



Reviewer's opinion on the Ph.D. Thesis of Martina Vráblová

Author : Mgr. Martina Vráblová

Regulation of stomatal development by environmental conditions and physiological processes in the leaf

Supervisor: prof. Ing. Jiří Šantrůček, CSc.

Reviewer: prof. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D.

The present thesis is aimed on investigation of nature of stomatal development and its regulation by environmental conditions (light, CO₂ concentration) and physiological processes in the leaf of higher plants. The overall aim of the thesis was to reveal the way how stomatal development is influenced by environmental conditions and how stomatal development is projected in leaf physiology. While a lot of attention has been paid to the research of the stomatal development and behavior in last decades, still a lot of knowledge is still missing about the interconnection between stomatal development and physiology. The research of the present Thesis thus brings very original knowledge about the effect of a combination of external and internal factors affecting stomatal development. I highly value its contribution to understanding how stomatal density and pattern influence leaf physiology and *vice versa*. For me as very interesting part was an inventive approach for studying transgenerational effect in stomatal development, since only little has been known about it till now. This part of the reasearch is presented only as a manuscript, however, I foresee this will not be that difficult to publish it in a good, impacted journal.

The Thesis is based on altogether 5 research parts, out of that 4 were already published in highly impacted plant science journals – all above a median for plant science (oscillating slightly above 1) - and one is in a form of a manuscript. In my opinion, this is a large volume of research, and I also appreciate that for the 2 last papers the defending student is a leading author.

The thesis starts with General Introduction, which gives on 17 pages review of the existing knowledge on stomatal development and its genetic and environmental controls, stomatal physiological functioning in leaf gas exchange and the last part is given to the transgenerational effect in stomatal development. It gives a very good background to the papers, which constitute the research part of the Thesis.

I appreciated that a special attention was devoted to the precise and concise formulation of the aims and hypotheses for the overall Thesis. This is very helpful to a reader to understand well to the complexity of the present research. The author states here „The research was based on (1) molecular approachand (2) physiological approach...” I myself would recommend to add also (3) anatomical approach since anatomical parameters of epidermis consituted an important part of the Thesis in my opinion and quantitative anatomical methods are rather undervalued in the present research.

Material and Methods are presented on 6 pages. Since I am myself in my research focusing on quantitative plant anatomy, too, I miss in this list a description of the methodology for estimation of stomatal parameters – stomatal and pavement cell densities and stomatal index.

Jana Albrechtova, Ph.D.

- Professor of Plant Anatomy and Physiology
- SCERIN Coordinator <http://csebr.cz/scerim/>
- President of the Czech Society for Experimental Plant Biology
- Member of the Executive Committee of the Council of Scientific Societies of the Czech Republic
- Head of the Scientific Board for Ph.D. studies in Plant Anatomy and Physiology at Fac. Sci, CU
- Guarantor of the Mgr. Study in Plant Anatomy and Physiology at Fac. Sci, CU

Department of Experimental Plant Biology
Faculty of Science, Charles University,
Viničná 5, Prague 2,
128 44, Czech Republic

E-mail: jana.albrechtova@natur.cuni.cz
Skype: jana_albrecht
Tel. office: +420-221951959
Mobile: +420-734272462

Administrative office:
Phone: +420 221 951 689
E-mail: kozlova1@natur.cuni.cz
Fax: +420 221 951 704

Charles University
VATIN: CZ00216208

I have several methodical questions to this. Stomatal index (SI) is first in the thesis defined on p. 2 as „number of stomata per total number of epidermal cells“ and the author of SI has not been cited what it should be or could in my opinion. In his work as it was first defined the definition is related to a certain unit of area, i.e. „the number of stomata per unit leaf area to the number of epidermal area cells plus guard cells per unit leaf area“. My question is, how the area for selection and counting of stomata and pavement cells was designed. Was the unbiased sampling frame used? I wonder how the principle of unbiased estimation of SI was applied. I also wonder what was the system for selection of sampling frames on a leaf epidermis? Was the principle of systematic uniform random sampling applied? As it is generally known there are anatomical gradients on a leaf in quantitative leaf parameters, thus, these should be regarded during design of sampling of observation fields on a leaf lamina. Could the defending colleague during the defense to give more thorough explanation on how sampling of observation fields on leaf lamina was accomplished with what aim in a particular paper?

The conclusions are written in a concise way, hypotheses evaluated giving good idea about overall contribution of the Thesis to important traits of environmental control of stomatal development and function. As a very valuable finding I regard revealed parental effect influencing stomatal development and proposed the role of cotyledons in light intensity sensing. However, more research will be needed for full elucidation of the phenomenon, to find the source and mediators of this type of signalization. Similarly, transgenerational effects in stomatal developments should be explored. Though the present Thesis brings a very valuable pilot study to this.

Regarding a formal quality of the Thesis – I regard it as very good again, written by good English with very minor grammatical errors, though I am not a native speaker so I cannot judge it well. As a minor obstacle for a reader of the Thesis I see a missing List of Abbreviations after the Thesis Contents. Particularly in the case of SD abbreviation, which is the most commonly used in a scientific community as an abbreviation of „standard deviation“, while here it stands for stomatal density. Since the list of abbreviations is missing, it would be better to introduce this abbreviation already in the Thesis background.

I have also few small remarks regarding figure captions (it is not necessary to read it during defense):

- Fig. 1 – Too small characters in the Figure – I could not read them after printing, only when enlarging in pdf to 200%. In the figure legend there is written – according to Bergmann & Sack (2007). I wonder if it was changed in the Figure comparing to the original, since if figure was adopted then better would be to write From. Stomatal developmental pathway FAMA is not explained in the legend.
- Fig. 2: The Figure caption is not clear: it refers to (A) and (B), which are not marked in the image. As a source is given (Serna *et al.*, 2002). Does it mean it was fully adopted or modified?
- I would appreciate a better description of Fig. 9: what is a color scale in right image? Do the values 17.3 and 19.1 correspond to degrees of centigrade?

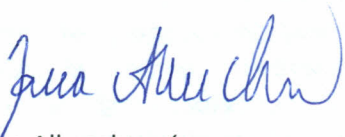
On p. 111: Santrucek J, *et al.* (2014) – while all other references list all authors, I think.

Further questions for discussion:

1. Surprising for me was the information that studies relating stomatal anatomy and frequency to leaf gas exchange are rare till now. Particularily because the quantification of stomata density and stomata length or size belong to the oldest studied quantitative parameters of a leaf, so I would have expected more focus to it. What is opinion of the author about this state?
2. What is opinion of the author about the reason for the finding in her manuscript Vráblová et al. that high light reduced amphistomy in favour of lower (abaxial) leaf side.

To conclude my review, I would like to state that I was really highly pleased by the exceptionallly good quality of the Thesis presented by Martina Vráblová. I can state it from the point of view of the Head of the Scientific Board for the Ph.D. Studies in Plant Anatomy and Physiology at my home institution – Charles University in Prague. In my opinion, the Thesis is excellent even under international measures. The research introduces an excellent combination of molecular, physiological and anatomical approaches, adopting up-to-date methodology. The results bring very important contribution to knowledge on understanding how stomatal density and pattern influence leaf physiology and *vice versa*.

In the end I would like to express my conclusion about exceptionally good quality of the theses and the research presented there by the Ph.D. Candidate Martina Vráblová and I recommend the thesis to the defence. If defended positively I strongly recommend awarding the title Ph.D. to Martina Vráblová.



Jana Albrechtová

10.10.2017



Posudek na disertační práci

Autorka: Martina Vráblová

Téma práce: Regulation of stomatal development by environmental conditions and physiological processes in the leaf

Předložená disertační práce se zabývá oblastí regulace vývoje jedné z nejdůležitějších částí rostlin, pokožky listů, která významně ovlivňuje schopnosti rostlin reagovat na podmínky vnějšího prostředí. Téma je tedy velmi aktuální a důležité a na první pohled by se také mohlo jevit jako poměrně dobře prozkoumané. Práce však vybrané téma nejen podrobně zpracovává, ale ukazuje také výrazné mezery v našem současném poznání této oblasti biologie rostlin a také některé z těchto bílých míst předloženými výsledky doplňuje.

Práce je složena ze dvou hlavních částí. Rozsáhlejší z nich je soubor publikací, který tvoří tři články už publikované v časopisech a jeden rukopis článku, jejichž je uchazečka spoluautorkou. Kvalitu už publikovaných prací dokládá nejen poměrně vysoký impakt faktor časopisů, ve kterých vyšly, ale zejména kvalitní způsob jejich zpracování. Využívají nejmodernější metodické přístupy používané ve zkoumané oblasti a také prezentace dosažených výsledků je velmi bohatá, doplněná o pečlivou statistickou analýzu dat a řadu doplňkových grafů rozšiřujících pohled čtenáře na zkoumaný problém.

Oddíl příloh předchází kratší úvodní část práce, která obecněji představuje zkoumanou problematiku a syntetizuje hlavní informace z publikovaných prací. Úvodní oddíl je členěn do několika kapitol. První z nich je obecný úvod, kde autorka přehledně popisuje hlavní známá fakta v oblasti vývoje epidermis listů a jeho regulace. Zabývá se také vlivem aktivity průduchů na celkovou rychlost výměny plynů mezi rostlinou a prostředím. Představení tématu je přehledné a zahrnuje dostatek detailních informací i odkazů na příslušnou literaturu.

Po uvedení do problematiky prezentuje autorka cíle a hypotézy, které stály na počátku každého výzkumného úkolu, prezentovaného v příložených publikacích. I tato kapitola je přehledná, cíle i hypotézy jsou jasně formulovány.

V další kapitole popisuje autorka stručně metody používané v experimentech prezentovaných v práci. Jednotlivé metody jsou popsány podrobně v publikovaných pracích, takže přehled je poměrně stručný, ale jasný a shrnující. Tato kapitola také dobře ukazuje poměrně velkou šířku





spektra metod, které výzkumný tým, jehož byla autorka členem, při práci na experimentech využíval.

Ve čtvrté kapitole úvodního oddílu autorka popisuje a komentuje postupně hlavní výsledky podrobně prezentované v druhé části práce ve formě publikací. Tento popis, rozsahem příliš nepřesahující abstrakta publikací, vcelku přehledně a samostatně shrnuje výsledky dosažené v rámci každé publikace. Pro plné pochopení získaných výsledků a zejména závěrů je však nutné prostudovat přiložené publikace, v nichž jsou získané výsledky všech experimentů shrnuty a diskutovány velmi pečlivě.

Celková syntéza informací prezentovaných v práci je pak provedena v poslední kapitole prvního oddílu se závěry a výhledy do budoucna. Tuto kapitolu považuji za velmi důležitou část prvního oddílu práce a potřebnou pro lepší objasnění existujících souvislostí mezi jednotlivými zkoumanými tématy. Domnívám se, že to se autorce podařilo. Jen obtížně se však mohla vyhnout opakování části faktů z předchozí kapitoly a nabízí se tedy otázka, proč tyto dvě poslední kapitoly nespojila do jedné velké, obecněji diskutující všechny dosažené výsledky. Většina poslední kapitoly však obsahuje nové pohledy a závěry, takže celkový velmi příznivý dojem práce nezmenšuje.

Předložená práce je celkově zpracována pečlivě i po formální stránce. Pro čtenáře je přehledná, obsahuje logicky seřazené všechny informace potřebné k dobrému pochopení prezentovaných závěrů. Práce je celá vypracovaná v angličtině, a pokud mohu soudit pohledem nerodilého mluvčího, je po jazykové i stylistické stránce velmi dobrá s minimem chyb a dobře se čte. Dotazy na uchazečku do diskuse a další drobné komentáře k práci jsou uvedeny v příloze tohoto posudku.

Autorka v této práci jasně ukázala, že dokáže samostatně plánovat, provádět a vyhodnocovat experimenty, které mají odpovědět na důležité otázky a jsou přínosem poznání ve vědě. Ukázala také, že umí tyto výsledky přehledně prezentovat nejen ve své disertační práci, ale zejména ve formě publikací v kvalitních mezinárodních časopisech svého oboru. Předloženou práci tedy s potěšením doporučuji k obhajobě.

V Brně 4. 10. 2017

doc. RNDr. Vít Gloser, Ph.D.





Příloha posudku disertační práce Martiny Vráblové

Domnívám se, že kvalita zpracování a vědecká hodnota dosažených a publikovaných výsledků, které jsou součástí práce, byly dostatečně posouzeny odbornými recenzenty renomovaných časopisů, ve kterých jsou publikace vydány. Proto bych rád svými komentáři a dotazy vybědl autorku k diskusi o otázkách, na které jsem v celém textu disertace většinou nenašel odpověď.

Bývá poměrně časté, že studenti PGS pracují také na vývoji nebo vylepšení výzkumných metod. Disertační práce je také vhodným textem, kde je možné popsat případné metodické potíže, které se při experimentech vyskytly a jejich řešení. Je škoda, že tyto informace disertace neobsahuje. Zajímalo by mne tedy alespoň, jestli přispěla uchazečka také nějak k vylepšení některé z použitých metod, a kterých svých metodických zkušeností si nejvíce cení?

Autorka ukázala ve své práci, že při zvýšení hustoty průduchů je rychlost asimilace omezoována vodivostí listového mezofylu pro CO₂. Jaké faktory nebo znaky mohou tuto vodivost ovlivňovat a které z nich se pravděpodobně uplatnily v prezentovaných experimentech?

V práci je dobře prokázáno, že průduchy vyvinuté ve shlucích jsou také funkčně jiné než průduchy vyvinuté normálně (odděleně od sebe). Může autorka stručně shrnout hlavní příčiny těchto funkčních rozdílů (například rozdílné kinetiky otvírání a zavírání) mezi těmito dvěma skupinami?

Přesvědčivě prokázat přenos informačního signálu ze starších do mladších listů je poměrně obtížné. Zvolená technika sledování vývoje průduchů na děložních listech a na prvních pravých listech je jistě poměrně jednoduchá avšak nespecifická. Existují už nějaké hypotézy, jakou může mít regulační signál povahu? (např. chemický, elektrický, hydraulický apod.) Existují i nějaké experimenty ukazující na jakou vzdálenost signál může působit?

Předložená práce hezky ukazuje, že zatímco zvýšení hustoty průduchů nepřinese většinou rostlině pozitivní efekt v podobě zvýšeného zisku uhlíku. Naopak mírné snížení hustoty průduchů může pomoci zefektivnit využití vody a tím vylepšit toleranci rostlin k suchu. Jaký má uchazečka názor na možné genetické modifikace znaků spojených s průduchy/morfologií listů (např. hustoty průduchů) jako nástroje pro zvyšování odolnosti rostlin ke stresu suchem?

