

Oponentský posudek na disertační práci Ing. Marka Hrašky

„Application of GFP signal gene in the development of the plant transgenesis strategy aimed at increasing the tolerance to biotic stresses“

Oponovaná disertační práce je uvedena krátkým literárním přehledem poznání v oblastech relevantních k řešení problematice, následuje vymezení cílů disertační práce, prezentace výsledků, seznam použité literatury a souhrn publikací doktoranda. Zarážející je absence kapitoly Materiál a metody.

Literární přehled se snaží přiblížit čtenáři velmi širokou oblast od zdůvodnění potřeby využití transgenních rostlin v rostlinné produkci po molekulární vlastnosti GFP a jeho chování v transgenních rostlinách. Obsáhnout tuto problematiku vyváženě na 12 stránkách by byl úkol nesnadný i pro zkušeného autora. Jednotlivé části Úvodu by mohly být vyváženější. V prvních částech působí Úvod až příliš popularizujícím dojmem. V částech věnovaných rozboru využití transgenních plodin v současné a budoucí rostlinné produkci postrádám zejména souhrn výsledků, které byly získány při studiu bezpečnosti transgenních rostlin s ohledem na ovlivnění okolních ekosystémů a zdraví člověka. Věřím, že jasná prezentace faktů zjištěných v těchto studiích by byla pro čtenáře přínosnější než uvádění obecně známého ne příliš šťastného vlivu politiků a veřejného mínění na neutěšený stav využívání GMO v rostlinné produkci v EU. Některé z těchto prací jsou citovány v části 1.6, kde však slouží pouze jako příklady využití GFP. V částech 1.3.1. a 1.3.2. bych uvítal hlubší zdůvodnění jednoduššího integračního obrazce cizorodé DNA do rostlinného genomu při transformaci využívající *Agrobacterium tumefaciens* ve srovnání s biolistickou transformací.

Cíle práce jsou prezentovány nezvykle rozvláchnou formou. Část uvedená „More detailed, aims of my Ph.D. thesis were following: ...“ by podle mého soudu odpovídala běžnému rozsahu této kapitoly. Cíle prezentované v této části jsou více-méně jasné formulované a je zřejmý význam jejich dosažení pro aplikaci GFP v přípravě a analýze transgenních rostlin.

V průběžném číslování kapitol chybí kapitola 3. Na tomto místě bývá obvyklé uvést přehledně popis použitých metodik a biologických materiálů pro všechny dílčí části práce. Tato kapitola bývá obzvláště cenná pro pracovníky, kteří navazují na práci doktoranda, protože poskytuje daleko větší prostor k podrobnému popisu než je tomu u časopiseckých publikací v impaktovaných časopisech. Tím usnadňuje ověření výsledků a navázání na ně.

Těžiště disertační práce představuje kapitola „4. Results“. Je tvořena dvěma přehlednými články, dvěma publikacemi původních výsledků a jedním rukopisem rovněž prezentujícím původní experimentální výsledky. Ing. Hraška je prvním autorem všech uvedených prací. Jednotlivým motivem prací je využití transgenózy pro zvýšení odolnosti plodin k biotickým stresům. Experimentální práce se soustřeďují na kritické vyhodnocení předností i nevýhod GFP jako markeru při přípravě a analýze transgenních rostlin. Z pohledu aplikovaného zemědělského výzkumu jde o problematiku vysoce aktuální zejména vzhledem k obvykle nízké efektivnosti transformačních protokolů u řady významných plodin a s tím spojené potřeby rychlé a účinné selekce transformovaného materiálu. Dalším důležitým hlediskem je možnost sledovat neinvazivně transgenní materiál v jeho různých vývojových stádiích a jeho případné nežádoucí šíření mimo plochy určené k jeho kultivaci. Obě publikované práce již prošly oponentním řízením, bylo by tedy nadbytečné je podrobně hodnotit. Dovolím si tedy jen jednu kritickou připomínku. U publikace Hraška et al.: Sample topography and position within plant body influence the detection of the intensity of green fluorescent protein fluorescence in the leaves of transgenic tobacco plants. *Plant Cell Rep.* a

rukopisu prezentovaného v části 4.5 by výpovědní hodnota experimentů byla podstatně vyšší a diskuze získaných výsledků přímočařejší, pokud by relativní intenzita fluorescence GFP byla korelována s hladinami transkriptu kódujícího GFP a samotného GFP proteinu, které nebyly kvantitativně stanoveny.

Kapitola „5. Summary“ uvádí do souvislosti výše uvedené práce a jejich zasazení do kontextu výzkumného zaměření týmu, ve kterém byla disertační práce vypracována. Rovněž hodnotí jejich význam pro přípravu a analýzu transgenických rostlin. Z formálního hlediska bych doporučil začlenění této kapitoly jako první podkapitoly v rámci kapitoly „4. Results“. Z věcného hlediska považuji za velmi odvážné tvrzení, že dřívější analýzy aktivity promotoru CaMV35S byly uskutečněny převážně u primárních transformantů – T₀ (str. 86). Analýza expresních profilů u T₀ generace je komplikována přežíváním *Agrobacteria tumefaciens* na primárních transformantech a proto má smysl jen pokud je použit konstrukt obsahující v reporterovém genu intron a tedy sledována pouze aktivita transgenů úspěšně integrovaného do jaderného genomu. Většina publikovaných analýz byla proto provedena na T₁ a dalších generacích. Rovněž stabilita aktivity promotoru CaMV35S i od něj odvozených chimérických promotorů byla podrobně studována v řadě za sebou následujících generací právě s ohledem na jeho využití v transgenických plodinách.

Přehled literatury uvedený v kapitole „6. References“ bych doporučil zařadit hned za literární přehled nebo za Cíle práce, ke kterým se bezprostředně vztahuje. V kapitole Výsledky má každá z prezentovaných prací svůj vlastní seznam použité literatury a v „5. Summary“ jsou citovány pouze vlastní práce autora, jejichž plné citace jsou uvedeny v „7. Summary of publications“.

Práce je předkládána v anglickém jazyce. K celkovému dojmu z jejího studia by přispěla pečlivější editace textu pokud jde o běžné překlepy i gramatiku. Jejich výčet by byl významně nad rámec tohoto posudku.

Závěrečné konstatování:

Významná část výsledků získaných doktorandem byla již publikována v impaktovaných časopisech. Přes výše uvedené věcné i formální připomínky se domnívám, že získané výsledky i forma jejich prezentace jsou dostatečné pro úspěšnou obhajobu disertační práce.

Mohu tedy konstatovat, že práci lze doporučit jako základ pro obhajobu k přiznání titulu „doktor“ (Ph.D.) v souladu s platnými předpisy.

Posudek disertační práce Ing. Marka Hrašky: „Application of GFP signal gene in the development of the plant transgenesis strategy aimed at increasing of the tolerance to biotic stresses.“

K oponentuře jsem obdržel výtisk doktorandské práce Ing. Marka Hrašky. Práce je sepsána v anglickém jazyce a sestává se z obvyklých částí. Literární přehled k problematice je uveden na stranách 1 až 12, vytčené cíle práce jsou na stranách 13 až 15, výsledková část prezentuje 5 publikací a jedno plakátové sdělení, kde je vždy prvním autorem doktorand, a souhrn je uveden na stranách 84 až 86.

Nemohu se považovat za znalce anglického jazyka, avšak v prvních dvou částech (literární přehled a vytčené cíle) lze nalézt gramatické chyby a pravděpodobné překlepy. Domnívám se, že napsanému textu nebyla věnována dostatečná pozornost. Tato pozornost by měla být o to větší, jestliže je disertační práce prezentována v jiném, než v mateřském jazyce. Zmiňovaný text navíc není rozsáhlý a jestliže uvedené textově obsáhlejší publikace prošly jazykovou korekturou, kterou pravděpodobně zajišťoval Marek Hraška jako první autor, mohl si nechat tento text rovněž zredigovat. V textu jsem našel například překlepy na straně 1, „at lešt“ místo „at least“ (2. řádek, kap. 1.1.), na straně 2 „area of genetics modifications“ místo „area of genetic modifications“ (2. řádek, kap. 1.2.), na straně 3 „Brassica napus“ místo „Brassica napus“ (3. řádek), na straně 5 „successfully“ místo „successfully“ (6. řádek, kap. 1.3.2.), na straně 6 „*A. tumefaciens* parasite on the roots“ místo „parasites on the roots“ (3. řádek) atp. Mluvnicky pak jde často o neshodu jednotného a množného čísla. Na straně 4 jde o text „genetic transformation and obtaining of transgenic plants represents...“ místo „represent“ (1. řádek, kap. 1.3.), na straně 8 jde o text „for this purposes“ místo „for these purposes“ (6. řádek, kap. 1.5.), na straně 12 je napsáno „such phenomena was reported“ místo „were reported“ (řádek 16) atp.

Problémem každé práce, kterou jsem doposud oponoval je nedostatečná kontrola citací uváděných v textu. Nesprávně jsou napsána příjmení v textu, např. na straně 5 Finner et al. (9. řádek, kap. 1.3.2.), na straně 9 Milwood (12. řádek), na straně 12 Behfey (26. řádek). Dále je uváděn nesprávný rok v textu, např. na str. 5 Fullner and Nester 1986 místo 1996 (v seznamu literatury není u časopisu navíc uvedeno číslo svazku 178) (6. řádek, kap. 1.3.1.), nebo na straně 12 Benfey et al. 1989 místo 1990 a v jednom případě jsem citaci z textu v seznamu literatury nenalezl viz. Shiina et al. 2000 ze strany 10 (29. řádek, kap. 1.6.).

Výsledky doktorandské práce Marka Hrašky jsou částečně shrnuty v 5 publikacích a v jednom plakátovém sdělení. Částečně proto, že dvě z těchto publikací jsou přehlednými

články, které se však týkají řešené problematiky. Jde o poznatky týkající se inhibitorů proteas a o poznatky týkající se použití GFP. Je škoda, že z časových důvodů nebyly získány publikovatelné výsledky použití transgenu pro inhibitor proteas (SPI2), přestože experimentální práce probíhaly. Hlavním přínosem doktorandské práce bylo tedy získání nových dat ohledně exprese GFP v transgenních rostlinách, přičemž nejpřínosnější data jsou dle mého úsudku uváděna v publikaci, která je zatím podána do tisku. Budu jen rád, pokud mi Marek Hraška potvrdí, že tato práce byla již přijata do tisku, nebo že recenzenti vyžadují pouze drobné úpravy textu před konečným přijetím. Zajímavé a do budoucna přínosné jsou též poznatky uvedené v plakátovém sdělení. Tyto se týkají řešení obtíží transformace lnu transgeny.

Mohu tedy konstatovat, že řada experimentálních výsledků je zcela průkazných a tedy publikovaných, což je důvod k tomu, aby byl Markovi Hraškovi titul Ph.D. udělen.

V souhrnu, který obsahuje výrazně menší počet chyb, Marek Hraška sám uvádí nejdůležitější závěry vyplývající z jeho experimentální práce. S těmito závěry se mohou ztotožnit. Především, bez ohledu na zjištěnou variabilitu exprese GFP, je tento marker použitelný k selekci transgenních rostlin a ke sledování síly exprese z použitých promotorů. Dalším důležitým závěrem je zjištěná stabilita exprese i v následujících generacích. Pro základní výzkum je zajímavým poznatkem, že interference chlorofylu s emisí záření z GFP není hlavním ani jediným důvodem zjištěného zeslabení světelné emise. V souhrnu doktorand též uvádí, že se mu podařilo získat několik rostlin lnu po transformaci genem SPI2, avšak k podrobnější analýze těchto rostlin již pravděpodobně nedošlo.

Navrhuji, aby i přes zjištěné nedostatky v předloženém výtisku disertační práce, které jsou obecného charakteru, byl Ing. Marku Hraškovi udělen titul Ph.D.

V Praze dne 1.10.2007


RNDr. Oldřich Navrátil, CSc.

Application of GFP signal gene in the development of the plant transgenesis strategy aimed at increasing the tolerance to biotic stresses

Autor : Marek Hraška, Jihočeská Universita, Přírodovědecká fakulta, České Budějovice

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

Předložená doktorandská práce se zabývá studiem využití visuálního markerovacího genu – green fluorescent proteinu (GFP) ve výzkumu transgenoz rostlin. Práce je přehledně členěna do 4 výsledkových částí odpovídajících publikovaným nebo k posouzení odeslaným manuskriptům, předcházejícímu úvodu a konečnému shrnutí.

Těmto předchází 13 stránkový úvod, popisující řešenou problematiku transgenoz rostlin v kontextu moderního zemědělství, kdy celosvětové využití GMO rostlin překročilo již rozlohu 100 mil ha (2006), navzdory přetrvávající diskusi o možných ekologických důsledcích a většinou negativnímu postoji veřejnosti. Dále autor stručně, ale dostatečně popisuje postupy transformace rostlin s důrazem na selekční postupy, na které navazuje představení zájmového genu pro GFP protein. Zde se autor nenechává „unést“, jen pozitivy, ale zmiňuje i existující negativa, či slabé body, které vyplynuly i v kontextu následné vlastní práce.

Cíle práce jsou přehledně formulovány na 3 stranách. Zde je patrné, že „konečným“ cílem transformační práce pracoviště, je využití transgenoz s cílem manipulace odolnosti rostlin k biotickým stresům, konkrétně houbovým a hmyzím patogenům s využitím inhibitorů proteináz.

Zde velmi stručně přeformuluji cíle, jelikož bych se k nim rád vyjádřil nakonec v kontextu výsledků.

1. Zjištění možnosti selekce a hodnocení transformantů na základě kvantifikace GFP exprese.
2. Detailní studium variability GFP fluorescence v různých pletivech, vývojových stadiích.
3. Studium „konstitutivní“ exprese široce využívaného 35S CaMV promotoru, s důrazem na generativní orgány.
4. Transformace lnu setého s využitím GFP jako selekčního nástroje.

Publikace č.1: Inhibitory proteinas, mechanismy účinku a perspektivy jejich využití v transgenoz rostlin. Chemické Listy 100: 501-507 (2006) Hraška M, Rakouský S, Čurn V.

V této publikaci je ve formě review přehledně popsán současný stav poznatků inhibitorů proteináz, mechanismus jejich účinku na hmyzí škůdce a regulace aktivity. Jedná se jednak o endogenní, rostlinám vlastní obranné inhibitory, tak i inhibitory izolované z hmyzu. Je zřejmé, že výzkum v této oblasti značně pokračuje. Zajímavá je zmínka o možném negativním efektu na „hostitelské“ rostliny, popřípadě necílové živočichy, včetně hospodářských zvířat a člověka. Z této práce je zřejmé, jaké jsou cíle a kam se ubírá práce dané laboratoře a tímto zodpovídá na část zmíněnou již v názvu PhD These, tj. manipulace odolnosti rostlin k biotickým stresům.

Publikace č. 2: Use of a simple semiquantitative method for appraisal of green fluorescent protein gene expression in transgenic tobacco plants. *Biologia Plantarum* 49: 313-316 (2005) Hraška M, Rakouský S, Čurn V.

Dle publikačního data soudím, že se jedná o prvotní publikaci charakteru Brief Communication, kde autor již provedl vlastní agrobakteriální transformaci tabáku s využitím T-DNA nesoucí *m-gfp5-EG* gen řízený 35S promotorem, společně s *nptII* selekčním markerem. Po potvrzení transgenních T0 regenerátů pomocí PCR analýzy bylo s využitím CCD kamery a softwaru analýzy obrazu Lucia, provedeno vlastní hodnocení hladiny GFP exprese. Z výsledků je zřejmá variabilita exprese a především pak jasné odlišení od netransformované kontroly.

Zde bych měl dotaz-poznámku. *Bylo v následné práci testováno, zda-li je korelace mezi hladinou exprese GFP jak na úrovni RNA tak proteinu a hladinou detekovanou pomocí fluorescenčního signálu CCD kamerou?*

Bylo by zajímavé zjistit pomocí Southern detekce genomové DNA (nebo segregace – viz níže), i počty T-DNA kopií.

Byl i v další práci detekován fenomén genového silencingu? tj. PCR potvrzené přítomnosti transgenů, ale ne již jeho exprese? – viz dále dotaz k publikaci č.3.

Publikace č. 3: Green fluorescent protein as a vital marker for non-destructive detection of transformation events in transgenic plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 86: 303-318 (2006) Hraška M, Rakouský S, Čurn V.

Tato práce představuje Review použití exprese GFP genu jako nedestruktivního markeru průběhu transformace rostlin. Shrnuje a porovnává současné poznatky využití GFP oproti dosud rozšířeným markerům jako jsou GUS a LUC proteiny. Je zde velmi přehledně formou tabulky presentován současný stav jednotlivých variant GFP s optimalizovaným složením kodonů, spektrálním využitím. Z příložená Tabulky 2 strana 309, je zřejmé široké využití v experimentální biologii rostlin. Uvedeny jsou téměř výlučně konstrukty mající konstitutivní 35S CaMV promotor. Zajímalo by mne, zda autor alespoň částečně studoval práce s využitím orgánově či časově specifických promotorů? Dnes je také stále více zřejmé, že právě 35S promotor, virového původu není tím „nejoptimálnějším“.

Velmi důležitá je kapitola zmiňující postupy GFP vizualizace a existující interferující faktory negativně ovlivňující fluorescenci. Zmíněné slábnutí GFP signálu ve starších pletivech navozuje otázku stability GFP proteinu, kde např. GUS protein je znám svou relativně dlouhou existencí, což např. vede (pomineme-li možnost difúze ne do jádra cílených variant) k jeho existenci i v dceřiných buňkách, poté co byla jeho exprese vypnuta. *Je tedy známá stabilita GFP proteinu? a vzhledem k jeho malé velikosti 27 kDa možnost difúze buněčnou membránou a stěnou?*

Zajímavá je zmínka o využití GFP jako pozitivního selekčního markeru, které však může být využito jen ve velmi specifických případech.

Publikace č. 4: Sample topography and position within plant body influence the of the intensity of green fluorescence protein fluorescence in the leaves of transgenic tobacco plants. *Plant Cell Reports* (2007) Hraška M, Heřmanová V, Rakouský S, Čurn V.

V této práci jsou presentovány vlastní experimentální výsledky s využitím T1 generace tabáku transformované *m-gfp5-ER* genem. Po ověření transgenů pomocí PCR a dot-blot Southern hybridizace, byla pomocí RT-PCR sledována i transkripční aktivita. Zde jen poznámka- bylo by zajímavé provést např. semi-kvantitativní RT-PCR s limitovanými cykly amplifikace (15-20x), elektroforézou produktu a následnou hybridizací blotu (popř. nejpřesnější verzi ve

formě quantitative – Real-Time PCR), což by umožnilo mít odhad míry exprese. Na druhou stranu, jeli možné, jak je presentováno na Obrázku 4, poměrně jednoduše detekovat GFP protein, je stanovení translační hladiny exprese informativnější. V tomto kontextu bych se rád autora dotázal, *zda-li by bylo takto možné odhadnout míru GFP exprese – tj. na základě gelu s proteinovými extrakty ?*

Cílem práce však bylo především zjištění parametrů exprese na pletivech listů tabáku pomocí analýza fluorescence CCD kamerou. Byly zjištěny výrazné rozdíly mezi abaxiální a adaxiální stranou a rovněž mezi pozicemi v rámci téhož listu. Rovněž tak byl zjištěn výrazný vliv pozice, stáří listu, s největší hladinou detekce v mladších listech. Dále pak rozdíly mezi jednotlivým analyzovanými nezávislými transformanty, což zřetelně odráží poziční efekt transgenu. Z výsledků je patrné, že transformant *G1*, je zřejmě příkladem neexprimovaného transgenu, s možným vysvětlením PTGS mechanismem RNAi. Je zajímavé, že tento transformant však stále vykazoval rezistenci ke kanamycinu, tj. *nptII* genu stejné T-DNA. *Bylo toto nějak testováno více ? a bylo případně detekováno více takových transformantů ?* Bylo by vhodné a zajímavé namísto dot-blotu jehož infomační hodnota je relativně nízká, provést klasickou Southern detekci na elektroforeticky rozdělené genomové DNA. Z těchto dat je patrné, že pro možné srovnání je důležité dodržet co nejpřesněji analyzovanou pozici. Důležité je zjištění, že celkový obsah chlorofylu nemá signifikantní vliv na expresi.

Publikace č. 5: Tracking of the CaMV 35S performance in GFP transgenic tobacco, with a special emphasis on flowers and reproductive organs, confirmed its predominant activity in vascular tissue. Hraška M, Rakouský S, Čurn V.
submitted to Plant Cell Tissue and Organ Culture 8/2007

Tato práce zúročuje a finalizuje autorovu dosavadní práci, neboť se zabývá podrobným studiem aktivity 35S CaMV promotorem řízenou expresí GFP reporteru. Zároveň umožňuje pomocí sledování T0-1-2 generací transformantů sledovat dědičnost transgenu (viz dotaz níže). Zvláštní důraz byl kladen na studium exprese v reprodukčních pletivech, tedy květních částech.

Prvotní molekulární charakterizace T1 a T2 rostlin byla provedena pomocí standardní PCR analýzy. Takto bylo potvrzeno, že došlo ke stabilní integraci transgenu do genomu tabáku, nicméně bylo by přeci jen vhodné (a to se opakují) provést přímý důkaz – tj. Southern hybridizaci genomové DNA. Studium exprese na úrovni RNA pomocí RT-PCR jednotlivých pletiv, prokázala expresi ve všech sledovaných, vzhledem k 32x použitým amplifikačním cyklům, není možné usuzovat na úroveň exprese. Odvozují z popisek k Obr. 1 že takto bylo molekulárně analyzováno 8 T1 a následně pak 10 T2 rostlin (od 4 T1). Je to samozřejmě dostatečný počet, uvítal bych jen (ale to je plně v kompetenci oponentů tohoto článku) přehlednou tabulku, kde by byly počty a popisy exprese, případně i s GFP fluorescencí, byla-li u tolika rostlin testována.

Jelikož bylo pracováno již s T2 generací, *byl proveden např. test klíčení semen na selekčním médiu s kanamycinem ? , dalo by se to použít i k odhadu počtu kopií transgenu na základě segregace.* Další kapitoly se již věnují podrobnému studiu exprese během vývoje. Není překvapivé, že velmi malá hladina exprese byla zjištěna ve zralých semenech, případně i pylu, neboť v těchto dočasných „dormantních“ částech, je translace téměř vypnuta a přítomny jsou jen zásobní proteiny potřebné pro klíčení semene popř. pylu ve vhodných podmínkách po hydrataci. Zajímavé je zjištění výrazné auto-fluorescence v kořeni, což dle mých vlastních zkušeností (a dále práce Benfey *et al.*) není např. v případě huseníčku, a může být způsobeno přítomností interferujících např. fenolických látek.

Studium exprese ve vegetativních pletivech – listech, stonku a kořeni, potvrdilo předchozí zjištění intenzivnější fluorescence mladších pletiv, kde autor zmiňuje jako možnou příčinu

snížení aktivity 35S promotoru popř. změnami metabolismu, snížení translace, vakuolizací buněk. Vysoká aktivita detekovaná ve vodivých pletivech, především živých a intenzivně metabolický aktivních buňkách floému, potvrzuje známé výsledky dosažené pomocí GUS reporteru. Již bylo zmíněno, že pozornost byla zaměřena na květní orgány, kde aktivita 35S promotoru je méně detailně popsána. Kališní a korunní plátky, jako fylogeneticky odvozené orgány listu, ne překvapivě vykazují 35S::GFP expresi. Podobně vysoká hladina exprese byla zjištěna v prašnicích, nitkách a samičích orgánech, blizně, čnělce a vajíčcích, placentě a nezralých semenech. Zde není překvapující, že zřejmě testovaná již zralá pylová zrna nevykazovala expresi, která by byla dle mých zkušeností s 35S::GUS konstruktem detekovatelná v nezralých mikrospórách a následně pak při klíčení pylových láček. Ještě osobní poznámka-zkušenost, je známo, že 35S jako virový promotor je aktivován při stresu, např. teplotním, což je patrné při indukci pylové embryogenese.

Zajímavé by bylo třeba studium translokace GFP proteinu v cévních svazcích, s využitím roubování (jak to bylo aplikováno při recentním studiu FT::GFP transgenu, což je zřejmě dlouho hledaný florigen), ale toto nebylo a není předmětem studia laboratoře a této disertace.

Následuje konečné shrnutí celé práce na 3 stranách. Zde je zřejmé, že je možné plně zodpovědět a prohlásit za splněné tři prvotní cíle a otázky týkající se využití GFP reporteru a studia exprese dosud široce využívaného 35S CaMV promotoru.

Nakonec je zmíněna rozpracovaná zahájená práce, týkající se vlastní transgenose pěstované plodiny – lnu setého, s „užitečným konstruktem“ kódujícím inhibitor proteinázy SPI2. Je velmi stručně konstatováno, že zde využití GFP jako vizuálního selekčního markeru narazilo na problémy značné auto-fluorescence (zmíněno v posledním příspěvku – konferenčního posteru), což může být opět jako v případech kořenů tabáku způsobeno přítomností většího množství fenolických látek (pozn. jako při izolace genomové DNA lnu-vlastní zkušenost oponenta). Tato práce pokud je mi známo bude v laboratoři dále pokračovat.

Konečně v závěru následuje seznam citované literatury, které společně se všemi uvedenými v přijatých publikacích, demonstrují dostatečný přehled autora v řešené problematice.

Celkově práce vzhledem ke 3 přijatým publikacím v impaktovaných časopisech, jedné recenzované, jednomu v současnosti odeslanému manuskriptu a 7 konferenčních příspěvcích, naprosto 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, ale to ponechávám na uvážení oborové radě.

V Šumperku dne 19. září 2007

Petr Smýkal

Dr. Petr Smýkal
Oddělení biotechnologií
AGRITEC Plant Research s.r.o.
Zemědělská 2520/16
787 01 Šumperk