

**Posudek oponenta na magisterskou práci studentky Biologické fakulty JU Jany Gazdové
„Molekulární analýza transgenních rostlin *Solanum tuberosum* získaných po vnesení
genů pro manózo-6-fosfátizomerázu“**

Předložená magisterská práce Jany Gazdové svým zadáním patří k náročným tématům nejen po stránce odborné, ale i časové. Její úspěšná realizace předpokládala, mimo jiné, dokonalé zvládnutí nejdůležitějších postupů explantátových technik, zejména transgenózy a vybraných metod molekulárních detekcí (polymerázová řetězová reakce – PCR, gelová elektroforéza, Southernova hybridizace, Northern blot). Vlastním cílem práce bylo zdokonalení postupu selekce transformantů brambor získaných kokultivační technikou na médiích s manózou, prokázání přítomnosti transgenů v regenerantech a molekulární charakterizace vybraných transgenních klonů brambor. Práce navazuje na předchozí bakalářskou práci autorky, jež byla zaměřena na ověření možnosti využití genu pro manózo-6-fosfátizomerázu (*pmi*) pro selekci transgenních rostlin bramboru v podmínkách *in vitro*.

Magisterská práce je zpracována na 50 číslovaných stranách, nad tento rozsah je přiložena kopie publikace autorky a přehled použité literatury. Rozsah a odborná úroveň zpracování literárního přehledu i metodické části svědčí o dobrém přehledu autorky v oblastech cílené modifikace genomu rostlin a základních technik molekulárních detekcí. Cenné je, že v literárním přehledu je kladen důraz na problematiku selekčních systémů a mechanismů selekce potenciálních transformantů rostlin. Díky zařazení řady recentních údajů tak čtenář získá aktuální přehled o stavu problematiky, včetně mnoha relevantních odkazů. K dané části mám jen několik drobných připomínek týkajících se určitých nepřesností. Úvodní tvrzení na str. 1 „Celé 20. století můžeme označit za období značného rozvoje genového inženýrství rostlin...“, je poněkud nadnesené. Techniky genových manipulací u rostlin se datují prakticky až od konce 70. a začátku 80. let minulého století. Nutriční hodnota brambor (str. 2, řádky 2-3) skutečně spočívá ve vysokém obsahu škrobu, podíl proteinů a vitamínů je však ve srovnání s jinými potravinami nízký (viz např. snahy některých týmů ze zemí třetího světa o zvýšení obsahu proteinů v hlízách brambor vnesením genů kódujících zásobní proteiny, např. z *Amaranthus* sp.). Enzym β -glukuronidáza stěpí β -D-glykozidické vazby mezi kyselinou glukuronovou a necukernou složkou aglykonem (na str. 8 uvedeno „aglykolem“). Latinská označení kříženců, uvedená na str. 13, jsou sice převzata z řádně citových zdrojů, jsou však poněkud nestandardní. Jaký způsob se k označování takového hybridního materiálu rostlin správně používá?

Metodické stránce bylo věnován dostatek prostoru, celkem třináct stran. Uveden je nejen popis použitého plazmidového vektoru, ale především postupy přípravy kultivačních

médií, transformací stonkových řízků, selekcí (testováno bylo 16 pokusných variant lišících v obsahu manózy a době jejího působení!), Southernovy a Northern hybridizací. Většina postupů je tak plně zpřístupněna dalším zájemcům o zopakování a případné pokračování v experimentální činnosti. Dílčí připomínky se týkají prakticky jen stylistické stránky věci. Názvy či zkratky některých chemikálií jsou uvedeny jen angličtině, přestože nic nebrání tomu uvést jejich český název (bromfenolová modř, hovězí sérový albumín, str. 22-26). Je na místě připomenout, že na odbornou literaturu psanou v českém jazyce, kam bezesporu patří i magisterské práce, se vztahuje povinnost užívat ČSN a jednotek SI. Údaje vztahující se k odstředování by měly být udávány, pokud možno, v hodnotách relativní odstředivé síly ($x g$), pokud tomu tak není, bývá zvykem alespoň uvádět v textu typ použité centrifugy a rotoru(ů) a v dalším pak otáčky za minutu ($ot.min^{-1}$), ze kterých je možno daný parametr vypočítat, nikoli rpm. Zejména v této části práce činilo Janě Gazdové určité problémy oprostít text od laboratorního žargonu (vyizolované DNA; rostlin vyselektovaných; prýty, které zregenerovaly; silně zvortexovala; naamplifikovaly fragment; 100 bp ladderu; sample buffer; running buffer). Budiž ke cti autorky to, že v jiných částech práce se tyto prohřešky vyskytují jen ojediněle.

Použité metody odpovídají cílům práce. Nicméně, domnívám se, že její rozsah byl poněkud větší, než bylo únosné v daném období zvládnout. Celkový počet rostlinných regenerantů, analyzovaných na přítomnost dvou transgenů *pmi* a *nptII* metodou „tissue“ PCR, činil 572 jedinců, vedle toho bylo zkoušeno 16 variant selekce na půdách s manózou, byt' se 7-15 explantáty na variantu, což samo o sobě ukazuje na značnou šíři záběru i mimo důkladnější molekulární charakterizace deseti vybraných klonů rostlin. Experimentální schéma selekce transformantů (zřejmě jedna Petriho miska na variantu se 7-15 internodií), vzhledem ke značné fyziologické variabilitě výchozího materiálu (běžné u explantátových kultur, i jak vyplývá z porovnání údajů tab.1-6) příliš nedovolalo optimalizovat podmínky selekce. Nicméně i tak lze usuzovat, že vyšší koncentrace manózy (5-10 %) v médiu aplikované záhy po transformaci podporovaly účinnost selekčního procesu. Z tohoto pohledu je třeba chápat i závěry práce “Ve své práci jsem optimalizovala alternativní selekční systém...”, včetně tvrzení “Jako optimální pro selekci internodií se ukázala koncentrace 5 g/l po dobu tří týdnů následně zvýšená na 10 g/l.” Přesto však získané výsledky těchto experimentů jsou cenné pro tým, který bezpochybně bude metodiku dále zdokonalovat. Jakým způsobem byla prováděna opakování variant selekce? Probíhalo hodnocení kultur k jednotnému datu? Neměly spíše být v tab. 3 údaje v prvním řádku (Man 1) počínaje čtvrtým sloupcem proškrtnuty?


Zřejmě v důsledku časové tísně dané celkovou náročností práce se například ve výsledkové části zbytečně opakují drobné chyby (překlepy) v popisech grafů 1-7 a tabulek 1-6 vzniklé kopírováním výchozí, nedostatečně zkontrolované šablony. Na druhé straně je třeba vyzdvihnout to, že výsledky molekulární části práce jsou doloženy kvalitní dokumentací. Můj dotaz k této části směřuje ke zjištění přítomnosti obdobných fragmentů u různých jedinců při Southernově hybridizaci, tedy velmi pravděpodobně o jejich stejném (klonovém) původu. Nedocházelo při regeneraci k tvorbě četných výhonů ("multiple shoots"), což by bylo pravděpodobnější vysvětlení než uniformita kalusu z hlediska obsahu transgenů?

Práce je jinak napsána čtivou formou, její jednotlivé části jsou úměrně zastoupeny a odpovídajícím způsobem zpracovány. Je bohatě doložena literaturou, která je povětšinou správně citována a vzhledem ke svému rozsahu (téměř sedmi stran) obsahuje minimálně chyb. Určitá nedůslednost se vyskytuje při dodržování jednotné formy názvů časopisů (většinou jsou uváděny plné názvy, ojediněle zkrácené). Nedopatřením není uveden zdroj (např. kniha abstrakt symposia) u autorčiny vlastní publikace.

Závěr:

Získané výsledky magisterské práce Jany Gazdové jsou bezesporu zajímavé a aktuální a přispějí k dalšímu vývoji metodiky alternativní selekce transformantů brambor, jakož i vektorových konstruktů. Dokumentace výsledků práce jsou zdařilé. Přehled použité odborné literatury je bohatý a svědčí značném rozsahu informací, který Jana Gazdová musela prostudovat a pečlivě posoudit. V závěru je však třeba znovu zmínit, že i přes výše uvedené dílčí připomínky je daná magisterská práce velmi hodnotná a splňuje předepsaná kritéria. Předloženou magisterskou práci doporučuji hodnotit známkou výborně.

V Českých Budějovicích, dne 25.1.2007


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