

Posudek na dizertační práci

Mgr. Martiny Komárkové (Benákové) „Vliv kadmia na vybrané fyziologické a anatomické charakteristiky a průběh stresové reakce u řepky olejky (*Brassica napus* L.)“

Dizertační práce v rozsahu 100 stran se zabývá sledováním vlivu různých koncentrací kadmia (Cd) a směsí kadmia a zinku (Zn) nebo vybraných redukujících sloučenin v pěstebních médiích na distribuci Cd a Zn v nadzemních a podzemních orgánech vybraných odrůd řepky olejky, fotosyntetický aparát, produkci nadzemní i kořenové biomasy, metabolismus některých makroelementů, obsah proteinů a vybraných redukujících organických sloučenin a vizualizací míst akumulace Cd v kořenech. Práce shrnuje výsledky 4 pokusů (1. sledování vlivu Cd na řepku pěstovanou v modelových rašelinových pěstebních substrátech ve skleníku, 2. zjišťování vlivu Zn, chemického analogu Cd, na vybrané parametry řepky pěstované v modelových hydroponických roztocích s Cd a oběma prvky, 3. zkoumání vlivu benzoanu sodného na vybrané fyziologické parametry rostlin, rozložení obsahu Cd, Zn, některých makroelementů, proteinů superoxidového aniontu a vybraných redukčních organických sloučenin v rostlinách řepky pěstované v hydroponických roztocích a 4. imulofluorescenční značení Cd v kořenech a především sledování změn mikrotubulárního cytoskeletu ovlivněného Cd v kořenech řepky). Autorka dizertační práce část výsledků z těchto studií publikovala ve dvou publikacích zveřejněných v časopisech s IF (Front. Plant. Sci. 2016 a Environ. Sci. Poll. Res, 2017). Publikované příspěvky prošly posouzením oponenty v rámci akceptačního procesu časopiseckých článků, proto dále hodnotím výhradně rukopis předložené dizertační práce.

I. K dizertační práci mám následující hlavní subjektivní připomínky:

Cíl práce: V zadání DisP se uvádí „Cílem dizertační práce je objasnění příjmu, translokace a akumulace těžkých kovů v rostlině a jejich vliv na fyziologické a anatomické změny rostlin. Etc., etc.“ V anotaci autorka zužuje předmět studia výhradně jen na kadmium „Cílem dizertační práce je zhodnotit vliv kadmia na vybrané fyziologické a anatomické charakteristiky u řepky olejky (*Brassica napus* L.)“ V úvodu dizertační práce, kap. 4 Cíle práce na s. 8 se pak uvádí „Cílem dizertační práce bylo prozkoumat vliv těžkých kovů, a to konkrétně Cd, na vybrané anatomické a fyziologické charakteristiky u řepky olejky (*B. napus*) etc.“ Pokud došlo v průběhu doktorské práce po dohodě s vedením katedry a školiteli k zúžení či specifikaci tématu na problematiku Cd a řepku olejku, mělo být zadání upřesněno nebo specifikace tématu v úvodu práce uvedena. Takto může vzniknout dojem, že práce splňuje zadání jen částečně.

Klíčová slova: fytoremediace se uvádí jako klíčová problematika práce, ale v zadání ani ve výsledcích práce není fytoremediaci věnována žádná samostatná kapitola (viz obsah).

7.1. Skleníkový pokus: Podmínky pokusu s pěstováním odrůd řepky v rašelinovém substrátu jsou popsány nedostatečně. Je možné, že vzhledem k silné afinitě Cd k humusovým látkám (rašelina) lze při udávané mírně kyselé reakci (pH-KCl = 6,2) předpokládat velkou adsorpční kapacitu rašelinového pěstebního substrátu pro kationty Cd²⁺. Pro pokus se neuvádí celková výměnná kapacita pro kationty (KVK, CEC) použitého substrátu, ani aktuální míra nasycení sorpčního komplexu rašeliny před pokusem a po aplikaci Cd²⁺. Ionty Cd²⁺ z aplikovaných roztoků (nalití roztoku na substrát, nikoli homogenní aplikace během důkladné homogenizace) mohly být adsorbovány jen v povrchové vrstvě substrátu nebo v různých hloubkách pěstebního substrátu dle rychlosti perkolace roztoku s Cd²⁺. Jen část Cd²⁺ z nejvyšších dávek Cd²⁺ mohla zůstat snadno dostupná v půdním (kapilárním) roztoku,

zbytek nebo všechny Cd^{2+} mohly být adsorpčně poutány na matici substrátu v jednotlivých nádobách do různé hloubky. Po aplikaci Cd^{2+} nebyl ve variantách pokusných substrátů stanoven skutečný podíl volného a adsorpčně vázaného Cd (adsorpčně výměnné Cd). Uvedené může být příčinou malých rozdílů v některých sledovaných parametrech řepky nebo je mohou vysvětlit. V reálných polních podmínkách s typickým obsahem humusu v ornici kolem 2–3 % může být závislost příjmu Cd adsorpčně slaběji vázaného na jílovité minerály kořeny řepky jiná než v kontaminovaném organickém substrátu a výsledky z pokusu nelze příliš zobecňovat.

Statistické hodnocení výsledků: Je známo, že sledované koncentrace proměnných s malými hodnotami (koncentrace mikroelementů, fyziologických metabolitů atp.), nemají statisticky normální rozložení (vlivem limitu nulové koncentrace jsou soubory měření výrazně vychýlené vpravo nebo mají nejvýše rozložení blízké log-normálnímu). Počítat prostý aritmetický průměr a jeho variabilitu na základě tří přímo naměřených hodnot je značně riskantní, protože jedno odlehle měření zásadně ovlivní výsledky statistického hodnocení. Práce neuvádí, zda byly naměřené hodnoty testovány na odlehlost (např. Deanovým – Dixonovým testem) a jak se při statistickém hodnocení s odlehlými výsledky pracovalo. Domnívám se, že použití robustnějšího odhadu střední polohy sledované veličiny pomocí mediánu a jeho nejistoty (např. MAD) by bylo méně rizikové než použitý prostý průměr, ale pravděpodobně počet statisticky významných rozdílů mezi mediány sledovaných veličin by byl značně menší. Navíc při prezentaci výsledků se v práci kombinuje vyjadřování nejistoty průměru jak formou SD, tak i SE což musí čtenář u každého diagramu kontrolovat. Přes absenci primárních dat, odhadem hodnot na ose y grafů je divné, že pro mnohé velmi blízké průměry a podobnou velikost jejich nejistoty byly zjištěny hodnoty průměrů jako statisticky významně rozdílné (např. Obr. 4 B pro 'CZL' kontrola vs. 50Cd, Obr. 4 D pro 'CZL' kontrola vs. 50Cd, pro 'Benefit' 50Cd vs. 100Cd a některé grafy následující).

Seznam citované literatury: Je správné, že všechny v textu citované práce byly nalezeny v seznamu literatury, který je psán jednotnou formou, dokonce včetně identifikátoru elektronických forem publikací (DOI). Bývalo ovšem pravidlem, že úplná citace použitých literárních zdrojů uváděla údaje (autoři, název práce) v přesné podobě, v jaké jsou v informačním zdroji uvedeny (vytištěny), přinejmenším jako doklad, že citace zdroje není přebírána z jiné práce nebo z mezinárodních informačních databází a abstraktů. Seznam použité literatury v dizertační práci neuvádí např. interpunkce u jmen autorů, které však byly v originálních pracích uvedeny (Proč?).

II. K některým vybraným údajům z dizertační práce mám následující výhrady:

Citace literatury: V česky psaném textu bych očekával odkazy na literární zdroje v češtině, např. Novák a Nožičková (2011) nebo Hůlka a kol. (2017), nebo v universitním prostředí v latinizované formě např. Novák et Nožičková (2011) nebo Hůlka et al. (2017). Používání hybridní anglické a latinizované kombinace citací Novák and Nožičková (2011) a Hůlka et al. (2017) působí z jazykového hlediska podivně.

Psaní odrůd rostlin: Kód nomenklatury kulturních rostlin (Code of Nomenclature for Cultivated Plants (2009, již 8. vydání) článkem 14. 1. stanovuje v odborných materiálech označovat kulturní variety jednotně jménem odrůdy v jednoduchých nebo prohnutých apostrofech (Alt0145/Alt0146). Odpadá tak potřeba v textu před jmény uvádět odrůda a předejde se možnému nepochopení textu, pokud se názvy odrůd bez označení ve větách skloňují.

Seznam použitých zkratk s. 4–5: Neobsahuje řadu použitých a dále v textu nevysvětlených zkratk (např. s. 12: HMA, NRAMP, ZIP, ABC..., s. 15 CAX, s. 17 ZIP, NRAMP, s. 19 MDA atd.)

Kap. 5.1 Těžké kovy s. 10: Pokud se v kapitole odlišují mikrobiogenní prvky od těžkých kovů, pak by měla být skupina tzv. těžkých kovů definována (např. podle hustoty prvku, velikosti protonového čísla, atomové hmotnosti nebo míry toxicity). Takto se zdá, že např. Cu, Ni, Zn autorka práce nepovažuje za těžké kovy, např. na rozdíl od ČSN 42 1300 a naopak Li (hustota 0,534 g.cm⁻³) mezi těžké kovy počítá.

p. 18: „Vápník patří mezi prvky, u nichž existuje antagonistický vztah v příjmu vůči Cd. Tyto dva ionty spolu díky vzájemné podobnosti kompetují o vazebná místa a je prokázáno, že vyšší dávky Ca mohou výrazně redukovat příjem Cd z půdy (Avelar Ferreira et al. 2013)“ [správně má být Ferreira et al. 2013]. V citované práci však aplikace vápence a křemičitanu vápenatého především zvýšila půdní pH a imobilizovala Cd ve velmi málo rozpustný uhličitan a křemičitan kademnatý a zvýšila fixaci atmosférického dusíku hlízkovými bakteriemi s dopadem na rychlejší tvorbu biomasy bobovité rostliny *Cupriavidus necator* použité k fytoremediaci půdy znečištěné těžkými kovy. Více o kompetici Cd a Ca o přenašeče kationtů v kořenech *Brassica* ale pojednávají jiné práce, např. Tan W.-N. et al. (2011), *Pedosphere* 21, (2): 223–229.

Obr. 5, s. 39: Nenašel jsem hodnoty Cd v kořenech a nadzemních částech pro kontrolní podmínky pokusu! Bylo by užitečné vedle translokačního faktoru ($TF = \text{konc.Cd}_s / \text{konc.Cd}_r$) použít i nějaký ukazatel míry znečištění či nahromadění Cd v podzemní a nadzemní biomase vážený koncentrací Cd v růstovém médiu. Z grafů se zdá, že účinnost (akumulační kapacita) kořenů řepky zadržovat Cd je nejmenší (20–50 %) při relativně nejnižších koncentracích Cd v pěstebním substrátu a s růstem znečištění půdy se zvyšuje (50–70 %). Pokud je to pravda, proč je retenční kapacita kořenů absorbovat Cd při nízké koncentraci Cd v půdě tak nízká?

s. 39: Vápník je považován za mikroprvek, proč?

s. 46 Závěr: „Analýzy neprokázaly významný fytoextrakční potenciál žádného testovaného kultivaru...“ „Fytoextrakční potenciálem“ autorka rozumí schopnost rostlin akumulovat Cd jen v nadzemních částech a nikoli v kořenech, ač biomasa kořenů je součástí těla rostlin. Např. pokud jsou údaje na Obr. 5A správné, pak můžeme zhruba odhadnout, že při obsahu Cd v půdě 150 mg.kg⁻¹ by kořeny řepky 'ZhonZhuang9' nahromadily Cd proti koncentračnímu gradientu v množství kolem 400 mg.kg_{d.w.}⁻¹, což jistě lze považovat za významný „fytoextrakční potenciál“.

Obr. 9, s. 48: Text k obrázku vysvětlující znázornění variability průměrné délky kořenů jednou chybovou úsečkou a současně dvěma rozdílnými parametry nejistoty je zmatečný. Výběrová směrodatná odchylka ($S.D. = \sqrt{s^2}$) jako míra variability naměřených hodnot veličiny ($n = 3$) je zhruba 1,7× „horší“ než střední chyba průměru ($S.E.M., SE = s/\sqrt{n}$) odhadující míru nejistoty výběrových průměrů. Pokud byla nejistota průměrů na začátku práce vyjadřována pomocí SE, proč od Obr. 11 se nejistota uvádí formou SD, a v následující kapitole opět jako SE? Dále není jasné, co pro údaje délky kořenů je míněno $n = 3$. Podle Obr. 10 jde snad o „délku“ hlavního (?) kořene u 3 náhodně vybraných rostlin daného kultivaru nebo snad o délku 3 kořenů různých řádů jedné rostliny každé odrůdy (Obr. 12?). V pokusech s měřením délky kořenů se soustavně mění n (proč?) Např. v Tab. 5 se parametry kořenů udávají pro $n = 5$ měření, zároveň pro první 2 sloupce chybí údaje o nejistotě udávaných hodnot a i přes malý počet měření je zarážející, že stejné hodnoty nebo s rozdílem setiny mm jsou udávány někdy jako statisticky neprůkazné, jindy jako průkazně rozdílné. Na Obr. 20 jsou pak uváděné parametry kořenů vztaheny k souborům měření o rozsahu $n = 6$, což zásadně ovlivňuje výsledky statistických šetření mezi různými měřeními kořenů.

Obr. 17 s. 58: Čtenáře by také jistě zajímalo, jaký je translokační faktor pro kontrolní variantu pokusu!

Vliv Cd a Zn na příjem a translokaci makroelementů s. 59-61: Pokud se spekuluje o tom, že kationty Cd^{2+} a Zn^{2+} v roztoku soutěží s kationty Ca^{2+} o vazbu na přenašeče Ca do kořenů řepky, proč narůstající koncentrace kationtů Zn^{2+} a Cd^{2+} v mediu ($10 \mu\text{M Zn}$ a $5 \mu\text{M Cd} + 10 \mu\text{M Zn}$) a konstantní koncentraci Ca^{2+} vede k výraznému snižování poměru obsahu Zn : Ca v kořenech a hlavně v nadzemních částí řepky, dle Obr. 17 a Tab. 6 (zhruba $1200 : 23000$ a $1200 : 33000$) a nikoli ke koncentračnímu poklesu poměru Zn : Ca v biomase?

Příloha 1: chybí údaj o udávaných koncentračních jednotkách, druhu střední hodnoty a intervalu její spolehlivosti a význam zkratky NA (neměřeno, pod detekční mezí metody?)

III. Vybrané nevhodné formulace a formální chyby

Anotace: Jako výsledek pokusu se uvádí, že pro variantu média benzoan sodný (BS) s Cd „...v nadzemní části pak došlo naopak k výraznému úbytku Cd.“ Správně by mělo být „... v nadzemní části pak došlo naopak k výrazně menšímu ukládání Cd než u rostlin pěstovaných v mediu s Cd bez přídavku BS“, protože nebyl v pokuse sledován vliv přídavku BS na redistribuci Cd v rostlinách řepky (výchozí koncentrace Cd v nadzemní části před a po dodatečném přídavku BS nebyla zjišťována). Stejně platí i pro následující popis výsledku pokusu s variantou média ve složení BS + 0 a další nebo např. závěr s. 78.

s. 10: „V půdě se dále vyskytuje také určité procento prvků (méně jak $10 \mu\text{g.g}^{-1}$)“ = V půdě se dále vyskytuje také určité procento prvků (% např. dle „Clarků“) v koncentracích menších než $10 \mu\text{g.g}^{-1}$.

s. 10: „V literatuře se můžeme setkat jak se synergistickými vztahy mezi příjmem biogenních prvků a těžkých kovů (Cherif et al. 2011; Cojocar et al. 2016), tak se vztahy antagonistickými (Balén et al. 2011; Tammam et al. 2016; Versieren et al. 2017)“. Téměř všechny zde citované práce se týkají výhradně vztahů Cd a Zn. Navíc vybrané citace literárních zdrojů nebyly vybrány příliš šťastně: Cherif et al. (2011) zjistili průkazné snížení příjmu Cd, pokud je v roztoku Cd přídavek Zn a stejně tak Cojocar et al. (2016) udávají menší příjem Cd řepkou, pokud je řepka vystavena Cd v kombinaci se Zn. Balén et al. (2011) zjistili snížení příjmu Cd a aktivity detoxikačního izozymu peroxidáza u okřehku, pokud rostl ve směsi Cd a Zn atd.

s. 26: „...pomocí infračerveného analyzátoru plynů LCpro+“ = ...pomocí analyzátoru plynů LCpro+ s čidlem infračerveného záření.

s. 24: „... $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a $10 \mu\text{M Zn}$ = ... $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a $10 \mu\text{M Zn}$.

s. 29: „Měření vlnových délek (663 nm, 646 nm, chlorofyl a, chlorofyl b) probíhalo na spektrofotometru ... „ = např. Obsahy chlorofylů byly stanoveny pomocí spektrofotometru měřením absorpance (či extinkce) vlnové délky 663 nm (chlorofyl a) a 646 nm (chlorofyl b).

s. 30: fericitrát (od ferric citrate?) = citronan železitý (popř. citran železitý) ale je podstatné zda šlo o hydrát nebo monohydrát.

s. 31: metanole = metanolu.

s. 48: rodina *Brassicaceae* = čeleď *Brassicaceae*.

s. 52: „Růst kořene je poté ovlivněn na mnoha úrovních,... např. oxidační stav“ = Růst kořene je poté ovlivněn na mnoha úrovních,... např. nárůstem počtu karboxylových skupin po oxidaci proteinů.

s. 59: „...redukce Ca v listech rostlin...mohla být způsobena okupací Ca kanálů právě ionty Zn^{2+} “ = ..redukce Ca v listech rostlin...mohla být způsobena kompeticí Zn^{2+} a Ca^{2+} v mediu o přenos v Ca iontových mikrotubulech.

- s. 62: „...množství Mg narostlo v mediu s Cd“ = obsah Mg v biomase řepky byl vyšší při koncentraci Cd v mediu 5 μ M než při koncentraci Zn 10 μ M.
- s. 63: v Tabulce 7 u hodnot žádné chybové úsečky nejsou = nejistota průměrné hodnoty je vyjádřena jako \pm SE.
- s. 76: Leadmium™ green = Leadium™ green.
- s. 77: „Mezi další biochemické stresové markery ukazující na toxicitu Cd patřily hodnoty obsahu celkových rozpustných proteinů, superoxidového radikálu, fenolů a flavonoidů“. Ovšem ve skutečnosti statisticky významný toxický efekt Cd byl zjištěn jen pro obsah flavonoidů.
- s. 81: Černá M. Spevackova V. Benes B et al = Černá M., Spěváčková V., Beneš B. et al. (též citace v textu Černá et al).
- s. 85: Cadmium(ii) and zinc(ii) ions = Cadmium(II) and zinc(II) ions.
- s. 85: Lachman J, Dadjak J, Miholova D, et al = Lachman J, Dadjak J, Miholová D, et al.
- s. 86: Lux A, Martinka M, Vaculík M, White PJ (2011) = Lux A, Martinka M, Vaculík M, et al. (2011a) pokud je zavedeno, že se citují pouze tři první autoři, pak též např. Romero-Puertas et al 2004, Roschztardt et al 2009 Rossi et al 2002 a další.
- s. 86/87: Řazení prací Lux A, et al není ani chronologické, ani podle abecedy spoluautorů.
- s. 89: Pietrini F, Iannelli MA, Pasqualini S, Massacci A (2003) = Pietrini F, Iannelli M, Pasqualini S, et al. (2003).
- s. 89: Polakova S, Kubík L, Němec P (2014) Registr kontaminovaných ploch (1998-2013) (ÚKZÚS) = Poláková S, Kubík L, Němec P (2014) Registr kontaminovaných ploch, celkové obsahy rizikových prvků v zemědělských půdách. Průběžná zpráva (1998–2013). Brno, ÚKZÚZ, 9 pp.
- s. 90: pro jeden informační zdroj Romero-Puertas MC. et al. se uvádějí dvě identické citace odlišené pouze (2002a) a (2002b).
- s. 91: Simonova E, Henselova M, Masarovicova E, Kohanova J (2007) = Simonová E, Henselová M, Masarovičová E, et al. (2007).
- s. 94: Vatehova Z, Kollarova K, Zelko I, et al (2012) = Vatehová Z, Kollárová K, Zelko I, et al. (2012).
- s. 96: Zákon č. 153/2016 Sb. o stanovení podrobnosti ochrany kvality zemědělské půdy a o změně vyhlášky č. 13/1994 Sb., kterou se upravují některé podrobnosti ochrany zemědělského půdního fondu. In: Sbírka zákonů 01.006. 2016 = Česká republika (2016) **Vyhláška** č. 153/2016 Sb., o stanovení podrobnosti ochrany kvality zemědělské půdy a o změně vyhlášky č. 13/1994 Sb., kterou se upravují některé podrobnosti ochrany zemědělského půdního fondu. Sbírka zákonů 2016, částka 59: 2692–2699.

Pokud autorka dizertační práce bude odpovídat na případné dotazy oponentů rád bych věděl,

1) Proč řepka v Cd kontaminovaném pěstební substrátu významně zvětšuje kořenový systém a tloušťku kořenů, přitom však zároveň dochází k významnému poklesu čerstvé hmotnosti kořenové biomasy proti kořenovému systému z kontrolního Cd neznečištěného pěstební média. (Důvodem zmenšení objemové hmotnosti je např. zvětšení buněk, resp. intercelulár, růst podílu suberinu, pokles turgoru buněk či jiné důvody??)

2) Jaký má autorka názor ve vztahu k využívání fytořemediace na fakt, že Cd extrahované z kontaminované půdy kořeny rostlin po sklizni rostlin zůstane v půdě a po rozkladu kořenů je Cd silně adsorbované na organické makromolekuly, čímž se snižuje podíl volně pohyblivého Cd v půdním profilu. Významně se tak prodlouží doba ustavení přirozené rovnováhy (až stovky let) na kontaminované ploše mezi atmosférickým spadem Cd a jeho vymýváním do půdní spodiny dešťovými srážkami (analogie historické kontaminace akumulované v lesním nadložním humusu) než kdyby kontaminované půdy nebyly meliorovány vegetací.

3) Pokud použité činidlo pro tvorbu zeleného chromokomplexu pro lokalizaci Cd v pletivech kořenů nebylo příliš Cd specifické, věděla by autorka o nějakém jiném způsobu detekce a fotovizualizace Cd pokusně zabudovaného ve strukturách rostlinných pletiv, který se již poměrně dlouho využívá ke zjišťování začleňování prvků do stavebních struktur tkání organismů?

Závěr

Předložená dizertační práce prokazuje, že autorka práce je způsobilá efektivního a samostatného výzkumu v oblasti rostlinné fyziologie, zvláště ve vztahu ke znečištění prostředí. Autorka prostudovala značné množství odborné literatury k řešené problematice a prokázala znalost publikované výsledky využít pro rešerši aktuálních znalostí o problematice, formulaci otázek, na které máji experimenty dát odpověď i pro porovnání a diskusi vlastních experimentálních dat. Prokázala dobré znalosti a laboratorní dovednosti při návrhu a realizaci příslušných experimentů. Získala také praktické zkušenosti v zahraničních a domácích laboratořích rostlinné fyziologie a zvládla moderní metody instrumentálního stanovení koncentrací chemických prvků v přírodních matricích a měření fyziologických procesů. Výsledky vlastních pokusů přehledně zpracovala, interpretovala a diskutovala s množstvím výsledků jiných autorů zveřejněných v početné odborné literatuře. Část výsledků opublikovala se spoluautory v časopisech s IF určenými mezinárodní odborné veřejnosti, což je dobrým vstupem pro zahájení samostatné výzkumné kariéry. Přes uvedené připomínky a výhrady uvedené v posudku, které však nejsou zásadního charakteru, doporučuji dizertační práci Mgr. Marty Komárkové (Benákové) uznat k obhajobě pro udělení vědecké hodnosti Ph.D.

V Průhonicích, 30. dubna 2018



doc. RNDr. Ivan Suchara, CSc.