

Posudek oponenta na diplomovou práci

Jméno oponenta: Ing. Přemysl Pejchar, Ph.D.

Datum: 30. srpna 2017

Autor: Bc. Jana Pohl

Název práce: Vliv hliníkové toxicity na dynamiku rostlinných kortikálních mikrotubulů

Cíle práce

Hlavním cílem diplomové práce bylo porovnání vlivu hliníkových iontů na dynamiku kortikálních mikrotubulů (MT) kořenových buněk *Arabidopsis* u WT a mutantů ve dvou isoformách fosfolipázy D - *pldα1* a *pldδ* s ohledem na zónu kořene, rychlost polymerace, počet a reorganizaci. Doplnující cíle pak byly pozorování dynamiky + konců MT v protoplastech buněk a studium akumulace hliníku v kroužku Ortmannové. Tematicky práce navazuje na dlouhodobě řešené téma v laboratoři, přináší však nové pohledy - studium dynamiky + konců MT, kratší časové rozmezí pozorování (v rádech minut).

Struktura (členění) práce

Posuzovaná diplomová práce se skládá z 64 stran textu, je standardně koncipována (úvod, literární přehled, materiál a metody, výsledky, diskuze, závěr, seznam použité literatury), velikosti jednotlivých kapitol odpovídají obvyklým proporcím. Abstrakt v české i anglické verzi je přehledný a stručný a výstižně formuluje cíle práce i dosažené výsledky. Součástí obou abstraktů jsou i klíčová slova. Práce obsahuje také seznam zkratk.

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

Součástí literárního přehledu jsou tři schémata, odpovídající jeho třem hlavním podkapitolám, která vhodně doplňují probíranou problematiku. V metodické části se nacházejí dva obrázky dokreslující metodické uspořádání pokusu. Výsledky pak obsahují několik mikroskopických obrázků, jejichž součástí je (až na dvě výjimky u obrázků trichomů) i měřítko, dále tabulky a grafy. Kvalita a rozlišení obrázků (opět s výjimkou trichomů) je dostatečná, avšak u některých grafů by mohlo být rozlišení lepší. V literárním přehledu a metodách nejsou obrázky/schématy citovány ve vlastním textu, nicméně jsou součástí příslušného odstavce. Ve výsledkové části je nejdříve citován Obr.7, pak teprve Obr. 6, stejně tak nejdříve citován Graf č. 2, pak teprve Graf č. 1. Popis tabulek by měl být nad vlastní tabulkou nikoli pod. Seznam literatury odpovídá zavedeným vědeckým stylům.

Logická stavba a jazyková úroveň práce

Celá práce je dobře logicky postavena, je psaná čtivě a srozumitelně spisovnou češtinou. Nepodstatné výtky směřují k častému psaní desetinné čárky tečkou nebo k větám začínajícím číslovkou, občas se vyskytne chybná stavba věty.

Literární přehled:

Literární přehled je logicky členěn, je rozdělen do tří hlavních částí – MT, jejich dynamika a proteiny s nimi asociované, vztah MT a fosfolipidové signální dráhy, hliník a jeho toxicita – odpovídá tedy tématu diplomové práce. Je psán srozumitelně, vhodně doplněn 3 obrázky/schématy, obsahuje adekvátní literární zdroje, které jsou správně citovány.

Materiál a metody:

Práce založena zejména na mikroskopickém pozorování a následné analýze dynamiky kortikálních MT, nicméně autorka musela zvládnout široké spektrum metod předcházejících samotnému pozorování. Počáteční snaha o stabilní či transientní transformaci *Arabidopsis*

markerem +konců MT a jeho selekci byla sice neúspěšná, pravděpodobně ale vzhledem k problematickému obdržení vektoru. Následovalo křížení WT a mutantních rostlin s funkčním markerem a genotypování dalších generací. Oceňuji dále zvládnutí netriviálních technik jako hydroponické kultivace rostlin pomocí speciálně upravených sklíčků, úspěšné provedení izolace protoplastů a v neposlední řadě samotnou práci s roztoky Al^{3+} (zajištění kyselého pH, větší množství kontrol, zabránění chelatace...). Metody jsou srozumitelně popsány a odpovídají prezentovaným výsledkům. Škoda, že autorka nezařadila podrobnější odstavec (sem nebo do výsledkové části) o vlastní analýze trasování EB1a markeru v programu Fiji např. s několika časově náročnými obrázky, zcela jistě byla analýza značně časově náročná.

Experimentální část:

Úvod každé kapitoly výsledků obsahuje cíl, za kterým je experiment prováděn. Nejdříve bylo ověřeno použití EB1a-GFP jako markeru + konců MT a to jak v listech, tak i hypokotylu a kořenu *Arabidopsis*. V dalších experimentech bylo zjištěno, že kořen *plda1* roste rychleji než WT, jak v kontrolních podmínkách, tak po ošetření Al^{3+} , kortikální MT transientní zóny kořene jsou citlivější na působení Al^{3+} než MT elongační zóny. Dále byl sledován vliv Al^{3+} na rychlost polymerace, počet a reorganizaci kortikálních MT u WT a *plda1*. Bylo také zjištěno, že EB1a-GFP není vhodný marker pro sledování + konců MT v protoplastech a byl proveden pokus o detekci Al po barvení morinem. Množství opakování experimentů a počet kořenů/MT pro analýzu považuji za více než dostačující a dokumentaci výsledků a statistické zhodnocení za adekvátní. Několik poznámek – u rychlosti polymerace je v tabulkách uvedena rychlost v nm ne v nm/min. Zkontrolujte hodnoty pro WT 3 min pH=4,5 + 300 uM Al v Tab. 5 a grafu č. 5, fialový sloupec. Zdá se mi, že rychlost polymerace kortikálních MT za kontrolních podmínek (pH=5,7) u WT a *plda1* není stejná (Tab.5 a 6. a Kap. 5.4.1), vidím rozdíl asi 10%, který byl v některých dalších případech brán jako statisticky průkazný. Škoda, že před grafem č. 9 a 11 chybí související tabulka s absolutními čísly (tak jak tomu bylo v Kap. 4.4), takto z procent se nedá porovnat WT s *plda1*. V Kap. 4.6 jsem pochopil, že by hledány rozdíly mezi WT a *plda1*. Pak bych asi bylo lepší mít související obrázky u sebe kvůli snadnějšímu porovnání (takto se musí porovnávat Obr. 7 s Obr. 11 atd.). Poslední poznámka se týká Obr. 18, báze trichomu je v tomto případě schovaná v silném modrém signálu. Nejdříve by asi bylo třeba provést pozitivní kontrolu, zda morin barví Al v kořeni v používaném hydroponickém systému, pak kontrolu barvení trichomu morinem bez ošetření Al^{3+} a následně s Al^{3+} .

Diskuze:

Diskuze je členěna podobně jako výsledky. Autorka se v ní stručně vrací k jednotlivým získaným výsledkům a ty následně uvádí do souvislostí a diskutuje s již publikovanými studiemi. Přidává i vlastní hypotézy ohledně možných mechanismů hrajících roli ve studované dynamice kortikálních MT.

Závěry (Souhrn):

V závěru jsou stručně a přehledně formulovány dosažené výsledky.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Téma práce je dlouhodobě celosvětově sledováno, neboť toxicita hlinitých iontů je hlavním faktorem zástavy růstu rostlin na kyselých půdách, ke které dochází během několika minut. Mechanismus působení je doposud nejasný, ale mezi primární cíle toxického působení hlinitých iontů bývá řazen i cytoskelet. Z tohoto hlediska vnímám předloženou práci jako velmi přínosnou, obsahující nové cenné poznatky ohledně časného zapojení fosfolipidové signalizace v dynamice MT během toxického působení Al^{3+} , na jejichž výsledcích lze postavit další detailnější experimenty. Vzhledem k prvotním problémům se získáním experimentálního materiálu se může práce jevit jako úzce zaměřená, s menším počtem

různých experimentů, ale to vyvažuje počet provedených biologických opakování, počet vzorků pro analýzu a následné náročné vyhodnocování, včetně statistického zpracování. I přes výtky uvedené v posudku jsem přesvědčen, že předložená diplomová práce přináší mnoho zajímavých poznatků, splnila většinu vytyčených cílů, a proto ji doporučuji k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta (povinná část posudku):

1. V literárním přehledu se píše o n-butanolu jako o aktivátoru (str. 9) a následně o 1-butanolu jako inhibitoru fosfolipázy D (str. 9 a 10). Jak to tedy je?
2. Proč bylo pro hydroponickou kultivaci používáno nestandardní 1/8 MS médium?
3. Zajímalo by mě, zda byla provedena alespoň růstová analýza (ikdyž nebyla součástí stanovených cílů) po ošetření nízkým pH a různými koncentracemi Al^{3+} pro *pldδ*, když se nepodařilo zkřížit EB1a-GFP markerem pro *pldδ*. Pokud ano, můžete komentovat výsledek?
4. Myslíte, že by k vizualizaci + konců MT v protoplastech byl vhodný jiný marker, např. v úvodu zmiňovaný SPR1-GFP?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

Pozn. Obvyklá délka standardního posudku je cca 2-3 strany.

Instrukce pro vypracování a odevzdání posudku:

- Pro vypracování posudku diplomové práce použijte tento formulář, text standardním písmem slouží jako vodítko
- Posudek můžete sami vložit do SIS, anebo s předstihem zaslat v elektronické podobě na adresu: hana.konradova@natur.cuni.cz a lipavska@natur.cuni.cz, a dále zajistit dodání podepsaného originálu (v 1 výtisku, jako součást protokolu o obhajobě) na sekretariát Katedry experimentální biologie rostlin PřF UK (p. Elena Kozlová), Viničná 5, 128 44 Praha 2. Podepsaný originál posudku musí být dodán před vlastní obhajobou, bez něho nesmí být obhajoba zahájena!