

Posudok na dizertačnú prácu

Autorka: **RNDr. Eva Pecková**

Názov: **Vývoj postranných kořenů a apoplastických bariér v kořenovém systému kukuřice (*Zea mays* L.)**

Význam „skrytej“ časti rastlín, ich koreňovej sústavy, pre rast a produkciu je nesporný z hľadiska záujmu o poskytovanie biomasy na najrôznejšie spôsoby využitia, vrátane toho najdôležitejšieho – pre výživu všetkých živočíšnych organizmov, a zároveň aj z hľadiska získavania teoretických poznatkov v biológii rastlín v najširšom slova zmysle. Záujem o vlastnosti koreňového systému sa sústreďuje najmä na otázky jeho architektúry (vývin, morfológia, biomasa) v rôznych ekologických podmienkach alebo jej genetickej podmienenosti. Napriek tomu, že bočné korene sú podstatnou časťou koreňového systému, sa pozornosť ich štruktúrnym vlastnostiam venuje zriedkavejšie. Z tohto pohľadu považujem výber témy spracovanej v predloženej dizertácii za správny a výsledky za mimoriadne dôležité.

Obsažný a zrozumiteľne napísaný úvod predloženej práce predstavuje najnovšie poznatky o vzniku a vývine bočných koreňov, charakteristiku mutanta použitého ako modelový objekt, poznatky o apoplastických bariérach, ich detekcii a priepustnosti v primárnom aj bočných koreňoch.

Ciele práce sú jasné, sú predstavené dopodrobna a dajú sa v celom diele veľmi dobre sledovať.

Časť Materiál a metódy obsahuje prehľad veľkého počtu histochemických a cytologických techník a techník pre svetelnú, fluorescenčnú, konfokálnu a elektrónovú mikroskopiu. Detailné postupy sú obsiahnuté v jednotlivých rukopisoch. Spracovaniu kvantitatívnych parametrov nechýba obrazová analýza a štatistické analýzy. Fotografická dokumentácia je na vysokej úrovni, s akou sa tradične stretávame vo výstupoch tohto pracoviska.

Výsledky práce sú prezentované vo forme jedného publikovaného článku a dvoch článkov v štádiu rukopisov pripravených pre tlač. Experimentálnym objektom je kukurica, kultivar Cefran, ktorý slúži ako model pre mnohé štúdiá na pracovisku a monogénny recesívny mutant kukurice (*lrt1*) s poruchou zakladania bočných koreňov na primárnom a adventívnych seminálnych koreňoch počas postembryonálneho vývoja. Zaujímavá charakteristika tohto mutanta je, že mutácia pravdepodobne postihuje iné aspekty regulácie vývoja bočných koreňov než je auxín a jeho polárny transport. Z mnohých nezodpovedaných otázok autorka charakterizovala celkový fenotyp mutanta a funkciu génu *lrt1* vo vývine koreňového systému a špecifických štruktúr hlavného a bočných koreňov kukurice. Tieto výsledky sú obsiahnuté v prvej časti práce vo forme publikovaného článku. Vzhľadom na to, že mutant sa vyznačoval zmenami v utváraní vonkajšej apoplastickej bariéry a aerenchýmu, dalo sa očakávať, že bude vhodným modelom pre funkčné analýzy apoplastických bariér a ďalších vlastností primárnej kôry. Z tohto dôvodu sa významná časť práce, prezentovaná vo forme rukopisu, venuje poznaniu variability apoplastických bariér v celom koreňovom systéme kukurice cv. Cefran v rôznych podmienkach prostredia. K týmto štúdiám sú nevyhnutné testy priepustnosti štruktúrnych bariér v koreni. Opodstatnenie má teda aj tretia časť práce, spracovaná v pripravenom rukopise. Obsahuje vyhodnotenie najvýznamnejších testov priepustnosti, využívajúcich vybrané apoplastické sondy, na základe vlastných výsledkov a dát z literatúry.

Dizertácia obsahuje ďalšie náležité časti – diskusiu o získaných výsledkoch, závery a zoznam použitej literatúry obsahujúci viac ako 160 citácií.

Výsledky charakterizujúce *lrl1* mutanta prinášajú nový pohľad na funkciu *lrl1* génu, ktorý podmieňuje slabšie rastové parametre celej rastliny a modifikáciu architektúry koreňového systému v závislosti od podmienok pestovania. Z výsledkov práce vyplýva, že *lrl1* gén, v závislosti na podmienkach prostredia, ovplyvňuje iniciáciu bočných koreňov, pôsobí na ich priestorovú distribúciu, nie však na frekvenciu a ovplyvňuje ich neskorší vývin. Mutácia *lrl1* sa menej výrazne prejavuje v primárnom koreni zmenami orientácie bunkových delení a výsledného vzoru pletív v sub-epidermálnej oblasti koreňa a tiež diferenciacie exodermy a tým aj priepustnosti periférnych pletív koreňa. Tieto nové poznatky získala RNDr. Pecková v spolupráci so zahraničným pracoviskom Univerzity v Bonne. O kvalite týchto výsledkov svedčí, že úspešne prešli recenzným konaním a sú publikované v časopise *Annals of Botany*, ktorého úroveň charakterizuje IF v rozmedzí 3,4 až 4. Moja drobná technická poznámka k tejto časti sa týka iba dĺžkových jednotiek: hodnoty v dodatkových tabuľkách S1 pre diameter centrálneho valca a kôrového pletiva a S2 pre hrúbku bunkových stien, udávané v mm sa mi zdajú neprimerane veľké. Pre porovnanie, v ďalších výsledkoch v tejto práci sa dá určiť napríklad diameter primárneho koreňa ca 0,85 mm a stele 0,34 mm (Manuskript I, Fig. 8A,8C).

Apoplastické bariéry študovala autorka so spolupracovníkmi na modeli kukurice cv. Cefran v primárnom a bočných koreňoch 1. až 3. rádu a v nodálnych koreňoch z 1. uzla a to v normálnych podmienkach aj po vplyve viacerých stresových faktorov. Unikátne výsledky dokumentujú širokú škálu rastových odpovedí v predlžovacom raste primárneho koreňa, vo frekvencii jednotlivých typov bočných koreňov, v ich distribúcii a vytváraní koreňov vyšších rádo v rôzne podmienky pestovania či stresový podnet. Tieto komplexné dáta doplňujú významné výsledky o stupni diferenciacie a kvantitatívnych vlastnostiach apoplastických bariér v endoderme a v periférnych pletivách všetkých typov koreňov v koreňovom systéme experimentálnych rastlín. Prvý krát kompletizovaný veľký objem dát tohto druhu poskytuje systematickú charakteristiku tvorby apoplastických bariér v celom koreňovom systéme.

Posledná časť výsledkov práce sa týka testov priepustnosti koreňových pletív, pri ktorých sa rôzne látky využívajú ako apoplastické sondy. Táto časť dokazuje, že autorka nemala ľahkú cestu k riešeniu svojich úloh použitím zabehnutých, vopred otestovaných a zaručene fungujúcich metodických postupov a to aj napriek mnohoročným skúsenostiam v tejto oblasti a publikovaným výsledkom školiteľa a kolektívu spolupracovníkov. Treba oceniť, že svoje vlastné poznatky a skúsenosti spracovala do pripravovaného rukopisu. V úvode tejto práce dokazuje, že má prehľad o používaných sondách, mechanizmoch ich účinkov a o ich účinnosti v rôznych rastlinných objektoch. Vlastné výsledky obsahujú návrhy farbiacich postupov, poukazujú na ich možné alternatívy či úskalía. Testovanie na rovnakom materiáli pri dvoch druhoch rastlín umožnilo porovnávať jednotlivé sondy navzájom a tiež ich mobilitu v mladších a diferencovaných pletivách koreňa kukurice alebo ryže. V prípade publikovania toto veľké množstvo dát ocenia mnohí odborníci zaoberajúci sa mechanizmami príjmu a transportu látok v rastlinách.

Napriek tomu, že každá časť výsledkov má svoju diskusiu, obsahuje dizertácia v závere aj zhrnújúcu diskusiu k najdôležitejším výsledkom práce. Okrem časti 4.3, kde som žiadnu diskusiu nenašla, sa tu dôkladne konfrontujú vlastné poznatky s poznatkami v literatúre, čo svedčí o veľmi dobrej znalosti a orientácii v literárnych prameňoch a tiež schopnosti autorky využiť ich na vysvetlenie pozorovaných faktov.

Rozsiahla diskusia vyúsťuje do hodnotných záverov. Iba ich časť III. o apoplastických sondách nie je záverom, ale zoznamom toho, čo sa v tejto časti práce urobilo. Závery svedčia o kvantite aj kvalite poznatkov, ktoré prispievajú k poznaniu štruktúrnych mechanizmov formovania a funkcií koreňového systému ako dôležitej súčasti rastlinného organizmu.

Otázky

„Postranní kořeny vznikají obvykle postembryonálně...“ – je známa aj iniciácia v inom (napr. embryonálnom) štádiu? (str. 5)

Pri iniciácii tvorby primordií bočných koreňov hrá zrejme úlohu vzájomné spolupôsobenie biochemickej a mechanickej regulácie. Tento fakt sa pri druhu *Arabidopsis thaliana* dáva do súvisu s ohybmi koreňov ako potenciálnymi induktormi iniciácie bočných koreňov. Je možné o niečom podobnom uvažovať aj pri iných druhoch rastlín?

Akým spôsobom ovplyvňujú medzibunkové priestory difúziu apoplastických sond (Str.106-107)?

V diskusii sa uvádzajú ťažkosti s použitím testov pomocou apoplastických sond v koreňoch rastúcich v pevných substrátoch, najmä v dôsledku poškodenia jemných bočných koreňov. Mohlo by sa tu uplatniť pestovanie v aeropónii, ktorá sa, vo vzťahu k diferenciacii apoplastických bariér, podľa autorov Redjala et al. (2011) najviac podobá pôde?

Pripomienky

„Proces začíná asymetrickým antiklinálnym dělením...“ žiada sa doplniť, že ide o delenie buniek pericyklu (str.6)

„Třetím vývojovým stádiem je pak tloušťnutí buněčné stěny, která je silnější v radiálních stěnách a slabší v tangenciálních.“ Hrubnutie bunkových stien je naopak, najvýraznejšie v tangenciálnej stene, čím sa často vytvára tzv. U-tvar. (str. 10)

Je správne používanie termínu „tracer“? (str. 17)

Tab.3 v manuskripte I. obsahuje iba symboly; v legende by nemal byť priemer („means“).

Pre čitateľa by bol prijateľný údaj napr. v ktorej časti koreňa sa dáta zaznamenali.

„V určité vzdálenosti od špičky hlavního kořene jsme detekovali změny v dělení buněk...“
Pokiaľ bola „určitá vzdialenosť“ už mimo meristému, detekovali sa zmeny v orientácii bunkových stien, na základe čoho sa môže usudzovať o poruchách v delení buniek. (str. 121)

V článku Enstone a Peterson (1997) nebola použitá TEM (str. 127)

Manuskript I a najmä II. zrejme bude potrebovať revíziu anglického jazyka

Záver

Ciele predloženej dizertačnej práce RNDr. Evy Peckovej boli splnené. Dizertácia je vypracovaná na dobrej vedeckej úrovni. Jej výsledky sú prínosom v oblasti funkčnej anatómie koreňov rastlín, konkrétne komplexnej charakteristiky vývinu koreňového systému a špecializovaných štruktúr dôležitých pre príjem a transport látok. Práca je dokladom schopnosti autorky pracovať s vedeckou literatúrou, jej rozsiahlych vedomostí o spracovávanej problematike, schopnosti samostatne vykonávať experimentálnu prácu, vyhodnotiť ju a vyvodiť kvalitné závery. Odporúčam preto prácu prijať k obhajobe.

V Bratislave, 15.12.2014



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