

## **Aktivace vybraných rostlinných promotorů v systému leaf factory v závislosti na přítomnosti supresorů silencingu a viroidní infekce.**

Práce se zabývá tabákem *Nicotiana benthamiana* infikovanými viroidem PSTV prostřednictvím infiltrace agrobaktériem a zkoumá je z několika pohledů.

Text má jen 39 stran plus Lit., ale je velmi dobře napsaný a pěkně se čte. To zdůrazňuji hned na začátku, aby bylo jasné, že následující výtky neznamenají opak. Snažím se jen studenta upozornit na chyby, které jsou v publikacích běžné, ale po určitých zkušenostech se dají omezit. Týká se to především úvodu (který je jinak velmi zajímavý a informativní). Obecně vyčítám především nepozorné přečtení hotového textu. Při pečlivém čtení se většinou ukáže, že je nutné vyškrtat mnoho hovorových výrazů jako „tento“, „tato“, „tak“, které se nám při sepisování zdají být na místě, ale jsou vlastně nadbytečné, opravit nepřesnosti, a divně konstruované věty:

-tyto molekuly jsou kovalentně uzavřené, tvořící tak specifickou sekundární strukturu,...

-Viroidy jsou také na rozdíl od satelitních virů schopny...

-komplementárně spárovaná? uzavřená RNA molekula...

-viroidy jsou submolekulární parazité (*proč sub – což nejsou molekulou?*)

-replikují se v chloroplastech pomocí jaderné RNA polymerázy?? (*za jadernou bych označoval pouze tu, co funguje v jádře; zde jde zřejmě o chloroplastovou, ale v jádře kódovanou RNAP*)

-Představou tedy je, že produkované viroid-specifické siRNA mohou...*divný začátek věty, také níže*

-A dále pak také z hlediska mol-biol., kde slouží jako modelové organismy.-*raději zopakovat podmět!*

Konec konců, i vlastní název práce je dvojznačný- není jasné, zda byly přítomny supresory infekce nebo naopak infekce.

Za mnohem významnější nedostatek úvodu i celé práce ale považuji to, že nikde není vysvětleno, v jakém smyslu se zde používá termín „viroidní infekce“. V pracích, na které se autor nejvíce odkazuje, se rostliny skutečně infikují buď přímo viroidem nebo in vitro vyrobenou RNA, ale zde se provádí pouze tzv. agro-infiltrace. Dochází v při transienční expresi k vytvoření viroidů z agrobaktériových transkriptů, jako při klasické agroinfekci? Šíří se potom viroid po rostlině už nezávisle na agrobaktériu? Zřejmě ano, ale nikde o tom není zmínka. Tento velmi zajímavý proces by měl být vysvětlen.

Metodika je velmi podrobně sepsaná a tvoří podstatnou část bakalářské práce. Vzhledem k tomu, že se na většinu izolací používaly komerční kity, doporučoval bych v některých případech spíš krátké vysvětlení principu izolace a odkaz na firemní návod než podrobné opsání pracovního postupu. Hojně se používá výraz „korkovač“ místo „korkovrt“. Zaujalo mě, že agrobaktérium po transformaci plasmidem se nechává růst na plotnách pouze přes noc (v naší laboratoři 40-60 hodin), a že na selekci transformovaných tabáků se používá kanamycin 50 mg/l (u nás 300-1000). Zvláštní se mi zdá i to, že úspěšnou transformaci agrobaktériem plasmidem dokazuje autor pomocí PCR, a nikoli stanovením tohoto plasmidu v agrobaktériu, což by bylo rychlejší a spolehlivější (a dokáže se zároveň přítomnost helperového Ti plasmidu). Žádám vysvětlení těchto údajů.

Výsledky jsou děleny na 3 podkapitoly.

V první části práce student zkonstruoval rostlinné vektory s obráceným dimerem méně virulentních kmenů „C3“ a „Mild“ PSTV. Šlo zřejmě o dost složitou konstrukci, jejíž úspěšná realizace je jistě úspěchem. Není vysvětleno, proč byly vytvořeny jen obrácené dimery, když pak byly srovnávány s přímým dimerem virulentního PSTV-vysvětlit! Agrobaktériem s těmito konstrukty byl infiltrován tabák a byla pozorována očekávaná retardace růstu u konstruktů s virulentnějšími PSTV.

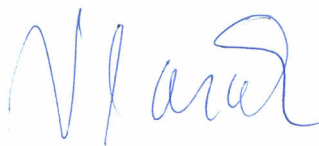
V další části byly vybrány dva rostlinné promotory, o nichž je údajně známo, že se aktivují při PSTV infekci, klonovány do rostlinného vektoru s GUS reporter genem, a agrobaktériem s tímto vektorem byly infiltrovány jednak divoké tabáky, jednak s různými PSTV (ale také

infiltrací). V popisu výsledků jsou některé zmatečné údaje, např. na straně 31 a na mnoha dalších místech se píše „zaměřili jsme se na promotor VSF1, jehož aktivita korelovala se silou projevů viroidních symptomů“, ale ze všech obrázků vyplývá, že tento promotor je naopak nejaktivnější v kontrolních rostlinách a nejslabší v rostlinách infikovaných nejvirulentnějším PSTV. Naopak s promotorem, jehož aktivita skutečně korelovala s infekcí, což je daleko zajímavější, byly další pokusy zastaveny s odůvodněním, že nebyl úplný. To by se mělo lépe vysvětlit.

Byly také infiltrovány některé známé supresory silencingu, které v některých případech zvýšily expresi, a to více u kontrolních rostlin, než u infikovaných. Vysvětlení tohoto jevu je podané v diskusi dokonce dvakrát stejnými větami, na str. 37 i 38, a je málo přesvědčivé. Byl pozorován podobný jev i v citovaných pracích?

V třetí části byly charakterizovány rostliny, získané už dříve stabilní transformací agrobaktériovým vektorem s virulentním PSTV. Transgen byl prokázán dot-blotem, ale křížení selfovaných rostlin se selekcí semenáčků na kanamycinu nedalo žádné rozumné štěpné poměry. Proč není ukázán Southern Blot?

Přes zmíněné chyby doporučuji bakalářskou práci k obhajobě a hodnotím ji jako výbornou. Především oceňuji studentovu pracovitost a zvládnutí množství velmi různorodých a časově náročných metod.



Doc. RNDr. Josef Vlasák, CSc.