

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci:  
Kasalický Vojtěch (2006): Denní změny fotosyntetické aktivity rozsivky  
*Thalassiosira weissflogii* : vliv dynamického světelného režimu a limitace dusíkem.  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Biologická fakulta

Magisterská diplomová práce má 71 stran, nečíslovaný obsah a 4 přílohy, které obsahují publikované práce (Šetlíková et al. 2005, *Photosynthesis Res.* 84:113 a Vredenberg et al. 2006, *BBA* 1757:173) a 2 postery z konferencí (X.. Dni fyziologie rostlin, Bratislava 2004 a 13th International Congress on Photosynthesis, Montreal, Canada 2004), kde je diplomant spoluautorem. Jak publikované práce, tak postery obsahují výsledky, které nejsou použité ve vlastní diplomové práci, ale mají s ní společné metodické přístupy ke studiu fotosyntézy. Práce obsahuje 2 tabulky, 14 obrázků (v kapitolách 2 – 4), 17 grafů (kapitola 5 Výsledky a diskuse), celkem cituje 126 literárních odkazů a 2 www stránky, je doplněna přehledem zkratk (kapitola 8).

Práce má standardní členění. Krátké „Shrnutí“ (kapitola 1) je úvodní informací o předmětu práce a metodických přístupech, „Úvod“ (kapitola 2) je zpracován jako rozsáhle pojatý (na 23 stranách) přehled, reflektující všechny důležité věcné okruhy řešené problematiky a metodické přístupy. Autor přehledně a logickým sledu vysvětluje všechny pojmy nezbytné pro pochopení vlastních výsledků i pro čtenáře, který nemá zkušenost s řešenou problematikou. Současně autor výběrem citací prokázal, že se výborně orientuje v rozsáhlé literatuře, je schopen ji kriticky posoudit a zpracovat jako review. Tuto část práce považuji za velmi zdařilou a přínosnou.

Autor formuloval následující cíle práce v krátké samostatné kapitole 3:

- sledování fotosyntetické aktivity řas v proměnném světelném režimu
- studium vlivu nedostatku dusíku na mořskou rozsivku *Thalassiosira weissflogii*

Kapitola 4 „Metody“ obsahuje stručný popis organizace experimentů, a použitých metod při hodnocení kultivovaných populací rozsivek. Podrobněji se autor věnuje popisu měření variabilní fluorescence a thermoluminiscence. Informace o klíčových metodách použitých pro sledování diurnálních změn fotosyntetických parametrů svědčí o tom, že autor zvládl tyto moderní metody a jejich instrumentaci.

V kapitole 5 „Výsledky a diskuse“ jsou presentovány výsledky rozsáhlého experimentu, který byl pečlivě naplánován a jehož provedení svědčí o vysoké profesionalitě. Výsledky spolehlivě ukazují průkazné denní rytmy v koncentraci pigmentů v buňce, aktivitě fotosystému II, maximální fotochemické účinnosti, kinetice reoxidace primárního akceptoru  $Q_A$ , maximální rychlosti fixace  $CO_2$ , fotoaklimaci buněk. Výsledky měření thermoluminiscence ukazují také výrazné pravidelné diurnální změny, a tyto výsledky lze považovat za originální přínos diplomanta. Porovnáním výsledků těchto moderních neinvazivních metod lze získávat mozaiku informací o stavu fotosyntetických procesů na různých „místech“ jako je vlastní zachycení světla, aktivita PSII a procesy při elektronovém transportu. Výsledky ukazují, jednak rozsah změn, které lze očekávat v rámci běžných podmínek denního světelného režimu, jednak ukazují na možný rozsah aklimačních a fotoadaptačních procesů. Vzájemná souvislost měřených parametrů poskytuje podrobnou informaci o příčinách a mechanismech tzv. „polední deprese fotosyntézy“. Tento jev je znám desítky let jak pro přírodní populace, tak z experimentů, a byl dříve zjednodušeně přičítán fotoinhibici. Dnes je zřejmé, že se jedná řadu vzájemně souvisejících procesů, které umožňují optimalizovat produkční procesy a ochranu fotosyntetického aparátu. Tomu odpovídají i zjištěné kovariance mezi sklonem P-I křivky ( $\alpha$ ) a maximální rychlostí fotosyntézy ( $P_{max}^b$ ).

Druhou sérii významných výsledků přineslo srovnání kultur limitovaných dusíkem a kultur v dostatečné koncentraci dusičnanů. Limitace dusíku se projevila především v parametrech jako je velikost buněk, v buněčném obsahu (i hustotě) uhlíku, dusíku, pigmentů. Pokud se



týká dynamických charakteristik, limitovaná kultura se chovala zpravidla podobně, jen v některých případech (např. obsah chlorofylu) nebyly pozorovány diurnální cykly. Zajímavé je zjištění, že maximální rychlost fotosyntézy normalizovaná na chlorofyl  $P_{\max}^b$  byla stejná pro limitovanou i nelimitovanou kulturu. Celkově lze říci, že dusíkem limitovaná kultura vykazovala nižší rozsah pozorovaných diurnálních cyklů a byla náchylnější k fotoinhibici.

Tyto znalosti jsou nezbytné pro pochopení produkčních procesů jak v oceánech, tak ve sladkých vodách, a pro interpretaci druhového složení fytoplanktonu a jeho vztahu k proměnlivým podmínkám vodního prostředí.

Třetí skupina výsledků experimentu ukazuje na endogenní cykly, které lze předpokládat, pokud diurnální změny zůstanou zachované i po převedení kultury na kontinuální osvětlení. Zatímco oscilace v parametrech buněčného složení (obsah C, N, pigmentů) v podstatě ustaly, dynamické parametry zejména fotochemická účinnost PSII, reoxidace  $Q_A$  a zejména thermoluminiscence si zachovaly periodické změny obdobné těm, které probíhaly v režimu střídání světla a tmy.

Celkově lze říci, že výsledky jsou zpracovány velmi pečlivě a systematicky. Jednotlivé výstupy experimentu jsou jednotně graficky presentovány, což přispívá k přehledné presentaci velkého objemu dat a poznatků. Hlavní zjištění jsou konfrontovány s relevantními výsledky především v současné literatuře.

Závěry práce jsou uvedeny stručně v kapitole 6, jednoduchým konstatováním jaké pravidelné denní rytmy byly zjištěny, že limitované a nelimitované kultury se v chování příliš nelišily a že metodou variabilní fluorescence se nepodařilo prokázat limitaci dusíkem.

Celkově lze konstatovat, že Vojtěch Kasalický předložil výbornou práci, profesionálně zpracovanou jak po odborné stránce, tak z hlediska formálního vybavení. Také příložené publikace a postery jednoznačně potvrzují, že zvládl zásady vědecké práce a je schopen pracovat v týmu. Přípomínky, které k jeho diplomové práci mám, ani v nejmenším, nesnižují vysokou úroveň jeho studie.

#### 1. Formální nepřesnosti, nepřesné formulace:

str. 3: věta „Jako součást fytoplanktonu se vyskytují také ve sladkých vodách, kde mohou tvořit nepřehlédnutelné nárosty na ponořených rostlinách“. *To by znamenalo, že planktonní druhy rozsivek tvoří nárosty – nárosty tvoří zpravidla jiné druhy než jsou planktonní rozsivky.*

str. 27: *chybně jednotky pro vypočtený chlorofyl z HPLC „ $\text{mgC}\cdot\text{m}^{-3}$ “ má být  $\text{mgChl}$  a  $\cdot\text{m}^{-3}$  a*

str. 31: *chybně číslována „Tabulka 1“ která je vlastně součástí popisu obr. 14*

str. 33: *patrně záměna v popisu křivek v dolní části grafu a chybí označení (a,b v grafech). Větší buňky by měly být kontrolní tj. světlé křivky*

str. 35: *chybný odkaz místo „Graf 2b“ má být Graf 3*

str. 55: *chybně „obrněnek (Cryptophyceae)“ obrněnky jsou Dinophyceae, Cryptophyceae jsou česky uváděné jako skrytěnky*

str. 57: *chybný odkaz místo „Graf 12“ má být Graf 17*

nepřesnosti v citování literatury –



- str 16: Platt a spol. (1976) – *chybí v seznamu literatury*
- str. 28 Genty a spol. (1989) – *chybí v seznamu literatury*
- *několikrát jsem zaznamenal v textu nepřesné citace např. místo uvedení dvou autorů práce (jak je v seznamu literatury) použití formátu „ autor a spol“ – to vede k pochybnostem zda jaká práce je citována, str. 3 (Ryamond) str. 14(Kolber))str.16 (Putt)str. 22 (Gilbert)str.23 (Rutherford) str.41(Samson) str.53 (Havaux).*
- *citaci Strasser, Stirbett 2001 jsem nezaznamenal v textu (možná přehlédl)*

## 2. Věcné připomínky a dotazy:

Cíle práce mohly být vyjádřeny ještě přesněji – První dva odstavce začínají:

„Hlavním cílem mé práce bylo sledování fotosyntetické aktivity řas v proměnném světelném režimu.“

a

„Hlavní součást této práce představuje studium vlivu nedostatku dusíku na mořskou rozsivku *Thalassiosira weissflogii*...“

z práce je dále jasný vztah a hierarchie těchto úkolů, ale bylo by lepší tuto skutečnost přesně vyjádřit formou bodů nebo hypotéz.

Další informace, kde a kdo se na práci podílel a co byla další činnost diplomanta patří dílem do „Shrnutí“ a „Metod“.

V kapitole 4 Metody postrádám podrobnější popis nebo schema experimentálního zařízení. Tato forma s odkazem na citace je v pořádku pro publikaci, ale nelze předpokládat, že oponent bude mít čas dohledávat tyto informace v literatuře. Druhý důvod proč by měly být experimenty popsány podrobně vyplývá z účelu diplomové práce, tj. posoudit vlastní činnost diplomanta. V metodách by mělo být jasně uvedeno jaké konkrétní úkoly a práce diplomant plnil v rámci týmu.

Mám dotazy k části 4.1 a 4.2 Popis experimentů

str. 26, 27

„Koncentrace  $\text{NO}_2^-$  v médiu měřená na výstupu z válců C3 a C4 byla  $600 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , koncentrace  $\text{NO}_3^-$  byla mimo detekční limit. U limitovaných kultur ve válcích C1 a C2 byly koncentrace obou forem dusíku v médiu na výstupu mimo detekční limit“

*Nejsou zaměněny dusitany a dusičnany, pokud ne, jak si lze vysvětlit tak vysokou koncentraci dusitanů a prakticky nulové dusičnany?*

*Jaké byly koncentrace amonného iontu?*

K odkazu na literaturu u automatického analyzátoru: „Počty buněk, jejich průměrná velikost, koncentrace  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$  a in vivo absorpční spektra rozsivky *Thalassiosira weissflogii* byly měřeny automatickým analyzátozem každých 25 minut během celého experimentu.“ - mám stejný problém jako u popisu experimentu. Myslím, že měly být zmíněny základní principy, zda šlo o průtokový cytometr, jaký byl analytický princip stanovení dusitanů a dusičnanů?

Zatímco tyto informace chybí, údaj o měření absorpčních spekter je nadbytečný, protože tyto výsledky v práci použity nebyly.

*Prosím, aby autor toto odpověděl při obhajobě.*

Ostatní části metod jsou zcela v pořádku, možná právě proto, že tato měření autor sám prováděl.



Výsledky by bylo vhodné doplnit o tabulky, které by udávaly průměrné charakteristiky a rozsah variability (zejména u popisných parametrů jako jsou látkové obsahy a hustoty buněk). Souborný graf 17 mohl být ještě zobecněn (průměry pro paralelní kultury, možná i vyhlazení křivek) Sledování čtyř křivek včetně „error bars“ je pro některé případy hodně obtížné.

Nechci zpochybňovat výsledek, že N-limitace neovlivnila maximální rychlost fotosyntézy normalizované na chlorofyl  $P_{\max}^b$ . Ale v literatuře lze nalézt řadu případů, kdy tomu tak není (např. Litchman et al. 2002, L&O 47:86, Hagen et al. 2000, Eur J Phycol 35:75). Nemohu souhlasit s kategorickým tvrzením „V této práci předkládám důkazy, že maximální fotosyntéza normalizovaná na množství chlorofylu v buňce ( $P_{\max}^b$ ) je nezávislá na limitaci dusíkem“. Tato problematika by si zasloužila podrobnější rozbor a diskusi.

Mám připomínku k interpretaci parametrů  $\alpha, \beta$  z rovnice (2) str. 16 podle Platt et al. 1980. Hodnota  $\alpha$  „slope“ je brána jako směrnice na světlo závislé části  $P - I$  křivky. Tomu zpravidla nejlépe vyhovuje prostá směrnice lineární regrese. Parametry  $\alpha, \beta$  v použité rovnici se vzájemně ovlivňují (pokud není  $\beta=0$ ) a oba mají vztah k teoretické hodnotě  $P_S$ . Závisí tak hodně na propočtení tvaru křivky a odhadu  $P_S$ . To může být příčinou velké variability parametrů  $\alpha, \beta$  a vypočítané hodnoty  $E_K$ .

Mám dotaz ke kapitole 5.8.1. Rychlost fotosyntézy vztažená na chlorofyl na str. 49 je uvedeno: „Buňky limitované dusíkem se v důsledku snížení  $\alpha$  fotoaklimovaly na vyšší intenzitu ozáření než buňky kontrolní, průměrně 110 oproti 80  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ “.

*Jak byly získány tyto hodnoty irradiance? Pouze odečtením z  $P - I$  křivky? Bylo by možné použít nefotochemického zhášení fluorescence (irradiance při které je  $qN$  nejnížší indikuje intenzitu, ke které je populace přizpůsobena)?*

*Není tato skutečnost v rozporu s tvrzením na str. 50 „Fotoinhibiční parametr  $\beta$  byl výrazně (asi 10krát) vyšší u dusíkem limitovaných kultur než u kontrolních.“*

Závěr:

Magisterská diplomová práce V. Kasalického splňuje nejprísnější kriteria pro hodnocení diplomových prací, je zpracována s velkou profesionalitou, a přináší původní a velmi přínosné výsledky. Práci doporučuji k obhajobě a v případě úspěšného průběhu navrhuji hodnotit stupněm **v ý b o r n ě**.

V Českých Budějovicích 16. května 2006



RNDr. Libor Pechar, CSc.

Laboratoř aplikované ekologie ZF JU v Českých Budějovicích

a

Oddělení ekologie mokřadů, ÚSBE AV ČR, Třeboň



## **Oponentský posudek magisterské práce Vojtěcha Kasalického „Denní změny fotosyntetické aktivity rozsivky *Thalassiosira weissflogii*“**

Tématem této magisterské diplomové práce jsou změny chování mořské rozsivky *Thalassiosira*, která je velmi významnou součástí ekosystému světových oceánů. Pěstování rozsivek v laboratorních podmínkách přináší řadu obtíží, které autor zvládl. Téma práce navazuje na dřívější studie životních cyklů zelených řas a fytoplanktonu pracovníků Laboratoře fotosyntézy (Prášil, Šetlík, Šetlíková, Havelková-Doušová). Pokusy v této práci byly součástí mezinárodního programu, kde získal autor experimentální zkušenosti na zahraničním pracovišti. Měření probíhala v simulovaném denním světelném režimu následovaném kontinuálním osvětlením, která odhalují paměť denních rytmů („endogenní hodiny“) těchto nejjednodušších modelových fotosyntetických organismů. Fotosyntetická aktivita a růst buněk byly sledovány kombinací fyziologických, biochemických a biofyzikálních metod, které umožnily podrobnou charakterizaci změn v kultuře.

Text má dobrou grafickou úpravu, je přehledná s obvyklou strukturou diplomových prací: obsah, shrnutí, přehled současných poznatků, cíle, metody, výsledky a diskuse, závěr, přehled literatury a seznam zkratk. Obsahuje více než 70 stran textu a 30 obrázků, z nichž 17 jsou výsledky měření. Experimentální část a diskuse jsou shrnuty do jedné kapitoly, což v tomto případě lépe vyhovuje pochopení pro čtenáře. Text je psán celkem dobrou češtinou, i když v některých částech by se dal výrazně zhustit (např. Cíle nebo Metody část 4.6 Termoluminescence). Součástí práce jsou i přílohy, kde jsou přetisky dvou impaktovaných publikací ve známých časopisech (V. Kasalický uveden jako spoluautor) a dvou plakátových sdělení, kde je prvním autorem. Velké množství výsledků, které jsou celkem logicky uspořádané, svědčí o autorově pracovitosti a přemýšlivosti. Jejich zpracování pro případné uveřejnění bude vyžadovat úpravy grafů a zestručnění.

### **Obecná doporučení:**

1. Pro čtenáře by bylo vhodnější dát seznam zkratk hned na počátek práce za obsah.
2. V 1.kapitole Shrnutí postrádám zmínku o výsledcích měření asimilace  $\text{CO}_2$ , která jsou v pokusech. Naopak jsou zde uvedena měření  $Q_A$  reoxidace u izolovaných thylakoidů hrachů, které jsem ve vlastní práci nenalezl.
3. Cíle práce jsou formulovány dost rozvláčně a poněkud neuspořádaně. Z textu není úplně jasné, co bylo vytýčeno jako hlavní cíl práce. Část 2. odstavce patří do metod a poslední odstavec bych doporučoval jako úvod ke 9. kapitole Přílohy.
4. Čísla rovnic se obvykle uvádějí v řádce vpravo v hranatých závorkách (v tomto textu vlevo)
5. Obrázky včetně grafů bych v takto rozsáhlé práci pro přehlednost doporučoval číslovat dvouúrovňově stejně jako je tomu u textu, tzn. číslo kapitoly-tečka-číslo obrázku, např. obrázek 11 by měl číslo 4.1.
6. Některé stěžejní práce nejsou v seznamu literatury, např. Platt a spol. (1976), Genty a spol. (1989).
7. Při uvádění hodnot se v češtině píše vždy desetinná čárka; u jednotek je nutné používat v textu i v grafech jednotný systém, spíše s násobky v exponentu např.  $\mu\text{mol kvant m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  než  $\mu\text{mol kvant/m}^2 \text{ s}^{-1}$ , bez teček mezi jednotkami a s mezerou mezi číslem a jednotkou, tedy např.  $153 \text{ mg (N) m}^{-3}$ .
8. Srovnání množství pigmentů PS:PP a de-epoxidační stav xantofylového cyklu jsou poměry, měly by být bezrozměrné (viz graf 6 na str. 39). Totéž u poměru uhlíku a dusíku (C/N) v buňkách (viz graf č. 4 na str. 37).



### Konkrétní dotazy k úvaze:

1. Požádal bych o krátkou úvahu o původu a významu fluorescenčního parametru  $F_0$ ?
2. Liší se „neaktivní“ a „uzavřená“ reakční centra II. fotosystému?
3. Můžete vysvětlit jaké informace o stavu fotosyntetického aparátu je možné získat ze záznamů fluorescenčních křivek  $F_M$  ST a  $F_M$  MT na obrázku 9 (str. 19)?
4. Jak si vysvětlujete posun denních maxim obsahu diadinoxantinu a diatoxantinu v buňkách rozsivky ve srovnání s maximem intenzity ozáření v kontrolní a limitované kultuře rozsivky?
5. Maximální rychlost fotosyntézy vztažená na buňku (ne na chlorofyl) je u rozsivky *Thalassiosira* limitována nedostatkem dusíku (graf 14, str. 50; oddíl 5.14.3, str. 60). Toto omezení je průkazné i z měření indukčních křivek fluorescence chlorofylu, tzn. aktuální rychlosti fotosyntézy při daném osvětlení (viz např. graf 12 na str. 47)

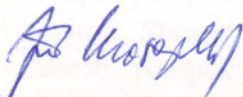
### Závěr:

Významným přínosem této magisterské práce bylo použití metody termoluminescence k diagnostice II. fotosystému při pozorování změn denních cyklů rozsivky. Navíc byl přístroj pro měření vyvinut firmou P.S.I. s.r.o. Brno ve spolupráci se skupinou doc. Prášila z treboňského pracoviště. Další významným bodem práce je zjištění, že denní rytmy fotosyntetické aktivity populací rozsivky za podmínek limitace nedostatkem dusíku nebyly příliš odlišné od kontrolních populací. Tento fakt naznačuje možnost regulaci fotosyntézy za nepříznivých podmínek.

Předložená magisterská práce, publikace i příspěvky na mezinárodních konferencích v souhrnu dokazují, že autor dobře zvládl základy vědecké výchovy.

**Magisterskou práci Vojtěcha Kasalického doporučuji k obhajobě a hodnotím ji jako výbornou.**

V Třeboni 24.5.2006



Doc. RNDr. Jiří Masojídek, CSc.