

## OPONENTSKÝ POSUDEK

Disertační práce: „Chemické metody studia strigolaktonů“

Autor: **Mgr. Rostislav Halouzka**

Mgr. Rostislav Halouzka se ve své disertační práci zabývá aplikací chemických, především analytických, metod ve studiu strigolaktonů (SL).

Obsahem práce byla následující témata:

Studium stability SL a mechanismus hydrolýzy syntetického analoga GR24, selekce vhodných biologických modelů pro studium SL, vývoj metod izolace a purifikace SL z rostlinného pletiva, vývoj UHPLC-MS/MS metodiky pro profilování SL a využití ambientních technik – DART a DESI. Mgr. Halouzka byl při vypracování své práce nucen překonat řadu překážek, především při výběru vhodného materiálu pro studium SL a optimalizaci metodik pro jejich analýzu. V průběhu práce prokázal značnou vytrvalost a houževnatost.

Těžištěm práce se stal výběr nejvhodnějšího protokolu pro izolaci a purifikaci SL z rostlinného pletiva, optimalizace metody UHPLC-MS/MS pro identifikaci SL u vybraných rostlinných modelů a ověření možností ambientních technik DART-HR-MS (přímá analýza v reálném čase) a DESI, která navíc přinesla důležitou informaci o lokalizaci sledovaných látek.

Úvod disertační práce je věnován přehledu problematiky SL – jejich struktuře a výskytu, metabolismu, transportu, signální dráze a fyziologickým funkcím a chemickým (přesnější by asi bylo „analytickým“) metodám jejich studia.

V experimentální části práce je popsána celá šíře používaných technik, včetně určení stability GR24 v kultivačních médiích a pufrch, syntézy reakčních produktů GR24 a vybraných nukleofilních látek a parametrů kultivace rostlinného materiálu. V další části jsou popsány metody přípravy a purifikace vzorků, chromatografické metody UHPLC-MS/MS a jejich optimalizace včetně metod HR-DART-Orbitrap a HR-DESI-Orbitrap.

Ve výsledcích je popsána stabilita SL, především GR24 v médiích, pufrch a rozpouštědlech, včetně nukleofilních reakcí a jejich monitorování pomocí UHPLC/MS-MS. Následuje výběr a kultivace biologického materiálu a metody přípravy vzorků – izolace a purifikace včetně srovnání různých izolačních protokolů. Další část je věnována optimalizaci detekce SL pomocí UHPLC-MS/MS a příklady využití metod HR-DART a HR-DESI. Zmíněn je i vliv SL na vývojové aspekty *A. thaliana*.

Disertace obsahuje sumarizující diskusi a závěr. Obsáhlý seznam literatury dokazuje velmi dobrou znalost sledované problematiky. Dodatek obsahuje dvě publikované prvoautorské publikace a

jednu dosud nepublikovanou (z celkem čtyř). Formální úprava disertační práce je výborná. Je napsána čtivou češtinou, s únosným množstvím překlepů.

K předložené práci mám několik dotazů a připomínek:

1) Na str. 16 uvádíte „Především se jedná o snahu připravit levný a komerčně dostupný analog, který bude vysoce efektivní v boji proti parazitickým rostlinám (Zwanenburg *et al.*, 2016)“. Jaké vlastnosti by měl takový analog vykazovat a který dosud popsany tyto vlastnosti nejlépe splňuje?

2) Str. 25 „sebevražedné klíčení“ jaké koncentrace SL je třeba použít a jaká by měla být stabilita použité látky?

3) Na str. 31 uvádíte „strukturní identifikace SL byla potvrzena pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR)“. Jedna metoda strukturní analýzy není obecně pokládána za dostačující pro identifikaci organických sloučenin. Jaké další metody byly použity?

4) Str. 37 jaký je uváděný detekční limit v případě DART?

5) Str. 45 „Tab. 12 Identifikace přirozeně se vyskytujících SL“ v tabulce je zahrnut i GR24.

6) Str. 46 „segmenty o velikosti asi 5 mm“. Jedná se o délku nebo průměr?

7) Str. 48 „Všechna měření chemické stability GR24 a jiných SL (5-deoxystrigol)“. Jde tedy o GR24 a 5-deoxystrigol nebo i o některé další SL?

8) Str. 49 „Pro izolaci a identifikaci jednotlivých komponentů reakční směsi posloužila chromatografie na tenké vrstvě (TLC)“. Jak byly látky identifikovány pomocí TLC? Jaké byly výtěžky reakcí a čistota izolovaných produktů?

9) Str. 49 které konkrétní produkty byly syntetizovány?

10) Str. 51 „Další testovaná plodina, kukuřice setá (*Zea mays* L), byla i přes poměrně rychlý růst nevyhovující kvůli absenci kanonických SL, jejichž standardy byly na pracovišti dostupné.“ Soudím že tato skutečnost byla známa již před zahájením experimentů.

11) Str. 54 „Nejvyšší citlivost společně s optimální separací analyzovaných složek poskytovala mobilní fáze C (Obr. 17).“ Jakou citlivost?

12) Str. 58 „Tab. 16 Analýza zastoupení SL v kořenových extraktech z vybraných rostlinných druhů pomocí UHPLC-MS/MS.“ V jakém množství byly SL identifikovány?

13) Str. 63 „Další použitou ambientní technikou byla HR-DESI-Orbitrap-MS, která byla použita pro detekci SL, ale hlavním záměrem použití bylo vytvoření 2D mapy prostorové distribuce SL v řezu stonku a kořene. „. Zde by bylo vhodné doplnit i případná omezení – citlivost a detekční limity.

14) Str. 66 jak byla provedena kalibrace spektrofotometrického stanovení koncentrace SL?

15) Str. 76 „Výhoda silikagelu je možnost frakcionace vzorku“. Vzorek lze frakcionovat i na C18.

16) Str. 81 Byly metodou DART a DESI identifikovány v totožném rostlinném materiálu stejné SL jako metodou UHPLC-MS/MS?

Závěr: Přes uvedené otázky pokládám předloženou práci za velmi dobrou, splňující všechny nezbytné požadavky a proto doporučuji, aby byla přijata k obhajobě.

Praha, 11. 11. 2020

Tomáš Vaněk

