

Oponentský posudek  
**disertační práce Mgr. Silvie Gajdošové**  
**„Biological effects and metabolism of *cis*-zeatin-type cytokinins in plants“**

Univerzita Karlova v Praze  
2011

Oponovaná disertační práce je uvedena Souhrnem (Summary) následovaným stručným představením poznatků, které vedly k formulaci jejich cílů (Introduction). Ty jsou vymezeny stručně a jasně na následující stránce (Aims and scope). Přehled literatury (Literature review) je věnován popisu struktury, metabolismu a signální dráhy cytokininů. Kapitola věnovaná experimentálním metodám (Material and methods) dokumentuje erudici doktorandky v oblastech: (i) testování biologické aktivity cytokininů, (ii) analýzy aktivity a substrátové specificity cytokininoxidasy/dehydrogenasy a (iii) extrakce a kvantifikace endogenních cytokininů. Získané výsledky jsou uvedeny v kapitole „Results“ a následně zasazeny do kontextu současného stavu poznání v této oblasti experimentální biologie rostlin (Discussion). Celkový rozsah disertační práce včetně seznamu citované literatury (References) a seznamu příloh (Appendices) je 73 stran. Disertační práce je předložena v anglickém jazyce.

Práce tvůrčím způsobem rozvíjí dlouholetou tradici výzkumu rostlinných hormonů, zejména cytokininů, na školitelském pracovišti doktorandky. Objem získaných výsledků odpovídá požadavkům kladeným na disertační práci. Část těchto výsledků již byla publikována formou dvou časopiseckých publikací, kde je doktorandka v jednom případě sdílenou první autorkou (Journal of Experimental Botany, IF<sub>2010</sub> = 4.818) a ve druhém případě (Physiologia Plantarum, IF<sub>2008</sub> = 2.334) členkou autorského kolektivu. Výsledky disertační práce přispěly i ke vzniku rukopisu, který bude jistě v dohledné době publikován v impaktovaném časopise. Doktorandka prezentovala své výsledky rovněž na několika mezinárodních a řadě domácích konferencích a setkáních formou přednášek a posterů. Doložené výsledky dokumentují dosažení vytčených cílů práce – získání kvantitativního obrazu rozšíření cytokininů *cis*-zeatinového typu v rostlinné říši, kvantifikace biologické aktivity cytokininů *cis*-zeatinového typu v řadě biologických testů, průkaz rozdílnosti metabolismu cytokininů *cis*- a *trans*-zeatinového typu a průkaz rozdílného působení *cis*- a *trans*-zeatinu na akumulaci chlorofylu. Získané výsledky vedly k formulaci hypotézy, podle které mohou hrát cytokinininy *cis*-zeatinového typu důležitou funkci v udržování minimální cytokininové aktivity v podmínkách limitujících růst. Tato minimální aktivita je postulována jako jeden z předpokladů pro přežití rostlin v těchto mezních situacích.

Otázky:

1/ Na základě získaných výsledků a poznatků z literatury formuluje doktorandka hypotézu předpokládající významnou roli cytokininů *cis*-zeatinového typu v situacích limitovaného růstu. Jedním z příkladů je vysoký podíl cytokininů *cis*-zeatinového typu v semenech *Arabidopsis thaliana* a strmý pokles tohoto podílu ve prospěch cytokininů *trans*-zeatinového typu v časných fázích růstu klíčnicích rostlin (publikace v Journal of Experimental Botany, Figure 3). V poslední práci uvedené autorkou v Přílohách bylo však zjištěno, že v průběhu klíčení hladiny cytokininů *cis*-zeatinového typu silně narůstají (vojtěška) nebo zůstávají téměř beze změny (oves a kukuřice) ve srovnání s jejich obsahem v suchém semeni. Jak lze vysvětlit tento rozpor? Byl analyzován podíl cytokininů *cis*- a *trans*-zeatinového typu v průběhu ontogeneze dalších rostlinných druhů?

2/ Doktorandka zjistila negativní vliv exogenních cytokininů na akumulaci chlorofylu v klíčcích rostlinách *Arabidopsis thaliana* (str. 46-47). Cytokiny jsou obecně považovány za pozitivní regulátory vývoje chloroplastů. Jak lze vysvětlit tento rozpor?

3/ Ve snaze vysvětlit inhibiční účinky cytokininů *cis*- a *trans*-zeatinového typu (jak samotných, tak v kombinaci s NAA) na dlouhivý růst hlavního kořene sledovala doktorandka jejich vliv na auxinová maxima v kořenové špičce s využitím reporterového konstruktů DR5:GUS. V jakém vztahu je dlouhivý růst primárního kořene a auxinová maxima v kořenové špičce? V horní části Obrázku 22 (GUS barvení v kořenových špičkách v nepřítomnosti NAA) není v souvisejícím textu popisované snížení intenzity barvení v případě ošetření cytokininy zřejmé. Barvení se jeví spíše intenzivnější v případě ošetření *trans*-ZR. Ve spodní části obrázku je zřetelně nižší zbarvení v případě současného ošetření NAA a *trans*-ZR proti samotnému působení NAA. Nejmarkantnější nárůst zbarvení je mezi vzorky které byly vystaveny působení NAA (v přítomnosti nebo nepřítomnosti uvedených cytokininů). Přitom všechna ošetření vedou k inhibici dlouhivého růstu primárního kořene. Intenzita barvení v kořenové špičce tedy nekoreluje s inhibicí dlouhivého růstu primárního kořene – alespoň ne na základě prezentovaných snímků.

4/ Výsledky analýzy obsahu cytokininů představují jednu z klíčových součástí této práce. Z jakého důvodu nebyly do Příloh zařazeny tabulky s výsledky stanovení obsahu jednotlivých forem cytokininů? Tyto výsledky nejsou dostupné ani jako Supplementary data v on line verzi Journal of Experimental Botany, kde jsou uvedeny jen sumy pro cytokiny *cis*- a *trans*-zeatinového typu.

5/ Na jakém stupni ve smyslu evolučního vývoje se poprvé setkáváme s HPT proteiny jako dodatečným článkem původního bakteriálního dvoukomponentního systému přenosu signálu? Z formulace na str. 24 by čtenář mohl nabýt dojmu, že jsou přítomny až u rostlin. Na téže straně formulace první věty navozuje dojem jakoby kvasinky, hlenky a houby nepatřily mezi eukaryota.

6/ Jakému skutečnému času odpovídá první bod v Obrázku 19? Pokud jde skutečně o 0 min, jak lze vysvětlit významný stupeň konverze *trans*-Z na *trans*-ZRMP?

7/ Jak zapadá do postulované hypotézy o roli cytokininů *cis*-zeatinového typu zjištění, že mutant *atipt2* nevykazuje (přes snížené hladiny těchto cytokininů) žádný fenotyp – viz str. 59?

Drobné připomínky:

Práci lze vytknout některé technické nedostatky, kterých je prosta jen málo která disertační práce. Vypracování práce v anglickém jazyce je samo o sobě velmi pozitivní. Je však třeba věnovat zvýšenou pečlivost kontrole konečné podoby výsledného textu. U hodnocené disertační práce lze najít drobné chyby (např. překlepy, užívání desetinné tečky místo desetinné čárky, řazení citované literatury podle české abecedy v anglickém textu – tedy CH má být zařazeno pod C, nikoliv následovat až po H), ale také neobratné vyjadřování, které může měnit smysl textu. Například druhý odstavec na str. 59 začíná konstatováním, že mutanty v tRNA-IPT jsou vhodným nástrojem pro studium funkce cytokininů *cis*-zeatinového typu. V následujícím textu je však uvedeno, že jedině výrazné fenotypové projevy u těchto mutantů zřejmě souvisejí spíše s poruchou proteosyntézy než s hladinami cytokininů *cis*-zeatinového typu. Rovněž formální editace textu mohla být pečlivější. Některé citace uvedené v textu nelze nalézt v seznamu literatury (např. str. 55 – Vaňková 1999, str. 57 – Yevdakova

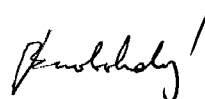
et al., 2008). V samotném seznamu literatury jsou některé citace uvedeny dvakrát – Brzobohatý et al., 1993, Pernisová et al., 2009, Vadassery et al., 2008, Veach et al., 2003).

**Závěrečná konstatování:**

Významnou část svých výsledků již doktorandka publikovala jako sdílená první autorka (Journal of Experimental Botany, IF<sub>2010</sub> = 4.818) a členka autorského kolektivu (Physiologia Plantarum, IF<sub>2008</sub> = 2.334). Další výsledky byly zpracovány do podoby rukopisu pro oponentní řízení v impaktovaném časopise. Objem i kvalita získaných experimentálních dat odpovídají požadavkům obvyklým pro úspěšnou obhajobu disertačních prací.

Disertační práce splňuje požadavky pro zahájení řízení pro udělení vědecké hodnosti Ph.D. v oboru „Anatomie a fyziologie rostlin“, plně odpovídá požadovaným kritériím Zákona o vysokých školách 111/98 Sb. a proto ji doporučuji k obhajobě.

V Brně 12. září 2011



prof. RNDr. Břetislav Brzobohatý, CSc.