

Posudek oponenta na diplomovou práci

Autor práce: Bc. Michaela Baková

Název práce: Selekce a fenotypizace homozygotních linií *Arabidopsis thaliana* s pozměněnými hladinami nukleotidpyrofosfatas

Oponent práce: Mgr. Pavel Jaworek

Poř. číslo	Kritérium hodnocení	Body (0-5)
1	Ucelenost a aktuálnost rešeršní části práce	4
2	Kvalita úvodní části práce (množství použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru)	5
3	Naplnění cílů práce	4
4	Logika postupu při vlastní rešeršní nebo experimentální práci	5
5	Úplnost popisu používaných metodik a postupů	2
6	Úroveň zpracování výsledků (vhodné používání grafů a tabulek atd.)	3
7	Adekvátnost interpretace získaných výsledků a jejich diskuse	1
8	Výstižnost souhrnů práce v českém a anglickém jazyce	3
9	Grafická úprava textu a obrázků	3
10	Jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví	4
11	Správnost a úplnost legend u obrázků a tabulek (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)	4
12	Správnost používání citačních odkazů (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních zkratk časopisů)	4
Celkem bodů		42

max
60

Konkrétní připomínky a dotazy

Ve své diplomové práci se Bc. Michaela Baková zabývala selekcí homozygotních linií rostlin *Arabidopsis thaliana* s umlčenými geny pro nukleotidpyrofosfatasy/fosfodiesterasy. Za tímto účelem diplomantka provedla PCR screening s primery specifickými k jednotlivým genům a jejich mutovaným variantám. Vyselektované rostliny podrobila základní fenotypizaci zaměřené na klíčivost semen a vývoj kořenového systému. Porovnála také aktivitu nukleotidpyrofosfatasy hrubých extraktů ze zvolených orgánů a vývojových stádií rostlin mutantních s přirozeně se vyskytujícími. Dále semikvantitativně stanovila množství vybraných cytokininů v rostlinách se zvýšenou expresí genů pro nukleotidpyrofosfatasy.

Připomínky nevyžadující opravu:

- Abstrakt obsahuje příliš široký úvod do problematiky na úkor dostatečného vysvětlení podstaty samotné práce, použitých metodik a alespoň stručného shrnutí výsledků.
- V abstraktu a také v závěru je uvedeno, že aktivita enzymu byla stanovena metodou HPLC, což je zavádějící. Pomocí HPLC je možné pouze stanovit změnu koncentrace substrátu a produktu enzymové reakce. Na základě toho je teprve možné aktivitu vypočítat.
- V úvodu chybí informace o prezentované diplomové práci. Nejsou z něj zřejmé důvody vzniku práce a její cíle.
- Rešeršní část práce je sepsána srozumitelně a s dostatečným množstvím relevantních odkazů na literaturu. S ohledem na studovanou problematiku a cíle práce však v teoretické části postrádám kapitolu shrnující fyziologické funkce cytokininů v rostlinném organismu.
- Na straně 10 (nejen) není dodržena jednotná velikost písma. Napříč textem nejsou využívány nezlomitelné mezery a pomlčky, což vede například k oddělení číselných hodnot od jednotek na koncích řádků. Některé zkratky (NPP – str. 9, KO – str. 31) jsou v textu použity bez vysvětlení při prvním výskytu.
- Místy není dodržováno správné názvosloví enzymů (například str. 8) a v experimentální části práce nejsou názvy genů psány kurzívou.
- Popis použitých metod neobsahuje dostatek odkazů na původní literaturu.
- Nepřehledné provázání textu s obrázky a tabulkami ve výsledkové části práce (str. 40 - 47).
- U grafů na obrázcích 17. - 19. chybí popisky os a jejich stručné vysvětlení.

Dotazy, jejichž zodpovězení očekávám u obhajoby:

- Jakým roztokem byly eluovány cytokininy v závěru purifikace na kolonách SPE Octadecyl C18/18?
- V kapitole 5.2 (Stanovení celkových cytokininů; str. 42 - 43) uvádíte v tabulkách výsledky měření pouze jako plochy píků a chybí zde kalibrace. Vysvětlíte proč.
- Práce se věnuje studiu enzymu, který je potenciálně odpovědný za isomeraci *trans*- a *cis*-zeatinu. Z jakého důvodu tedy nebyl pomocí HPLC analyzován také *cis*-zeatin?
- V praktické části práce je popsána pouze jedna HPLC metoda, přestože jsou pomocí HPLC stanovovány cytokininy i změny v koncentracích FAD a FMN. Byly obě skupiny látek analyzovány stejnou metodou? Prezentujte chromatogramy použitých standardů.

- Aktivita nukleotidpyrofosfatasy byla stanovována pouze v hrubých extraktech rostlinných pletiv. Mohla být přeměna FAD na FMN ovlivněna také jinými přítomnými enzymy? Jaké by to mělo důsledky pro interpretaci výsledků?

Chyby, které je nutno opravit a v písemné podobě přiložit k diplomové práci:

- Opravit studijní program na titulní straně z bakalářského (B1406) na navazující magisterský (N1406).
- V metodické části je nezbytné přesně uvést postup výpočtu enzymové aktivity nukleotidpyrofosfatasy.
- V kapitole 4.1 (Materiál a metody) nejsou v seznamu chemikálií uvedeny standardy cytokininů, FAD a FMN pro HPLC analýzy, a jejich dodavatel.
- Celkové cytokininy byly stanovovány v několika liniích tzv. “overexpresorů”. Do kapitoly 4.1 (Materiál a metody) je třeba doplnit, jakým způsobem byly linie získány a uvést geny, jejichž exprese byla navýšena.
- Práce postrádá diskuzi. Odpovídající kapitola pouze znovu shrnuje výsledkovou část a obsahuje některé faktické chyby (např.: „gen pro hypotetickou zeatin *cis-trans* isomerasu se uplatňuje při neenzymatické přeměně *cis*-zeatinu na *trans*-zeatin“). Diskuzi je třeba přepracovat. Výsledky musí být uvedeny do kontextu dostupné literatury. Chybí zhodnocení slabých míst použitých metod a z nich vyplývající omezení pro interpretaci dat. Například při více krokové purifikaci cytokininů nebyly použity interní standardy. Srovnání výsledků po HPLC analýze je tedy pouze orientační, neboť není možné určit návratnost purifikace u jednotlivých vzorků.

Teoretická část diplomové práce je až na drobné chyby dobře zpracovaná, ocitovaná a logicky uspořádaná. Experimentální část práce však obsahuje řadu nedostatků, z nejzávažnějších nepřesný popis použitých metod a nesprávné zpracování diskuze, která postrádá zhodnocení výsledků v kontextu s již publikovanými poznatky.

Diplomantka realizovala řadu experimentů zejména s využitím molekulárně biologických a analytických metod. Úspěšně se jí podařilo vyselektovat homozygotní linie rostlin *A. thaliana* mutantní v genech pro nukleotidpyrofosfatasy a provést jejich fenotypizaci.

Celkově práci hodnotím jako dobrou. Pokud diplomantka zodpoví položené dotazy, opraví chyby v metodické části a dle připomínek znovu zpracuje diskuzi, doporučuji, aby jí byl po úspěšném obhájení diplomové práce udělen titul Mgr.

Závěr: práci doporučuji k obhajobě.

V Klosterneuburgu dne: 19.5.2015

Podpis