



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Biotechnologické centrum

Studentská 13, 370 05 České Budějovice

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

☎ *420-387772588

fax: *420-387772588

e-mail: vcurn@seznam.cz

Oponentský posudek na diplomovou práci
Bc. Petry Skotnicové

**„Molekulární analýza transgenních rostlin rododendronů,
získaných po transformaci vektorem 35SGUSint.“**

Předložená diplomová práce řeší specifickou problematiku analýzy potenciálně transgenních rostlin rododendronu za použití různých metodických a analytických přístupů. Práce je po formální i věcné stránce zpracovaná na průměrné úrovni. Členění práce pak odpovídá standardu kladenému na diplomovou práci.

Úvodní kapitola uvádí do problematiky diplomové práce a navozuje problematiku transformace okrasných rostlin. Následující kapitola *Cíl práce* není dobře zpracovaná a cíl práce je velmi nejasně uveden v jedné větě. Druhý odstavec pak nemá charakter definice cíle práce, ale pouze konstatuje, co bylo během řešení diplomové práce prováděno a tento text má pak charakter shrnutí či závěru práce. Postrádám jasné definování hypotéz a cílů práce a tento nedostatek se pak projevil i během zpracování práce a formulaci jejích závěrů.

Kapitola *Literární přehled* je kusá, strohá, působí lehce odbytým dojmem a obsáhlé pasáže jsou prostým textem bez uvedení literárních pramenů. Tento fakt mne lehce zaráží, protože např. problematika transformace, selekce, detekce aktivity GUS jsou témata, ke kterým lze nepochybně nalézt spoustu literárních pramenů.

Kapitola *Metody* by se správně měla nazývat *Materiál a metody* a zejména část týkající se analýzy transformovaných rostlin je zpracována velmi podrobně a podává přehled o metodách a postupech, které byly v průběhu řešení použity. Dotaz mám jen k histochemickému stanovení GUS aktivity, kde si nejsem jist, zda autorka popsala celý pracovní postup.

Výsledkům a diskusi je pak věnována velká pozornost, autorka podrobně uvádí a dokumentuje dosažené výsledky, připomínky jsou uvedeny níže. Diskuse je rovněž poměrně kvalitně zpracovaná, občas se objevují delší pasáže bez uvedení citací.

Kapitola Závěr pak shrnuje výsledky získané v průběhu řešení diplomové práce.

Poznámky a připomínky:

- V řadě případů – např. str. 3 jsou citace uváděny v závorce až za „tečkou“ – citace je ale součástí dané věty textu.
- Podstatně bohatší soubor pěnišníků lze nalézt v Dendrologické zahradě VÚKOZ v Průhonicích – str. 3.
- Nevhodné je používání počestěného názvu bakterie rodu *Agrobacterium*, namísto „využívá dvou druhů agrobakteria“ by bylo správné „využívá dvou druhů bakterií rodu *Agrobacterium*“.
- Termíny bombardování, vápencovité půdy – nejsou zcela ideální.
- Dotaz mám k výpočtu aktivity GUS – na str. 18 - tyto postupy vytvořila autorka diplomové práce nebo jsou převzaty z literatury?
- Nepochopil jsem údaje na grafu 1, k tomu se vztahující text a stejně tak data v tabulce 4 – co probouha zobrazuje graf 1? – udává kolik rostlin mělo nějaký obsah proteinu?, a k čemu je to dobré? navíc se z tohoto grafu nedá přečíst, co to jsou to ony kontrolní rostliny s nižším obsahem proteinu; chaotické je i další popsání výsledků – a sice, že kontrolní rostliny mají aktivitu enzymu 0,294.... a průměrná aktivita všech rostlin je 150 ... – v tabulce 4 je kontrola jedna (je to průměr kontrolních rostlin nebo je to v předchozím textu špatně popsáno?) a řada dalších rostlin má aktivitu i mnohonásobně vyšší, pod onu hranici 150 pmol se dostaly jen tři rostliny – je výpočet uvedený v diplomové práci správný?, co tyto hodnoty aktivit znamenají, v textu práce toto autorka taktně přešla.
- Při fluorimetrické metodě byla u 15 rostlin zjištěna mírně zvýšená aktivita enzymu β -glukuronidázy, u 7 rostlin zhruba 5x vyšší a u 3 rostlin více než 10x vyšší v porovnání s kontrolou. – co to je mírně zvýšená aktivita, jaké rostliny měly aktivitu 10x vyšší? – v tabulce 4 žádná taková není a byly tyto hodnoty statisticky průkazné?
- V případě PCR detekce transgenu bych vřele doporučoval provádět multiplex reakce a kromě transgenu detekovat i rostlinný gen (interní standard) – např. na obr. 4 vzorek 3 a 5 nedává signál, více nařaděný vzorek 6 zase ano, tyto výpadky mohou být způsobeny špatnou přípravou reakce spíše nežli nepřítomností transgenu a multiplex by toto měl odhalit.
- U kterých rostlin byla dříve prokázána přítomnost genu *gusA* – popis materiálu je nedostatečný a není to uvedeno ani např. u obr 5 a dalších.
- Proč byly testovány 3 postupy pro přenos fragmentů DNA na membránu, když o tom ve výsledcích není ani zmínka?

Získané výsledky jsou zajímavé a dokumentují složitou problematiku transformace okrasných dřevin. Autorka sice prokázala schopnost samostatné vědecké práce a interpretace získaných dat, ale mohla zpracovat diplomovou práci poněkud

odpovědněji a pečlivěji. Práci doporučuji k obhajobě a hodnotím ji klasifikačním stupněm „dobře“.

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Biotechnologické centrum ZF

Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v.v.i.

Květnové nám. 391

252 43 Průhonice

OPONENTSKÝ POSUDEK NA DIPLOMOVOU PRÁCI

Skotnicová, P. Bc., 2011: Molekulární analýza transgenních rostlin rododendronů, získaných po transformaci vektorem 35SGUSint. [Molecular analysis of transgenic rhododendron plants obtained by transformation with 35SGUSint. construct. Mgr. Thesis, in Czech.] – 43 s. Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Vedoucí práce: Mgr. Daniela Pavingerová, CSc. (PřF JU a ÚMBR, BC AV ČR, v.v.i.)

Předložená diplomová práce se zabývá molekulární analýzou rostlin rododendronů (dvou kultivarů) pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Pro důkaz přítomnosti transgenů byla použita polymerázová řetězová reakce (PCR) a Southern blot. Pro zjištění přítomnosti genu *gusA* byla práce zaměřena také na fluorimetrickou a histochemickou metodu stanovení aktivity β -glukuronidázy.

Práce je velmi přehledně rozčleněna. **Úvod** zahrnuje využití transgenóze i výstižně popsany cíl práce. **Literární přehled** nás seznamuje detailně s problematikou a je podpořen četnými citacemi aktuálních prací ve sledovaném oboru. Kapitola **Metody** podrobně popisuje experimentální materiál, *in vitro* kultivaci dvou odrůd rododendronů ('Rebe' a 'Azuro') a použité analytické metody (fluorimetrické stanovení GUS, histochemické stanovení GUS aktivity, analýza obsahu proteinů, izolace DNA, PCR, Southernova hybridizace). V kapitole **Výsledky** jsou uvedeny hodnoty získané z regenerace rostlin po transformaci, z fluorimetrického a histochemického stanovení GUS aktivity, z PCR a Southernovy hybridizace. **Diskuze** a **Závěr** srozumitelně komentují a shrnují dosažené výsledky. **Použitá literatura** obsahuje dostatečný počet prací.

K diplomové práci nemám žádné zásadní připomínky. Literární přehled (10 stran) je zpracován velmi dobře s využitím aktuálních údajů. Pouze doporučuji psát tečky až za citací autorů (str. 3). Přestože je práce zaměřena na transgenní rostliny, chybí mi v tomto přehledu krátký odstavec o regeneraci *in vitro* u rododendronů. Myslím, že by bylo vhodné uvést dva základní způsoby regenerace, tj. organogeneze a somatická embryogeneze. I z důvodu, že

diplomantka v Diskuzi uvádí jako další možnost vyzkoušet postup přes jednobuněčný původ transgenních rostlin.

Materiál a metody (13 stran) jsou popsány adekvátně a přehledně, je zřejmé, že metodiku diplomantka výborně zvládla. Možná bych doporučila jen trochu upravit některé výrazy, např. v Tab. 2 – místo přendáno použít přeneseno, ne nadrcený ale rozdrčený? vzorek, X% sloučeniny psát bez mezery, konečný objem 1 (jedné) reakce, ale to jsou jen detaily. Nutné je však doplnit celé názvy růstových regulátorů k uvedeným zkratkám (IAA, 2iP), u kanamycinu naopak zkratku Km? (str. 15).

Výsledky (9 stran) jsou rozděleny podle sledovaných kultivarů, pod tabulkami bych uvedla význam hodnoty $\pm 0,00\dots$, jedná se o střední chybu průměru? Jaký statistický test byl použit, jaký byl počet opakování experimentu? Doporučuji doplnit pod uvedené tabulky.

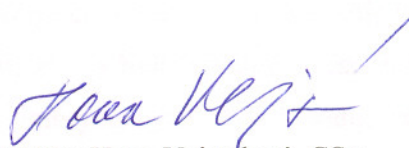
Je škoda, že Diskuze (pouze 3 strany) je krátká. Myslím, že vzhledem k rozsáhlosti použité metodiky by mohla být podrobnější. Nebo spojit Výsledky s Diskuzí, protože v některých pasážích Výsledků se už získané údaje diskutují (např. str. 29 s uvedenou citací Knapp et al., 2001). Závěr je stručný, ale dostatečný.

V citacích autorů jsou drobné nepřesnosti. Str. 1 – Iwazaki, 2004, chybí et al., někde za et al. chybí čárka, str.7- doplnit letopočet u Pavingerová et al., str. 36- ne Hobbs, 1990, ale Hobbs et al., 1990. V Literatuře jsem nenašla citaci Drobník a Ondřej (2002). Také netřeba se opakovaně citovat u své bakalářské práce, stačí vlastní citaci uvést jen jednou, a to při prvním objevení v textu.

Další drobnosti: str.20-po dobu 10 minut, str.14-rostlinný materiál jsem pěstovala v *in vitro* kultuře, ne vitamíny ale vitaminy, str.13-za názvem našeho ústavu doplnit v.v.i.

Cíle diplomové práce považuji za splněné. Oceňuji především metodickou část práce, musela být velmi náročná. Někdy chybějící předpokládané výsledky chápu, jen samotná *in vitro* regenerace netransgenních rostlin je obtížná, zejména metodou somatické embryogeneze z listových explantátů. Předložená práce splňuje všechny podmínky kladené na diplomovou práci. Autorka prokázala znalost oboru, schopnost uvažovat tvůrčím způsobem i adekvátním způsobem výsledky zpracovat, okomentovat a shrnout. Práci považuji za zdařilou, doporučuji ji k obhajobě a navrhuji známku 1.

V Průhonicích dne 9.5.2011


RNDr. Hana Vejsadová, CSc.