

Posudek oponenta na diplomovou práci
Jméno oponenta: Petra Mašková
Datum: 7.9.2016
Autor: Bc. Iveta Zajícová
Název práce: Vizualizace buněčných struktur listu <i>Malus domestica</i> pro účely studia interakce s patogenem <i>Venturia inaequalis</i>
Cíle práce Předkládaná práce si klade za cíl zvládnutí metodických přístupů vizualizace buněčných struktur listu jabloně, sledování ontogenetických změn povrchových struktur listu a dále také reakci listu na napadení patogenem <i>Venturia inaequalis</i> , a to na buněčné a pletivové úrovni.
Struktura (členění) práce Rozsah práce (počet stran): Je uveden anglický i český abstrakt a klíčová slova? Diplomová práce má 96 stran, včetně abstraktu a klíčových slov v českém a anglickém jazyce, obsahu a seznamu zkratk.
Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, seznam literatury) Splňuje všechny požadavky na DP. Jen číslování tabulek někdy neodpovídá tomu, v jakém pořadí se odkazy objevují v textu (např. Tabulka 15). V Obr. 14 chybný odkaz na Tabulku 32.
Logická stavba a jazyková úroveň práce Celý text je napsán srozumitelně a čtivě, překlepy a stylistické chyby, které se jako u většiny DP vyskytují, neubírají na srozumitelnosti textu.
Literární přehled: Odpovídá tématu a je logicky členěn? Jednotlivé kapitoly mají logickou stavbu, v literárním úvodu jsou však některé podkapitoly řazeny z mého pohledu nelogicky nebo mi důvody k tomuto řazení zůstaly skryty. Konkrétně kapitole 2.6. Povrchové struktury jabloně (pojednávající mimo jiné o kutikule a její stavbě) předchází kapitola 2.4.1. Kutikula, kde autorka zmiňuje význam kutikuly v obraně jabloní před studovaným patogenem. Za optimální bych považovala spojit obě kapitoly. Podobně kap. R-geny, jejichž přítomnost v genomu a exprese je fakticky součástí obranných mechanismů, je řazena tak, že kapitole o obranných mechanismech předchází. Velmi zdařilá je tabulka terminologických zkratk souvisejících s interakcí hostitel-patogen na str. 26, které ale bohužel chybí popis a je spolu s odpovídajícím textem (bez odkazu) vsunuta do kapitoly Specifická depozice buněčné stěny, ikdyž se vlastně týká obecných mechanismů obrany hostitele. Přes uvedené výtky považuji tuto hlavní část literárního úvodu (kap. 2.1.-2.6.) za zdařilou a byla jistě cennou informační základnou pro experimentální práci. Je text napsán srozumitelně? ANO Jsou použité literární zdroje dostatečné, relevantní a aktuální? ANO, pokud mohu posoudit. Jsou literární zdroje (včetně obrázků) v práci správně citovány? ANO (Je obr. 4 vlastní?)
Materiál a metody: Šíře použitých metodik je velká a překračuje běžný rozsah pro DP, což bylo dáno pravděpodobně požadavky řešeného projektu a tento rozsah je dle mého bohužel slabinou výsledkové části. Cenné je bezpochyby zavedení nových metodik, např. ESEM.

Odpovídají popsané metody prezentovaným výsledkům? ANO

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO, za velmi čtenářsky přívětivé považuji vysvětlení použitých zkratk pod jednotlivými obrázky.

Faktických chyb se vyskytuje relativně málo (např. 18M inositol v kultivačním médiu, koncentrace ATB roztoku 1 μ l/ml). U kultivačních médií není kromě jednoho uvedený způsob přípravy médií a zda a jak byla sterilizována. U sekundární protilátky na str. 49 chybí, s čím byla konjugována.

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků adekvátní? ANO i NE, to týká se především „neúspěšných“ experimentů. Pro účely DP bych prezentovala i výsledky, které nevedly k cíli (např. viabilita a klíčivost sterilních konidií, in situ vizualizace cytoskeletu na řezech). U Obrázku 22, který dokumentuje jedny z klíčových výsledků práce, má obrázek C jiné zvětšení (kontrast), což znesnadňuje porovnání tloušťky kutikuly s Obr. D. Obrázek 23 ukazuje strukturu kutikuly jen u starších listů, je škoda, že není porovnání s listy mladšími.

Je množství provedených experimentů dostačující? S ohledem na šíři použitých metodik bylo experimentů provedeno velké množství, z textu (až na výjimky) ale jasně nevyplývá, zda byly dosud neoptimalizované experimenty opakovány a kolik vzorků/opakování bylo hodnoceno u jednotlivých pokusů, zda příp. jak byly optimalizovány transformační protokoly pro daný materiál apod., takže lze těžko odhadnout celkový objem práce.

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO, pokud mohu posoudit. U srovnání změn v povrchových strukturách listu pěstovaných v in vitro a ex vitro podmínkách však porovnání s literárními daty postrádám.

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO, autorka většinou navrhuje řešení, které by brzy mohlo přinést pozitivní výsledky.

Závěry (Souhrn):

Jsou závěry podloženy výsledky? ANO

Jsou výstižně formulovány? ANO

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Diplomová práce se zabývá aktuálním tématem interakcí mezi houbovým patogenem *Venturií* a listy jabloní a soustředí se na zavedení metodik pro hodnocení interakcí na buněčné a pletivové úrovni. Práce byla z mého pohledu pojata relativně ambiciózně (šíře použitých metodik x nemodelový organismus, nově řešené téma na pracovišti) a nepočítala s metodickými obtížemi, což jistě pramení z potřeby splnit projekt řešený školící laboratoří. Jak autorka sama píše, bylo nutno dělat experimenty nikoli následně ale souběžně, což jí práci rozhodně neusnadňovalo. Osobně bych zvolila jinou strategii řešení projektu – kompletně zpracovat dílčí úkol a další řešit po optimalizaci předchozího. Studentka prokázala snahu o splnění všech cílů, i když se jí to podařilo jen zčásti (regenerace in vitro, řízená infekce patogenem, vizualizace povrchových struktur různými metodami). Optimalizace jiných metod se dosud nepodařila. Při testování ontogenetických změn v povrchových strukturách a reakce listu na napadení patogenem a se podařilo získat jen předběžné výsledky, které ale ukazují, že právě zde by do budoucna mohlo být těžiště výzkumu.

Co považuji za nutné vyzdvihnout, je skutečnost, že studentka během řešení musela prokázat vytrvalost a vysokou odolnost vůči neúspěchu, a přesto u tématu setrvala, což vnímám jako velkou devizu, a to nejen pro plánované doktorské studium.

Pro další studium této problematiky a plán doktorského studia bych autorce doporučovala

zaměřit se jednak na studium změn povrchových struktur listu (kutikula, BS), paralelní hodnocení citlivého a rezistentního kultivaru (prezentované výsledky jsou jen pro citlivý kultivar), neváhala bych použít sadový materiál (zvážit riziko přítomnosti dalších patogenů) a rozhodně bych pokračovala v podrobnějším studiu ontogenetické závislosti odolnosti k patogenu. Vhodné by bylo i porovnání jedinců téhož i odlišných kultivarů lišících se v rychlosti růstu.

Otázky a připomínky oponenta:

- Velká část výsledků se věnuje porovnání materiálu pěstovaného v podmínkách *in vitro* a *ex vitro*. Z literatury je známo, že při *in vitro* kultivaci dochází k změnám v povrchových strukturách listů (tloušťka a složení BS a kutikuly). Extracelulární struktury, jak sama uvádíte v úvodu, jsou však důležité pro citlivost k napadení *Venturií*. Daleko smysluplnější by se mi tedy zdálo srovnání mezi neinfikovaným a infikovaným materiálem pro jednotlivé sledované parametry jen podmínkách *ex vitro*, případně pro optimalizaci kultivace porovnání sadového materiálu a rostlin pěstovaných *ex vitro*.
- Vizualizace cytoskeletu *in situ* se ukázala jako relativně obtížná. U metody využívající mrazového drcení, pokud je fotodokumentace v maximální možné kvalitě, bude možná komplikované porovnání změn v reorganizaci cytoskeletu po napadení patogenem. Také se mi zdá, že bude dost obtížné u této metody rozlišit, která buňka je ovlivněná patogenem, protože přítomnost či nepřítomnost patogena v apoplastu hodnocené buňky se bude výrazně hůř detekovat oproti penetrujícím hyfám u intracelulárních patogenů.
- V literárním přehledu je uvedeno, že u citlivých kultivarů je možné infekci indukovat expresí genů pro metalothioniny. Jaký význam to má/může mít pro hostitele?
- Poslední část literárního přehledu (kap 2.7.) se věnuje reakcím organel a cytoskeletu modelových organismů na infekci patogenem, který penetruje do buněk hostitele. *Venturia* je ovšem patogen extracelulární (apoplastický), který do buněk nepenetruje, je tedy možné, že reakce na přítomnost patogena bude odlišná. Data pro interakci *Venturie-jabloň* nejsou k dispozici, existují relevantní literární data (reakce organel, cytoskeletu) pro jiné extracelulární patogeny? A pokud ne, jakou reakci předpokládáte?
- Pro inokulaci patogena byly používány rostliny 3 týdny po přenesení do *ex vitro* podmínek. Je tato doba dostatečná pro aklimaci na nové podmínky? Máte nějaké porovnání s inokulací listů rostlin dlouhodobě kultivovaných ve skleníku, příp. v sadu? Prováděla jste (bylo provedeno dříve) analýzu povrchových struktur listu u rostlin pěstovaných „*in vivo*“, tzn. ze sadu? Liší se od listů z *ex vitro* podmínek?
- Hodnocení stavu kutikuly pomocí autofluorescence považujete za nejrychlejší a nejjednodušší metodu. Je také nejvýhodnější pro sledované parametry?
- Dílčím cílem projektu, v rámci kterého byla práce řešena, je nalézt časné buněčné markery infekce *Venturií* (úvodní část diskuse). V čem vidíte výhody Vašeho experimentálního přístupu (vizualizace změn v povrchových a buněčných strukturách) oproti např. stanovení biochemických markerů infekce?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: