

OPONENTSKÝ POSUDEK
doktorské disertační práce

„Hormonální regulace dělení a prodlužování rostlinných buněk“

Předkladatel disertace: RNDr. Jan Petrášek

Přírodovědecká fakulta UK Praha

Oponent: RNDr. Miroslav Griga, CSc.

AGRITEC Plant Research s.r.o. Šumperk

RNDr. Jan Petrášek předložil disertační práci zabývající se hormonálními aspekty buněčného dělení a růstu na modelu suspenzních kultur tabáku. Práce sleduje dva hlavní „hráče“ na poli buněčného dělení a růstu, a to cytokininy a auxiny – první skupiny růstově regulačních látek se dotýká spíše letmo, gross práce spočívá ve studiu auxinů. První zmínky o existenci růstově regulačních látek se objevují již koncem 19. století (Sachs, Darwin), v průběhu 20. století se konstituuje základní koncept fytohormonů, jsou definovány hlavní skupiny rostlinných hormonů (auxiny, cytokininy, gibereliny, ABA, etylén), jejich chemická struktura a mechanismy účinku, jsou izolovány čisté přírodní fytohormony a připravena řada syntetických analogů. Studium fytohormonů reflektovalo tehdejší omezené instrumentální / experimentální možnosti, přesto je základní koncept jejich účinku v zásadě platný podnes. Poslední čtvrtina 20. století pak přináší dramatický rozvoj molekulárních technik (mj. genetická transformace), extrémně citlivých analytických metod a možnosti mikroskopické detekce/lokalizace a vizualizace sledovaných látek v subbuněčných strukturách. Všechny tyto metody přinášejí nové možnosti studia účinku fytohormonů, zejména na buněčné úrovni. Výše popsany recentní instrumentální a metodický aparát byl využit v předložené práci pro osvětlení mechanismů směrovaného transportu auxinu ve vztahu k dělení buněk, ustavení polarity a následného růstu.

Dizertace je prezentována v anglickém jazyce a po formální stránce je uspořádána způsobem léta běžným v zahraničí a nyní stále častěji používaným i u nás (samozřejmě pouze u uchazečů s kvalitní publikační činností relevantní k tématu disertace), tj. práce je uvedena obecným úvodem do problematiky, zde jsou formulovány i cíle dizertace; vlastní výsledky jsou dokladovány kopiemi publikovaných prací autora na dané téma, tyto výsledky jsou pak shrnuty v krátkém závěru. Výsledková část je tedy přehledem 6 publikovaných prací z období 2002-2006, jmenovitě 5 prací časopiseckých (Plant Cell Reports; Planta; Plant Physiology; Nature; Science) a jedné kapitoly v monografii (Biotechnology in Agriculture and Forestry). V pěti pracech je uchazeč prvním autorem, v jedné práci (Nature) pak čtvrtým autorem z 11-členného kolektivu. U každé práce autor přesně vymezuje svůj „pracovní“ podíl. Společným jmenovatelem těchto prací je zejména využití modelového systému auxin-dependentních, cytokinin-autonomních buněčných suspenzí tabáku VBI-0 a BY-2 (ve své „standardní“ verzi či ve verzích transformovaných, kupř. geny pro PIN transportéry, jejichž exprese v orgánech / pletivech / buňkách / buněčných strukturách je vizualizována imunofluorescenčními technikami. Pro studium mechanismů příjmu, polárního transportu, akumulace a exkrece auxinu byly využity inhibitory polárního (NPA) a vezikulárního (BFA) transportu auxinu. Po formální stránce lze konstatovat, že předložená práce je na vysoké grafické / estetické úrovni s minimem formálních chyb (tyto vyznačeny přímo v textu práce).

Plant Cell Reports 2002: Formulována hypotéza, že exkrece cytokininů z buněk může představovat jeden z mechanismů kontrolujících endogenní hladinu cytokininů. (VBI-0)

Planta 2002: Poprvé na buněčné úrovni popsán efekt inhibitoru transportu auxinu (fytotropin NPA, kyselina naftylftalamová) z buněk, vedoucí ke zvýšené akumulaci auxinu v buňce a reverzibilní inhibici buněčného dělení. (VBI-0)

Plant Physiology 2003: Studována inhibice polárního transportu fytootropinem NPA a inhibitorem vesikulárního transportu brefeldinem A (BFA) – hodnocena akumulace auxinu v buňce a strukturální změny cytoskeletu a endoplasmatického retikula. (BY-2)

Nature 2005: Formulován dosud nepopsaný mechanismus působení rostlinných hormonů (na příkladu auxinu): auxin reguluje cyklický transport proteinových PIN přenašečů a tím i jejich výskyt a aktivitu na buněčném povrchu, čímž může zpětně regulovat svůj vlastní transport. (VBI-0, BY-2, mutanti a transgenní rostliny *Arabidopsis thaliana*)

Science 2006: Role PIN a PGP transportérů v přenosu auxinu z buněk. (BY-2, *Arabidopsis thaliana*- transformované buněčné linie a rostliny)

Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 58 „Tobacco BY-2 Cells“ 2006: Review o využití buněčné linie tabáku BY-2 jako nástroje pro studium transportu auxinu. Review analyzuje a syntetizuje (mimo jiné) výsledky předchozích prací, na kterých se uchazeč podílel.

Vzhledem k faktu, že se jedná o rigorózně recenzované práce v periodicích s vysokým, resp. nejvyšším impakt faktorem, je vcelku bezpředmětné je nějakým způsobem komentovat. Otázka tedy zní, jaká je vlastně role oponenta v takovéto situaci? Zřejmá odpověď – oponent může (1) lakonicky konstatovat předložené, (2) případně vznést „zvědavé“ dotazy.

Dotazy:

- Otázka modelu a reálné situace *in planta* - situace v buněčné suspenzi (jednotlivé volné buňky, resp. řetízky či agregáty buněk) versus meristém (těsné uspořádání a komunikace buněk). Jaký je osud auxinu při effluxu či cytokininů při exkrezi z buňky v organizovaném meristému (stonkový a kořenový apikální meristém, axilární meristémy listů, adventivní pupeny či kořeny)?
- Objevily se od r. 2002 další důkazy o exkrezi cytokininů do média (rostlinný druh, typ kultury ??)?
- Jak z hlediska polárního transportu auxinu vysvětlit embryogenní indukční stimul v buněčné suspenzi či u různých typů výchozích explantátů – u některých rostlinných druhů je potřeba pro indukci somatické embryogeneze exogenní auxin (většina), u jiných však cytokinin? Je též známo přímé asymetrické dělení izolovaných protoplastů za vzniku embrya.
- Indukce somatické embryogeneze u různých typů explantátů včetně suspenzních kultur většinou vyžaduje exogenní auxin (viz předchozí otázka). Bylo by hypoteticky možné aplikací fytootropinů a následnou zvýšenou akumulací auxinu v buňkách jako důsledek inhibice effluxu auxinu z buněk nahradit embryogenní stimul exogenně aplikovaných (většinou syntetických) auxinů?

- V naší laboratoři pracujeme s přímou somatickou embryogenezí u hrachu – apikální stonkový meristéum (0,5 – 1 mm) s listovými primordií je kultivován na médiu s pikloramem a v oblasti listových primordií se během 2 týdnů přímo diferencují somatická embrya. Anatomická evidence naznačuje, že se vývoj již založených listových základů změnil na vývoj embryogenní. Co se tam mohlo stát z hlediska účinku / transportu auxinu a cytokininů?

ZÁVĚR

RNDr. Jan Petrášek předložil jako doktorskou disertaci soubor originálních výsledků týkajících se regulačních aspektů transportu a účinku auxinu a cytokininů na dělení a růst rostlinných buněk. Většina dosažených výsledků významně přispívá k rozšíření poznání v dané oblasti fyziologie rostlin, některé mají prioritní charakter. Publikační činnost uchazeče (ať již přímo či zprostředkovaně související s tématem disertace) je úctyhodná a čítá 12 publikací v impaktovaných časopisech, 4 publikace v časopisech bez IF, jednu kapitolu v prestižní monografii a několik desítek abstraktů z mezinárodních konferencí publikovaných ve zvláštních číslech impaktovaných časopisů či v konferenčních proceedings. Touto kvalitní publikační činností uchazeč vysoce převýšil požadavky kladené na završení doktorandského studia. Většina získaných výsledků byla dosažena týmovou prací (včetně mezinárodní spolupráce s renomovanými pracovišti v daném oboru) s významným pracovním a tvůrčím vkladem uchazeče. Autor přesvědčivě prokázal způsobilost k tvůrčí vědecké práci, osvojení si nejmodernějších postupů experimentální biologie rostlin, analýze experimentálních dat, jejich interpretaci a formulaci zobecňujících závěrů a nových pracovních hypotéz. Předložená práce po formální stránce splňuje a po obsahové stránce vysoce převyšuje požadavky na doktorské práce kladené, a proto doporučuji Komisi z oboru anatomie a fyziologie rostlin, aby práce byla přijata k obhajobě a po jejím splnění byla RNDr. Janu Petráškovi udělena vědecká hodnost Ph.D.

V Šumperku 7. května 2007

M. Griga