hodnotila jednak růstové charakteristiky (čerstvou hmotnost kořenů a prýtu, v některých případech výšku rostlin). Zde vidím určité limity – růstová analýza by mohla být doplněna o stanovení listové plochy či specifické listové plochy (SLA). Zejména parametr SLA by mohl mít výpovědní hodnotu o reakci na nedostatek vody.

Hlavním zaměřením práce bylo sledování míry oxidativního stresu, kde jako vybrané markery sloužily obsah malondialdehydu (kolorimetrické stanovení), hladina ROS (stanovení pomocí fluorescenční sondy) a míra úniku elektrolytů. Pro poslední ze jmenovaných metod studentka vyvíjela a testovala protokol. Všechny tyto metody jsou velmi podrobně a srozumitelně popsány. Bohužel z časových důvodů neuskutečněným záměrem práce bylo i stanovení aktivity NADPH oxidázy, což je komentováno v diskusi. Jasně a výstižně jsou též popsány statistické přístupy k hodnocení získaných dat. Prezentované výsledky jednoznačně vycházejí z popsaných metod.

Experimentální část:

V kapitole 4. Experimenty jsou srozumitelně popsány plány jednotlivých pokusů včetně přehledných schémat. Byly provedeny 4 experimenty *in vitro* (3x na 4 genotypech, 1x na dvou) a dva experimenty *ex vitro* (2x na dvou genotypech). V závěru kapitoly v tabulce je přehledně uvedeno, jaké analýzy byly u jednotlivých pokusů plánovány a které nakonec byly dokončeny. Bohužel přibližně třetinu (dle tabulky 4.1) plánovaných analýz se nepodařilo dokončit – buď z důvodů časových, nebo z důvodů nedostatku materiálu danému nízkými přírůsty rostlin. Tato neúplnost bohužel následně ztížila autorce obecnější interpretaci výsledků a nedovolila zodpovědět některé zásadní výzkumné otázky. Samotné množství provedených experimentů včetně různých optimalizačních kroků rozhodně není malé, avšak problém vidím právě v nedokončených analýzách, na které pravděpodobně nezbyl čas díky dlouhému ladění experimentálních podmínek. Ačkoliv v mnohých případech studentka dospěla k negativním výsledkům, či takovým, které nepodporují vstupní hypotézy, samotná prezentace získaných výsledků pomocí grafů včetně statistického hodnocení je velmi precizní.

Diskuze:

V diskusi na osmi stranách textu autorka rozebírá vhodnost a úskalí experimentálních přístupů (*ex vitro* a *in vitro* kultivace, mixotrofní a fotoautotrofní *in vitro* kultivace), diskutuje použité metodické přístupy, interpretuje dosažené výsledky a srovnává je s literárními údaji. Kriticky se staví ke slabinám práce, konstatuje, že dosažené výsledky jsou pouze dílčí a navrhuje alternativní postupy k těm provedeným.

Závěry (Souhrn):

V poslední kapitole autorka v devíti bodech formuluje závěry, které bylo možno na základě získaných výsledků učinit. Závěry jsou výstižně formulovány a autorka uzavírá, že vybrané parametry míry oxidativního stresu (obsah MDA, hladina ROS) se neukázaly na daném experimentálním materiálu jako vhodné pro hodnocení stresové paměti. Jediná míra úniku elektrolytů by mohla mít pro aklimaci bramboru na chlad a sucho vypovídající hodnotu. Závěry též hodnotí odlišné reakce poddruhu *tuberosum* cv. Lada a poddruhu *andigena* genotypu 66B. Nedostatek spíš formálního typu shledávám v tom, že autorka nespárovala své závěry s hypotézami formulovanými na začátku práce.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Cíle práce se podařilo splnit pouze částečně, a to zejména kvůli problémům s kultivací experimentálního materiálu *in vitro*. Díky přechodu na *ex vitro* kultivaci se studentce podařilo získat další výsledky na zúženém spektru materiálu (jeden genotyp od každého

poddruhu) i když i zde zůstaly dílčí části experimentů nedokončené (absence kontroly genotypu 66B u chladového experimentu). Dosažené výsledky jsou velmi dobře formálně prezentovány a v diskusi autorka kriticky přiznává nedostatky práce. Dílo budí dojem, že prodloužení studia o 1 semestr by dovolilo některé nedokončené analýzy finalizovat a dát závěrům robustnější podklad. Gabriela Lotová při zpracování diplomové práce zvládla navrhnout a i přes objektivní obtíže s materiálem realizovat experimenty s jednorázovým i opakovaným stresovým působením. Zvládla optimalizaci metody pro stanovení úniku elektrolytů dříve v laboratoři nepoužívanou. Získané výsledky byla schopna statisticky vyhodnotit, graficky prezentovat a kriticky diskutovat. Zvládla práci s odbornou literaturou. Autorka sama slabiny práce přiznává a navrhuje jejich řešení, která již nestihla realizovat. Oceňuji v tomto autorčinu upřímnost a též si cením schopnosti modifikovat postupy při experimentálních obtížích. Avšak zejména z důvodu nedokončených analýz v kombinaci s drobnějšími prohřešky formálního typu navrhuji klasifikaci mezi VELMI DOBRĚ a DOBRĚ.

Otázky a připomínky oponenta (povinná část posudku):

- Na obrázku 3 jsou vidět rostliny, které přivykají na na *ex vitro* podmínky. Nemůže umístění víka ovlivňovat světelné podmínky rostlin?
- Na obrázku 4 poukazujete na rozdílnou morfologii chladem stresovaných rostlin – můžete zdůraznit, v čem se rostliny liší a jak byste mohla tento rozdíl kvantifikovat?
- Občas shledávám nepřesnosti v popiskách – v grafech na str. 32-37 jsou v popisu uvedeny „přírůstky čerstvé hmotnosti“ – šlo opravdu o přírůstek, tedy rozdíl hmotnosti v době odběru a hmotnosti rostliny před ošetřením? Nebo jde o čerstvou hmotnost při finálním odběru?
- V úvodu postrádám, explicitní propojení primárního stresu ze sucha se sekundárním oxidativním stresem (zatímco u nízké teploty mechanismus máte) – můžete prosím doplnit?
- Na str. 45 u vyhodnocení obsahu ROS v kořenech a listech po přerušení závlivky je zřejmě omylem uvedeno místo působení sucha působení chladu – prosím opravte formou opravného lístku.
- V diskusi absence zvýšení obsahu ROS v kořenech i listech uvádíte jako možný důvod efektivní zhášení antioxidantními systémy. Můžete navrhnout konkrétní látky, které by bylo vhodné u bramboru sledovat jako indikátory efektivního zhášení ROS?
- Co soudíte o parametru specifické listové plochy (SLA $\text{m}\cdot\text{g}^{-1}$) jako možného růstového markeru odolnosti k suchu a chladu či stresové paměti u bramboru? Jsou v literatuře dostupné údaje?
- V práci řešíte stresovou paměť v situaci, kdy aklimační a následující stres jsou stejného charakteru. Ví se u bramboru o stresové paměti spojené s tzv. cross tolerancí k suchu či chladu? Jak byste se stávajícími zkušenostmi navrhla hypotézu a experiment týkající se cross tolerance k vybraným abiotickým faktorům u bramboru?
- Jak sama uvádíte v diskusi, díky časové tísní se nepodařilo některé analýzy dokončit do odevzdání práce. Pokusila jste se něco finalizovat za účelem posílení závěrů při obhajobě?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: