

Posudek oponenta na bakalářskou práci studentky Biologické fakulty JU

Kateřiny Čutkové

“ Transformace in vitro kultury *Dendranthema grandiflorum* cv. Orinoko genem ACCO v antisense orientaci pomocí *Agrobacterium tumefaciens* ”

Téma dané bakalářské práce úzce souvisí s další bakalářskou prací řešenou na katedře genetiky Biologické fakulty JU. Bezesporu dobrý záměr o urychlení postupu prací a vytvoření komplexního obrazu o problematice transformace chryzantémy odrůdy Orinoko, bakteriálním genem pro jeden z klíčových enzymů biosyntézy etylénu, oxidázu 1-aminocyklopropan-1-karboxylové kyseliny (ACCO), měl nevýhodu v tom, že bylo nejdříve třeba odvodit aseptickou kulturu výchozího materiálu. To sice byl úkol druhé práce, na druhé straně však v podstatě neumožňoval včas zahájit tolik nezbytnou experimentální činnost, což se i v pozdějším období nepříznivě projevilo malou efektivností transformační metody, nižším rozsahem materiálu použitelného ke stěžejním analýzám a jistě i pochybnostmi autorky o zdaru vlastní práce. K nepříznivým faktorům přispěla i dlouhodobá nemoc původní vedoucí diplomové práce. I za této mimořádné situace dokázala Kateřina Čutková studovat potřebnou literaturu a systematicky pokračovat v řešení zadané problematiky. Výsledkem mimořádného úsilí autorky i dobrého metodického vedení nové školitelky ustavené do funkce v kritické fázi dané bakalářské práce, molekulárních analýzách přítomnosti transgenů v rostlinách, je kvalitní práce, která si nezadá s jinými pracemi řešenými za příznivých okolností.

Celá bakalářská práce čítá, včetně obrazových příloh, 29 stran. Je psána stručně, avšak velmi výstižně. Literární přehled nepostrádá informaci o žádné z problematik, jež úzce souvisí s řešeným tématem. Zahrnuje nezbytný nástin transformačních technik, přiblížení nejčastěji využívaného postupu transformace listových disků, základní charakteristiky vektorových bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, vlastního objektu výzkumu - rostlinného druhu *Dendranthema grandiflorum*, jakož i syntézy a biologických účinků specifického rostlinného hormonu, etylénu. Již z této části je zřejmé, že Kateřina Čutková přistupovala k řešení úkolů bakalářské práce velice zodpovědně. I přes omezený rozsah kapitoly jsou srozumitelnou a přehlednou formou vystiženy podstatné momenty metodik a klíčové faktory ovlivňující biosyntézu a vnímání etylénu rostlinami. K této části mám následující dotaz. U jednoho ze syntetických faktorů, dusičnanu stříbrného AgNO₃, je uvedeno, že inhibuje samotné působení etylénu na rostlinu. Je možné osvětlit o jaký(é) mechanismus(y) se v daném případě jedná a do jaké míry jsou výše uvedené regulační mechanismy tvorby/ rozpadu a vnímání etylénu u vyšších rostlin univerzální? Na str. 8 je v posledním odstavci zmíněno, že po transformaci

brokolice genem pro ACCO v protismyslové orientaci došlo „ k redukci etylénu o 91 %“: Je zřejmé, že při překladu z anglického originálu došlo k omylu. Jak má správně daná formulace znít?

Kapitola „Materiál a metodika“ je uvedena stručným a přitom výstižným způsobem na osmi textových stranách. Postihuje převážnou většinu potřebných informací. K dané části mám několik dílčích připomínek. Ty převážně pramení ze skutečnosti, že autorka byla okolnostmi dlouhou dobu nucena řadu otázek řešit od zcela samostatně, bez vlastních dlouhodobých zkušeností. V odborné literatuře, kam patří i diplomové práce, je třeba používat jednotky SI i zavedené standardy. Správně by tedy veličiny jako osvětlení neměly být uváděny s lomítky, ale jako násobky s uvedením exponentu (př. $90 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Vzhledem k tomu, že se jedná o českou práci, měla by také složení médií apod. být uváděna v češtině [viz MS medium (including vitamins), tryptone, yeast extract, (o-n) kultury, ladder atd.] a jednotnou gramatikou (sacharóza, vs. sacharoza, glukosa – str. 9-12). Obdobně je třeba se vyhýbat takovým termínům, kde dochází ke spojování českých předpon s cizím slovním základem, významovým duplikacím apod., jako například výrazům: „zregenerované“, „vyselektovaných“, apod. Z důvodu posouzení metodik i jejich možného dalšího využití následujícími diplomanty je vhodné uvádět další významné údaje, jako např. dobu skladování vzorků (např. extraktů s DNA) do jejich dalšího využití i co vedlo k přidávkům, případně vynecháním určitých látek/ kroků metodik (př. přidavek 1 M MgSO_4 do kokultivačního média). Převzaté metodiky, stejně jako materiály je třeba patričným způsobem vyznačit a citovat (př. primery pro detekce genů *ACCO*, *npIII*, sekvence *vir* oblasti, schémata příloh).

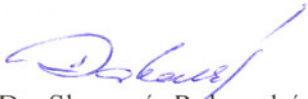
Je však třeba říci, že zmíněné nedůslednosti jsou pouze okrajovým jevem a bezpochyby by na ně za normálních okolností včas poukázal školitel. Stejně tak by od počátku nastínil optimální sled činností (stanovení mezních koncentrací kanamycinu pro selekci transformantů a teprve poté vlastní realizace transformačních experimentů) a upozornil na možná úskalí explantátových technik (př. potřeba provádět více opakování s menším rozsahem souboru než jediné s velkým počtem jedinců apod.). Naproti tomu pozitivní vliv osoby nového školitele v části věnované molekulárním analýzám transformantů je velmi dobře patrný.

Výsledková část je prezentována na čtyřech stranách, je výstižná a dostatečně doložena průkaznými materiály (elektroforetogramy produktů polymerázových řetězových reakcí). Zde autorka mohla připojit i některé z četných metodických poznatků, které získala. Diskuse, stejně jako závěry práce jsou věcné a velmi dobře postihují problematiku a dosažené výsledky autorky. V této souvislosti je třeba velmi ocenit samostatnost Kateřiny Čutkové a mimořádné úsilí, které věnovala zdárnému dokončení i konečné redakci bakalářské práce. Studentka

dokázala i za daných nepříznivých okolností dosáhnout vytýčených cílů práce, tj. získání rostlinných regenerantů pocházejících z transformačních pokusů, jejich další selekce a zejména realizace molekulárních analýz různých typů transgenů. K dobrému dojmu z předložené bakalářské práce přispívá i to, že použitá obrazová dokumentace je kvalitní a v celé práci je jen velmi málo překlepů či drobných nesrovnalostí. Jen ojediněle se vyskytují drobné nepřesnosti ve způsobu citování použité literatury [zkratky časopisů – plné názvy, např. Theoretical and Applied Genetics (str. 24) a Theor. Appl. Genet. (str. 26) apod.]. Mile překvapuje vyzrálost písemného projevu, která přispívá k velmi dobré čtivosti celé práce a svědčí i dobrých znalostech odborné literatury, jež studentka získala v průběhu studia a řešení bakalářské práce.

Vzhledem k tomu, že předložená bakalářská práce Kateřiny Čutkové splňuje po všech stránkách požadovaná kritéria, plně ji doporučuji k obhajobě. Práci hodnotím jako kvalitní a přínosnou. Doporučuji ji klasifikovat známkou *výborně*.

V Českých Budějovicích, dne 23.1.2006


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