



### **Posudek na disertační práci Ing. Ireny Hoštičkové: “Analýza genů indukovaných abiotickým stresem u řepky.”**

Disertační práce řeší téma, které je z pohledu současných výkyvů počasí vysoce aktuální a vzhledem k předpovědním modelům asi čím dále častější. Jedná se o problematiku šlechtění rostlin na odolnost vůči abiotickým stresorům. Z tohoto pohledu jsou výsledky uvedené v předložené disertační práci nejenom aktuální, ale také podnětné pro aplikovaný, ale i teoretický výzkum. Disertantka uvedenou problematiku řešila na několika významných pracovištích v rámci studované problematiky, proto se domnívám, že získané výsledky jsou velmi zajímavé a cenné. Je na škodu, že výsledky byly opublikovány pouze v jednom časopisu s IF.

Předložená disertační práce je členěna a psána standardním způsobem a je napsána na 90 číslovaných stranách textu. Oceňuji velké množství prostudované literatury, které zahrnuje 198 zdrojů uvedených v přehledu použité literatury. Jedná se především o zdroje z posledního období, ale i staršího data, která vhodným způsobem konfrontuje se současnou úrovní vědeckého poznání.

V úvodu svého posudku bych chtěl konstatovat, že předložená disertační práce je psána velmi krásnou češtinou, bez výrazných překlepů či prohřešků proti gramatice (např. drůda, tresu apod.). Také po formální stránce se jedná o velmi kvalitně zpracovanou práci. I přesto se v textu některé chyby či překlepy objevují. V rámci terminologie by bylo vhodnější používat termín stresor a nikoliv stres. *Jaký je v tom rozdíl?* V textu je nesprávně uváděno pracoviště VÚRV, v.v.i. v Praze – Ruzyni. Při psaní fyzikálních jednotek je nutné si uvědomit, jak jsou čtena, neboť při psaní bez mezery se jednotka čte jako přídavné jméno a v případě psaní s mezerou jako jméno podstatné. Dále vědecká jména rostliny se píší kurzívou (s. 26 - *Arabidopsis*). Na s. 23 je text poněkud neupravený, když došlo k odskočení odstavce a věty od původního textu. Domnívám se, že fyzikální označení jednotky Dalton je Da (kDa) a nikoliv D, jak je uvedeno na s. 18.

V literárním přehledu se autorka zabývá především problematikou šlechtění řepky olejky, jako významné olejniny v podmínkách ČR a její odolnosti vůči stresorům. Pozornost byla věnována nejenom obecným zákonitostem stresové reakce vůči vodnímu deficitu, ale



také vůči chladu. Autorka velmi pečlivě uvádí současné poznatky o vlivu sucha a chladu na rostliny, včetně reakcí rostlin. Není opomenuta ani otázka LEA proteinů a dehydrinů. Možná by bylo vhodné text obohatit i o další látky, které souvisí s reakcí rostlin na výše uvedené stresory. Jedná se o tzv. osmoprotektanty. *Můžete, prosím uvést některé příklady těchto látek?* Navržené cíle a hypotézy jsou jasně formulovány a navazují na ní zvolené metody zpracování.

Zvolené metodické postupy jsou odpovídající a poskytují komplexní pohled na genetický základ stresových reakcí řepky olejky k vodnímu deficitu a chladu. V případě použití PEGu se spíše jedná o osmotický stres nežli vodní stres. V textu jsem nenašel zmínku o stáří rostlin, pouze o délce působícího stresoru, neboť jinak reagují na stresor juvenilní rostliny a jinak rostliny starší, u nichž mohlo dojít k aklimatizaci. Prosím o doplnění v rámci obhajoby.

V textu postrádám bližší popis použitých statistických metod, neboť ve výsledkové části je na ně odkaz. Prosím o doplnění v rámci obhajoby práce.

Výsledková část je zpracována velmi detailně a opírá se nejenom o fotodokumentaci a grafické znázornění dosažených výsledků. Jedná se o přehledné vyjádření výsledků. Při hodnocení získaných výsledků disertanta uvádí spíše procentické rozdíly hodnot než hodnoty naměřené. Možná by bylo vhodné tuto část doplnit právě o získaná data z měření a stanovení. V textu se objevují odkazy na statistické analýzy, ale v grafech nejsou tyto uvedeny. To poněkud snižuje výsledkovou část.

Na s. 35 je uvedeno, že ..*“U obou odrůd Cadeli došlo po 24 hodinách...”* Nejedná se o varianty?

*Dá se ze získaných výsledků u sledovaných genotypů řepky stanovit nějaký trend či závislost, která by byla využitelná v rámci dalšího šlechtění či výběru šlechtitelského materiálu?*

Diskuse je v rámci celé práce sice relativně krátká, zahrnující 11 stran textu, ale přesto je dostačující. Autorka své výsledky srovnává s literárními údaji a snaží se je zobecnit a zhodnotit. Z uvedené části je patrný zájem o danou problematiku a pochopení jednotlivých vztahů mezi měřenými parametry a možnou mírou odolnosti rostlin vůči suchu. Autorka v této kapitole prokázala své umění syntézy a práci s literaturou a interpretaci uváděných



skutečností, včetně vytýčení dalšího směru výzkumu v této oblasti. Nejedná se o pouhé srovnání výsledků s literaturou.

Závěry jsou shrnující a postihují významné dosažené výsledky, možná bych je uvedl pro přehlednost do bodů a seřadil bych je podle cílů a hypotéz.

V uvedené disertační práci však postrádám kapitolu věnovanou rozvoji dané vědní disciplíny a uplatnění výsledků v praxi. Bývá totiž zvykem, že uvedená kapitola je součástí disertační práce. Prosím disertantku, aby se v rámci obhajoby své práce zaměřila také na tuto otázku.

Jak již bylo uvedeno výše, autorka cituje 198 literárních pramenů. Bohužel několik literárních pramenů jsem v přehledu literatury nenašel, nebo byl rozpor mezi citováním v textu a v přehledu použité literatury. Jedná se např. o citování zdroje Hughes et al. (2010; 2013), kdy v textu je uvedena Hughesová et al. (2010; 2013).

Naopak několik pramenů jsem nenašel nebo přehlédl v textu (např. Rurek (2010); Livak and Schmittagen (2001); Nylandera et al. (2001)). U citace Hejna (nepublik.) by bylo možné uvést ústní sdělení, které se však také uvádí jako zdroj informace.

K disertantce mám následující otázky:

1. Jaký je vztah mezi dehydriny a odolností vůči nízkým teplotám?
2. Jakým způsobem dochází k vymrzání porostů při nedostatku sněhu?

Závěrem bych chtěl konstatovat, že předložená práce Ing. Hoštičkové splňuje i přes uvedené poznámky či připomínky kritéria pro disertační práce. Na základě svého posudku doporučuji uvedenou disertační práci k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení navrhuji Ing. Ireně Hoštičkové udělit akademický titul doktor, ve zkratce „Ph.D.“

V Praze: 15. 4. 2019

Doc. Ing. František Hnilička, Ph.D.

## Posudek disertační práce

|                     |                                                                 |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <b>Název práce:</b> | Analýza genů indukovaných abiotickým stresem u řepky            |
| <b>Autorka:</b>     | Ing. Irena Hoštičková                                           |
| <b>Pracoviště:</b>  | Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta |
| <b>Školitel:</b>    | prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.                                |
| <b>Oponentka:</b>   | doc. Dr. Ing. Pavlína Smutná, Mendelova univerzita v Brně       |

Předkládaná práce se zabývá aktuální problematikou hodnocení úrovně odolnosti řepky olejky vůči abiotickým stresovým faktorům, konkrétně chladu a suchu. Výsledky uvedené v práci byly získány v rámci šesti grantových projektů podpořených NAZV a Grantovou agenturou Jihočeské univerzity. V teoretické části autorka stručně shrnuje význam řepky jako důležité olejninu a zmiňuje se také o šlechtitelské práci, díky níž bylo u této plodiny dosaženo velkého pokroku. Větší pozornost pak věnuje problematice abiotického stresu u rostlin, a to zejména z hlediska regulace průběhu reakce rostliny na stres jak na úrovni genů, tak na úrovni ochranných proteinů.

V části „**Hypotézy a cíle práce**“ jsou definovány dvě výzkumné hypotézy a formulovány tři dílčí cíle. Tyto cíle na sebe logicky navazují a vykazují potenciál pro získání výsledků publikovatelných ve vědeckých časopisech.

V kapitole „**Materiál a metody**“ jsou popsány tři experimenty. V prvním byla u rostlin dvou odlišných odrůd řepky pěstovaných za nízké teploty hodnocena relativní exprese genu *ERD10* pomocí Rt-qPCR a zároveň stanovena akumulace odpovídajícího proteinu pomocí metody SPR. U navazujícího experimentu byly vybrány čtyři genotypy, u kterých byla očekávána kontrastní akumulace cílového proteinu. Rostliny byly opět pěstovány v podmínkách se řízeným stresem a v odebraných vzorcích listů bylo stanoveno množství proteinu a zároveň exprese tří homologních sekvencí genu *ERD10*. Třetí experiment hodnotil stresovou reakci u mikrosporových embryí kultivovaných v in vitro podmínkách, stres suchem byl navozen přidáním polyethylenglykolu do kultivačního media.

V části „**Výsledky**“, která je nejrozsáhlejší, jsou grafickou formou porovnány a okomentovány úrovně relativních expresí sledovaných genů a odpovídajícího proteinu zjištěné u kontrolních a stresovaných rostlin v jednotlivých experimentech. Také část věnovaná diskuzi je poměrně obsáhlá, autorka se zde snaží vysvětlit zjištěné rozdíly a konfrontovat je s již publikovanými poznatky jiných autorů. Práce je napsaná bez výrazných gramatických a

stylistických nedostatků a má pěknou grafickou úpravu, pouze opakované použití termínu „expresní analýza genů“ nepovažuji za příliš vhodné.

K jednotlivým částem mám několik dotazů a poznámek:

1. V experimentu označeném jako A bylo u rostlin odrůdy Cadeli pěstovaných za nízké teploty zjištěno výrazné zvýšení relativní exprese genu *ERD10* (Obr. 6), zatímco akumulace odpovídajícího proteinu hodnocená 11. den působení stresu zůstala na úrovni srovnatelné s kontrolními rostlinami (Obr. 9). U druhé sledované odrůdy Navajo však došlo k očekávanému nárůstu koncentrace proteinu. Autorka tuto skutečnost vysvětluje tak (str. 59), že vyšší počáteční akumulace proteinu by mohla být příčinou pomalejší reakce rostliny na stres, a uvádí souvislost s nižší úrovní exprese genu *ERD10* u odrůdy Cadeli. Z obrázku 6 však vyplývá, že vlivem nízké teploty došlo k významnému zvýšení aktivity tohoto genu již během prvního a druhého dne trvání stresu u obou odrůd v porovnání s kontrolní variantou. Poté došlo u obou odrůd k poklesu relativní exprese, která byla hodnocená po dobu 13 dní, akumulace proteinu však pouze 11. a 42. den. Je otázkou, jestli u takto koncipovaného experimentu je možné usuzovat něco o dynamice akumulace výše zmíněného proteinu, případně jeho efektu na průběh stresové reakce.
2. Z výsledků získaných v experimentu B vyplývá, že u všech čtyř hodnocených odrůd došlo k značnému nárůstu exprese testovaných genů (Obr. 11 až 13). U odrůdy Lagoda však nebyla po dobu působení stresu zjištěna vyšší akumulace dehydrinu (Obr. 10). V diskuzi jsou uvedeny dvě možné příčiny tohoto zjištění, a to přítomnost mutace, která by mohla navodit změny v translaci, nebo možnost, že vyšší koncentrace proteinu v pletivech blokuje další expresi příslušného genu. Přítomnost mutace by bylo možné relativně jednoduše ověřit pomocí sekvenování produktů PCR. Druhé tvrzení je problematické z důvodu nesouladu mezi dobou působení stresu pro stanovení akumulace proteinu (34 nebo 50 dní?) a termíny odběru vzorků pro hodnocení aktivity genů (6 dní). Domnívám se tedy, že na základě experimentu B nelze popsat případný dlouhodobější účinek proteinu nebo chladu na transkripci sledovaných genů.
3. Hodnoty relativní akumulace proteinu se u kontrolních rostlin v experimentech A a B výrazně liší (Obr. 9 a 10). Prosím o vysvětlení tohoto rozdílu.
4. Určité výhrady mám k použitému rostlinnému materiálu, jednotlivé genotypy nejsou v práci popsány a ani není zřejmé, jak se od sebe fenotypově liší. Tvrzení, že byly vybrány na základě předchozích výzkumů, by mělo být podloženo relevantními odkazy.

5. V metodice zcela chybí popis statistického zpracování dat. U jednotlivých výsledků je průběžně uváděna informace o statistické průkaznosti vlivu stresu na expresi jednotlivých genů zjištěná pravděpodobně pomocí analýzy rozptylu. Korektní použití této statistické metody vyžaduje data splňující určité předpoklady a v případě signifikantního efektu provedení následného testu pro porovnání průměrů. Na základě prezentovaných výsledků, a i vlastních zkušeností se domnívám, že hodnoty relativní exprese pro analýzu rozptylu příliš vhodné nejsou. Další otázkou je počet provedených opakování, v textu je pouze zmínka o třech technických opakováních, jejichž hodnoty ovšem nelze považovat za nezávislé. Prosím o upřesnění metodiky z hlediska statistického hodnocení jednotlivých experimentů.
6. Druhá z hypotéz je definovaná ve smyslu zjištění korelace mezi výsledky transkriptomických a proteomických analýz, ale v kapitole výsledky ani v diskuzi tato otázka řešena není. Pokud by měla být SPR metoda použitelná pro selekce, jak autorka navrhuje, bude nutné vše ověřit na výrazně rozsáhlejším souboru odlišných genotypů a vyhodnotit závislosti nejen mezi aktivitou genů a akumulací ochranných proteinů, ale především s fenotypovým projevem.
7. Výše uvedené připomínky jsou převážně metodického charakteru. Je škoda, že se autorka během studia nepokusila o větší uplatnění dosažených výsledků ve vědeckých časopisech, věřím, že během redakčního řízení by došlo k vyjasnění a nápravě většiny nedostatků.

Na práci oceňuji snahu o studium reakce rostlin na stresové podmínky nejen na úrovni transkripce, ale také translace. Proteomické analýzy jsou finančně a technicky náročné a neumožňují snadnou separaci jednotlivých proteinů, což limituje jejich použitelnost pro selekci. Originalita předložené práce spočívá v použití inovativní optické metody rezonance povrchového plazmonu pro stanovení specifického produktu hodnoceného genu. Tato metoda vykazuje podle dostupných informací velký potenciál pro základní i aplikovaný výzkum. Z předkládaných výsledků je však zřejmé, že bude nutné tuto metodu optimalizovat a ověřit na dalších experimentech.

**Předložená disertační práce Ing. Ireny Hoštičkové prokazuje, že doktorandka je schopna samostatně řešit odbornou problematiku na požadované úrovni. Doporučuji tedy přijetí práce k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení navrhuji udělit výše jmenované akademický titul Ph.D.**

.....

V Brně, dne 18. 4. 2019

doc. Dr. Ing. Pavlína Smutná

**Posudek na doktorskou disertační práci**

**Autor:** Ing. Irena Hostičková  
*Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*

**Název:** Analýza genů indukovaných abiotickým stresem u řepky

**Oponent:** Doc. Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.  
*Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta,  
Mendelova univerzita v Brně*

Oponovaná disertační práce je standardně členěna (Úvod, Literární přehled, Hypotézy a cíle práce, Materiál a metodika, Výsledky, Diskuze, Závěr). Na začátku práce je uveden seznam recenzovaných publikací a aplikovaných výstupů, kde je doktorandka součástí autorského kolektivu; a dedikace předložené doktorské disertační práce na 6 výzkumných projektů (3x NAZV a 3x IGA JU). Disertační práce má 90 stran, obsahuje 23 obrázků a 4 tabulky.

**Souhrn (Summary)** je standardní a sumarizuje dosažené výsledky v průběhu řešení doktorské disertační práce.

V částech **Úvod** a **Literární přehled** autorka shrnuje poznatky o řepce olejce s důrazem na charakteristiku studovaného objektu a jeho šlechtění. Nejrozsáhlejší část je zaměřena na abiotický stres u rostlin. Je škoda, že autorka neudržela jednotnost v psaní a vysvětlování zkratk (a to v celém textu disertační práce). V případě, že práce je psána v českém jazyce, považoval bych za vhodné uvádět obsah obrázků v českém jazyce a nekombinovat český text s anglickými grafickými přílohami. Autorka na str. 12 používá termín „amfiploid“. *Bylo by možné vysvětlit rozdíl v terminologii „polyploid“ vs. „amfiploid“?* Na str. 14 je uvedena formulace „...je šlechtění na odolnost k fómovému černání stonku, neboť existuje mnoho ras tohoto patogena...“. *Je tato formulace správná? Který patogen je původcem onemocnění?* V textu se objevují i tzv. anglikanismy, např. overexprimovány.

**Hypotézy a cíle disertační práce** jsou jasně a srozumitelně formulovány.

**Materiál a metodika** je relevantně charakterizován materiál. V rámci experimentu „B“ bych považoval za vhodné charakterizovat (rozdělit) kontrastní

genotypy. Je možné uvést jejich rozdělení před zahájením experimentu vzhledem ke sledovanému faktoru? V metodice experimentu „C“ je uvedeno využití pevného diferenčního média. Je jeho složení uvedeno v práci Verslues et al. (2006)? Pokud ne, je možné ho uvést? V případě software použitých pro statistické analýzy by se mi zdálo vhodné uvádět i verze software. Od této části se v textu vyskytuje různý název VÚRV Praha-Ruzyně.

V části **Výsledky** autorka popisuje dosažené výsledky ve všech třech experimentech spojených se studiem abiotického stresu (chlad a sucho) u řepky. Mírně stížena orientace ve výsledcích je způsobena skutečností, že odkazy na jednotlivé obrázky (grafy) jsou uvedeny až za jejich umístěním v práci. Někdy se objevuje nepřesná formulace, např. str. 35 „.....u obou odrůd Cadeli....“. Správně by mělo být asi uvedeno „...u obou variant odrůd Cadeli....“. Významný výsledkem disertační práce se jeví i vývoj a testování biočipu (SPR analýza) a testování úrovně genové exprese u kandidátních oblastí spojených se stresovým faktorem sucho. Z výsledků (ale i navazující diskuze) se rýsuje možnost využití metody SPR pro kvalitativní detekci a nikoli pro kvantitativní detekci. *Mohla by doktorandka charakterizovat a doporučit jiné metody, které by mohly být použité pro srovnání dosažených výsledků, resp. validaci metody?*

Na dosažené výsledky navazuje část **Diskuze**, kde se povedlo autorce relevantně srovnat dosažené výsledky s jinými autory (publikacemi), včetně vyvození závěrů. V mnoha případech jsou nastoleny další otázky pro směřování studia problematiky abiotického stresu u řepky. Je škoda, že aspoň jeden z termínů SPR analýzy neodpovídá časové ose pro analýzu genové exprese genu ERD10. Tímto by mohl být vytvořen prostor pro další diskusi získaných výsledků. V rámci výsledků, ale i diskuze je zmiňována skutečnost o výběru genů na základě analýzy pomocí MALDI-TOF/TOF. *Jsou tyto výsledky někde dostupné? Vzhledem k získaným výsledkům, že v rámci působení různých abiotických stresových faktorů jsou do obranných mechanismů zapojeny stejné geny (oblasti), autorka v diskuzi zmiňuje vhodnost studia kombinace stresových faktorů. Mohla by doktorandka uvést příklad metodiky studia nějaké vhodné kombinace pro její modelovou rostlinu?*

**Závěr** doktorské disertační práce je adekvátní svým obsahem i rozsahem.

V **Seznamu literatury** je uvedeno více než 190 literárních pramenů zejména zahraniční provenience. Bohužel nejsou uvedeny všechny /např. Rurek (2010) str. 18, Hugnesová a Graether (2010) str. 19/. Rovněž citace nejsou uvedeny v jednotném formátu, což je nejvíce vidět na formátu citování časopisů v plném a zkráceném formátu (dokonce dvě varianty) nebo v diakritice jmen autorů.

**Závěr.** Doktorská disertační práce Ing. Ireny Hostičkové je zpracována na velmi zajímavé a hlavně aktuální téma. Byly získány velmi podnětné výsledky, které mohou být využity v dalším studiu abiotického stresu u řepky, ale i v praxi. Bohužel se autorka nevyvarovala drobných formálních nedostatků, které je možno odstranit např.

formou opravného listu. Tyto nedostatky ale nesnižují odbornou úroveň vlastní práce.  
***Na základě výše uvedeného doporučuji přijmout doktorskou disertační práci k obhajobě a na základě její úspěšné obhajoby udělit titul „doktor (Ph.D.)“.***

  
Doc. Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.

V Brně, dne 15. 4. 2019