

Oponentský posudek disertační práce

Autorka: **Mgr. Helena Kyseláková**

Název: **Obranné mechanismy rostlin proti oxidativnímu stresu**

Oponent: **Mgr. Marek Petřivalský, Dr.**

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Předložená disertační práce je tvořena shrnujícím textem v rozsahu 97 stran, který je doplněn přílohami - kopiemi dvou publikovaných prací a jednoho rukopisu v recenzním řízení. Text splňuje všechny formální požadavky na strukturu disertační práce a obsahuje obvyklé náležitosti jako český i anglický souhrn, obsah, cíle práce, teoretický úvod, použité metody, souhrn výsledků spojený s jejich diskusí a závěr. Připojeny jsou seznamy citované literatury, životopis a přehled publikačních výsledků autorky.

Tématem disertační práce jsou obranné mechanismy rostlin proti oxidativnímu stresu vyvolanému abiotickými i biotickými stresovými stimuly. Cílem autorky bylo sledovat změny fotosyntetického aparátu v listech ječmene vlivem oxidativního stresu indukovaného aplikací chemické látky methylviologenu a v listech hrachu způsobené infekcí virem enační výrůstkové mozaiky. V patosystému hrachu vystavenému virové infekci bylo dále cílem sledovat úlohu reaktivních forem dusíku a kyslíku v signálních drahách rostlinných hormonů a lokalizaci jejich produkce v infikovaných pletivech.

Cíle práce byly splněny, jak je možné posoudit z článků, na kterých se doktorandka podílela jako spoluautorka, publikovaných v impaktovaných časopisech *Journal of Plant Physiology* a *Plant Physiology and Biochemistry*, a dalšího rukopisu článku v recenzním řízení. Helena Kyseláková je první autorkou na jedné publikaci a zasláném rukopisu, a třetí autorkou další publikace; podíl autorky disertační práce na příslušných experimentech a příprav rukopisů jednotlivých publikací je vymezen v úvodním prohlášení.

V teoretickém úvodu jsou značně rozsáhlou formou shrnuty současné poznatky o vzniku reaktivních forem kyslíku v rostlinách, rozvoji tzv. oxidačního stresu a jeho souvislosti s interakcemi rostlin s patogeny. V textu jsou detailněji popsány nejvýznamnější obranné mechanismy rostlin vůči oxidativnímu stresu se zaměřením na ochranu fotosyntetického aparátu. Dále autorka uvádí velmi stručný popis metod použitých v jednotlivých experimentech projektů.

Ve výsledkové části jsou výstižně shrnuty stěžejní výsledky jednotlivých experimentálních studií, obsažené v jednotlivých publikovaných článcích a zasláném rukopisu. V první studii, publikované v **Kotabová, Kaňa, Kyseláková a kol., 2008** (Příloha I), byla potvrzena existence nerovnováhy mezi rozsahem deepoxidace xantofylových pigmentů a intenzity nefotochemického zhášení (NPQ) v podmínkách oxidativního stresu vyvolaného aplikací methylviologenu na listy ječmene za slabého osvětlení bílým světlem. Výsledky prokázaly, že ačkoli methylviologen nezpůsobuje měřitelné změny parametrů oxidativního poškození buněk, je rozsah oxidativního stresu možno sledovat jako pokles aktivity askorbátperoxidasy a nárůst aktivity glutathion-reduktasy.

V další studii, publikované v **Kyseláková, Prokopová a kol., 2011** (Příloha II) byl prokázáno, že lokální a systémová infekce rostlin hrachu virem enační výrůstkové mozaiky vede k urychlení senescence listů v důsledku snížení účinnosti fotochemie fotosystému II. Výsledky ukázaly, že v pozdějších stádiích infekce dochází k odbourávání fotosyntetických pigmentů, poklesu asimilace CO₂ a aktivaci fotoprotektivních mechanismů jako deepoxidace pigmentů a nefotochemického zhášení. Navazující studie, shrnutá v rukopisu **Kyseláková, Sedlářová a kol.** (v recenzním řízení, Příloha III) demonstrovala, že virová infekce je spojena se systémovými odezvami změn hladin hormonů kys. abscisové a salicylové a s indukcí akumulace heat shock proteinů HSP70 a aktivity

peroxidas. Rozvoj infekce v pletivech byl doprovázen zvýšenou hladinou reaktivních forem kyslíku a dusíku, které se mohou účastnit procesů hyperplasie a diferenciacie.

V celkovém hodnocení předložené disertační práce pokládám za potřebné vyzdvihnout širokou paletu metod, které doktorandka zvládla v rámci jednotlivých experimentů, a rozsáhlou řadu výsledků získaných při studiu systémové odezvy na zemědělsky významnou infekční chorobu hrachu. Po formální stránce se na druhé straně v textu vyskytuje velké množství pravopisných nedostatků: častý výskyt překlepů, chybějící nebo zdvojených slov a neshod podmětu s přísudkem, které se domnívám šlo relativně lehce odstranit použitím příslušného nástroje textového editoru. Velký rozsah teoretického úvodu práce je však bohužel spojený také s nepřehledným uspořádáním textu některých kapitol, včetně některých věcně nesprávných tvrzení. Dle mého názoru jsou příliš časté citace diplomových prací, přehledných referátů staršího data a habilitační práce doc. Sedlářové (citována celkem 18x) také slabšími místy práce autorky s literárními zdroji práce.

V Souhrnu práce není zmíněna důležitá signální funkce ROS a jejich produkce v průběhu fyziologických procesů, v dalším textu podrobně popsána. Oproti velmi kvalitně zpracované kapitole 3 věnované obranným mechanismům by si předcházející kapitola 2 o vzniku ROS zasloužila daleko pečlivější zpracování. Např. uspořádání obsahu kapitol 2.1 a 2.3 není přehledné – oddělení přehledu zdrojů a lokalizace produkce ROS je nepříliš šťastné. Úvodní odstavec kapitoly 2.1 byl převzat z přehledného článku zaměřeného na živočišné mitochondrie a obsahuje řadu nepřesností ve vztahu koncentrace kyslíku a produkce ROS v dýchacím řetězci rostlinných mitochondrií. Např. tvrzení že „čtyřelektronová redukce kyslíku v respiračním ETC je vždy spojena s částečnou redukcí ...“ (str.4), nebo „Hlavní podíl na produkci superoxidu má cytochrom c oxidasa ...“ nejsou správná - navíc v rozporu s textem práce v kap 2.3.2., kde se ovšem na str.13 objevuje tvrzení, že „aktivitu komplexu III inhibuje KCN“. Obdobně je poněkud neuspořádaný úvod kap. 4 – např. definice pojmu „hostitel“ se objevuje až na následující str. 33. Úvodní odstavce kap.6 Materiál a metody (str. 64), které zdůvodňuje na kterých projektech a proč se doktorandka podílela, by patřily obsahem do úvodu kapitoly 7 Souhrn výsledků. Obdobně velká část kap. 6.1 a 6.2 na str. 65-68, věnované mechanismům účinku methylvliogenu a biologii PEMV viru, patří dle mého názoru naopak do úvodního přehledu problematiky.

Jako další výtky k věcnému obsahu práce bych si dovolil zmínit:

- opakované používání výrazu „enzymy/látky odklízející ROS“
- nemožnost existence „-CH₂- skupiny obklopené z obou stran dvojnou vazbou“ (str.8)
- na rozdíl od tvrzení na str. 34 i systémové reakce rostlin mohou být velmi časně – zde postrádám zmínku o předcházejících studiích pracoviště doktorandky věnované šíření elektrických signálů při poranění tabáku
- kap. 4.1.1. na str. 34 je nazvána „Konstitutivní obrana“ ale většina textu je věnována mechanismům indukovaného zvýšení mechanických bariér nebo reorganizaci cytoskeletonu
- zvláštní vydělení kap. 4.1.3 na str. 40 nazvané „Biochemická rezistence“, jejímž mechanismům se ovšem již rozsáhle věnuje kap. 4.1.2., přičemž kap. 4.1.3 je zaměřena prakticky výhradně na tematiku PR proteinů, poněkud v rozporu s definicí „biochemické obrany“ uvedené v první větě této kapitoly.
- kap. 4.4 na str. 46 je vyčleněna, jako by NO nepatřil mezi „jiné signální molekuly“, popisované v kap. 4.3
- v kap. 6.3 je na str. 68 zmíněna metoda kvantifikace peroxidu s využitím činidla Amplex Red, tento postup ani příslušné výsledky jsem však v publikaci III nenalezl.

V poslední kapitole textu jsou opět stručně shrnuty zásadní výsledky jednotlivých studií, bohužel zde postrádám diskusi jejich souvislostí v návaznosti na předcházející výsledky pracoviště autorky a spoluautorů. Některé formulace závěru jsou příliš „silné“ v souvislosti s provedenými experimenty, např. v pokusech popsaných v publikaci III nebylo nijak testováno a tudíž ani potvrzeno, že se „ROS, NO a POX podílejí na reorganizaci buněčné stěny“

Ve vztahu k závěrům uvedeným v diskuzi bych autorce položil následující otázky:

1. Na str. 37 je popsán vznik „hnědé pigmentace ... v důsledku tvorby melaninu“ – je u rostlin známo, jakým mechanismem dochází k biosyntéze melaninu?
2. Na str. 46 autorka uvádí že „NO reaguje nepřímo s DNA, proteiny a lipidy“. Prosím o vyjasnění, co je konkrétně myšleno „nepřímou reakcí“ NO s biomolekulami.
3. Je opravdu možné zdůvodnit naměřený pokles aktivity askorbátperoxidasy v extraktech listu ječmene (publikace I, diskuze viz kap. 7.1, str. 70) nedostatkem substrátu askorbátu nebo rozkladem enzymu působením peroxidu? Je možné předpokládat jiný mechanismus inhibice enzymu v daném časovém intervalu provedeného experimentu? Je možné odhadnout, jakou část naměřené aktivity představují cytosolické a chloroplastové formy APX?
4. Je možné blíže objasnit, v čem se liší závěr publikace II o pozitivní korelaci hodnot deepoxidace xantofylových pigmentů a nefotochemického zhášení oproti závěrům publikace I (viz kap. 7.2 na str. 74)?
5. Proč byly v experimentech inokulovány právě první dva pravé listy rostlin hrachu a parametry sledovány ve 3. a 4. listu? Bylo testováno, nakolik se mohou lišit hodnoty měřených parametrů mezi 3. a 4. listem?

V souhrnném hodnocení disertační práce Mgr. Heleny Kyselákové konstatuji, že celková úroveň práce, originalita a kvalita dosažených výsledků, které byly publikovány v impaktovaných časopisech nebo byly zaslány a přijaty do recenzního řízení, splňují obvyklé požadavky na výsledky doktorského studia. Doktorandka prokázala tvůrčí schopnosti, její předložená práce splňuje požadavky kladené na disertační práci v daném oboru, a proto disertační práci **doporučuji k obhajobě**.

V Olomouci dne 21. 8. 2012

Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Katedra biochemie PřF UP