

## Posudek oponenta na diplomovou práci

**Jméno oponenta:** Stanislav Vosolsobě

**Datum:** 27.8.2024

**Autor:** Zuzana Hudáková

**Název práce:**

Význam aminokyselin hubového původu pro metabolismus protokormov orchideí

The role of amino acids of fungal origin for the metabolism of orchid protocorms

**Cíle práce**

Porovnat vliv aminokyselin (Glu, Asp, Gly, Ala) a sacharosy na růst protokormů

*Dactylorhiza majalis*, monitorovat obsah škrobu a rozpustných sacharidů.

**Struktura (členění) práce**

Rozsah práce (počet stran): 82 (54 čistý text)

Je uveden anglický i český abstrakt a klíčová slova? ANO

**Formální úroveň práce** (obrazová dokumentace, grafika, text, seznam literatury)

Grafická úroveň práce je standardní, nebyly shledány zásadní nedostatky až na malé detaily (obsah není patkovým písmem, odsazení odstavce za názvem kapitoly se nedělá).

**Logická stavba a jazyková úroveň práce**

Logická stavba práce je dobrá, po jazykové stránce srozumitelně a jasně napsaná.

**Literární přehled:**

Literární přehled je pečlivě zpracovaný, zaujímá 16 stránek, je strukturován logicky, psán srozumitelně a popisuje problematiku biologie orchidejí z veliké šíře, což prokazuje dobrou erudici autorky, na druhou stranu to nebylo zcela nutné s ohledem na užší zaměření práce, kdy by na místo „orchideocentrického“ přístupu, mohl být zvolen přístup, který by například shrnoval relevanci příjmu aminokyselin napříč rostlinami. V práci se zdroji nebyly shledány nedostatky, pouze seznam cca stovky citací mohl být úsporněji formátován, aby nezabral 20 stran.

**Materiál a metody:**

Metodicky se jedná o poněkud užší práci, obsahuje pouze kultivaci a analýzu sacharidů, což je sice dostačující pro vypracování diplomové práce, nicméně je škoda, že není využíván potenciál moderních metod, které pracoviště nabízí, například širší metabolomika či transkriptomika, která je v současnosti možná díky existenci assembly genomu *D. majalis* (Wolfe, 2023). Použité metody jsou však popisovány velice podrobně, což je chválihodné z hlediska reprodukovatelnosti. Z didaktických důvodů mohla být volena poněkud kondenzovanější forma popisu odpovídající odborným publikacím, aby text nebyl jen replikací protokolu. Vedle popisu médií formou protokolu, by bylo žádoucí uvést také obsah látek v mol/L finálního média. Pokud jsem správně pochopil popis, bylo médium SMS vždy připraveno bez kaseinu, poté bych ho neuváděl v tabulce. Není zmíněna velikost Petriho misek, množství média na misku a počet replikací u každého výsevu. Ve výsledcích by byla vhodná fotodokumentace výsevů pro ilustraci efektivitu klíčení/klastrování protokormů (má vliv na rychlost růstu). Ve statistice není nikde zmiňována transformace dat předcházející výpočtu ANOVA, ačkoliv data mají výrazně nenormální distribuci. Alternativně mohla být použita metoda GLM s Gamma distribucí. Při aplikaci ANOVA bez transformace může být prezentovaná signifikance zcela nevěrohodná. V případě pokusu na Petriho miskách je záhodné vysít alespoň 3 misky/variantu a potom hodnotit pokus modelem se smíšenými efekty (LME/GLMM). V designu jsou pro všechny varianty používány stejné koncentrace aminokyselin a sacharosy, nicméně, pokud je přidán 1 mM glycinu, je dodáno 2 mM uhlíku, kdežto při stejné koncentraci sacharosy je v médiu 12 mM uhlíku, tudíž by bylo vhodné,

doplnit i kontrolu, kde vždy srovnatelný obsah uhlíku sacharidového původu, jako aminokyselinového (samozřejmě tím vyvstává zase problém s rozdílnou osmolaritou), a zároveň variantu, kde je sacharosa a anorganický dusík, neboť v média jsou ve výchozím stavu zcela bez dusíku, tudíž nelze odlišit vliv aminokyseliny a samotného vlivu dodání dusíku.

#### **Experimentální část:**

Výsledkové kapitoly začínají konstatováním statistické významnosti, lepší by bylo jednou větou uvést design daného experimentu. Kapitoly vyššího řádu nejsou komentovány vůbec. Tvzení „Rozdiely medzi jednotlivými variantami boli štatisticky preukazné metódou ANOVA ( $F[3,1360] = 421.3, \alpha = <2 \times 10^{-16}$ )“ není korektní, protože ANOVA prokáže odlišnost alespoň jedné varianty. Signifikanci doporučuji vyjádřit jako „ $p =$ “, nikoliv „ $\alpha =$ “, všechny statistické veličiny by měly být kurzivně. Výsledek statistiky by měl být uvedený zejména přímo v popisku grafu a zde chybí zmínka o počtu změřených objektů/opakování. Dále bych doporučoval použití moderního stylu nadpisů kapitol (např. „Kasein stimuluje růst, zejména v kombinaci se sacharosou“). U pokusu, kde je sledován růst na glutamátu, bych neporovnával jednotlivé varianty prostřednictvím TukeyHSD (z toho nelze rozumně nic vyvodit, zejména při nenormální distribuci dat), ale fitoval bych růst v závislosti na (logaritmované) koncentraci a testoval bych celkovou signifikanci faktoru. Taktéž není diskutována interakce obou faktorů, což může být to nejzákladnější. A výsledkem statistiky není jen signifikance, ale i predikce síly efektu, která by měla být taktéž prezentována (např. přidavek sacharosy zvyšuje růst  $1.3 \pm 0.2$ -krát/mM). Velice zajímavé by také bylo statisticky vyhodnotit jednotlivé aminokyseliny mezi sebou a taktéž kontrolní sacharosové varianty napříč experimenty, což by ukázalo variabilitu mezi experimenty (pozitivně hodnotím, že samostatná kontrola jen se sacharosou byla vykonána v každém pokusu).

#### **Diskuze:**

Poněvadž ve výsledkové části byly separátně prezentovány tři související výsledky (tedy efekt aminokyseliny na růst, obsah sacharidů i škrobu), pro diskuzi bych viděl jako vhodné, interpretovat výsledky zároveň. Tím by se zlepšila vypovídající hodnota diskuze. Kapitola „Prenos uhlíka v orchideoidnej mykorhíze“ obsahuje informace, které by mohly být v literárním přehledu a zároveň zbytečně opakuje tvrzení z předchozí části diskuze a místo dvou částí diskuze mohlo být vše diskutováno společně.

#### **Závěry (Souhrn):**

Závěry jsou formulovány výstižně s oporou v získaných datech.

#### **Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Práce jednoznačně splnila zadání a přinesla velice hodnotné výsledky k porovnání efektu vybraných aminokyselin. Výsledky hodnotím jako extrémně zajímavé, jejich význam je možná až nedostatečně vyzdvížen v práci samotné. Zejména zjištění, že alanin a glycin nemají generálně příznivý efekt na růst protokormů, který se dokonce v případě glycinu projeví v interakci s přidáním sacharosy a u alaninu je dokonce samotný přidavek aminokyseliny inhibiční, pokud není kompenzován přídavkem sacharosy. Celkově práci hodnotím „velmi dobře“, přičemž nedostatky práce, na které upozorňuji, nevedou k tomu, že by práce negativně vybočovala z dobrého standardu prací v oboru, spíše bych rád poukázal na rezervy, které chybí práci k dokonalosti a plnému využití potenciálu, který zkoumaný systém nabízí.

#### **Otázky a připomínky oponenta (povinná část posudku):**

- U glycinu a alaninu lze vysledovat až inhibiční efekt s rostoucí koncentrací oproti glutamátu a aspartátu. Existuje pro to vysvětlení, případně obdobné výsledky u rostlin s dobře popsaným metabolismem (*Arabidopsis*, *Solanum* apod.)?
- Je patrná určitá korelace mezi inhibičními efekty aminokyseliny a akumulací škrobu.

Lze to vysvětlit například generálním stresem, který by vedl k akumulaci škrobu?

- Proč byl k úpravě pH používán NaOH a nikoliv KOH, jak je v rostlinných médiích běžné?
- Jaká koncentrace sacharosy byla naměřena při kontrolním HPLC v rámci kaseinového experimentu? (Je detekovatelný úbytek v důsledku růstu protokormů?)
- Proč je při filtraci HPLC vzorků vyplachována stříkačka a nikoliv použita nová? Při ceně ~ 1 Kč/kus u 2 ml lékařské stříkačky (a ~ 30-75 Kč u filtru) by dávala recyklace smysl jen při použití speciální stříkačky, ale to není specifikováno.
- Jaký je důvod čtyřminutové sterilizace EtOH? Jsou publikovány protokoly s dobou < 1 min.
- Jakými příkazy byla vykonávána dvoufaktorová ANOVA v R? Jak byla hodnocena signifikance jednotlivých efektů? Pro účely DP bych doporučoval uvést kompletní skript statistické analýzy, jednak z důvodu oponentury, dále z didaktických důvodů pro studenty, které budou z práce čerpat (pozn. zejména jako podnět pro oborovou radu, nikoliv pro studentku).

**Návrh hodnocení oponenta** (prosím zaškrtněte X)

výborně (1)    velmi dobře (2)    dobře (3)    nevyhověl/a (4)

Podpis oponenta: