



Oponentský posudek na diplomovou práci

Název: „Kvantifikace progresu virové infekce virů RaMV a TuRSV pomocí real-time PCR“

Autor: Tereza Kasalová

Rozsah diplomové práce: 34 stran textu, v klasickém členění na úvod, literární přehled, cíl práce, materiál a metody, výsledky, diskuse a závěr, reference

Hlavním cílem diplomové práce byla relativní kvantifikace virové RNA virů RaMV a TuRSV v průběhu virové infekce pomocí real-time PCR a porovnání úspěšnosti replikace a šíření obou těchto comovirů.

Předložená práce je klasicky členěna, první část je stručným literárním přehledem týkajícím se jednak popisu genomu studovaných virů, jednak popisu použité metody kvantifikace, real-time PCR. Tato část je přehledně zpracována. Obsahově vychází ze studia a analýzy téměř čtyřiceti původních vědeckých prací.

Další část práce obsahuje metodické postupy a výsledky, které jsou uvedeny ve formě tabulek a grafů. Z práce je zřejmé, že autorka zvládla metodu real-time PCR i vyhodnocení získaných výsledků. Grafické zpracování práce je pečlivé.

K práci mám následující připomínky a dotazy:

- Jak staré byly rostliny, které jste inokulovala? Kolik pater měly v době inokulace? Mělo by být uvedeno v Materiálu a metodách.
- Grafy na str. 23 -24. Proč jsou uvedeny dva grafy se stejnými výsledky, které se liší pouze vynesáním směrodatné odchylky?
- V tabulce na str. 20, 5. den chybí listy třetího patra, 10. den již pro ně hodnoty uvedeny jsou. Nestačily rostliny dorůst? Mělo by být vysvětleno.
- Str. 25- proč jsou znázorněna množství viru pouze pro listy 1 a 2 a ne pro další odběry, když jste hodnoty měřila?
- Str. 26- píšete, že rozdílná koncentrace virů RaMV a TuRSV v rostlinách byla zjištěna i po třiceti dnech od inokulace. Proč neuvádíte hodnoty?

- V práci není uvedeno, z které části genomu jsou vybrány sekvence primerů. Jsou-li primery pro oba viry ze stejné oblasti?

K celé práci mám i několik připomínek jazykových: Proč užíváte slovo próba, česky lépe je použít slovo sonda. V práci je použito více anglikanismů, které by mohly být nahrazeny českými ekvivalenty.

V práci chybí seznam zkratk, např. pro mě je zkratka K ještě stále označením pro Kelvina, nikoli pro kDa.

Práce Terezy Kasalové odpovídá jak množstvím výsledků tak i svým zpracováním požadavkům kladeným na diplomovou práci, a proto ji doporučuji k obhajobě a hodnotím jako výbornou.

V Praze 19. května 2008



RNDr. Noemi Čeřovská, CSc.

Posudek magisterské práce
Kvantifikace progresu virové infekce virů RaMV a TuRSV pomocí real-time PCR
Tereza Kasalová
Přírodovědecká fakulta JU

T. Kasalová stanovila relativní množství dvou taxonomicky příbuzných virů v jednotlivých listových patrech v rostlinách hořčice v průběhu 30 dnů po inokulaci metodou real-time PCR. Jedná se o experimentálně velmi náročnou studii, která je součástí řešení grantu GAČR. Zjistila, že TuRSV dosáhl po 30 dnech 2 x , vyšší koncentrace než RaMV. Po věcné i formální stránce má práce všechny náležitosti.

Na základě výsledků dřívějších studií, získaných jinými metodami, se soudilo, že virus po určité progresivní fázi infekce a replikace v rostlinách dosahuje nejvyšší koncentrace a poté dochází ke snížení koncentrace viru. Výsledky jsou u uvedených virů a zejména TuRSV zcela nové a velmi zajímavé, neboť ukazují něco jiného. Zvlášť je třeba ocenit snahu stanovit dynamiku koncentrace viru v jednotlivých patrech (listech) rostlin. Autorka se pečlivě snažila vyvarovat všech možných vlivů, které mohly ovlivnit koncentraci viru v rostlinách.

Připomínky drobné:

1. Jmenuje se uváděná čeleď *Leguminosae* na str. 4 skutečně tak, nebo je správný jiný název například *Fabaceae*?
2. Na str. 14 místo slova **triplikáty** by správně mělo být ve třech opakováních.
3. U obrázků 3 a 4 by bylo vhodné uvést v legendě o jaké ředění, resp. vzorky se jedná.
4. Proč autorka použila u grafů 1 a 2, respektive 3 a 4 rozdílnou časovou osu, navíc u grafů 2 a 4 chybně znázorněnou? Vhodnější by bylo spojit grafy 1 a 3, resp. 3 a 4 do jednoho, lépe by vyniklo srovnání rozdílů v koncentraci obou virů v čase. Podobně by bylo vhodné spojit „Grafy 3“ na straně 25.
5. Důležité sdělení, že pokus s oběma viry probíhal současně a lze tedy vyloučit ovlivnění průběhu infekce jednoho nebo druhého viru různými podmínkami kultivace, je uvedeno až v diskuzi na str. 28. Mělo by být uvedeno v části Materiál a metody.

Připomínky zásadní:

1. Postrádám v diskuzi srovnání s výsledky jiných podobných studií, nezdá se mi že by se jednalo o zcela první práci v rostlinné virologii, která se snaží použít real-time PCR pro stanovení koncentrace viru v rostlinách.
2. Nesouhlasím s tvrzením autorky na str. 2, že nemáme žádné přesné informace o koncentraci viru v rostlině během infekce, kolikátý den po inokulaci je koncentrace viru v rostlině nejvyšší (nejvyšší koncentrace bude u jednotlivých virů různá v závislosti na kultivačních podmínkách rostliny, koncentraci inokula, replikačním mechanismu a typu nukleové kyseliny viru) a že ani nevíme, jak se koncentrace viru mění v průběhu infekce v jednotlivých částech rostliny. Podobně autorka uvádí, že se nikdo nezabýval stanovením koncentrace viru v průběhu infekce, resp. že se nepodařilo najít literaturu zabývající se koncentrací rostlinných virů v průběhu infekce. V diskuzi na str. 28 autorka vůbec nezmiňuje možnost stanovení koncentraci viru pomocí ELISA. V ELISA lze na základě hodnot absorbance (koncentrace obalového proteinu - virového antigenu) a kalibrační křivky např. purifikovaného viru, stanovit koncentraci viru v rostlinách. Velmi bych se divil kdyby podobné práce neexistovaly, protože se podle mého názoru tento způsob stanovení používal často. Navíc nejvyšší koncentrace viru v rostlině po inokulaci byla

v minulosti důležitým údajem pro purifikaci viru. Tím nechci nijak zpochybnit originální výsledky práce autorky a doporučuji pečlivější hledání na Web of Science.

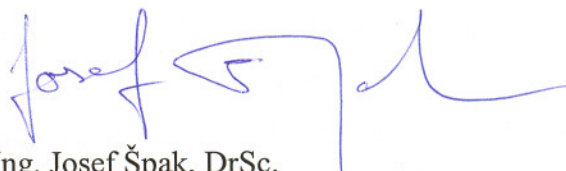
3. Má autorka nějaké vysvětlení pro náhlé, desetinásobné zvýšení relativní koncentrace RNA mezi 20. a 30. dnem v nejstarších listech – č.2, resp. trojnásobné v listu č. 1 v případě RaMV? Mně se zdá podezřelé a chtělo by experimentálně ověřit.
4. Na str. 2 autorka uvádí, že informace o koncentraci viru v rostlinách v průběhu infekce by mohly být využity k odhadnutí nevhodnější doby k aplikaci různých ozdravných prostředků. Mohla by autorka vysvětlit co jsou „různé ozdravné prostředky“ a jak si představuje praktické využití informace o koncentraci viru v rostlině?

Závěr:

Školitel zadal velmi náročné téma Mgr práce. Autorka jej bezpochyby zvládla, hodně se naučila a sepsala velmi pěknou práci. Po experimentálním ověření některých údajů u RaMV a doplnění diskuze – viz připomínky, by bylo možné práci publikovat v impaktivním časopise.

Práci klasifikuji - **Výborně minus** - .

Na letišti Milano - Malpensa 24.5.2008


Prof. Ing. Josef Špak, DrSc.