

Oponentský posudek

magisterské diplomové práce Bc. Marka Neuberga :

„ Redukce negativních účinků stresového etylénu u rostlin pomocí bakterií kořenové rhizosféry.“

Předložená diplomová práce Bc. Marka Neuberga je zpracována na 40 stranách textu včetně obrázků a seznamu citované literatury čítajícího 62 položek. Obsahuje kratičký seznam použitých zkratk, zhruba jednostránkový úvod, přehled cílů práce, sedmistránkový literární přehled, popis použitého materiálu, médií a metod, popis výsledků na cca 8 stranách včetně grafů, třístránkovou diskusi a závěry, což odpovídá zvyklostem pro práce tohoto druhu.

Práce se zabývá studiem vlivu etylénu na vadnutí řezaných květů chryzantémy a využitím bakterie *Enterobacter cloacae* Cal2 ke snížení obsahu tohoto stresového fytohormonu. Bakterie patří do skupiny tzv. PGPR (Plant Growth Promoting Bakteria) a je vybavena enzymem ACCD (deamináza ACC). ACC je kyselina 1-aminocyklopropan-1-karboxylová, která je prekurzorem etylénu a je jinak enzymem ACCO (ACC oxidázou) převáděna na etylén, jež se podílí na snížení životnosti řezaných květů, urychluje totiž senescenci a opad květů po opylení a ovlivňuje to, co je důležité pro rostlinu a nevýhodné pro květináře, snažící se řezané květy udržet co nejdéle krásné, totiž vývoj semen. Použití bakterií (jimž ACC slouží jako zdroj N, C a energie) by mohlo nahradit syntetické inhibitory tvorby etylénu, nejčastěji na bázi stříbra, které jsou většinou toxické. Z tohoto pohledu je myslím práce velmi přínosná jak z vědeckého tak z praktického hlediska.

Sama bakterie, jak je zmíněno v literárním přehledu, může produkovat auxin (IAA) a tím stimulovat produkci ACC a biosyntetickou dráhu etylénu. ACC je z vnějšího prostředí rostliny bakterií odebírána a tak je ve větší míře do vnějšího prostředí uvolňována i endogenní ACC, což v konečném důsledku vede ke snížení produkce etylénu rostlinou a prodloužení životnosti a čerstvosti květu.

Literární přehled je docela hezky zpracován, jen bych se autora chtěla zeptat, jestli ví, odkud vlastně pochází onen etylén, jehož produkci měřil, ve které části květu či rostliny vzniká, případně odkud pochází signál pro jeho syntézu a jak je to s citlivostí rostlin (kultivarů) na etylén?.

Je etylén tím nejdůležitějším faktorem, ovlivňujícím životnost květů?

Faktorů, které ji mohou ovlivňovat je celá řada, jak je zmíněno v literárním přehledu. Ví se něco o bakteriích, které se přirozeně vyskytují ve vodě ve váze na bázi odříznutých stonků, jak ony ovlivňují například stav cévních svazků a příjem vody a tím i vadnutí květů?

Na str. 6 je věta „Etylén je nejjednodušší chemická látka s biologickou aktivitou.“ Myslím, že míněno bylo hormonální či regulační aktivitou, protože jinak jsou jistě i látky chemicky jednodušší, které také mají biologickou aktivitu. Ale nechci chytat autora za slovíčko.

I v této práci se objevuje citace učebnice Taiz, L and Zeiger E. (1991) Plant Physiology na místě, kde by asi měl být citován původní autor, ale jen asi ve dvou případech.

Pokud se týká metodiky, výsledků a diskuze možná jsem něco přehlédla, ale marně jsem hledala vysvětlení, proč se přidával auxin (IAA) k rostlinám a proč v koncentracích, které jsou dost vysoké (ve srovnání s fyziologicky se vyskytujícími v rostlinách). Tyto koncentrace budou pro růst inhibiční.

Předpokládám, že cílem bylo experimentální zvýšení produkce etylénu v různých variantách různé, aby se prokázalo, že i při vysokých koncentracích bakterie obsah etylénu snižuje.

Mimochodem, je-li koncentrace etylénu vysoká díky vyšší koncentraci IAA, pomohla by vyšší koncentrace bakterií k jeho efektivnějšímu snížení? Byla použita jen jedna koncentrace bakterií.

Trošku jsem měla problém se orientovat v metodické části na str.15, kde jsou použity dvojitě jednotky, které znamenají tutéž koncentraci ($\mu\text{g/ml}$ a mg/l), ale spíše bych se chtěla zeptat na způsob přípravy roztoku IAA. Tam se uvádí, že se rozpouštěla v 1M NaOH, což je hydroxid. Jaká byla pak výsledná koncentrace v jednotlivých roztocích o různé koncentraci IAA? Mohlo to nějak ovlivnit pH roztoků? Tzv. negativní kontrolu je umístěna v destilované vodě, která asi bude mít pH víceméně neutrální.

V části „Výsledky“ se v grafech na str. 24-27 uvádí produkce etylénu v $\mu\text{l/g}$ hod. Hmotností k níž je produkce vztažena se miní hmotnost květu? V metodice na str.14 je totiž uvedeno, že květy byly zváženy, ale v kapitole „Výsledky“ jednotka v nichž se produkce etylénu vyjadřuje blíže specifikována není.

Zajímavé je ono „druhé maximum“ produkce etylénu při vyšších koncentracích IAA (viz graf str. 24), protože ono je přítomno ve variantách bez bakterie (graf č.3), ale ne v těch s bakteriemi (graf č.4). V diskusi na str. 30 se píše, že by to nemusel být etylén, ale nějaké produkty rozkladu karotenoidů?. Co by to mohlo být za látku? V metodické části na str. 17 se uvádí, že plynový chromatograf byl kalibrován na vzdušný methan, protože ten kolona není schopna od etylénu odlišit. Pokud to opravdu není etylén, mohl by to být methan? A mohla by ho bakterie také využívat?

Trošku mi také uniká, proč se měřila rychlost translokace bakterie stonkem, z obrázku na str. 28 je patrné, že za 18 hodin doputovala část bakterií (respektive jejich radioaktivní značka) do vzdálenosti cca 4 cm od báze stonku. Celková délka stonku je 6 cm. Ke květu se tudíž nedostaly, alespoň ne v průběhu pokusu.

Z výsledků vyplývá, že bakterie *Enterobacter cloacae* Cal2 jednoznačně snižuje produkci etylénu rostlinou a tím oddaluje subjektivně hodnocené vadnutí květu chryzantémy. Otázkou zůstává, jak přesně to dělá? Odebírá ACC z roztoku v němž je stonek ponořen, z buněk stonku?

Dále se můžeme ptát, do jaké míry samotná koncentrace plynného etylénu může ovlivňovat tyto procesy, protože nádoby pro měření musely být na 60 minut uzavřeny, aby bylo možno měřit koncentraci etylénu.

V této souvislosti bych se chtěla zeptat jestli měření produkce etylénu i subjektivní hodnocení míry vadnutí rostlin se provádělo na stejných rostlinách nebo byly použity dvě sady rostlin?

Závěrem bych shrnula, že magisterská diplomová práce Marka Neuberga je přehledně členěna, dobře graficky zpracována a až na drobné nedostatky srozumitelně napsána. Autor prokázal velmi dobrou znalost literatury (citace jsou rovněž korektní), schopnost samostatné experimentální práce a hodnocení získaných výsledků.

Proto doporučuji jeho práci k obhajobě s hodnocením velmi dobrý.

V Českých Budějovicích 24. ledna 2008

M. Hronková

Ing. Marie Hronková, PhD

OPONENTSKÝ POSUDEK

Magisterská práce Bc. Marka Neuberga řešená na Katedře fyziologie a anatomie rostlin Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích s názvem „*Redukce negativních účinků stresového etylénu u rostlin pomocí bakterií kořenové mikroflóry*“ se vztahuje k aplikovanému výzkumu. Téma se dotýká problematiky snížení stresu a zpomalení vadnutí řezaných okrasných květin. Zabývá se přístupem založeným na poznatcích o vzájemných metabolických interakcích mezi rostlinou a mikroorganismy v její kořenové zóně.

Smyslem práce bylo zavedení a optimalizace metody pro měření produkce etylénu, fytohormonu zodpovědného za vadnutí, u řezaných květů a otestování možnosti aplikace vybraného bakteriálního kmene za účelem snížení hladiny etylénu a zpomalení vadnutí.

Cíle práce byly v úvodní části definovány. Informace potřebné k pochopení studované problematiky byly prezentovány v literárním přehledu. Domnívám se, že samostatná podkapitola měla být věnována fytohormonu indolyl-3-octové kyselině (IAA).

Je třeba vytknout, že se autor nepokusil na konci úvodu do problematiky stručně formulovat, jak bude svých cílů dosahovat a proč zvolil příslušné přístupy. Práci je nutno vytknout také absenci jakýchkoliv pracovních hypotéz.

Studie byla prováděna s jedinou rostlinnou varietou *Dendrathera grandiflorum* var. Sunny euro a bakteriální kulturou *Enterobacter cloacae* Cal 2, která byla získána ve spolupráci s autorem modelu využití PGPR bakterií k snížení hladiny etylénu při stresové odpovědi rostliny - profesorem Glickem z kanadské University Waterloo.

Hlavní experimentální práce spočívala v určení průběhu vadnutí řezaných květů u pokusné variety. K tomuto účelu sloužil experiment založený na aplikaci různých koncentrací fytohormonu indolyl-3-octové kyseliny (IAA) na řezané květy. Stupeň vadnutí byl hodnocen vizuálně na základě pořízených fotografií v průběhu experimentu. Nebylo doloženo na základě kolika pokusů, měření a snímkování bylo hodnocení provedeno. Tato metodická část je doprovázena galerií fotografií a popisem hlavních stupňů vadnutí.

Všechny varianty téhož pokusu byly paralelně prováděny v přítomnosti zvolené PGPR bakteriální kultury. Během pokusu byla měřena produkce etylénu pomocí plynové chromatografie. Popis GC analýzy neuvádí základní údaje, na základě kterých by mohlo být GC měření zopakováno.

Za účelem zjištění rychlosti průniku bakteriální kultury do tkáně ošetřené rostliny byl proveden experiment se značením bakteriálních buněk radioizotopy a jejich následné detekce. Nejsou uvedeny podrobnosti o technice detekce.

Metodika předkládané práce neuvádí žádné statistické přístupy pro hodnocení výsledků.

Získaná data byla zpracována do 11 grafů a okomentována v textu. Závislost stupně vadnutí na různé koncentraci IAA v průběhu času byla znázorněna sloupcovými diagramy, z nichž je vyvozeno potvrzení závislosti stupně vadnutí na koncentraci IAA. Tento závěr však není podložen statisticky. Podobně bez statistické analýzy je vyvozována časová závislost a vliv bakteriální kultury. Práce neuvádí žádné statistické porovnání naměřených dat a chybí tím pádem i vyhodnocení průkaznosti vlivu sledovaných faktorů na vadnutí.

Průběh produkce etylénu v závislosti na čase, přítomnosti bakteriální kultury a koncentraci IAA byl hodnocen na základě tří měření. Průměrné hodnoty byly zpracovány formou přehledných grafů. I v tomto případě chybí statistická analýza, která by umožnila vyhodnocení průkaznosti testovaných faktorů na produkci etylénu.

Rychlost průniku bakteriální kultury zachycuje graf č. 11; není zřejmé, jaký parametr udává osa y, což souvisí i s nedokonalým vysvětlením v metodické části.

Diskuse se zabývá vlastními výsledky průběhu vadnutí a produkce etylénu, v obecné rovině je porovnává s podobnými současnými pracemi na jiných rostlinných druzích a diskutuje význam celé problematiky. Jednoznačné definování optimálních podmínek testované metodiky se však v diskusi ztrácí.

Shrnutí v závěrečné části má pouze formální charakter, *de facto* se jedná o kompletní text z části 3-*Cíle práce* převedený do minulého času.

Seznam citované literatury nemá zcela jednotnou formu.

Předkládaná práce řeší zajímavé téma. Nicméně řada základních nedostatků a zejména absence statistického vyhodnocení dat snižuje její celkovou hodnotu. **I přes zmíněné výhrady doporučuji k obhajobě před odbornou komisí.** Jelikož se jedná o práci magisterského stupně, hodnotím ji podmíněně stupněm 3, v případě excelentní obhajoby lze hodnocení o stupeň zmírnit.



RNDr. Dana Elhottová, Dr.

V Českých Budějovicích 25/1/2008

DOPLŇUJÍCÍ DOTAZY A PŘIPOMÍNKY

1. Za zásadní věc považuji zodpovězení otázky: Na základě kolika nezávislých pokusů byla předkládaná práce a s ní i zaváděná metodika vypracována?
2. Kolik rostlinných jedinců bylo použito? Odkud byly získány? Byly v den pokusu čerstvě uříznuty?
3. Jaké statistické metody a postupy navrhuje k doplnění hodnocení předložené práce?
4. Jak byly definovány optimální podmínky pro měření produkce etylénu u řezaných květů chryzantém?
5. Str. 14 *Příprava kultury*. Není zřejmé, jak byl odvozen vztah pro závislost mezi koncentrací bakteriální suspenze a absorbancí. Prosím vysvětlete.
6. Str. 21. výraz „Vyplívá“, prosím opravit.
7. Lze etylén měřit bez interference s metanem na koloně jiných separačních vlastností?