

Posudek na magisterskou diplomovou práci Silvie Svidenské
„Nicotina occidentalis chloroplast ultrastructure imaged with transmission electron microscopes working at different accelerating voltages“

Předložená magisterská práce rozpracovává unikátní a velmi specifickou problematiku, a to využití nízkonapěťového transmisního elektronového mikroskopu pro pozorování biologických preparátů. Vzhled ultrastruktury je porovnáván mezi nízkonapěťovým 5 kV TEM a TEM, který pracuje při napětí 80-100 kV.

Diplomová práce je členěna obvyklým způsobem a je psána v angličtině. Hned na první straně je nesprávně uveden rok 2009, i když k odevzdání práce došlo v roce 2010.

Úvodní část práce shrnuje informace o konstrukci obou typů transmisních elektronových mikroskopů a přípravě biologického materiálu. Tato část práce je nejzdařilejší. Nicméně v textu je celá řada gramatických a stylistických chyb, chybějících členů a překlepů. Autorka se dopouští řady nevhodných či nesprávných formulací, což vyvolává dojem nepochopení. Několik příkladů ze strany 11: „The own process of sample preparation is as well somewhat simlified and shortened...“, „...the thickness of transmitted sample“, „The whole device is composed of three main parts; small electron and optical microscopes, electronics with different sources and vacuum system...“, „... a fluorescent screen which detect the trasmitted electrons.“ V kapitole 1.2.a „Fixation“ na str. 13 autorka uvádí, že radiace/ozařování („radiation“) může zabránit autodegradaci tkání; na str. 14 je uvedeno, že při fixaci OsO₄ dochází k extrakci mnoha proteinů a RNA. Přestože se Silvie v roce 2008 účastnila kurzu, kde byla metoda lámání nožů vyučována, k přípravě skleněných nožů pouze uvádí: „...pieces of glass, if freshly broken in a certain way...“. Autorka zvolila pro krájení 20 nm řezů nesprávný anglický termín „extreme ultrathin sections“ a ve větách používala nesprávné slovní spojení „extreme thickness“. Zde uvádím příklad ze str. 19: „Secondly, if such an extreme thickness has to be cut, the embedding material must be very hard“. Navíc, ze svých vlastních zkušeností vím, že pro krájení 20 nm ultratenkých řezů je možné použít i pryskyřice středních tvrdostí. Kapitola 1.2.i) má již ve svém názvu chybu. Místo použitého „Oscillate diamond knife“ by měl být použit termín „oscillating diamond knife“, který autorka dále v textu používá.

V této úvodní kapitole není uvedeno, zda příprava rostlinných tkání pro TEM má nějaká specifika, chybí již známé údaje o rozsahu extrakce materiálu v průběhu odvodňování, o velikosti komprese v průběhu krájení, 25° diamantových nožích atd.

Kapitola II. Materiál a metody je jednou z nejméně povedených. Je zde řada celá řada překlepů, chybné psaní indexů, gramatických chyb a nepřesných vyjádření. Uvádím několik příkladů: *Nicotiana Occidentalis* (druhové jméno je napsané s velkým písmenem v celém textu diplomové práce), cupric grids, formwar membrane; „... I obtained four types of grids in the mean of contrasting“; „No additional changes or modifications in graphical software were done...“. Chybí zde důležité informace o složení vypíracího roztoku, koncentraci roztoku OsO₄, použití vodní lázně při ozařování vzorků mikrovlnami, rychlosti krájení a typu sítěk.

Výsledky a diskuze jsou špatně srozumitelné. Text neodpovídá gramatické správnosti, je zde řada překlepů a nesprávných anglických termínů a formulací: „In the aim to study...“; „... leaves exposed to a standart protocol...“; „Starch grains are not very electro-dense and

therefore they are bright“; „...extra ordinal view of chloroplast's and plant cell ultrastructures“.

Literatura, ze které autorka čerpala v úvodu, obsahuje spíše učebnice než původní anglickou literaturu. Mnoho informací není podloženo citacemi a není tedy jasné nejde-li o vlastní pozorování. Navíc velmi často používá at al. (místo zkratky et al.). Jednou z vyjímek je citace autora H. Haglera, kterého zná autorka dokonce osobně. Přesto je citován jako Haglar a citace Haglar 2005 (str. 17) se v soupisu literatury vůbec nenachází.

V textu postrádám řadu důležitých informací a proto prosím o jejich doplnění:

Otázky:

Uvádíte důkazy o tom, že tyto struktury nevznikají uměle při krájení tenkých řezů a jsou pozorovatelné pouze u řezů 40 nm a tenčích. Nicméně nejmenší průměr stromul, který uvádíte v úvodu, je mezi 0.4- 0.8 μm a délka 65 μm . Jaká je velikost stromul, které jste pozorovala? Můžete svá pozorování s těmito údaji porovnat. Jsou stromuly obklopené membránou?

Vzhled škrobových zrn v LVTEM je odlišný od pozorování v HV TEM. Na obrázcích 11 a 12 je kolem škrobových zrn vidět prázdná místa a některá granula se zdají být posunuta. O tomto faktu není nic uvedeno. Pozorovala jste rozdíl v ultrastruktuře materiálu bez a po fixaci OsO_4 . Zamýšlela jste se nad poněkud umělým vzhledem škrobových zrn v obou typech TEM?

Máte představu o tom, jak je obsah škrobových zrn stabilizován během fixace a co se s tímto materiálem děje během odvodňování? V úvodu není uvedeno také jaké metody nebo způsoby přípravy materiálu byly použity pro vizualizaci stromul ve fluorescenčním, světelném a elektronovém mikroskopu. Nabízí se možnost, že „stromuly“ vznikají jako artefakt během přípravy preparátu.

Tuto práci doporučuji k obhajobě, protože z vlastní praxe vím, jak obtížné je získat obrázky pomocí LVTEM. Cíle, které si Silvie stanovila, byly více méně splněny, i když k formulacím závěrů mám také výhrady.

V Českých Budějovicích 21.1. 2010

RNDr. Marie Vancová, PhD.



Posudek na magisterskou diplomovou práci Silvie Svidenské: *Nicotiana glauca* Chloroplast Ultrastructure Imaged with Transmission Electron Microscopes Working at Different Accelerating Voltages

Práce kolegyně Svidenské mne zaujala, protože se týká problematiky mně blízké – ultrastruktury rostlinných buněk, především chloroplastů, a transmisní elektronové mikroskopie (TEM) jako metody studia této problematiky. Předložená práce se zabývá především touto metodou, konkrétně srovnáním nízkonapěťové (LV) TEM nepostfixovaného a nekонтastovaného rostlinného materiálu s konvenční TEM téhož materiálu. Práce je psána anglicky, má 51 číslovaných stránek a je rozdělena běžným způsobem. Všechny elektronmikroskopické snímky jsou však zařazeny na jejím konci jako příloha. V práci jsem vyznačil tužkou všechna podle mého názoru problematická místa (chyby), zde se soustředím na podstatné připomínky. Ne příliš dobrá angličtina bohužel často znesnadňuje čtení a pochopení textu.

V Úvodu na str. 6 chybí vysvětlení symbolů v rovnicích 1.2 a 1.3 a na str. 21 je nesprávné tvrzení, že na rozdíl od mitochondrií chloroplasty mají dvě obalové membrány – mitochondrie je mají také. V Materiálu a metodách postrádám na str. 23 přesnější určení stáří listů, z nichž byly odebírány vzorky pro studium, je při sledování ultrastruktury chloroplastů důležité. Kolik listů bylo použito? Pocházejí všechny v práci uvedené a hodnocené snímky z listů rostlin, které nebyly infikovány virem mozaiky jetele? Jaká byla při eventuální postfixaci koncentrace kyseliny osmičelé? Jak byly vzorky zalévány do pryskyřice (str. 24, předpokládám, že šlo o Spurrovo médium), co znamená „resin curing“? Výsledky práce poměrně přesvědčivě ukazují, že nízkonapěťový TEM, konkrétně LVEM5 navržený prof. A. Delongem, dokáže při urychlovacím napětí 5 kV zobrazit se slušným kontrastem ultrastrukturu rostlinné buňky u materiálu klasicky fixovaného glutaraldehydem, ale bez postfixace kyselinou osmičelou a bez kontrastování řezů uranylacetátem a citrátem olova, tedy patrně ve stavu bližším stavu za živa, viz např. obr. 6 (a obr. 8, který je jeho více zvětšenou verzí). Toto není možné v běžném TEM s urychlovacím napětím 80 kV, viz např. obr. 9 a 10. Klíčové pro použití LVEM jsou ovšem extrémně ultratenké řezy, které zřejmě není snadné připravit. V té souvislosti oceňuji upřímnost diplomantky, když v Diskusi na str. 35 přiznává, že se jí ideální, 20 nm „tlusté“ řezy nařezat nepodařilo a zůstala odkázána na velmi zkušenou pracovníci v EM mikrotechnice, která to dokáže. Hlavního cíle diplomové práce bylo však dosaženo. Přesto jsem na základě mnohaleté práce v oblasti ultrastruktury chloroplastů ve vztahu k jejich fotosyntetickým funkcím skeptický k možnosti využívat metodiku LV TEM „nekонтastovaných řezů“ ke smysluplnému studiu ultrastruktury rostlinných buněk, přinejmenším ultrastruktury chloroplastů. Zde se v posledních letech nabízí EM tomografie, pracující s kryorezy, bez chemické fixace, odvodnění a zalévání objektů do pryskyřice, tedy za stavu velmi blízkého nativnímu a při velkém zvětšení. Tato metoda je ovšem pro svoji náročnost extrémně nákladná a v tom se zásadně liší od LV TEM. Naprosto skeptický jsem k „nové ultrastruktuře“ či „tubulárním útvarům“ v buňkách, které jsou v práci popisovány, a byť jsem je neviděl „živě“ v elektronovém mikroskopu, považuji je za artefakt, spojený, jak diplomantka správně vyznamenala, s řezáním extrémně ultratenkých řezů pro TEM. Podotýkám, že plastidové stromuly, se kterými je autorka srovnává (str. 36), nelze považovat za organely. Nakonec autorku vyzývám, aby si důkladně prohlédla exemplář práce s mými poznámkami, protože jsem nechtěl obtěžovat auditorium příliš dlouhým posudkem.

Závěrem navrhuji, s přihlédnutím ke zmiňovaným i dalším nedostatkům diplomové práce kolegyně Svidenské, ale také s přihlédnutím k její náročnosti a průkopnickému charakteru, aby byla přijata k obhajobě a po jejím úspěšném průběhu klasifikována stupněm „velmi dobře“.

V Praze dne 21. 1. 2010

doc. RNDr.  Jaromír Kutík, CSc.