

## Posudek oponenta na bakalářskou práci studentky Přírodovědecké fakulty JU

Kláry Kolářové

„*Transformace embryogenní kultury smrku ztepilého (Picea abies)*“

Předmětem předložené bakalářské práce bylo vyhledání vhodných experimentálních podmínek umožňujících dosažení stabilní transformace embryogenních kultur smrku ztepilého pomocí biolistické metody a modelového plazmidového konstruktu se signálním genem pro bakteriální  $\beta$ -glukuronidázu (GUS). Toto atraktivní a aktuální téma bylo podpořeno nejen ekonomicky ze strany souvisejícího grantového projektu GA ČR, ale i jasnou koncepcí řešení. Jak se však ukázalo i v samotném průběhu práce, jedná se o úkol značně nesnadný. Techniky explantátových kultur a genetických modifikací lesních dřevin skýtají, i přes jistý pokrok dosažený zejména v posledních dvou desetiletích četné obtíže, které je možné obvykle přesněji vymezit až v průběhu vlastních pokusů s konkrétními genotypy a za daných podmínek pracoviště. Pro zdárné splnění účelu práce bylo nezbytné zvládnutí řady technik jako *in vitro* kultivací embryogenních kultur, vyhledání vhodných selekčních agens, vymezení parametrů zařízení pro biolistiku, detekce GUS a statistické zpracování získaných dat, odpovídající práce s literaturou a interpretace vlastních výsledků.

V poměrně rozsáhlém literárním přehledu autorka uvádí výčet metod přímé a nepřímé transformace rostlin, nejčastěji využívaných systémů selekce transgenních buněk a jedinců a alternativních selekcí. Přehled transformačních postupů uzavírá zhruba dvojstránkový výčet technik a výsledků dosažených při genetických modifikacích jehličnatých dřevin – konifer. Samostatná podkapitola je věnována problematice využití genetického markeru pro GUS. Literární přehled je zpracován se znalostí věci, byť v některých ohledech měla autorka pozici ulehčenu existencí četných českých zdrojů (zejména monografie Ondřej a Drobník 2002, bakalářské a magisterské práce na BF, PřF a ZF JU věnované transformacím rostlin). Škoda jen, že se Klára Kolářová do značné míry přidržela vžitého klišé uvádění dostatečně známého a některých ohledech již překonaného přehledu metod transformace a neposkytla více prostoru zajímavým problematikám somatické embryogeneze a transformace lesních dřevin. I tak je výčet uváděných literárních zdrojů na bakalářskou práci rozsáhlý, zahrnuje 6 stran úplných citací.

Kapitola Materiál a metodika se zabývá postupy pěstování a ověřování citlivosti dvou kmenů embryogenních kultur smrku ke čtyřem typům selekčních agens (paromomycinu, kanamycinu, hygromycinu a D-mannóze) a především transformací smrku s využitím mikroprojektilů. K této části mám řadu připomínek a dotazů. V případě uváděných složení kultivačních médií by, při daném způsobu zápisu (např. 1 ml glycinu, 5 ml BAP, u E média

navíc na 350 ml), bylo spíše na místě označení „způsob přípravy...“. Poněkud nestandardní je i způsob uvádění koncentrací zásobních roztoků (zásobní roztok o  $c = 200 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ; koncentrace =), přestože z faktického hlediska je správný (běžná forma zápisu: zásobní roztok  $200 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ), obdobně  $\text{pH}=7$  (místo  $\text{pH } 7$ ) na str. 22, termín „přendala“, apod. Látka na ztužování médií je v celé práci chybně označována jako Gerlit, zatímco její správný název je Gelrite. Řada skutečností není v metodice jednoznačně definována. V bodě 5.1. na str. 15 „Testování senzitivity na selekční látky“ autorka pouze nepřímou naznačuje („Na Petriho misky ...s 20 ml Erikssonovým médiem ..a přidanou určitou selekční látkou“), že prováděla testování na Erikssonově médiu (E), to však již není ani jako selekční médium v části „Složení média E“ označeno. V dalším textu je pro změnu uváděn pouze termín „selekční médium“ bez přídomku E. Snaha o „úspornost“ se projevuje i v řadě jiných sdělení a je zdrojem zbytečných nejasností, stejně jako v důsledku záměn termínů „transformace“, „transformovat“ (jako proces k dosažení cílené genetické změny), a „transformační experiment“ (obsahuje i netransformované kontroly). Díky tomu jsou například popisy schémat jednotlivých biolistických pokusů těžko srozumitelné, pokud vůbec poskytují dostatečné vysvětlení použitých počtů Petriho misek v rámci jednotlivých variant. Co je míněno kupříkladu termínem „vzorek“ v nepřiliš logické větě „Každou variantou podmínek jsem transformovala 6 vzorků“ v prvním a druhém řádku shora na str. 21? Petriho miska, pletivo? Má termín stejný význam i v následující větě „Odlišný byl také počet kontrolních vzorků“? Protože daná bakalářská práce byla napsána v českém jazyce, bylo by jistě na místě, obdobně jako v jiných českých odborných sděleních, pokud možno uvádět i české termíny (nutně se nemusí jednat o doslovné překlady) pro součásti zařízení (zde např. pro biolistiku). Úplné přejímání anglických označení s českými koncovkami (kupř. nosič rupture disků, kovová část nosiče stopping screenů a macrocarrierů) zde rozhodně nepřispělo k vyšší srozumitelnosti výkladu a zbytečně snižuje váhu díla. Stejně tak některé věty jako: „18  $\mu\text{g}$  zlatých partikulí o velikosti 1  $\mu\text{m}$  byly žihány přes noc (12 hodin) při 180 °C.“ nejenže postrádají shodu podmětu a přísudku, ale i bez dalšího vysvětlení vznášejí nové a nevysvětlené otázky (Zbavení částic možných kontaminací mikroorganismy a DNA? Nejsou tyto ani po dvanáctihodinovém žihání dostatečně sterilní?). Jednalo se v případě plazmidu o konstrukt shodný s tím (GUSInt), který vytvořil Vancanneyt et al. (1990)? Alespoň částečné schéma konstruktů na vysvětlenou by bylo prospěšné pro mnohé zájemce o práci.

Zásadnější je však skutečnost, že prakticky zcela chybí vysvětlení, proč byly určité metodické kroky činěny. Co vedlo k rozhodnutí testovat citlivost embryogenních kultur na E médiu? Filtrační papír na površích médií měl zřejmě usnadnit vážení kalusů. Byl snad jiný

důvod? Byly autorkou či jinými autory zjištěny nějaké rozdíly v citlivosti smrkových embryogenních kultur pěstovaných na vrstvě filtračního papíru a přímo na médiu k selekčním látkám? V práci zcela chybí vysvětlení, které faktory přispívají k vyzrávání somatických embryí a prorůstání rostlin, může je autorka uvést ve své odpovědi? Od věci by nebyl ani stručný popis morfologie somatických embryí (SE) konifer, která se poněkud liší od běžného obrazu SE typických pro dvouděložné rostliny.

Řada připomínek je i k použitým metodikám pokusů. Například při zjišťování přirozené citlivosti/tolerance výchozích embryogenních kultur smrku vůči vybraným selekčním látkám byl užit pouze minimální rozsah pokusů (2 ks Petriho misek s celkem šesti inokuly kultur na variantu), navíc bez opakování v čase. Proto takto získané výsledky nemají potřebnou průkaznost a je třeba je považovat pouze za předběžně (viz i významné rozdíly mezi nulovými variantami pro různé selektivní látky). To nic nemění na zjištění inhibičních efektů, avšak porovnání míry inhibice růstu vlivem např. kanamycinu a hygromycinu je za dané situace více než diskutabilní. Na druhé straně dosažené výsledky i bez toho, že by byla potvrzena stabilní transformace embryogenních kultur smrku jsou dobrým východiskem pro další práci. Autorka potvrdila nejen rozdíly v citlivosti dvou rozdílných klonů kultur k selektivním látkám a vytipovala antibiotikum kanamycin jako použitelné agens (mj. jiné pro jeho výrazně nižší toxicitu vůči člověku a zvířatům), ale i možné rozdíly v jejich transformovatelnosti na základě zjevných odlišností v projevu dočasné exprese transgenů pro GUS. Na tomto základě byly také vymezeny použitelné parametry zařízení pro biolistiku.

Diskuze je do značné míry orientována na vlastní výsledky a jen v málo případech jsou tyto porovnávány s výsledky jiných autorů. Závěry jsou adekvátní rozsahu a charakteru práce. I přes zmíněné nedostatky je však dobře patrna snaha autorky o objektivitu a kvalitní redakci celé práce. Seznam použité literatury i přes svůj značný rozsah obsahuje jen minimálně drobných nepřesností.

Bakalářská práce Kláry Kolářové bezpochyby splnila svůj cíl a proto ji doporučuji k ohajobě. Práci hodnotím jako přínosnou a doporučuji ji klasifikovat známkou **velmi dobře**.

V Českých Budějovicích, dne 27.5.2009



RNDr. Slavomír Rakouský, CSc.  
Zdravotně sociální fakulta JU  
a katedra genetiky Přírodovědecké fakulty  
České Budějovice