



Posudek na magisterskou práci Dagmar Huckové – Genetic engineering of *psbA* gene in *Nicotiana tabacum*

Magisterská práce Dagmar Huckové se zabývá přípravou mutantní linie tabáku, který exprimuje modifikovanou verzi podjednotky D1 fotosystému II (PSII). Práce je založená na předchozích výsledcích získaných pomocí modelové sinice *Synechocystis* PCC 6803, které prokázaly vyšší termostabilitu PSII po záměně dvou aminokyselin v sekvenci proteinu D1. Cílem magisterské práce bylo pozměnit tyto aminokyseliny také u vyšších rostlin (konkrétně tabáku), a jak předpokládám, získat tak rostliny potencionálně odolnější proti teplotnímu stresu.

Celá práce je napsána velmi slušnou angličtinou, a ačkoli jsou některé obraty trochu nešikovné (např. *D1 protein is under constant highly oxidative stress..* a podobně), práce se čte velmi dobře. V literárním přehledu autorka čtenáře krátce seznámí s fotosyntézou a problematikou poškození a opravy PSII, a následně s metodikou transformace plastidové DNA rostlin. V této části mi chybí uvedení do problematiky tepelného stresu u rostlin - čtenář by měl pochopit, proč je vůbec potřebné podobné rostliny konstruovat. Příprava transgenních rostlin trvá roky, takže by mělo být zcela zjevné, co je vědeckou motivací k zahájení takového to projektu. Také problematika termostability PSII je zmíněna pouze okrajově (práce o bakteriálních reakčních centrech zcela chybí). Pomohlo by například schéma reakčního centra PSII s vysvětlením, jaký je předpokládaný strukturní princip teplotní odolnosti PSII v případě mutací v D1.

Část Materiál a metody obsahuje velmi detailně zpracovanou metodiku, která může být užitečná jako "kuchařka" v laboratoři. To je jistě přínosné vzhledem k faktu, že transformace plastidové DNA pomocí homologní rekombinace není triviální. DNA konstrukt musí být korektně inkorporován a následně také segregován do všech kopií cpDNA a ověření tohoto procesu vyžaduje důkladné kontroly. Na druhou stranu, složení každé konkrétní PCR, opakované složení agarózového gelu a podobně působí až nadbytečně. Metodika neposkytuje žádnou informaci o indukci kalusu a o regeneraci rostlin (viz jeden z dotazů).

Vlastní výsledky jsou opět popsány velmi pečlivě a je třeba zdůraznit, že se autorce podařilo připravit homoplasmické linie tabáku nesoucí mutace v *psbA* genu, a tak splnit cíle své práce. Metodice přípravy linií nelze nic vytknout. Nicméně protože se jedná o čistě metodickou práci, ve výsledcích se opakují informace z M&M a diskuse je z části opět pouze popis konstrukce linií. U takto čistě metodické práce není překvapením, že je diskuse hodně limitovaná. Je škoda, že práce končí v momentě, kdy je dalším krokem experimentální práce s danými liniemi, což se jeví jako téma poutavější jak pro studenta, tak pro případné čtenáře. Nicméně chápu, že časová náročnost transformace tabáku příliš neumožňuje další experimentování v horizontu magisterského studia.

Magisterskou práci Dagmar Huckové považuji za solidní, postavenou na pořádné porci laboratorní práce. Z práce jasně vyplývá, že autorka zvládla pokročilé metody manipulace s DNA a transformaci tabáku. Chybí mi poněkud hlubší vhled a širší

perspektiva dané práce. **Doporučuji k obhajobě** s předběžným hodnocením **chvalitebně**.

K předložené práci mám několik dotazů:

Lze na základě literatury předpokládat, že manipulace s PSII opravdu povede k vyšší odolnosti rostlin na teplotní stres? Je známo, které procesy u vyšších rostlin jsou nejvíce náchylné na vysokou teplotu? Je fotosyntéza tím nejslabším článkem?

V citovaném článku Dinamarca et al., (2011 Plos One) je efekt mutací v D1 pozorovatelný pouze za uměle vysoké koncentrace CO₂ (1%). Očekáváte podobný efekt i u tabáku?

Existuje možnost, že se konstrukt integruje do jaderného genomu? Pokud ano, jak takovou situaci rozpoznat?

Jakou metodikou se indukoval kalus a regenerovaly rostliny?

Jsou již k dispozici alespoň předběžná data o fenotypu získaných mutantních linií tabáku?

Třeboň, 7.1. 2018

Doc. Ing. Roman Sobotka, PhD

