

Posudek oponenta na bakalářskou práci studentky Biologické fakulty JU

Terezy Kasalové

“Příprava in vitro kultury Dendranthema grandiflorum cv. Orinoko a její následná transformace genem pro ACCD pomocí Agrobacterium tumefaciens”

Předložená bakalářská práce byla koncipována jako úvod do studia problematiky transformace jedné z odrůd chryzantémy, cv. Orinoko, bakteriálním genem pro enzym L-aminocyklopropan-1-karboxylát deaminázu (ACCD). Již v úvodu je však třeba předeslat, že zdánlivě běžné téma bylo ve skutečnosti pro začátečníka v oborech explantátových kultur a transgenóze značně náročné. Prvním z klíčových momentů bylo již odvození aseptické kultury *in vitro* rostlin chryzantémy, jež by byla použitelná jako výchozí materiál pro transformace. Přestože chryzantémy jsou jedněmi z nejrozšířenějších dekorativních květin, dostupné informace o technikách jejich aseptického pěstování a transformace jsou omezeny na okruh několika kultivarů. Sterilizace rostlinných objektů, které mají tendenci ke dřevnatění pletiv, ke kterým chryzantémy rozhodně patří, nebývá jednoduchá. Častou komplikací omezující možné využití *in vitro* kultur v dalších biotechnologických postupech bývá výskyt latentních kontaminací a to i v poměrně ustálených kulturách. Takový materiál je pak zcela nepoužitelný pro transformační studie.

Před Terezou Kasalovou tak stál nelehký úkol, v co možná nejkratším časovém období vyhledat účinný způsob povrchové sterilizace rostlin použitelný k získání *in vitro* klonů chryzantémy cv. Orinoko prostých veškerých kontaminujících mikroorganismů. Poté rostlinný materiál namnožit a využít pro vlastní transformace. V konečném kroku pak prokázat přítomnost některého z transgenů v rostlinách pomocí molekulárněbiologických technik.

Již při studiu literárního přehledu a metodiky je zřejmé, že Tereza Kasalová přistupovala k řešení úkolů bakalářské práce velice zodpovědně. Srozumitelnou a přehlednou formou jsou uvedeny základní charakteristiky rostlinného druhu *Dendranthema grandiflorum*, vektorových bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, diskové metody transformace, informace o biosyntéze etylénu a faktorech ovlivňujících jeho vnímání rostlinami. K této části mám následující dotaz. Z jakých skutečností vychází tvrzení, že disková metoda transformace je vhodná při použití vektorů, které nevnašejí do rostlin geny pro růstové látky, ale jen rezistence k různým antibiotikům?

Materiál a metodika jsou uvedeny stručným a výstižným způsobem na osmi textových stranách. K dané části mám několik dílčích připomínek, které víceméně pramení ze

skutečnosti, že autorka byla okolnostmi nucena řadu otázek řešit od počátku zcela samostatně, na základě dostupných literárních údajů a vlastních krátkodobých zkušeností. V práci je například uveden způsob sterilizace médií s využitím programu Liquid Load, avšak bez uvedení údaje o tlaku či typu použitého zařízení. V tabulce složení kultivačních médií (3.1.4) jsou uvedena složení syntetických substrátů pro pěstování rostlin a jejich částí pro různé účely. Velmi pravděpodobně většina z těchto údajů byla přejata a proto měl být citován jejich zdroj. Tím se přejímající subjekt může vyhnout i některým faktickým výtkám. V daném případě je totiž poněkud překvapující skutečnost, že v médiu pro indukcii tvorby prýtů (metabolicky a energeticky náročný proces diferenciacie orgánů) nejsou obsaženy vitamíny, zatímco pro kultivaci rostlin (více méně již zcela autotrofní jedince) jsou tyto součásti běžného média. Obdobně je tomu zřejmě i v případě označování médií: CHR1 (pro kokultivaci segmentů s bakteriemi) a hormonálně i jinak odlišného CHR1 5,8 (pro kultivaci regenerovaných prýtů). K čemu se vztahuje koncentrace 4 % roztoku Domestosu, bylo skutečně k povrchové sterilizaci použito 25násobné ředění činidla? Je také zvyklostí, že v případě použití méně obvyklých složek či postupů autor uvádí důvod (např. přidavku $MgSO_4 \cdot 7H_2O$). To jsou však záležitosti, na které by za normálních okolností včas poukázal školitel. Stejně, jako by od počátku nastínil optimální sled činností (např. nejprve stanovení mezních koncentrací kanamycinu pro selekci transformantů a teprve poté pokročit k vlastní realizaci transformačních experimentů apod.), doporučil vhodnou literaturu (např. Teixeira da Silva 2002 se mj. zabývá technikami zakládání *in vitro* kultur chryzantém) a upozornil na používání správné terminologie. Je třeba se vyhýbat takovým termínům, kde dochází ke spojování českých předpon s cizím slovním základem, významovým duplikacím apod., jako například výrazům: „zregenerovaný“, „zcentrifugován“, „vyizolovaná“, „vyselektovaných“, apod. Pozitivní vliv školitele specialisty v části věnované molekulárním analýzám transformantů je naproti tomu dobře patrný.

Výsledková část včetně kvalitní obrazové dokumentace zaujímá 7 stran. Náročnost práce, potřeba poměrně rychlého postupu vývoje metodiky a omezený časový interval pro realizaci experimentů příliš nedovolovaly provádět jejich opakování, přesto by však měla být dodržována zásada minimálně tři opakování pro každou variantu v rámci pokusu. Z tohoto důvodu práce nezahrnuje více zevšeobecnění ani statistická vyhodnocení pokusů, která by jinak byla možná.

Na druhé straně je třeba vysoce ocenit samostatnost Terezy Kasalové a mimořádné úsilí, které věnovala zdárnému dokončení práce. Studentka dokázala i za daných nepříznivých okolností dosáhnout vytýčených cílů práce, tj. odvození aseptických kultur chryzantémy cv.

Orinoko, získání četných rostlinných regenerantů pocházejících z transformačních pokusů, jejich další selekce i molekulárních analýz různých typů transgenů. Závěry jsou adekvátní získaným údajům a jsou skutečně dobře interpretovány. Diskuze je věcná avšak někdy poněkud stručnější, vzhledem k tomu, že řada aspektů byla již diskutována v předchozích částech. Tereza Kasalová v ní kriticky hodnotí zejména vlastní dosažené výsledky ve srovnání s literárními údaji. Je třeba zdůraznit, že z celé práce je dobře patrná snaha o co nejpřesnější odborné vyjadřování, věrné postihnutí skutečností jakož i vyvození odpovídajících závěrů. Je potěšitelné, že i závěrečná redakce bakalářské práce byla provedena velmi pečlivě. Obrazová dokumentace je kvalitní, k dobrému dojmu přispívá čtivost textu i skutečnost, že v celé práci je jen velmi málo překlepů či drobných nesrovnalostí. Jen ojediněle se vyskytují drobné nepřesnosti ve způsobu citování použité literatury

Autorka v omezeném časovém limitu daném dobou od zadání tématu práce i přes četné obtíže spojené s dlouhodobou absencí vedoucí práce, si osvojila řadu metodik a získala výsledky dobře srovnatelné s jinými autory. Za významné z hlediska dalšího rozvoje problematiky i potenciální využitelnosti považují zejména potvrzení možnosti využít *in vitro* kultur chryzantémy cv. Orinoko pro transformační pokusy, rámcové vymezení koncentrací vhodných k selekci transformantů, jakož i možnosti získání transgenních jedinců ze začleněným genem pro ACCD.

Vzhledem k tomu, že bakalářská práce Terezy Kasalové po všech stránkách splňuje požadovaná kritéria, plně ji doporučuji k obhajobě. Práci hodnotím jako kvalitní a přínosnou. Doporučuji ji klasifikovat známkou **v ý b o r n ě**.

V Českých Budějovicích, dne 23.1.2006



RNDr. Slavomír Rakouský, CSc.
Zdravotně sociální fakulta JU
a katedra genetiky Biologické fakulty JU