

Oponentský posudok na dizertačnú prácu

Zuzana Lenochová: Charakteristika programovanej bunenej smrti pri vzniku lyzigenného aerenchýmu

Významným procesom v ontogenéze živých organizmov je programovaná bunková smrť (PCD). Je to aktívny, geneticky regulovaný proces vedúci k selektívnej eliminácii nežiaducich alebo poškodených buniek eukaryontov. PCD môže byť pre niektoré procesy alebo rastlinné druhy esenciálna, pre iné benefičná. V rastlinách hrá kľúčové úlohy v mnohých fázach, od vývinu embrya, tvorby a dozrievania mnohých typov buniek a pletív, morfogénzy listov až po senescenciu a opad orgánov a tiež v reakcii či adaptácii rastlín na environmentálne podmienky. Je niekoľko dôvodov, prečo je štúdium PCD zložitá a náročná: je to spomenuté široké uplatnenie sa PCD, variabilita spôsobov odumierania buniek (vrátane viacerých typov PCD) v rastlinách, diverzita dráh regulujúcich proces PCD a účasť početných komponentov na týchto regulačných mechanizmoch.

V súčasnosti sa intenzívne študujú molekulové a genetické aspekty procesov PCD. Poznanie ich súvislostí s morfológickými (vrátane lokalizácie buniek podliehajúcich PCD v rastlinnom pletive) a fyziologickými prejavmi v rastlinnom organizme je nevyhnutné pre dobré rozlíšenie typov PCD a stanovenie ich významu pre rastlinu. Rozšírenie takéhoto poznania je cieľom dizertačnej práce Zuzany Lenochovej, ktorá sa zameriava na preukázanie účasti PCD na tvorbe aerenchýmu v koreňoch vo vzťahu k vonkajším faktorom (hypoxia, etylén) a interným vlastnostiam (indukovaný, konštitutívny vznik aerenchýmu a jeho morfológický vzor) rastlín s rôznymi ekologickými nárokmi.

Literárny prehľad charakterizuje typy hynutia buniek, zvlášť typy PCD v živočíšnych a rastlinných bunkách, na bunkovej, molekulovej a génovej úrovni a regulujúce faktory, vrátane účinkov rastlinných hormónov, na vznik PCD. V rastlinnej ríši rozlišuje konštitutívnu a indukovanú PCD, opisuje mechanizmy ich vzniku a výskytu z vývinového hľadiska aj z hľadiska lokalizácie v rastlinnom organizme. Jednou z významných štruktúrnych adaptácií vznikajúcich za účasti PCD je špecializované pletivo, aerenchým, ktorý je predmetom štúdia predloženej práce. Charakterizovaný je z hľadiska vzniku, morfológických typov a významu pre rastlinu. Prehľadne sú uvedené mikroskopické metódy v súčasnosti používané na detekciu procesu PCD. Literárny prehľad sa zakladá prevažne na súčasných literárnych prameňoch, na poznatkoch dosiahnutých na vlastnom pracovisku a svedčí o dobrých teoretických vedomostiach doktorandky v skúmanej oblasti.

V súlade s cieľmi práce si doktorandka vybrala rastliny líšiace sa vznikom (konštitutívny, indukovaný) a typom/vzorom formovania aerenchýmu: kukuricu ako modelovú rastlinu, 5 mokradových a 1 vodný druh. Úlohu etylénu pri tvorbe aerenchýmu demonštrovala štandardným použitím inhibítora syntézy etylénu. Na dôkaz prítomnosti PCD vo vzťahu k tvorbe aerenchýmu použila adekvátne, náročné metódy: obrazovú analýzu pre stanovenie rozsahu aerenchýmu v koreňoch, cytochemické a imunocytochemické varianty reakcie TUNEL (terminal deoxynukleotide transferase dUTP nick-end labeling) na dôkaz prítomnosti zlomov DNA, v kombinácii s rôznymi mikroskopickými technikami (svetelná, fluorescenčná, konfokálna, UV svetlo), doplnené stanovením viability buniek pomocou viacerých farbív a fluorescenčných detekčných činidiel. Štatisticky sú spracované výsledky vhodné pre tento spôsob vyhodnotenia.

Výsledky práce sú sčasti potvrdením známych poznatkov avšak pri použití niektorých nových techník a porovnávaním ďalších modelových rastlín, a sčasti nové, v oblasti metodického prístupu aj v oblasti poznania. Sú vhodne dokumentované grafmi a veľkým počtom kvalitných mikrofotografií, čo je aj odrazom prostredia vynikajúcej školy v oblasti anatómie a interpretácie štruktúrnych nálezov. Za dôležité považujem výsledky v metodickej časti, napr. stanovenie optimálneho riedenia komponentov kitu TUNEL reakcie, čím autorka

získala objektívne údaje o výskyte jadier s charakteristicky fragmentovanou jadrovou DNA. Spolu s využitím viacerých mikroskopických techník a novej techniky vizualizácie TUNEL-pozitívnych jadier pod UV žiarením dosiahla vyššiu špecifickosť reakcie. Viaceré testy viability buniek dopĺňujú dôkaz prítomnosti PCD v kôrovom pletive koreňov.

Testovanie 12 kultivarov kukurice ukázalo, že aerenchým sa tvorí v koreňoch kukurice nezávisle od genotypu a to aj v podmienkach dostatočného prísunu kyslíka (na rozdiel od niektorých súčasných údajov, napr. Nishiuchi et al. Rice 5:2-14,2012). Výsledky potvrdili, že rozsah aerenchýmu koreluje s dĺžkou koreňa, nie s jeho vekom. Potvrdila sa kontrolná úloha etylénu a vplyv svetelných podmienok pri tvorbe aerenchýmu v koreňoch kukurice. Preukázaná bola nielen morfológicky, ale aj signifikantnou redukciou TUNEL pozitívnych jadier po aplikácii inhibítora syntézy etylénu (AOA).

V zásade sa pomocou TUNEL reakcie detegujúcej bunkové jadrá s charakteristicky fragmentovanou DNA preukázala účasť procesov PCD na vzniku aerenchýmu a ich presná lokalizácia v kôrovom pletive, v koreňoch kukurice aj testovaných mokrad'ových druhov s lyzigénnym pôvodom aerenchýmu, nie však pri druhu so schizogénnym pôvodom aerenchýmu. Pozoruhodná je prítomnosť váčkovitých útvarov pozitívne reagujúcich na dôkaz esteráz v bunkách predurčených na degradáciu. Dôležité overenie a potvrdenie prítomnosti PCD priniesli reakcie testujúce viabilitu buniek. Ukázali podobnú lokalizáciu odumierajúcich buniek v obidvoch testovacích systémoch a ich topografický vzťah k budúcim lyzigénnym kanálom aerenchýmu. Sumarizácia výsledkov dovolila autorke navrhnúť reálny sled štruktúrnych prejavov, ktoré sprevádzajú vznik aerenchýmu v kôrovom pletive koreňov.

Formálne pripomienky a otázky:

V textoch odporúčam vždy k opisu konkrétneho výsledku uviesť v zátvorke (číslom aj písmenom) príslušný obrázok dokumentujúci daný výsledok (nie ako výpočet obrázkov na konci celého odstavca opisujúceho viaceré štruktúrne pozorovania (napr. 3 obrázky 4.20,4.21,4.22, ktoré vlastne predstavujú 8 samostatných snímok, str. 68 - 71).

Na mnohých mikrofotografiách chýba vyznačenie (šípkou, značkou) štruktúry/bunky/typu pletiva, o ktorých sa hovorí v texte alebo v legende, napr. vyznačenie pletív (obr. 4.25), typov buniek a štruktúr (obr. 4.26 a 4.27), kvôli ktorým sú snímky použité.

Aký je rozdiel v informácii na obrázkoch 4.6 a 4.7B – boli potrebné obidva?

Obr. 4.30A je čierno-biely; nemôže obsahovať zelené zafarbenie

Mohli by sa interpretovať fluoreseinciom zafarbené „...okolí pomerně veľkých váčkovitých štruktúr (obr. 4.28)“ ako cytoplazma (zafarbená) a vakuola (nezafarbená)? (Str. 76-77).

V diskusii sa navrhuje pravdepodobná postupnosť dejov vedúcich k vzniku lyzigénneho aerenchýmu. Je možné určiť, v ktorej fáze dochádza k tvorbe zlomov DNA (k výskytu TUNEL-pozitívnych jadier)? (str.116-117)

Perforácia tracheálneho elementu sa vytvára v mieste primárnej bunkovej steny (ako uvádza aj citovaný článok Nakashima et al. 2000); nie je správna formulácia, že sa “sekundárni buněčná stěna...” mení na “perforační desku” (str. 113).

Informácia o priebehu farbenia esteráz pomocou FDA (str. 113-114) by bola užitočnejšia v literárnom prehľade, aby pomohla pri následnom “čítaní” informácií z obrázkov vo výsledkoch.

Snímky z konfokálneho mikroskopu sú na obr 4.29, nie 4.30 (str. 111)

Otázky do všeobecnej diskusie

1. Zaujímavé sú otázky regulácie tvorby aerenchýmu iba v kôrovom pletive koreňa, regulácie jeho „architektúry“, t.j. vznik určitého typu/vzoru a tiež selekcia jednotlivých buniek, v ktorých prebehne PCD na rozdiel od susedných, ktoré si zachovávajú integritu a funkčnosť. Sú známe mechanizmy týchto regulácií?
2. Je možné, že etylén všeobecne nemá vplyv na vznik aerenchýmu v mokrad'ových rastlinách s konštitutívnou tvorbou aerenchýmu – podobne ako sa ukázalo pri druhu *Juncus effusus* (Visser a Bögemann, New Phytol. 171:305-314, 2006)?

Záver

Ciele dizertačnej práce Zuzany Lenochovej boli splnené. Výsledky predstavujú prínos pre porozumenie procesov PCD v rastlinách, menovite pri štruktúrnej adaptácii koreňov na nepriaznivé podmienky prostredia. Dokazujú bohaté skúsenosti doktorandky po stránke metodickej a vysokú odbornosť po stránke vedomostnej. Doktorandka tiež preukázala schopnosť samostatnej vedeckej práce a preto odporúčam, aby práca bola prijatá k obhajobe.

V Bratislave, 8. 8. 2012

RNDr. Milada Čiamporová, CSc.
Botanický ústav SAV
Dúbravská cesta 9
845 23 Bratislava
e-mail: milada.ciamporova@savba.sk
Tel. +421-2-594 26 129