

## Posudek na doktorskou práci Mgr. Jitky Jezberové

*Phenotypic diversity and phylogeny of picocyanobacteria in mesotrophic and eutrophic freshwater reservoirs investigated by a cultivation-dependent polyphasic approach*

Práce Mgr. Jezberové se zabývá detailní charakterizací izolátů pikosinic pocházejících z různých sladkovodních reservoirů. Spolu s fenotypickým popisem využívá autorka k charakterizaci kmenů též molekulárních metod. Fyziologie získaných izolátů je studována především se zaměřením na změny morfologie buněk a tvorbu shluků buněk, sloužících pravděpodobně jako ochrana před zvýšeným predáčním tlakem.

Podaná práce má 76 stran, z čehož 17 stran zabírá stručný úvod následovaný čtyřmi příloženými publikacemi. První příložená práce (Jezberová a Komárková, *Hydrobiologia, přijato k publikaci*) se zabývá změnami v morfologii tří izolátů sladkovodních pikosinic v závislosti na kultivačních podmínkách. Velikost buněk byla ovlivněna především složením kultivačního média a teplotou, kdežto ozáření měla vliv pouze u jednoho kmene. Druhý článek (Jezberová, sborník *Reservoir limnology and water quality, 2006*) pojednává o schopnosti tří vybraných kmenů planktonních sinic vytvářet shluky buněk jako možnou obranu proti predáčnímu tlaku heterotrofních nanoflagelátů rodu *Ochromonas*. Dva ze studovaných kmenů reagovaly na přítomnost predátorů výraznou tvorbou kolonií. Třetí kmen tvořil kolonie i v nepřítomnosti nanoflagelátů, jejich přítomnost ovšem ovlivnila jejich velikost a strukturu. Třetí publikace (Jezberová a Komárková, *podáno k publikaci*) popisuje přítomnost zvláštních ostnů na povrchu sladkovodní sinice *Cyanobium* sp. 0NR35S02. Tvorba ostnů je zřejmě vyvolána predáčním tlakem nanoflageláta *Ochromonas*. Spolu s tvorbou ostnů dochází též k tvorbě shluků buněk. Poslední nejrozsáhlejší práce (Jezberová a kolektiv, *v přípravě*) se zabývá genetickou charakterizací množství sladkovodních sinicových izolátů náležejících do skupiny *Cyanobium-Synechococcus*. Analýza odhalila 6 nových podskupin, z nichž se 5 vyznačovalo tvorbou kolonií. K detailnější analýze příbuzných druhů byla využita metoda ARDRA, která poskytla detailnější rozlišení blízce příbuzných druhů, které není možné postihnout na základě sekvence 16S rDNA.

Předložená práce je kvalitní, jednotlivé části práce spolu logicky souvisí. První tři části pojednávají především o morfologické variabilitě studovaných kmenů, jež je ovlivněna vnějšími podmínkami jako jsou množství živin, růstová teplota či přítomnost predátorů. Jelikož značná morfologická plasticita studovaných organismů komplikuje taxonomické zařazení jednotlivých kmenů, využití molekulárních metod v poslední části práce je zcela logickým krokem. Pozitivem předložené práce je fakt, že je téměř kompletně dílem hlavní autorky s pouze malým příspěvkem ostatních spoluautorů. S přihlédnutím k tomuto faktu je rozsah práce poměrně značný.

Přes výše zmíněná pozitiva musím předložené práci vytknout některé nedostatky a položit několik otázek:

Jistou slabinou práce je, že její části, s výjimkou sborníkového příspěvku, dosud nebyly publikovány. Článek I je v současné době přijat do tisku čímž došlo k formálnímu naplnění publikačních požadavků na doktorskou práci. Článek III byl podán do časopisu *Environmental Microbiology*, není ovšem dosud přijat. Poslední článek je pouze v rukopisu.

## Úvod

Domnívám se, že si tato část zasloužila trochu větší pozornost. Napomohlo by to čtenáři k lepší orientaci v textu a řešené problematice. Úvod je evidentně okopírován z článku IV a narychlo „přešit“, ale na kvalitě je to znát. Část o agregaci a fotosyntetických pigmentech je pouze lehce „nahozena“, taxonomická část je poněkud lepší.

... Pcy have minor or negligible influence on global production .... Autorka měla zřejmě na mysli produkci určitého ekosystému, nikoliv globální produkci (celé planety), ta je naopak značná.

Pcy usually exhibit two or three maxima during the season. Toto platí pouze pro „naše“ podmínky, nikoliv univerzálně.

## Článek I.

Proč nebyly pro kultivaci použity i vyšší intenzity světla než  $50 \text{ umol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ?

Tvorba filament u kmene 1 a 3 byla pozorována pouze při jedné teplotě (28°C). Proč nebyly vyzkoušeny i jiné teploty?

Proč nebyl vliv živin testován spíše v chemostatových kulturách? Vsádkové kultury ve stacionární fázi růstu mají pouze obtížně reprodukovatelnou fyziologii.

Smysl úvodu diskuse je nejasný:

„Our results indicate cytomorphological differences among the strains. Despite similar morphology under common culture conditions strains were found to be different.“

Jistou slabinou článku je, že není k dispozici genetická afilace použitých kmenů na základě 16S rDNA. To nutí autorku k nejasným prohlášením typu: „... in spite of similar cell morphology (of two presumably *Synechococcus* strains) and thus identical taxonomic classification, these two strains differed in many other features making it disputable as to whether they are genetically identical.“

Článek II.

Na základě čeho byly zvoleny pokusné organismy? Jsou výsledky reprezentativní i pro ostatní příbuzné kmény?

Text vyvolává dojem, že tvorba shluků byla poměrně rychlá („When *Ochromonas* sp. was added, cells aggregated in large colonies.“). Pouze při podrobném studiu Metod čtenář zjistí, že kultivace trvala měsíc. Po jaké době se objevily shluky?

Článek III.

Jak častá je tvorba ostnů u pikosiníc v přírodních podmínkách? Z textu se zdá, že dosud nebyla pozorována. Nakolik je pozorovaný jev významný v přírodě?

Domnívám se, že odstavec o tvorbě ostnů u bakterií náleží spíše do diskuse. Je zbytečné prozrazovat pointu už v úvodu.

Článek IV.

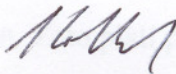
Fylogenetické stromy na obrázcích 8 a 9 dokládají velmi těsnou příbuznost vyzolovaných kmenů. Obrázek 8 napovídá, že jednotlivé izoláty se nelišily v 16S rDNA sekvenci o více než o 2%. To by odpovídalo různým kmenům v zásadě stejného druhu. Zajímavá je i poměrně těsná blízkost rodu *Cyanobium* a mořských zástupců rodu

*Synechococcus*. Rozdíly v 16S sekvencích klastru *Cyanobium gracile* jsou naprosto zanedbatelné a představují spíše sekvenační chybu než skutečný rozdíl. Podobně je tomu například u Colonial cluster 3 (*Aphanothece*). Je taková těsná příbuznost dána tím, že tento druh je ekologicky významný a proto je často izolován a nebo je spíše důsledkem izolační procedury (snadno izolovatelný druh)? Je škoda, že autorka nevyužila nashromážděná data k nějakému zásadnějšímu prohlášení ohledně taxonomie pikosinic. Například z textu sice vyplývá, že autorka nepovažuje tvorbu shluků za významný taxonomický znak, ale logický závěr, jakým by bylo odmítnutí některých rodových jmen, není učiněn. V textu postrádám referenční čísla pro nalezení získaných sekvencí v GenBanku (u cizích izolátů jsou čísla obvykle uvedena).

Text podané práce obsahuje některé gramatické chyby a překlepy, které by jistě bylo možné odstranit pečlivější kontrolou finálního textu. Kvalita reprodukováných obrázků je nízká. Je škoda, že autorka nevyužila možnosti vložit do práce kvalitní reprodukce mikroskopických snímků, které by čtenáři umožnily získat lepší informaci o studovaných objektech.

Ve shrnutí, práce Jitky Jezberové přináší nové důležité vědecké výsledky a potvrzuje její schopnost samostatné vědecké práce. Práce zcela splňuje nároky na doktorskou práci kladené na BF JČU. Nepochybuji, že si Mgr. Jitka Jezberová udělení titulu *Doctor of Philosophy Ph.D.* plně zaslouží.

Třeboň 7. listopadu 2006



Mgr. Michal Koblížek PhD.

Mikrobiologický ústav AV ČR

Opatovický mlýn

379 81 Třeboň

Posudek na práci:

JEZBEROVÁ, J. (2006): Phenotypic diversity and phylogeny of picocyanobacteria in mesotrophic and eutrophic freshwater reservoirs investigated by a cultivation-dependent polyphasic approach. – PhD disertace, Jihočeská univerzita v Č.Budějovicích, Biologická fakulta, 76pp.

**Téma práce:** Je aktuální a nepochybně atraktivní, pikoplanktonní sinice a řasy se od svého objevu postupně staly vděčným tématem studií. Jejich význam je nepochybný, v mořích i sladkých vodách hrají tyto velikostí nepatrné organismy mnohdy důležitou roli v primární produkci. Problém je s jejich určováním protože morfologické znaky jsou jen omezeně použitelné. Práce nesporně přispívá k jejich dalšímu poznání.

**Metodika:** Je založena na izolacích a kultivačních experimentech, molekulárně-biologických testech příbuznosti, cytomorfolonii pod světelným i elektronovým mikroskopem, zhodnocení ekologie a následné zpracování komplexním, polyfázickým přístupem. To je asi nejmodernější co lze v současné době v této problematice použít.

**Výsledky:** Disertace je založena na 4 publikacích z nichž jedna již vyšla, jedna je v tisku, jedna přijata a jedna připravena v rukopise. Jedna publikace je rozšířený abstrakt z konference. Výsledky jsou založeny na rozsáhlých souborech dat, např. přes 100 izolátů bylo zpracováno a vyhodnoceno v poslední práci. Metody i zpracování dat jsou na odpovídající světové úrovni.

Formální zpracování disertační práce je velmi dobré, je logicky členěna a velmi pěkně graficky zpracována.

**Závěr:** Předložená disertace splňuje všechny požadavky na PhD práci, rád doporučuji její přijetí.

RNDr. Jaromír Lukavský CSc.

Botanický ústav AVČR, Úsek ekologie rostlin, Dukelská 135, CZ-379 82 Třeboň.



**Jitka Jezberová: Phenotypic diversity and phylogeny of picocyanobacteria in mesotrophic and eutrophic freshwater reservoirs investigated by a cultivation – dependent polyphasic approach. – 76 pp., 2006.**

Předloženo na Biologické fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (Katedra ekologie).

Tato anglicky psaná disertační práce obsahuje soubor 4 studií z nichž jedna byla přijata k publikaci v impaktovaném odborném časopisu „Hydrobiologia“, čímž byla splněna základní publikační podmínka pro obhajobu PhD disertace. Jitka Jezberová je v této práci první autorka, jako jediná spoluautorka je uvedena vedoucí práce, J. Komárková. Z ostatních prací v souboru je jeden rozšířený abstrakt vyšlý ve sborníku mezinárodní konference „Reservoir Limnology and Water Quality“ v roce 2006 (jehož je Jitka jedinou autorkou) a dále dvě práce zadané nebo připravované do tisku. Tyto dva rukopisy jsou navrženy do prestižních časopisů a existuje předpoklad jejich přijetí bez komplikací. Všechny čtyři studie mají nesporně velmi dobrou kvalitu a přinášejí významné nové vědecké poznatky. I u těchto dalších prací je J. Jezberová první autorkou a všechny se týkají úzce zadaného tématu. Mohu tedy konstatovat, že ve svém souboru publikací splnila autorka zadané cíle své doktorské práce. Celý soubor je uveden sedmi-stránkovým anglicky psaným souhrnem hlavních výsledků. Práce i zmíněná „Introduction“ jsou psané v dobré angličtině. Autorka se nevyvarovala jen několika drobných chyb (vesměs se zřejmě jedná o překlepy, které již nestihla opravit).

Ve svém posudku nechci opakovat hlavní these ani výsledky práce. Předpokládám také, že všechny rukopisy prošli recenzním řízením a byly tedy podrobeny kritice a hodnocení různými specialisty. Pokládám všechny výsledky za velice přínosné k hodnocení diverzity pico-cyanobakterií a nebudu je tedy detailně rozebírat. Přinášejí cenné poznatky o genetické i fenotypové diverzitě studovaných kultur pico-cyanobakteriálních kmenů, o jejich biologii a ekologii. Práce o příčinách shlukování buněk do charakteristických kolonií jsou zejména přínosné a užitečné pro další studie v tomto směru. Proto se omezím jen na několik zásadních problémů doplněných několika otázkami na autorku, z jejich zodpovězení by mělo vyplynout zvládnutí celé problematiky.

Shrnující úvod je hodně stručný. Nejsou v něm žádné chyby, ale pokud by to měla být zkrácená rešerše jak je v podobných případech zvykem, pak autorka hodně informací opomenula. Zejména bych očekával podrobnější zpracování odstavce „Diversity and occurrence“, který neobsahuje o diverzitě skoro žádné informace. Např. i když se práce samozřejmě týkala sladkovodních středoevropských vodních nádrží, mohly být zmíněny výsledky z četných prací např. o mořském pikoplanktonu. V celé práci se autorka téměř nezmiňuje o oceánickém, ale velmi důležitém pikoplanktonním rodu *Prochlorococcus*, dnes již prokazatelně řazeném mezi pikoplanktonní sinice. Srovnání jeho biologie se sladkovodními typy by bylo potřebné, třeba právě v otázce diskutované agregace buněk.

Druhý odstavec autorčina „Summary“ je poněkud nejasně formulovaný. Nerozumím zejména větám opírajícím se o citace Ernstové a jejich spolupracovníků (2003). Autorka píše, že „almost all isolates [rozumí se jejich] belonged to the large *Cyanobium* – marine *Synechococcus* – *Prochlorococcus* group“ a v dalším textu poněkud nejasně diskutuje různé skupiny na mnoha úrovních. Problematika jednotlivých a různě charakterizovaných skupin (clusters) a jejich morfologie s libovolným používáním tradičních rodových jmen a s doslovnou džunglí různých kmenových označení, je dosti nepřehledná. Zcela stejný charakter má i stromeček (Fig. 9) z práce číslo IV (str. 68), kde v označení jednotlivých jednotek existuje značná nejednotnost. Z analýzy stromečku v diskusi (str. 66-73) převažují spíše další

problémy než řešení. Nechci to autorce příliš vytykat, protože stejná situace existuje v odborné literatuře o klasifikaci sinic všeobecně. Právě proto ale je třeba se o této otázce zmínit a z této situace také vyplývají moje otázky:

1) Jakákoliv taxonomická klasifikace je vlastně metoda k porozumění diverzity určité skupiny organismů. Jaká kritéria by tedy podle autorčiných zkušeností měla být použita ke klasifikaci těchto fenotypově jednoduchých pikoplanktonních sinic?

A z toho plyne celá řada dalších otázek:

2) V poslední době se u cyanobakterií všeobecně propaguje tzv. polyfazický přístup k taxonomickému hodnocení. Tento termín má autorka i v názvu své dizertace. Co to tedy znamená u této skupiny cyanobakterií?

3) I nejavantgardnější autoři se nemohou vyhnout používání tradičních vědeckých jmen, v čemž už existuje v literatuře neúnosný zmatek, protože jednou použité jméno pro daný kmen je tvrdošijně používáno i nadále, i když se zjistí, že bylo původně aplikováno chybně. Co si autorka myslí o řešení tohoto problému? A co s označováním kmenů, ve kterém existuje už nyní spousta různých způsobů, synonymních symbolů a omylů?

Vrátíme se ale k vlastní problematice práce. Jednou ze závažných otázek, kterým se autorka věnovala, je střídání fáze, kdy drobné cyanobakteriální buňky žijí jednotlivě a tvoří pikoplanktonní společenstvo a za jakých podmínek se shlukují do kolonií. Je to jedno z hlavních řešených témat. Velmi cenný je autorčin důkaz, že tvoření kolonií je do značné míry podmíněno predačním tlakem mikroskopických heterotrofů. Všeobecně panuje názor, že existují pikoplanktonní sinice, které se nikdy do kolonií neshlukují, jiné, u nichž je střídání koloniální a jednobuněčné formy součástí životního cyklu a konečně typy, které se shlukují vlivem vnějších podmínek. Je tomu opravdu tak? Je mi jasné, že autorka nemůže tuto problematiku vyřešit beze zbytku, ale přesto s tím je spojeno několik dalších otázek:

4) Domnívá se autorka, že skutečně se mohou některé pikoplanktonní sinice vyskytovat trvale jen jako solitární buňky? Pokud ano, čím by to bylo způsobeno?

5) Existují typy u nichž je sdružování do kolonií pravidelnou součástí životního cyklu bez ohledu na vnější podmínky? Nebo toto shlukování je závislé jen na vnějších okolnostech?

6) V tradiční taxonomii drobnobuněčných planktonních koloniálních sinic je považována schopnost tvoření určitého typu kolonií za genotypově stabilní. Je tomu tak? Pokládá autorka na základě svých dosavadních zkušeností strukturu kolonií za oprávněnou pro takové rody se specifickým typem kolonií jako je např. *Cyanodictyon*, *Cyanonephron*, *Epigloeosphaera*, *Aphanothece* subg. *Anathece* a další, a příslušný tvar kolonií za geneticky fixovaný znak? Napovídá její práce číslo II (str. 33-36), že tomu tak skutečně je?

7) Je známo, že právě koloniální typy, které se převedou do kultury, se většinou rozpadnou a charakteristický tvar kolonií se ztrácí. Jaké má autorka zkušenosti, že tento charakteristický tvar je možno v kulturách navodit? Má autorka zkušenosti, že existuje v tomto znaku určitá variabilita? Je tedy určitý typ kolonií stálý pro jednotlivé kmény nebo druhy?

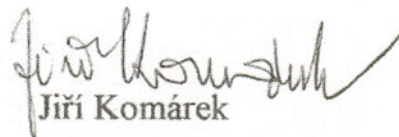
V souvislosti s tím je významný fenomén produkce slizových obalů. K této problematice přispěla autorka důležitým zjištěním tvorby slizových sloupečků (které poněkud nevhodně nazývá „spinae“) u jednoho kmene z rodu *Cyanobium*. Tento fakt je jistě zajímavý, samozřejmě však vyvolává řadu otázek o frekvenci tohoto fenoménu u jiných typů, jeho závislosti právě na predačním tlaku a řadu dalších. Doufám, že autorka se ke studiu těchto otázek dostane v budoucnu. Nicméně alespoň dva dotazy:

- 8) U rodu *Cyanobium* se předpokládá pouze úzký slizový obal a vytváření takových útvarů, jaké popisuje autorka je v rozporu ve srovnání s ultrastrukturou typového *C. gracile*. Proč je tedy kmen 0NR35S02 pokládán za *Cyanobium*, když ve stromečku na straně 68 nezapadá do skupiny (cluster) „*Cyanobium*“, naopak do „colonial cluster 1 (A3)“?
- 9) Z autorčiny práce vyplývá, že primární rozlišení a hlavní diakritické znaky rodu *Cyanobium* a *Synechococcus* jsou velmi diskutabilní. Přesto z molekulárního hodnocení vyplývá celá řada skupin, které by mohly být podle bakteriologických kritérií hodnoceny jako různé taxony na generické úrovni. Jaký je autorčin názor na další vývoj taxonomie těchto rodů (celé skupiny typů), jaké metodiky a jaká kritéria by zde měla být uplatněna?

Samozřejmě podobných otázek by byla celá řada (charakteristika dalších skupin – clusters na rodové úrovni, funkce ekologie při vymezení jednotlivých taxonů, atd.). Ale diskuse kolem nich by byla při této příležitosti přebytná. Zajímaly by mne sice autorčiny názory na tyto aktuální problémy cyanobakteriální taxonomie, ale je mi jasné, že by tato diskuse měla spíše seminární charakter a že by na ně autorka v současné době ani vyhraněný názor mít nemohla. Pro prokázání autorčiny vědecké způsobilosti, o které nepochybuji, jistě postačí zodpovězení výše uvedených otázek. Pokládám tento způsob za přijatelnější než pitvání jednotlivých drobných nedostatků.

**Závěr:** Disertační práce Jitky Jezberové má po stránce tématické, metodické i výsledkové velmi dobrou úroveň. Autorka prokázala schopnost vědecky pracovat a splnila všechna kritéria, která jsou k obhajobě PhD disertace požadována. Její práce přináší řadu nových poznatků a je přínosem v daném vědním oboru, konkrétně při hodnocení diverzity a ekologie obtížné skupiny pikoplanktonních cyanobakterií. Proto doporučuji přijetí jejich tézí jako podklad k udělení titulu PhD a to s nejlepším hodnocením.

V Třeboni, 10.11.2006

  
Jiří Komárek