



**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**KATEDRA BOTANIKY**

**Korespondenční adresa:** Benátská 2, CZ-128 01 Praha 2, Czech Republic

Tel.: +420 221 951 646

Fax: +420 221 951 645

*Posudek na doktorskou práci Pavla Rychteckého: Application of modern fluorescence techniques in studying growth, viability and phosphatase production of phytoplankton*

Předložená doktorská práce obsahuje úvod shrnující možnosti využití moderních fluorescenčních metod při studiu fytoplanktonu, tři články publikované v časopisech s oborově velmi vysokým IF (Freshwater Biology IF 2.91; Hydrobiologia IF 2.21 a Microbial Ecology IF 3.12) a jeden rukopis. U dvou článků je P. Rychtecký prvním autorem.

V úvodu autor stručně charakterizoval fytoplankton, jeho roli v primární produkci a potravním řetězci, zmínil historii využití fluorescenčních technik, základní principy fluorescence a věnoval se fluorescenčním technikám vhodným pro stanovení růstové rychlosti, detekci mrtvých a živých buněk a stanovení produkce extracelulárních fosfatáz. Úvod je přehledně členěn a myšlenkově sjednocuje články, které jsou součástí disertační práce. Úvod vychází z aktuálních článků, hodnotí výhody a nevýhody jednotlivých technik a jejich možnosti při studiu přírodních populací fytoplanktonu. Uvítala bych obsáhlejší kapitolu o fytoplanktonu.

Dotazy a okruhy k diskusi:

- Jaká je výhoda SYTOXu oproti štěpení fluorescein diacetátu (FDA)?
- Jaký význam hraje buněčná smrt (konkrétně naprogramovaná buněčná smrt) v ekologii fytoplanktonu?
- Jaké je vysvětlení toho, že druhy produkující fosfatázy málokdy dominují ve fytoplanktonu, když by jim to mělo přinést kompetiční výhodu?

Následné práce převážně prošly oponentním řízením, proto je nechci hodnotit, spíše mám několik obecnějších dotazů/návrhů k diskusi vztahujících se k tématu. Článek 1 srovnává rychlost silifikace tří druhů rozsivek a vztah mezi intenzitou fluorescence PDMPO a růstovou rychlostí u jednotlivých druhů. Obecně je známo, že větší druhy rozsivek ukládají ve své schránce více křemíku než menší druhy.

- Platí toto i v rámci jednoho druhu, jehož schránky se zmenšují s narůstajícím počtem nepohlavních dělení?

Článek 2 srovnává počty živých a mrtvých buněk několika dominantních druhů přehrady Římov na prostorově-časovém měřítku. Regulace buněčné smrti u fytoplanktonu je komplexní, ovlivněna množstvím externích a interních faktorů.

- Můžeš jmenovat některé konkrétní externí a interní faktory?
- Obr. 2 (str. 40) zachycuje v levém sloupci živé a v pravém mrtvé buňky. V obou sloupcích je patrná autofluorescence chlorofylu – jak dlouho po odumření buněk je autofluorescence chlorofylu ještě detekovatelná?

Článek 3 se zabývá vztahem růstové rychlosti a viability *Fragilaria crotonensis* v přehradě Římov

- Proč je dostupnost Si negativně ovlivněna viabilita (schránka už je hotová, dalšího Si není zapotřebí) a ne růstová rychlost (kdy je po dělení nezbytné dotvořit druhou část frustuly – a tedy buňka potřebuje další Si? Co znamená „maintaining“ – udržování frustuly?

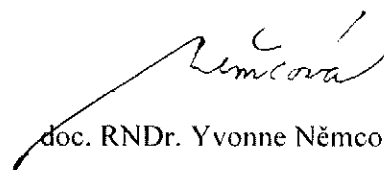
Článek 4 zkoumá vliv různých světelných podmínek na aktivitu extracelulárních fosfatáz u fytoplanktonního společenstva.

- Je produkce alkalických fosfatáz druhově specifická? Pokud je určitý druh „neumí“ produkovat, tak jejich produkci nelze indukovat pomocí změn podmínek prostředí?
- Jak je to s druhy schopnými skladovat P „luxury uptake“, produkují alkalické fosfatázy?

Předložená práce představuje tematicky ucelené dílo. Je velmi kvalitně a pečlivě zpracována. Práce dokládá, že Pavel zvládl základy vědecké práce a dokáže plánovat vědecké experimenty, vyhodnotit data a diskutovat výsledky ve světle nejnovějších vědeckých poznatků. Je schopen týmové spolupráce. O odborné kvalitě článků svědčí to, že byly publikovány v uznávaných mezinárodních časopisech. Hlavní přínos práce vidím v použití moderních fluorescenčních technik přímo *in situ* pro studium přírodních populací fytoplanktonu. Otázka viability buněk z časo-prostorového hlediska a příčiny mortality jsou dosud jen velmi málo probádány.

Práce svým rozsahem (počtem zařazených článků) a kvalitou přesahuje požadavky kladené na doktorskou práci. Bylo mi potěšením si práci přečíst a doporučuji ji k obhajobě.

V Praze 13. 11. 2014



doc. RNDr. Yvonne Němcová, Ph.D.

Čtvrtý článek (Rychtecký et al., *Microbial Ecology*, přijato do tisku) diskutuje rozsáhlý datový soubor pocházející z terénních měření i laboratorních experimentů s cílem ověřit hypotézu, že produkce extracelulárních fosfatáz je řízena dostupností slunečního záření. Kromě toho byla získána cenná data o sezónním průběhu fosfatázové aktivity na úrovni jednotlivých druhů.

Je tedy zřejmé, že disertace Pavla Rychteckého představuje ucelený soubor studií, které s využitím moderních fluorescenčních metod významným způsobem posouvají naše poznání procesů ovlivňujících změny početnosti fytoplanktonu v přirozeném prostředí. Práce přináší inovativní a zajímavá zjištění, která díky aplikaci nových metodických postupů i obecným závěrům otevírají nové možnosti studia ekologie fytoplanktonu.

Otázky:

1. Růstová rychlost rozsivek byla stanovena v 50 ml lahvích exponovaných 24 hodin ve vodním sloupci. Je možné odhadnout, jak byly tyto hodnoty blízké růstové rychlosti v přirozených podmínkách, tj. buněk cirkulujících v míchané vrstvě? Jak často na obou odběrových místech hloubka míchání překračovala tloušťku eufotické vrstvy?
2. Pozorovali jste ve vzorcích s vysokým podílem buněk rozsivek obarvených SYTOX Green také větší podíl prázdných frustul?
3. Bylo by možné na základě získaných dat odhadnout, jak je odumírání buněk velkých druhů rozsivek významné pro změny početnosti v porovnání se ztrátami sedimentací?
4. Jak si vysvětlujete silnou korelaci viability buněk a koncentrace křemíku, když křemík zjevně pro dominantní druhy rozsivek nebyl limitujícím faktorem? Může v nádrži Římov docházet v některých letech k limitaci tímto prvkem?
5. Je podle vašeho názoru metoda stanovení viability buněk pomocí SYTOX Green aplikovatelná i na jiné ekologické skupiny sinic a řas? Existují nějaké další metody, a pokud ano, jaké jsou jejich výhody a nevýhody?
6. Do jaké míry byla podle vás pozorovaná negativní korelace růstové rychlosti a viability dána větší propustností membrán u dělicích se buněk?
7. Je možné vysledovat nějaké společné znaky (životní strategie, ekologie, taxonomie), které charakterizují druhy produkující fosfatázy?
8. Do jaké míry mohlo být sezónní sledování celkové fosfatázové aktivity i aktivity jednotlivých druhů fytoplanktonu ovlivněno krátkodobými změnami? Existují data (i z jiných lokalit), dokládající denní variabilitu fosfatázové aktivity?

**Závěr: Předložená disertační práce splňuje podmínky kladené v doktorském studijním programu Hydrobiologie na PŘF JU, a proto ji plně doporučuji k obhajobě.**

Praha, 13. listopadu 2014



RNDr. Linda Nedbalová, Ph.D.



**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA EKOLOGIE**

✉ 128 44 PRAHA 2 - Viničná 7, ☎ 221 951 807, fax: 221 951 673  
e-mail: [ecology@natur.cuni.cz](mailto:ecology@natur.cuni.cz), Web: <https://portal.natur.cuni.cz/biologie/ekologie>

*OPONENTSKÝ POSUDEK NA DISERTAČNÍ PRÁCI*

**Název: Application of modern fluorescence techniques in studying growth, viability and phosphatase production of phytoplankton**

**Autor: RNDr. Pavel Rychtecký**

Disertační práce je tvořena souborem čtyř článků, z nichž tři již byly publikovány nebo jsou přijaty do tisku v impaktových časopisech, a jeden je ve formě rukopisu připraveného k odeslání do recenzního řízení. Doktorand je prvním autorem dvou z publikovaných článků, na vzniku ostatních dvou se významným způsobem podílel, ať už prací v terénu, v laboratoři nebo při přípravě rukopisů. Články byly publikovány ve velmi kvalitních časopisech a text jako celek tedy plně vyhovuje z hlediska formálních požadavků na disertační práci.

Kapitoly obsahující jednotlivé články jsou doplněny úvodem, který stručně, ale výstižně představuje hlavní východiska práce z hlediska ekologie fytoplanktonu a aplikace fluorescenčních metod při studiu této skupiny. V úvodní části najdeme též jasně formulované cíle práce a stručný souhrn výsledků, který je užitečný pro rychlou orientaci v práci. V této části bych asi vynechala nadpis „general discussion“, který je podle mého názoru vzhledem k obsahu příliš ambiciózní. Následující čtyři kapitoly přinášejí odpovědi na hlavní položené otázky.

Po formální stránce je práce velmi pěkná a obsahuje všechny obvyklé náležitosti. Snad jen seznam literatury na konci úvodní části poněkud utrpěl pravděpodobně v důsledku časové tísně při dokončování práce.

Jelikož tři ze čtyř klíčových kapitol disertace úspěšně prošly recenzním řízením v impaktových časopisech, nebudu zde hodnotit zasazení studií do širšího kontextu, adekvátnost použitých metod, prezentaci výsledků, ani jejich statistické vyhodnocení.

V prvním článku (Znachor et al. 2013, *Freshwater Biology*) autoři jako první prokázali korelaci růstové rychlosti rozsivek a depozice křemíku stanovené s použitím fluorescenčního značení pomocí PDMPO. Širší aplikace této metodiky má potenciál výrazně posunout znalosti o ekologii této významné skupiny fytoplanktonu, jak na úrovni společenstev, tak na úrovni jednotlivých druhů.

Druhý článek (Rychtecký et al. 2014, *Hydrobiologia*) otevírá jednu z „černých skříněk“ ekologie fytoplanktonu. Na rozdíl od predace a sedimentace je buněčná smrt dosud podceňovaným procesem, který vede ke snižování abundancí fytoplanktonu. Tato práce s využitím fluorescenčního barviva SYTOX Green prokázala, že životaschopnost (viabilita) buněk se liší jak v prostorovém, tak v časovém měřítku, což má nepochybně vliv na fluktuace početnosti jednotlivých druhů.

Ve třetím článku (Znachor et al., rukopis) kombinují poznatky z předcházejících dvou prací s cílem identifikovat faktory, které ovlivňují růst a viabilitu buněk rozsivky *Fragilaria crotonensis*, která v letním období dominuje v přehradní nádrži Římov. Překvapivé je nejen zjištění, že tyto parametry ovlivňují odlišné environmentální faktory, ale i to, že oba parametry jsou negativně korelovány.