

Posudek oponenta na diplomovou práci
Jméno oponenta: Lukáš Fischer
Datum: 24.5. 2022
Autor: Magdaléna Dybová
Název práce: Fotosyntetické charakteristiky rostlin bramboru se sníženou expresí transkripčního faktoru BEL11
Cíle práce: Analýzou rostlin bramboru se sníženou expresí transkripčního faktoru BEL11 přispět k objasnění role tohoto TF v modulaci fotosyntézy a alokace sacharidů v rámci rostliny, která ve svém důsledku vede k posílení tvorby hlíz.
Struktura (členění) práce Rozsah práce (počet stran): 79 stran (bez seznamu literatury) Je uveden anglický i český abstrakt a klíčová slova? ano
Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, seznam literatury) je velmi dobrá. Obrázky a grafy jsou pečlivě zpracované s podrobnými popisky. V textu je jen malé množství jazykových chyb (většinou se jedná o neshodu pádu u přívlastku shodného). V seznamu citací jsem neobjevil žádnou formální vadu.
Logická stavba a jazyková úroveň práce je velmi dobré úrovni, text je čtivý. Jen opakovaně používaný termín „duření stolonů“ nepovažuji za vhodný – ani synonyma slova duřet - „opuchat, nabíhat, otékat, bobtnat“ – významově neodpovídají procesu buněčné proliferace, ke které v subapikální zóně stolonu dochází.
Literární přehled: Odpovídá tématu a je logicky členěn? ano Je napsán srozumitelně? ano Jsou použité literární zdroje dostatečné, relevantní a aktuální? ano Jsou literární zdroje (včetně obrázků) v práci správně citovány? ano Na více místech se pojednává o poptávce sinku (sing.) po asimilátech (vč. obrázku 1) – považoval bych ale za vhodnější uvádět plurál – ostatně i v diskusi se řeší síly jednotlivých sinků v rámci rostliny. Úplně nesouhlasím s tvrzením, že „Vykládání sacharózy z floému ve stolonu probíhá podobně jako její nakládání v produkčním listu.“
Materiál a metody: Šíře metodik použitých v práci je velká, pro diplomovou práci jistě dostatečná. Popsané metody odpovídají prezentovaným výsledkům. Metody jsou popsány velmi podrobně, většinou zcela správně či jen s drobnými nepřesnostmi (některé uvádím v dodatku k posudku). Studentku ale prosím o stručný komentář ke třem bodům: i) Na mnoha místech práce je uvedeno, že sterilizace roztoků probíhala pomocí 0,45μm filtru. Jaké jsou běžné velikosti bakterií? Nemohly některé kontaminace kultur souviset s použitím 0,45μm filtru? ii) Byl jako interní standard pro qPCR opravdu použit gen pro polyubiquitin? Chybí citace původního článku, jako zdroj jsou uvedeny jen dvě diplomové práce. iii) Jak byla reprodukovatelně zjišťována hmotnost kořenů u <i>in vitro</i> rostlin?

Experimentální část:

Cíl experimentů je vysvětlen srozumitelně, dokumentace postupu práce a získaných výsledků je poměrně detailní a odpovídá standardům. Množství provedených experimentů a získaných výsledků je plně dostačující, i když nebyl zcela naplněn původní plán práce, především v důsledku Covidových omezení a kontaminací kultur. Vzhledem k tomu, že od odvození analyzovaných linií uběhl dlouhý čas, považoval bych za vhodné zkontrolovat hladinu exprese *StBEL11* v listech a do práce vložit i výsledky ze stanovení hladiny exprese v kořenech (s poznámkou, že finální stanovení prováděla školitelka).

Prosím o velmi stručné upřesnění (korekci) věty „Rychlá kinetika fluorescenční indukce je dočasná fluorescence chlorofylu na tmu adaptovaných rostlin po vystavení krátkému (1-2 s) vybuzejícímu pulsu aktinického modrého světla“.

Je zavedení termínu „trend“ pro pozorované rozdíly s p hodnotou mezi 0,05 a 0,15 podloženo nějakým precedentem? Osobně to nepovažuji za šťastné, zvláště pak ve formulaci „navýšení Ch b a karotenoidů statisticky průkazné na hladině $p < 0,15$ “.

Diskuze:

Diskuse je opravdu diskusí a studentka vynaložila značné úsilí, aby se pokusila interpretovat získané výsledky v souladu s tím, co již bylo v problematice indukce tvorby hlíz a interakcí mezi zdroji a sinky publikováno. Získané výsledky ale ne zcela naplnily očekávání a byly zatíženy relativně vysokým rozptylem, který byl dán jednak technickými důvody, ale především značnými rozdíly v odezvě jednotlivých transgenních linií. V diskusi studentka uvádí i vlastní hypotézy a navrhuje možné přístupy pro jejich testování.

Závěry (Souhrn):

Závěry jsou podloženy výsledky a výstižně formulovány.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Cíle práce byly i přes zmíněné objektivní komplikace splněny v dostatečné míře. Práce je pečlivě napsaná a obsahuje zajímavé originální, byť obtížně interpretovatelné, výsledky z charakterizace linií kultivarů Kamýk se sníženou expresí *StBEL11*. Výsledky naznačují, že snížení hladiny *StBEL11* vede k vychýlení distribuce asimilátů ve prospěch podzemních sinků. Výsledkem práce je i soubor transgenních linií poddruhu *S.t. andigena* (před jejich detailní charakterizací bych ale doporučil získat z lab. prof. Hannapela jako referenci již dříve charakterizované antisense linie tohoto poddruhu). Práce splňuje požadavky na DP kladené a práci doporučuji k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta (povinná část posudku):

Prosím o informaci (v práci jsem nenašel), ve kterém čase (v rámci fotoperiody) byly z rostlin odebírány vzorky a prováděna neinvazivní měření. Jak bylo zajištěno, aby při větším počtu vzorků nedocházelo v důsledku posunutého časování ke zkreslení získaných dat?

Nemůže absence silnější korelace mezi naměřenou rychlostí čisté fotosyntézy na jedné straně a obsahem sacharidů a celkové biomasy rostlin z autotrofní *in vitro* kultivace na straně druhé, souviset s rozdílnou hladinou CO₂ (při měření byla hladina nastavena na 500 ppm, při kultivaci *in vitro* bych ale předpokládal výrazně nižší hladinu)? I naměřené hodnoty čisté fotosyntézy se v absolutních hodnotách výrazně lišily mezi *in vitro* a *ex vitro* kultivacemi. Jak mohla ještě *in vitro* kultivace ovlivnit distribuci asimilátů mezi prýtl a kořeny (R/S ratio) ve srovnání s přirozenými podmínkami v půdě?

Má studentka nějakou představu, o jaký typ sacharidové signalizace by se mohlo jednat, když v závěru diskuse uvádí větu „Snížená hladiny *StBEL11* transkriptu podpořila navýšení síly podzemních sinků, která přes změnu sacharidové signalizace posílila distribuci asimilátů právě do podzemních sinků.“?

Z čeho vychází představa, že rostlina jako celek potřebuje zachovávat určitou míru fotosyntetické produkce a že snížení listové plochy „potřebuje“ kompenzovat zvýšenou rychlostí fotosyntézy, jak naznačuje věta „Aby celková fotosyntetická kapacita na rostlinu byla zachována, možná i posílena, byla zvýšena rychlost čisté fotosyntézy.“?

Co by mohlo být příčinou mnohdy protichůdného chování charakterizovaných transgenních linií? Lze v získaných datech najít nějaký parametr, který opravdu dobře koreluje s mírou exprese *StBEL11* v prýtu, v kořenech či jejich kombinaci u všech analyzovaných linií?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

Dodatek k posudku (není nutné komentovat v rámci obhajoby):

- Označení „mutantní“ pro transgenní linie není špatně, ale je nepřesné,
- V angl. abstraktu je poddruh *S.t. tuberosum* uveden jako species místo subspecies,
- Formát zkratk názvů proteinů a genů není úplně jednotný – např. není jasné, proč jsou zkratky pro tři GA oxidázy v seznamu zkratk kurzívou, zatímco *P35S CaMV* nikoli,
- Ve větě „Ke zpoždění iniciace tvorby hlíz může dojít, pokud ve špičce stolonu GA nelze degradovat, nebo jsou stále tvořeny nové aktivní GA.“ by bylo vhodnější použít spojku „a“ místo „nebo“,
- Formulace „regulaci transkripce fytohormonů“ považuji za nevhodnou (popis obr. 3),
- Značení konstruktů *35S:CaMV:StBEL11* by bylo vhodnější např. *CaMV 35S::StBEL11*,
- V níže uvedené větě je nevhodně kombinována orgánová, buněčná a subbuněčná lokalizace. „Lokalizace proteinu se mění v závislosti na stáří rostliny – v mladých rostlinách je lokalizován především v plazmatické membráně sinkových listů, ve starších rostlinách byl objeven především ve zdrojových listech ve svěracích buňkách průduchů a na tonoplastu (Chincinska et al., 2013)“,
- Enzym Rubisco má oxygenázovou aktivitu (ne oxigenázovou),
- Po elektroporaci agrobaktéria se používá YEB recovery médium (nikoli standardní YEB), chybí specifikace použitého kmene,
- V metodice je uvedeno, že na 4cm Petriho misky bylo nalito 30 ml média. Jsou uvedené hodnoty správné?
- V metodice je u izolace DNA uvedený mírně zavádějící popis: „Odebrala jsem supernatant a pelet jsem nechala vyschnout na buničité vatě.“