

## Posudek :

**PhD Thesis : Dynamics of cold regulated proteins during cold acclimation in cereals**  
**Autor : Mgr. Pavel Vítámvás, Katedra fyziologie rostlin, PřF UK Praha**

**Oponent : Dr. Petr Smýkal, Agritec Plant Research s.r.o. Šumperk**

Předložená doktorandská práce se zabývá studiem mechanismu chladové aklimace prostřednictvím analýzy dynamiky chladem regulovaných proteinů kontrastních genotypů ječmene a pšenice.

Práce je členěna do 5 částí odpovídajících publikovaným nebo k posouzení odeslaným manuskriptům. Těmto předchází jednostránkový úvod, popisující stručně výchozí poznatky a volně definující cíle práce.

Přestože je tato forma používána a stále více rozšířena, osobně bych doporučoval a preferoval jasnou formulaci výzkumných cílů a přeci jen obsáhlejší biologický úvod do problematiky, což většinou publikace až s výjimkou review neumožňují. Jako úvodní lze však chápat a přijmout **článek 1** (přijatý k publikování do *Biologia Plantarum*), což je review pojednávající o roli specifické skupiny proteinů – dehydrinů v reakci na chladové působení.

Protože vědecká část byla či je v současnosti hodnocena odborníky v dané oblasti, zaměřím se v posouzení celkové odbornosti a formálnosti předložené práce.

**Článek-kapitola 2: *Proteome analysis in plant stress research***, přijatý do *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, je zaměřen jako krátký exkurs vyjmenovávající současné proteomické techniky, z nichž autor následně sám použil 2-DE analýzu s LC-MS/MS identifikací diferenciálně exprimovaných proteinů. Jedná se o dosti stručný metodický nástin proteomických postupů vhodných k analýze rostlin vystavených působení stresu.

**Článek 3: *WCS120 protein family and proteins soluble upon boiling in cold-acclimated winter wheat***, publikovaný v *Journal of Plant Physiology*, 2007, demonstruje výsledky experimentů prováděných z větší části samotným autorem. Je zde patrné uspořádání experimentů, tj. použitý materiál dvou odlišných odrůd pšenice MIR a BEZ a vlastní proces chladové aklimatizace rostlin.

Možnost práce v zahraniční laboratoři, Risø National Laboratory, Denmark umožnila jistě podstatný progres v dané problematice a práci na přesné identifikaci proteinů pomocí MS. Je zajímavé, že Western blot 1-DE analýza pomocí WCS120 protilátek neodhalila významnější rozdíly mezi oběma genotypy (viz Fig. 1, str. 71), na rozdíl od kvantitativní analýzy 2-DE gelů. Touto technikou pomocí barvení gelů, Western analýzy WCS120 protilátkou a konečně jasnou MS identifikací dvou vybraných (WCS66 a WCS120) byly demonstrovány rozdíly.

Následně bylo pomocí LC-MS/MS techniky identifikováno celkem 33 proteinů v případě chladově ošetřených a 42 proteinů u kontrolních rostlin. Dle očekávání bylo identifikováno množství proteinů podílejících se jednak na fotosyntéze a fixaci uhlíku, translaci, tak i samotné cold-related proteiny (COR). Z těchto 3 byly společné/identifikované pro oba vzorky, zatímco zbývající 4 byly specifické pro chladově aklimatizované rostliny. Lze předpokládat, že tyto výsledky mohou a budou sloužit jako podklad k dalšímu studiu a experimentům. Jelikož se jedná o korelaci mezi fenotypovým projevem ovlivněným komplexem fyziologických procesů a genovou expresí na úrovni proteinů, pro obecnější závěry by bylo nutné prostudovat jednak více odlišných genotypů tak i případné křížení dvou výchozích a studium segregující F2 generace.

**Článek 4: *WCS120 protein family and frost tolerance during cold-acclimation, de-acclimation and re-acclimation of winter wheat.***, v současnosti ve fázi odeslaného manuskriptu.

Tato práce navazuje na předchozí a zabývá se podrobnějším studiem 5-ti členů WCS120 skupiny proteinů u ozimé pšenice Mironovskaya 808 během procesů dlouhodobého chladového působení, krátké a dlouhé fáze de-aklimatizace. Současně byly sledovány fyziologické parametry, jako je sušina a mrazová tolerance listů.

Výsledkem 2-DE analýz a matematického modelování bylo zjištěno, že maximum sušiny dosáhly rostliny v době maxima vernalizační doby, zatímco maximální úroveň mrazové tolerance listů byla zjištěna o 14 dní dříve. Zajímavé výsledky byly zjištěny během procesu re-aklimatizace, kdy WCS120 proteiny re-akumulovaly v menší míře u částečně vernalizovaných rostlin, zatímco úroveň mrazové tolerance byla menší v případě plně vernalizovaných (saturovaných) rostlin.

Zde mám dotaz, poznámku týkající se kvantifikace exprese pomocí Western analýzy 1-DE (Fig. 1, str. 89, Fig. 2, str.90), vycházející z kvantitativně stejně „loadovaných“ gelů (6 opakování). Zde by bylo žádoucí a přesnější mít možnost interního standardu, což však chápu, že v případě stresové fyziologie je problematické (aktin, tubulin apod. ?). Každopádně kvantifikace exprese proteinů pomocí 2-DE je dosti náročná a problematická.

**Článek 5: *Temperature-dependent accumulation of dehydrins in wheat and barley cultivars with different frost tolerance.***, v současnosti ve fázi odeslaného manuskriptu, se zabývá studiem 5-ti odrůd pšenice a 2 odrůd ječmene s odlišnou tolerancí k mrazu. Výsledkem je zjištění rozdílů v sušině, mrazové toleranci a indukci dehydrinů. Autoři konstatují, že akumulace dehydrinů v listech je závislá na míře tolerance dané odrůdy a dále na teplotě. Největším přínosem práce je zjištění, že odrůdy pšenice odolné k mrazu akumulují vyšší hladiny WCS120 proteinů a to již při teplotě 17C. Podobně v případě ozimého a jarního ječmene byla zjištěna odlišná hladina exprese DHN5 proteinu (WCS120 ortologu). Validací těchto výsledků na větším souboru odrůd by bylo možné doplnit a následně i urychlit šlechtitelský proces z hlediska vyhodnocení chladové/mrazové odolnosti pšenice, případně ječmene.

Poslední část (str. 111-112) je věnována stručnému shrnutí všech dosažených výsledků, dá se říci abstrakt jednotlivých abstraktů.

Syntéze, formulaci celkového „závěru“ celé práce je věnován jen 4 řádkový závěrečný odstavec, konstatující, „..že chladová regulace exprese COR proteinů a mrazová tolerance mohou být odlišné procesy, a že úroveň exprese studovaných dehydrinů může být asociována nejen z mrazovou tolerancí, ale i vývojovými stádii a rozdíly v teplotách při kterých byly rostliny pěstovány“.

Toto považuji za nedostatečné a bylo by i vhodné formulovat „nové, odvážnější „ hypotézy, popř. oddisktovat možnosti a vzájemné vztahy anatomie, fyziologie, ekofyziologie a molekulární biologie. Dá se odhadnout a pohled do publikované literatury to potvrzuje, že odolnost k chladu/ mrazu není dána je expresí COR proteinů, zde představených zástupci jedné genové rodiny WCS120, ale i molekulárně mnohem komplexnějším procesem, k jehož poznání částečně přispěla i vlastní práce autora.

Přehled použité a citované literatury (obtěžněji sledovatelný vzhledem k 5-ti jednotlivým částem) dokládá dostatečný přehled autora v dané problematice. Přestože pracuji v jiné oblasti biologie rostlin, letný pohled a studium vybraných článků na Web of Science naznačuje

intenzivní práci v dané oblasti. Subjektivně bych ocenil zařazení článků do diskuse studujících genovou expresi na úrovni RNA a zabývajících se o „minimálně jeden stupeň výše postavených“ regulačních proteinů – transkripčních faktorů, viz např. práce : Title: Differential and coordinated expression of Cbf and Cor/Lea genes during long-term cold acclimation in two wheat cultivars showing distinct levels of freezing tolerance Author(s): Kume S, Kobayashi F, Ishibashi M, Ohno R, Nakamura C, Takumi S Source: GENES & GENETIC SYSTEMS 80 (3): 185-197 JUN 2005.

Podobně by bylo vhodné oddiskutovat/ zmínit práce zabývající se funkční analýzou daných proteinů např. pomocí transgenose viz.

Yin ZM, Pawlowicz I, Bartoszewski G, et al.

Transcriptional expression of a Solanum soganandinum pGT :: Dhn10 gene fusion in cucumber, and its correlation with chilling tolerance in transgenic seedlings CELLULAR & MOLECULAR BIOLOGY LETTERS 9 (4B): 891-902 2004

Houde M, Dallaire S, N'Dong D, et al.

Overexpression of the acidic dehydrin WCOR410 improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves

PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL 2 (5): 381-387 SEP 2004

V případě pšenice by bylo zajímavé diskutovat a sledovat lokalizaci jednotlivých členů CR proteinů WCS120 rodiny pomocí substitučních linií, tak jak bylo publikováno pracovištěm školitele :

Title: The relationship between vernalization requirement and frost tolerance in substitution lines of wheat Author(s): Prasil IT, Prasilova P, Pankova K

Source: BIOLOGIA PLANTARUM 49 (2): 195-200 JUN 2005

Toto je však, jak již zmíněno, samozřejmě subjektivní selekce literatury a na podporu autora je nutné zmínit, že podobné práce zabývají se manipulací mrazové tolerance popř. studiem exprese v segregující F2 populaci jsou zmíněny v článku-review č. 1.

Celkově práce vzhledem ke 3 přijatým publikacím a dvou dalším odeslaným manuskriptům splňuje formální požadavky na obhajobu u následné udělení doktorské hodnosti. Autor prokázal schopnost samostatné experimentální práce, analýzy a interpretace dosažených výsledků.

Je jasné, že ani autor ani já nejsme rodilými anglickými mluvčími a některé části práce by mohly být formulovány jinak, ale nechci a nemohu hodnotit gramatický aspekt předložené práce. Přesto by nebylo od věci mít alespoň v mateřském českém jazyce stručně formulovány výsledky práce, jedná-li se o doktorát obhajovaný na české universitě.

V Šumperku dne 23. července 2007

Petr Smýkal

Dr. Petr Smýkal

Oddělení biotechnologií

AGRITEC Plant Research s.r.o.

Zemědělská 2520/16

787 01 Šumperk