



RNDr. Kateřina Bišová, PhD, Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i.,  
Opatovický mlýn, 379 81 Třeboň, , tel. 384 340 484, fax 384 340 415,  
e-mail: bisova@alga.cz

---

Třeboň 19. května 2011

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Jany Husákové „**Transformace ptDNA *Chlamydomonas reinhardtii***“

Předložená diplomová práce byla vypracována pod vedením Doc. RNDr. Jindřicha Břízy, CSc. a školitelky-specialistky Mgr. Pavly Příkladové na Přírodovědecké fakultě Jihočeské Univerzity a na Ústavu molekulární biologie rostlin BC AV ČR v Českých Budějovicích.

Diplomová práce se zabývá aktuálním tématem genetické transformace chloroplastu u zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii*. Cílem práce bylo otestovat a porovnat dvě metody genetické transformace u této zelené řasy. Výsledkem práce byla částečná optimalizace biolistické metody transformace.

Práce je v přiměřeném rozsahu 65 stran včetně citované literatury a formálně správně členěna. Úvod vhodně zdůvodňuje, proč jsou řasy výhodným modelovým organismem a proč je důležitá právě transformace chloroplastu. Literární přehled je pečlivě a přehledně zpracován. Odpovídajícím způsobem představuje jak použitý modelový organismus, tak použitou metodiku.

V kapitole Materiál a metody jsou všechny používané metodiky detailně a odpovídajícím způsobem popsány.


Výsledky obsahují přehledné tabulky a obrázky shrnující dosažené výsledky. Jedním z problémů, se kterými se autorka ve své práci potýkala, byly problémy s PCR. Zajímalo by mě, zda zkoušela i jiné způsoby, jak zvýšit kvalitu PCR reakce sekvencí bohatých na GC páry, kromě betainu obsaženého v PCR enhanceru? Mám na mysli zejména přidání DMSO, popřípadě použití jiné polymerázy než ExTaq. Problémy s amplifikací delších fragmentů mohou být také dány metodou izolace výchozí DNA. Zkoušela autorka také jiné způsoby izolace DNA pro PCR, kromě velmi jednoduché metody popsané v metodách?

V Diskusi jsou získané výsledky porovnány s literaturou a řádně oddiskutovány. Autorka vhodně hodnotí výsledky svých pokusů a systematicky pátrá po příčinách neúspěchu. V této souvislosti bych ráda zdůraznila, že i negativní výsledky, resp. výsledky, které nevycházejí přesně podle očekávání, jsou nedílnou a velmi důležitou součástí vědecké práce.

V Závěru je celá práce jasně a logicky shrnuta včetně zhodnocení nezdarů a neúspěchů.

Celkově je práce napsána velmi pečlivě, téměř bez překlepů, a je esteticky dobře zpracována. Jedinou kritickou připomínku mám k občasnému použití jazyka vhodného spíše pro popularizační článek než pro vědeckou publikaci. Mé připomínky k práci jsou víceméně formální. Předložená práce splňuje všechna požadovaná kritéria a plně ji doporučuji k obhajobě.

Hodnotím známkou: A.



RNDr. Kateřina Bišová, PhD.

**Posudek oponenta na magisterskou práci studentky Přírodovědecké fakulty JU  
Bc. Jany Husákové „Transformace ptDNA *Chlamydomonas reinhardtii*“**

Předložená magisterská práce Jany Husákové svým zadáním patří k velmi náročným tématům nejen po stránce odborné, ale i časové. Před autorkou stál nelehký úkol, osvojit si a zavést v laboratoři katedry genetiky Přírodovědecké fakulty JU *in vitro* kultury řas druhu *Chlamydomonas reinhardtii* a techniky jejich genetických modifikací. Dále pak dosáhnout modifikace genetické informace uložené v plastidech (plastomu) a porovnat účinnost biolistické a elektroporační techniky přenosu cizí dědičné informace do buněk řas. Úspěšná realizace magisterské práce, mimo jiné, předpokládala dokonalé zvládnutí nejdůležitějších postupů aseptické kultivace řas, vybraných metod přímé transgenózy a metod molekulárních detekcí transgenů (PCR, gelová elektroforéza, Southernova hybridizace).

Magisterská práce je zpracována na šedesáti pěti číslovaných stranách, nad tento rozsah jsou uvedeny předepsané anotace a obsah práce. 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. K dané části mám jen několik drobných připomínek týkajících se určitých formulačních nepřesností. V úvodu na str. 1 je uvedeno: „V současnosti není takřka problém pozměnit genetickou informaci bakterií a neustále se objevují i nové pokusy o genetické transformace hospodářsky významných rostlin či dokonce živočichů.“ (pozn. První geneticky modifikované /GM/ odrůdy zemědělských plodin byly pěstovány v r. 1996. V loňském roce již celosvětové pěstební plochy GM plodin dosáhly 148 mil. ha). Obdobně je tomu i při zdůraznění cílů práce: „Cílem mé diplomové práce bylo dostupnými metodami (genové dělo, elektroporace) vyzkoušet a porovnat transformaci chloroplastového genomu řasy *Chlamydomonas reinhardtii*.“ Jaké má být v daných případech správně znění vět? Některé termíny jako „transformační gen“, „jaderná a chloroplastová transformace“, „kruhový plazmid“ (str. 7, 10, 11, 13, 16) jsou doslovnými překlady z angličtiny, v českém odborném projevu se však nahrazují vhodnějšími a přesnějšími názvy (transformující či cílový gen, transformace jaderné a chloroplastové DNA, cirkulární forma plazmidu). Obdobně, v případě termínu „střela“ (shot) je spíše na místě označení „nástřel“ či „pokusné ovlivnění“ apod. Co je míněno tvrzením na str.16: „Všechny metody disponují značným množstvím proměnných, které mohou hrát v transformaci podstatnou roli, např. přítomnost nosiče exogenní DNA u biolistiky nemá vliv (Kindle *et al.*, 1989), naopak při elektroporaci či transformaci pomocí skleněných kuliček je transformací účinnost vyšší (Shimogawara *et al.*, 1998).“?

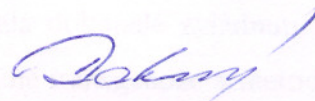
Metodické stránce byl v práci věnován dostatečný prostor, postupy jsou podrobně popsány a proto velmi cenné pro případné pokračování experimentální činnosti v daném

směru. Dílčí připomínky se týkají prakticky jen stylistické stránky věci. Například na str. 31, „biomasu jsem uložila do - 70 °C“, Hlavička tabulky Tab. 11 (str. 32) uvádí: „Složení extrakčního a T5E pufru“, ale poskytnuté údaje jsou převážně v ml. Na místě by proto byl spíše název: „Návod na přípravu extrakčního a T5E pufru“. Nejspíše nedopatřením je na str. 35 v Tab. 13 (Složení hybridizačního roztoku a fosfátového pufru) uváděn chybný údaj 1 M  $\text{NaPO}_4$  (pH 7,2). Na str. 26 autorka zmiňuje: „Poté jsem řasy zahustila na  $1.10^8$  b/ml média centrifugací 5 000 rpm, 4 min., 4 °C a resuspendovala v příslušném objemu tekutého TAP média s 60 mM sorbitolem (Wykoff, 1998)“. Nemá formulace znít: „Poté jsem řasy zahustila centrifugací při 5 000 rpm, 4 min., 4 °C a resuspendovala v příslušném objemu tekutého TAP média s 60 mM sorbitolem na denzitu  $1.10^8$  b/ml (Wykoff, 1998)? Jakým způsobem autorka hodnotila životnost (vitalitu) buněk? Vzhledem k tomu, že se jedná o odbornou práci psanou v češtině, vztahují se na ní příslušné předpisy, jako uvádění hodnot v jednotkách soustavy SI či alespoň dle národních standardů. 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 ( $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$ ), ze kterých je možno daný parametr vypočítat, nikoliv v rpm. U metodik byl měl být zmíněn jejich zdroj, stejně jako v případě použitých vyobrazení, jinak se má za to, že jsou dílem autora/autorky. Budiž ke cti autorky to, že v jiných částech práce se tyto prohřešky vyskytují jen ojediněle.

Získané výsledky jsou dostatečně popsány a přehledně uvedeny na čtrnácti stranách práce. Pro potřeby vlastní experimentální práce byly, mimo jiné, charakterizovány růstové parametry kultur řas pěstovaných dvěma způsoby. Graficky jsou však vyobrazeny pouze propočtené křivky bez zjištěných průměrných hodnot a rozptylu. Proč jsou křivky plošně zvýrazněny? Některá označení nejsou zcela výstižná, např. sloupec „kultivace buňky/ml“ v tab. 18. Jaké by mělo být odpovídající označení? Výsledky jsou odpovídajícím způsobem diskutovány ve světle dostupné recentní literatury. Forma, jakým je celá práce zpracována, svědčí o velmi dobrém přehledu autorky o problematice genetické transformace řas a jejím kritickém náhledu. Skutečnost, že se nepodařilo zcela dosáhnout všech cílů práce, konkrétně transformace genetické informace plastidů, je třeba posuzovat s ohledem na celkově nízkou účinnost transformací u řas. Jak ukázala i sama autorka použité parametry transformace, konkrétní druh a kmen, jakož i vektorový konstrukt(y) významně ovlivňují úspěšnost/neúspěšnost celého postupu. Práce je napsána srozumitelnou a čtivou formou, její jednotlivé části jsou úměrně zastoupeny a odpovídajícím způsobem zpracovány. Je bohatě doložena literaturou, která je správně citována a vzhledem ke svému rozsahu osmi stran obsahuje jen minimálně drobných nepřesností.

**Závěr:** Získané výsledky magisterské práce Bc. Jany Husákové jsou bezesporu velmi cenné a aktuální. Bezpochyby přispějí k dalšímu vývoji metodiky účinné transformace a selekce transformantů řas druhu *Chlamydomonas reinhardtii*, jakož i vektorových konstruktů. Dokumentace výsledků práce jsou zdařilé. Přehled použité odborné literatury je bohatý a svědčí značném rozsahu informací, který Bc. Jana Husáková 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 11.5.2011



RNDr. Slavomír Rakoušký, CSc.  
Zdravotně sociální fakulta JU  
a katedra genetiky JU PŘF