

Posudek oponenta na diplomovou práci

Jméno oponenta:

Aleš Soukup, PhD.

Datum: 2.9.2020

Autor:

Bc. Jana Modráčková

Název práce:

Studium funkce genů EXO70H7 a EXO70H8 ve vývoji *Arabidopsis thaliana*.

Cíle práce

- Analýza fenotypu mutace v genech *EXO70H7* a *EXO70H8*.
- Vytvoření rostliny s dvojitou mutací *exo70H7-exo70H8*.
- Vytvoření konstruktů s GFP pro studium lokalizace proteinů *EXO70H7* a *EXO70H8*.
- Pozorování kořenů rostlin s mutacemi v genech *EXO70H7* a *EXO70H8* a rostlin divokého typu za různých stresových podmínek a najít případné odchylky.

Struktura (členění) práce

Rozsah práce (počet stran): 47

Je uveden anglický i český abstrakt a klíčová slova? Ano

Vlastní práci tvoří 40 stran textu s řádkováním 1,5, který již zahrnuje mikrofotografie a grafy.

V seznamu literatury najdeme 67 citací. Uspořádání je standardní se všemi požadovanými částmi.

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, seznam literatury)

Text je napsán srozumitelným jazykem s přijatelným množstvím překlepů, chybějících slov, či dalších drobných typografických nedostatků (např. *in vitro* by mělo být kurzívou, CaMV 35S se píše s velkým S, kompartment s a, atd.). Grafické zpracování odpovídá standardům diplomové práce, výsledky jsou doplněny tabulkami, grafy a poměrně zdařilými mikrofotografiemi. Grafy nemají jednotnou úpravu a u krabicových grafů by bylo vhodné uvést, co vyjadřují „vousy“. Většina použitých zkratk je uvedena v seznamu (chybí např. APS, TRIS, TEMED a některé další). Seznam literatury obsahuje drobné chyby způsobené nejspíše neúplným zadáním citací do použité databáze.

Logická stavba a jazyková úroveň práce

Jazyková úroveň se v práci mění – je výrazně lepší v diskusi a závěrech. V literárním úvodu a výsledcích jsou poměrně četná nepřesná vyjádření, která mohou být v některých případech zavádějící (některé příklady uvádím níže). Lze značně vylepšit použití českých termínů a jejich jednotnou aplikaci v textu. Použití některých označení (např. ionizovaná x demineralizovaná voda – M&M) není příliš smysluplné.

Literární přehled:

Literární přehled poskytuje srozumitelný úvod do tématu práce. Jeho kvalitě by prospělo lepší zacílení a propojení informací předkládaných v textu. Na rozdíl od diskuse jsou zde informace předkládány poněkud neuspořádaně, bez interpretace a vysvětlení souvislostí s navazujícími experimenty.

V některých částech působí text poněkud zmateně. Např. první kapitola s titulkem „2.1 Vývoj kořene

v přítomnosti stresových faktorů“ obsahuje pouze základní informace o uspořádání některých částí kořene bez ohledu na stres, který se objeví až o kapitulu dále. Podkapitola nazvaná „2.1.1 Ochranné vrstvy kořene podle Nawrath et al., 2013“ má s uvedeným review poměrně málo společného, navíc zahrnuje i další informace mimo apoplastické bariéry a proto nepovažuji tento nadpis právě za šťastný.

Autorka by měla lépe vážit formulace a použití správných termínů či relevantních citací. Například píše: “*Caspariho proužek vzniká depozicí ligninu a suberinu na transversální straně buněčné stěny endodermálních. Navíc plazmatická membrána buněk těsně ulpívá na Caspariho proužku a potlačuje tak laterální difuzi proteinů v rámci plazmatické membrány (Karahara and Shibaoka, 1992).* Domnívám se, že autorka zde směšuje funkci a vývoj CP. Uvedená citace se vtaňuje ke struktuře a funkci endodermis co apoplastické bariéry a neřeší vymezení domén CP v plazmatické membráně při jeho vzniku, které najdeme např. v pozdějších publikacích z lab. N.Geldnera.

Taktéž pochybuji, že Esau (1960) je správnou citací pro tvrzení že „Obdobně slouží proteinový komplex tzv. tight junction u živočichů, který také utěsňuje mezibuněčný prostor a zabráňuje tak úniku solutů a vody mezi buňkami (Esau, 1960).

Další kapitola označená „2.1.2 Zóny kořene podle Takatsuka and Umeda, 2014 a Verbelen et al., 2006“ představuje longitudinální zonaci špičky kořene. Ani v jedné z uvedených prací není definováno autorkou předkládaných 5 longitudinálních zón, ale standardní rozdělení na meristematickou, přechodovou, elongační a diferenciací oblast. Označení zón není ani v textu DP uváděno jednotně - občas je například uvedena „zóna přechodná“ a občas zóna přechodová.

Tvrzení že „Zbytek kořene (za elongační zónou) je tvořen již buňkami v plně diferencovaných trvalých pletivech. A právě zde dochází k zakládání a růstu postranních kořenů, jež vznikají z pericyklu.“ také není právě přesné.

Definice QC jako „*klidové centrum (seskupení téměř se nedělících buněk produkujících fytohormony)*“ také již úplně neodpovídá úrovni DP, navíc bez uvedení jakékoliv citace.

„*V publikaci Li et al. (2010) byl potvrzen výskyt proteinu EXO70H7 v různých pletivech Arabidopsis pomocí metody polymerázové řetězové reakce v čase (dále jen RT-PCR).*“ - Zde se jedná o Reverse transcription PCR.

Bohužel musím konstatovat, že výše uvedené příklady a řada podobných mne zcela nepřesvědčily, že autorka uvedené publikace opravdu četla a čerpala z nich při psaní literárního úvodu.

Řada dalších tvrzení této části není vyloženě „chybná“ ale jejich předložený výklad je značně zjednodušený a zavádějící – viz např. úvod části „2.2.1 Vliv solného stresu na vývoj kořene“.

Předpokládám, že oba obrázky použité v literárním úvodu autorka sama vytvořila (není uvedena citace).

Materiál a metody:

Studentka v práci využila a osvojila si základní sadu dovedností pro klonování DNA, transformace bakterií, stabilní i tranzientní transformace rostlin a různých metod mikroskopie. Tato šíře je pro diplomovou práci zcela adekvátní. Popis jednotlivých postupů je ve většině podrobný, byť v míře detailu nekonzistentní.

- Při definici složení jednotlivých roztoků je třeba mimo hmotnosti použité chemikálie uvést také objem výsledného roztoku (např. u kultivačních roztoků).

- Dle popisu přípravy „100 μ M železnatého média“ není zřejmé, zda se jedná o finální koncentraci, nebo množství přidaného Fe²⁺ do roztoku kultivačního média. Chápu správně, že pro vytvoření Fe deficientní kultivace byly použity ½MS soli (plné MS obsahuje cca. 100 μ M Fe) a přidáno 10 μ M FeSO₄? Jaký byl cíl této kultivace?
Naopak, lze vůbec předpokládat, že přidání 100 μ M FeSO₄ do ½ MS média lze navodit toxicitu železa (viz. např. Ward JT, Lahner B, Yakubova E, Salt DE, Raghothama KG. The effect of iron on the primary root elongation of Arabidopsis during phosphate deficiency. Plant Physiol. 2008;147(3):1181-1191. doi:10.1104/pp.108.118562)?

Experimentální část:

Experimentální část přehledně shrnuje získaná data. Nejdříve prezentuje buněčnou lokalizaci v pokožkových buňkách tabáku.

Ne všechna v textu komentovaná pozorování jsou z mikrofotografií patrná. Např. tvrzení že *“Mezi dvěma buňkami byla patrná i střední lamela bez signálu. Viz obr. 5 a 6.”* nelze z obrazové dokumentace doložit a nemyslím si, že by bylo možné střední lamelu použitým zobrazením rozlišit. Také nepokládám za vhodné označovat mikrofotografie ze světlého pole (nebo DIC? – není uvedeno) jako „pozorování ve viditelném spektru“. To je mimochodem použitá fluorescence také.

Pro pozorování transformantů huseničku (EXO70H7) je jedním z klíčových závěrů tvrzení, že *„U obou konstruktů byla vyvrácena lokalizace na plazmatické membráně díky pozorování s využitím barviva FM-64, která barví plazmatickou membránu. Signál tohoto barviva nekolokalizoval se signálem GFP.“* Bohužel z předložených mikrofotografií nelze takový závěr potvrdit. V zeleném kanálu je zřejmý signál také na periférii buněk, která může zahrnovat i PM. Lze opravdu vyloučit přítomnost signálu na plazmatické membráně? Byly pořízeny obrázky o dostatečném rozlišení na kterých lze takové tvrzení postavit? Existují obrázky kontrolních rostlin pro odlišení autofluorescence?

Při hledání funkční úlohy genů EXO70H7 a EXO70H8 bylo hodnocena rychlost a procento klíčení semen při působení salinity a osmotického stresu na rostliny původního genotypu a použitých inzerčních mutantů. Původně plánované pozorování a vyhodnocení růstu kořenů za stresových podmínek nebylo dokončeno, respektive podrobnější výsledky nejsou prezentovány.

Design experimentu hodnocení klíčivosti a rychlosti klíčení semen použitých genotypů není z textu právě zřejmý. Vhodné by bylo uvedení použitého statistického testu (chí-kvadrát test?) přímo v testu, aby se čtenář nemusel domýšlet z použitých programů (M&M) či tabulky č.1. Může autorka upřesnit, co je míněno „metodickým“ opakováním experimentu (část 4.3.1 Klíčení semen mutantních rostlin *exo70H7*) a jaké bylo uspořádání experimentu? Jaké byly počty hodnocených semen v jednotlivých experimentech, proč jsou u grafů č.17 a 18 uvedeny pouze dva experimenty? Z jakých dat byla počítána statistika v tabulce č. 1 a 2?

Studentka na základě získaných dat uzavírá, že *„Menší objem vyklíčených semen mutantu *exo70H8* na médiu s NaCl oproti vyklíčeným semenům divokého typu též na NaCl je signifikantní na úrovni 0,01 (viz tab. 2). Můžeme tedy tvrdit, že tento mutant výrazně hůře klíčí na NaCl médiu.“* Mohu poprosit o vyjádření, jak je toto tvrzení konzistentní s grafy č.20 – 1. a 2. pokus?

Diskuze:

Diskusi považuji za nejkvalitnější část oponované práce a to jak z pohledu použitého jazyka, tak i uvažování nad významem jednotlivých výsledků, jejich interpretace a uvedení do příslušného literárního kontextu. Konečně se zde objevuje i odůvodnění proč byly jednotlivé experimenty plánovány a úvahy, jak v této oblasti pokračovat. Je zde výrazný kvalitativní posun oproti literárnímu úvodu a výsledkům, který doufám mohu přičíst „zraní autora“ během psaní DP.

Přesto i zde si neodpustím několik komentářů.

- V úvodním odstavci 5.1 Podjednotky EXO70H7 a EXO70H8 ve vývoji kořene se píše, že „Při analýze fenotypů mutantních rostlin *exo70H7*, *exo70H8* a dvojitého mutantu *exo70H7-exo70H8* nebyl v této práci identifikován žádný pozorovatelný projev těchto mutací“. Z výsledků jsem ale nabyl dojem, že tyto vlastně ani nebyly analyzovány a o dvojitým mutantovi jsme se také nic nedověděli.
- Autorka píše, že „Výsledky mikroskopického pozorování v této práci ukázaly, že se *EXO70H7* nejspíše lokalizuje na buněčné přepážce a účastní se tak dělení buněk.“ – v této práci jsem ale takové výsledky nezaznamenal.
- Studentka spekuluje o možných důvodech různé lokalizace exprese *EXO70H7* v této práci a publikaci Li et al. 2010. Může být jednodušším vysvětlením to, že jednou jde o protein fúzovaný na N konci s GFP a podruhé o GUS pod promotorem příslušného genu?

Závěry (Souhrn):

Závěry práce jsou napsány v podobném duchu jako diskuse. Lze pochválit jejich sloh, srozumitelnost a věcnost. Bohužel, podobně jako diskuse, ne zcela odpovídají prezentovaným výsledkům, jak již bylo zmíněno výše.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Hodnocená diplomová práce umožnila studentce osvojit si celou řadu metodických přístupů a i přes výše uvedené výhrady a komentáře věřím, že jí poskytla dobrý úvod do vědecké práce. Na nedotažení části experimentů se s vysokou pravděpodobností podepsala i komplikovaná epidemiologická situace tohoto roku a proto je pokládám z části za pochopitelné.

Předkládaná práce splňuje nároky kladené na diplomovou práci, proto ji doporučuji k obhajobě. Podle průběhu obhajoby navrhuji hodnocení velmi dobře nebo dobře.

Otázky a připomínky oponenta (povinná část posudku):

Své otázky jsem již uvedl výše a věřím, že diplomantka úspěšně doplní a dovysvětlí vše požadované.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: