

## Oponentský posudek bakalářské práce

### „Kontrola přítomnosti fytoplazem v indikátorovém hostiteli *Catharanthus roseus* pomocí polymerázové řetězové reakce.“

Autor: Martina Růžičková  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Biologická fakulta  
Katedra genetiky

Školitel: Dr. Ing. Jana Fránová  
Biologické centrum AV ČR  
Ústav molekulární biologie rostlin  
Oddělení rostlinné virologie

Oponent: Ing. Jaroslava Příbylová, Ph.D.  
Biologické centrum AV ČR  
Ústav molekulární biologie rostlin  
Oddělení rostlinné virologie

Bakalářská práce slečny Martiny Růžičkové je zaměřena na kontrolu přítomnosti fytoplazem v hostiteli *Catharanthus roseus*, indikátoru vypěstovaném ze semene a drženém ve skleníkových podmínkách na Oddělení rostlinné virologie. Při molekulární detekci fytoplazem pomocí polymerázové řetězové reakce se často setkáváme s falešně pozitivními výsledky. Stejně zkušenosti nám potvrdili i zahraniční kolegové, kteří pracují na stejné problematice. Vzhledem k závažnosti fytoplazmóz v ČR, kde celkem 10 původců těchto onemocnění je zahrnuto do seznamu škodlivých organismů, považujeme spolehlivou detekci fytoplazem za zásadní. Polymerázová řetězová reakce je dostatečně citlivou metodou pro tuto detekci. Důležitý je ovšem vhodný výběr dostupných primerů a jejich kombinací, případně ověření spolehlivosti primerů nově navrhovaných.

Bakalářská práce obsahuje celkem 50 stran vlastního textu, který je členěn do 9 hlavních kapitol, logicky koncipovaných.

Metodická část práce v rozsahu 8 stran textu poměrně podrobně a přehledně uvádí použité metody a materiál. Autorce se podařilo splnit dílčí cíle vytýčené v bakalářské práci. Ze vzorků odebraných z poměrně velkého souboru bezpříznakových rostlin *Catharanthus roseus* vypěstovaných ze semene a uchovávaných ve skleníkových podmínkách byla vyizolována DNA standardní chloroform-fenolovou metodou. Fytoplazmová DNA byla detekována pomocí direct, nested a seminested PCR s použitím univerzálních primerů světově používaných. Následná identifikace PCR produktů byla provedena pomocí restrikčního štěpení několika vybranými enzymy. Jeden vzorek byl vybrán pro ověření přítomnosti fytoplazmy k sekvenování.

V části výsledky v rozsahu 5 stran textu spolu s 15 stranami příloh jsou celkem podrobně a přehledně uvedeny autorkou dosažené výsledky dokladované převážně formou tabulek a fotografií. Pro celkem rozsáhlý soubor testovaných vzorků bylo zvoleno několik kombinací primerů a po otestování vyhodnoceny nejspolehlivější.



## Oponentský posudek bakalářské práce

### „Kontrola přítomnosti fytoplazem v indikátorovém hostiteli *Catharanthus roseus* pomocí polymerázové řetězové reakce.“

Autor: Martina Růžičková  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Biologická fakulta  
Katedra genetiky

Školitel: Dr. Ing. Jana Fránová  
Biologické centrum AV ČR  
Ústav molekulární biologie rostlin  
Oddělení rostlinné virologie

Oponent: Ing. Jaroslava Příbylová, Ph.D.  
Biologické centrum AV ČR  
Ústav molekulární biologie rostlin  
Oddělení rostlinné virologie

Bakalářská práce slečny Martiny Růžičkové je zaměřena na kontrolu přítomnosti fytoplazem v hostiteli *Catharanthus roseus*, indikátoru vypěstovaném ze semene a drženém ve skleníkových podmínkách na Oddělení rostlinné virologie. Při molekulární detekci fytoplazem pomocí polymerázové řetězové reakce se často setkáváme s falešně pozitivními výsledky. Stejně zkušenosti nám potvrdili i zahraniční kolegové, kteří pracují na stejné problematice. Vzhledem k závažnosti fytoplazmóz v ČR, kde celkem 10 původců těchto onemocnění je zahrnuto do seznamu škodlivých organismů, považujeme spolehlivou detekci fytoplazem za zásadní. Polymerázová řetězová reakce je dostatečně citlivou metodou pro tuto detekci. Důležitý je ovšem vhodný výběr dostupných primerů a jejich kombinací, případně ověření spolehlivosti primerů nově navrhovaných.

Bakalářská práce obsahuje celkem 50 stran vlastního textu, který je členěn do 9 hlavních kapitol, logicky koncipovaných.

Metodická část práce v rozsahu 8 stran textu poměrně podrobně a přehledně uvádí použité metody a materiál. Autorce se podařilo splnit dílčí cíle vytýčené v bakalářské práci. Ze vzorků odebraných z poměrně velkého souboru bezpříznakových rostlin *Catharanthus roseus* vypěstovaných ze semene a uchovávaných ve skleníkových podmínkách byla vyizolována DNA standardní chloroform-fenolovou metodou. Fytoplazmová DNA byla detekována pomocí direct, nested a seminested PCR s použitím univerzálních primerů světově používaných. Následná identifikace PCR produktů byla provedena pomocí restričního štěpení několika vybranými enzymy. Jeden vzorek byl vybrán pro ověření přítomnosti fytoplazmy k sekvenování.

V části výsledky v rozsahu 5 stran textu spolu s 15 stranami příloh jsou celkem podrobně a přehledně uvedeny autorkou dosažené výsledky dokladované převážně formou tabulek a fotografií. Pro celkem rozsáhlý soubor testovaných vzorků bylo zvoleno několik kombinací primerů a po otestování vyhodnoceny nejspolehlivější.



Bližší vysvětlení požadují k níže uvedeným otázkám:

1. Na str. 12 v kapitole 4. Materiál a metody uvádíte měření absorbance vyizolované DNA při vlnových délkách 260nm a 280nm. Proč se měří vyizolovaná nukleová kyselina při těchto vlnových délkách?
2. Na str. 19 v kapitole 5. Výsledky a s tím související příloha IA, obr. 1D uvádíte výsledek RFLP analýzy pomocí enzymu *RsaI*. Podotýkám, že uvedené profily neodpovídají standardu uvedeném v klasifikaci Lee a kol. (1998), a sice u vzorku č. 4 (standardní kontrola 16SrIII-A pochází z Itálie – celosvětové sbírky fytoplazem) a vzorků č. 5 a 6 (zařazená do 16SrX-A). Čím si to vysvětlujete? Pracovala jste vždy se stejnými pozitivními kontrolami?
3. Na str. 21 a 22 v kapitole 5. Výsledky uvádíte v Tabulce č. 1 a 2 přehled testovaných rostlin a kombinace použitých primerů. Proč nebyly všechny vzorky testovány stejně? Současně podotýkám, že v Tabulce č. 1 je chybně uvedeno, že vzorek č. 3 vykazoval negativní reakci v případě kombinací primerů P1/P7 → F2/R2 (v příloze II, obr. 1 je u tohoto vzorku patrná pozitivní reakce).
4. Na str. 45 v kapitole 9 Přílohy je na Obr. 1 uvedeno štěpení enzymem *MseI*. Vz. č. 22 uvedený jako pozitivní kontrola Peanut witches' broom (PnWB) (chybně napsáno, správně je: Peanut witches'-broom PnWB). Štěpení tímto enzymem neodpovídá standardnímu profilu (dle klasifikace Lee a kol., 1998), přestože tato kontrola byla jako standard 16SrII-A dovezena z Itálie. Čím si to vysvětlujete?
5. V Příloze IV jsou uvedeny restriční profily skupin a podskupin fytoplazem, které byly v této práci použity v porovnání s restričním profilem osekvenovaného vzorku č. 9, za pomoci enzymů *MseI*, *AluI*, *RsaI*, *HhaI*, namodelované pomocí Vektor NTI suite 8. Podotýkám, že u modelu I. – enzym *MseI*, neodpovídá standardu štěpení vzorek č. 2 (16SrI-C) a vz. č. 8 (16SrXII-A). U modelu II. – enzym *AluI*, neodpovídá standardu štěpení vz. č. 2 (16SrI-C), vz. č. 6 (16SrX-A), vz. č. 7 (16SrX-B) a vz. č. 8 (16SrXII-A). U modelu III. – enzym *RsaI*, neodpovídá standardu štěpení vz. č. 8 (16SrXII-A). U modelu IV. – enzym *HhaI*, neodpovídají standardu štěpení vz. č. 7 (16SrX-B) a vz. č. 8 (16SrXII-A). Navíc u tohoto modelu není dobře zvolený marker. (Poznámka: za standardní je považováno štěpení uvedené v publikaci Lee a kol., 1998). Ptám se: odkud pocházejí vybrané izoláty? Pokud se jedná o izoláty prokazatelně zařazené do skupin, proč u nich nejsou uvedeny kódy GenBank. Vhodné by bylo použít izoláty fytoplazem používané v klasifikaci Lee et al. (1998), u nichž jsou uvedeny kódy v GenBank.

Připomínky:

1. dle klasifikace (Lee a kol., 1998) se píše 16S rDNA nebo 16S rRNA – týká se celé práce
2. str. 2 – ... s mnoha onemocněními. Dále nerozumím poslední větě na stránce
3. str. 5 - ... opravit na: Ekonomické ztráty ... se pohybují v rozmezí od částečných ...
4. str. 6 - pokud se používá citovaná klasifikace (Lee a kol., 1998), pak by se měly názvy skupin psát s velkým písmenem: Apple proliferation group, Aster yellows group, apod.
5. dle klasifikace (Lee a kol., 1998) se píše 16SrI-A, 16SrI-B, atd. - týká se celé práce
6. str. 11 – neuzívá se slovo ... rozsuspendován, ale resuspendován
7. str. 13 a další str. – označení primerů M1, M2 je podle literatury jiné: 16R758F/16R1232R (Gibb et al., 1995).



8. str. 14: MM (master mix) – pokud neuvádíte složení, pak bych doporučovala alespoň uvést výrobní firmu. U komponentů Primer A, Primer B – 0,5µl by měl být dodatek: z 20 pmol zásobního roztoku.
9. str. 14 – chybné označení barviva: správně je SYBR Green
10. str. 15 – pro centrifugaci uvádíte rpm, na str. 11 uvádíte pro centrifugaci otáčky. Nejvhodnější by bylo uvést hodnoty v g
11. str. 19 v kapitole 5. Výsledky chybí v závorce uvedení podskupiny 16SrIII-A.
12. str. 29 – v bodě 2: ... z bezpříznakových rostlin *C. roseus* čtyři reagovaly...(tedy čtyři nebo pět, jak je uváděno jinde v práci?)
13. str. 30 – Seznam použité literatury: nikde v práci jsem nenašla odkaz na citaci Bonnet F, Saillard C, .....1990.
14. str. 31 – Seznam použité literatury: uvádíte dvě práce Fránová a kol., 2006, které nejsou rozlišeny a, b, a v textu práce je citována pouze jedna (na str. 29). Nenašla jsem v práci odkaz na citaci Chang F, C Chen, C Lin. 1995. Navíc citace nemají jednotné zápisy, což se v Seznamu použité literatury objevuje ještě několikrát.
15. str. 32 – nenašla jsem v práci odkaz na citaci Lee I-M, Davis RE. 1988. Jsou uvedeny dvě práce Lee a kol. 1998 – bez rozlišení a, b.
16. str. 33 – uvedeno Nelson MW. 1979 – v práci uvádíte na str. 1 a 4 Nielson, 1979. Jedná se o stejného autora?
17. str. 33 – u autora Schneider B a kol. 1997 je uvedena pouze jedna citace. Na str. 8 ale uvádíte Schneider a kol., 1997a. Chybí tedy ještě jedna citace? Dále jsem nikde v práci nenašla odkaz na citaci Srinivasulu B, P Narayanasamy. 1995 (odlišný zápis citace) ani odkaz na citaci Thomas S, M Balasundaran. 2001.

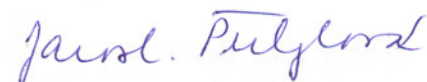
Přes uvedené připomínky hodnotím práci klasifikačním stupněm

- **v ý b o r n ý** -

a doporučuji ji k obhajobě.

Vzhledem k tomu, že se jedná o bakalářskou práci s obtížným tématem a kde pouhé nastudování literatury řešeného problému, zvládnutí četných laboratorních metod a počítačového zpracování a vyhodnocení výsledků je časově velmi náročné, se domnívám, že vytčené cíle práce byly splněny. Pokusy byly mnohokrát opakovány a díky preciznímu provedení štěpení enzymem *MseI* byly zjištěny odlišnosti mezi podskupinami 16SrX-A, 16SrX-B a 16SrX-C, což není uvedeno ani ve vzorové klasifikaci Lee a kol. (1998). Byla vybrána nejspolehlivější kombinace primerů pro minimalizaci nespecifických reakcí a díky sekvenování byla demonstrována přítomnost neznámé sekvence, čímž byla vyloučena náhodná kontaminace fytoplazmou. Díky těmto novým zjištěním byly některé výsledky prezentovány na mezinárodní konferenci a následně budou publikovány v *Acta Horticulturae*.

V Českých Budějovicích, dne 30. 5. 2006

  
Ing. Jaroslava Příbylová, Ph.D.