Posudek na diplomovou práci

☒ **Posudek školitele**	**Jméno školitele: RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D.**
	Datum: 29.8.2016

Autor: Bc. Iveta Zajícová

Název práce: Vizualizace buněčných struktur listu *Malus domestica* pro účely studia interakce s patogenem *Venturia inaequalis*

Zařazení předkládané práce do kontextu dalších prací týmu

Práce je součástí grantu "Zvýšení efektivity postupů ochrany jabloní proti strupovitosti" s hlavním řešitelem VÚOŠ Holovousy, poskytovatel Ministerstvo zemědělství České republiky. Hlavním cílem celého projektu je nalézt nové efektivní postupy především chemické ochrany proti patogenu *Venturia inaequalis*. Součástí tohoto praktického souboje s patogenem musí být i základní výzkum, který dovolí pochopit lépe vztahy mezi patogenem a hostitelem. Ačkoliv *V. i.* je zkoumána již desítky let, překvapivě málo je publikováno o odpovědi buněk listu jabloně na infekci na buněčné úrovni. Tato DP měla tedy za cíl prozkoumat naše možnosti ve vizualizaci jednotlivých buněčných komponent v listech jabloně, které by se mohly stát v budoucnosti základem dalšího výzkumu interakce *Malus-Venturia*.
Protože se jedná o nový výzkumný směr, bylo jako první třeba zavést výzkumný materiál na pracovišti a propagovat jej. Na základě dostupného materiálu bylo pak možné zahájit pokusy, jejichž cílem byla vizualizace vybraných struktur (jejichž důležitost v infekci Venturií byla předpokládána) v živých či fixovaných buňkách. Z tohoto důvodu je předkládaná práce z největší části metodická. Některé metody byly využity ke zkoumání změn v buňkách listu po infekci. Hlavní experimenty však budou prováděny až během PGS studia Ivety, které bude na DP přímo navazovat.

Přístup studenta k zadanému tématu

Výše zmíněné cíle zavést výzkumný materiál, připravit jeho dostatečné množství pro pokusy a zavést metody vizualizace nejrůznějších struktur považuji za úspěšné, a to především díky píli, samostatnosti a celkové experimentální zdatnosti studentky Ivety Zajícové. Iveta se nevzdávala ani v nejvypjatějších chvílích, stále systematicky vyhledávala nové informace a postupy v literatuře a tyto se snažila uplatňovat tam, kde se nedařilo využít metodu, která jinak fungovala dobře např. v *Arabidopsis*. V její odborné péči vzkvétají jak *in vitro,* tak do půdy přesazené rostliny, což je dalším důležitým, zdaleka ne samozřejmým jevem, který umožnil experimenty v rámci výše zmíněného grantu.
Velmi si cením toho, že Iveta byla schopna ovládnout velké spektrum metod. Tyto zahrnovaly kromě samotné kultivace materiálu, indukce kořenění a infekce konidiemi též regeneraci nových rostlin z kalusu, metody buněčně biologické - imunofluorescenční vizualizace pomocí alespoň dvou různých metod, transformaci včetně přípravy DNA, metody biochemické - izolace proteinů a Western blot, a samozřejmě mikroskopii včetně práce na konfokálním mikroskopu.

Postup práce

Na začátku práce bylo třeba především zavést rostliny na pracovišti, což bylo provedeno velmi hladce. Během dalšího řešení projektu se vyskytly dva základní problémy, které bylo třeba řešit. Prvním problémem byla samotná řízená infekce rostlin konidiemi *V.i.,* která se nedařila ani na *in vitro*, ani na hrnkových rostlinách. Problém byl posléze po soustředěném úsilí vyřešen ve spolupráci s VÚOŠ a infekce jsou v současné době opakovaně úspěšně prováděny s použitím vitálního inokula konidií *V.i.*. Druhým problémem je "nedobytnost" buněk listu jabloně pro protilátky v *in situ* vizualizacích a pro vektory pro transformaci buněk. Vizualizace struktur pokožkových buněk pomocí *in situ* vizualizace byla nakonec úspěšná díky protokolu zavedenému původně pro *Arabidopsis;* transformaci buňky listu jabloně stále odolávají. Je zřejmé, že nový rostlinný materiál, jakým jsou listy jabloně, bude vyžadovat podstatnou přestavbu metod zavedených v laboratoři pro především *Arabidopsis* či tabák. Důležitým aspektem v úspěších Ivety je především její soustavná práce, systematičnost, přesnost, píle a též výborná schopnost spolupracovat s ostatními členy týmu, které vedly k úspěšnému zavedení většiny metod.

Diplomovou práci sepsala samostatně, v literatuře se orientovala výborně, vzhledem k tématu a mnoha klíčovým publikacím staršího data, které nebyly k dispozici v elektronické podobě, neváhala využít klasické knihovní služby.
Další poznámky k průběhu práce: Projekt přináší do výzkumného týmu novou problematiku a nový rostlinný materiál. Předpokládáme, že první kroky v řešení projektu byly díky výsledkům Ivety Zajícové úspěšné. Zavedené metody budou využívány během PGS studa Ivety, kde bude sledována odpověď pokožkových buněk na úrovni cytoplazmy (změny struktury cytoskeletu a organel) či buněčné stěny (depozice nového materiálu atd.) na infekci v různě citlivých druzích.
Celkové hodnocení: výborně
Podpis školitele