

Posudek na bakalářskou práci Haliny Steblové „Charakterizace nových izolátů rodu *Chromera* (Chromerida: Alveolata)“

V první části své bakalářské práce autorka seznamuje čtenáře na šesti stranách s evolucí plastidů a se skupinou Myzozoa (i když ji takto nenazývá). Na prvních řádcích je naakumulováno několik gramatických chyb a zvláštních tvarů (např. hned první použitá čárka, „pohltila cyanobakterií“, termín „světlo-pohlcující“), zbytek textu však z hlediska chyb nevybočuje z normálu. Zvolený koncept úvodu, v podstatě kopírující předchozí práce členů týmu Doc. Oborníka, které jsem oponoval, nepovažuji v daném případě za příliš vhodný, protože moc nesouvisí s následující experimentální částí. Kapitoly zabývající se evolucí plastidů (zde autorce zřejmě ušlo, že skupina Rhizaria je součástí chromalveolát a že třídění na Chromista a Alveolata neplatí), obrněnkami (mimořádně, jejich destičky neleží na povrchu buňky, ale v kortikálních alveolech), výtrusovci a jejich plastidy jakoby do práce nepatří. Předpokládám, že koncepčně jde o relikty z doby, kdy bylo potřeba ukázat, že *Chromera* není obrněnka, ale že je příbuznější výtrusovcům. Naopak, postrádám více informací o kolpodelách, jakožto blízkých příbuzných chromeridů a o diverzitě symbiontů korálů (v celé práci se nevyskytuje slovo *Symbiodinium*, přestože obrněnky mají samostatnou kapitolu), které by se do předložené práce vysloveně hodily.

K úvodu mám několik otázek:

1. Autorka tvrdí, že apikoplast je specifickým znakem výtrusovců a že „byl nalezen u všech tří hlavních skupin“. Nepovažuje snad gregariny za jednu z hlavních skupin výtrusovců? V práci není ani zmínka o plastidů rodu *Perkinsus*, který byl objeven již v roce 2007. Podobá se spíše apikoplastu, anebo některým plastidům obrněnek?
2. Není mi jasný původ izolátu CT 24. V práci je uvedeno, že je to klon získaný při práci s izolátem RM 24. O jeho původu se však v práci nic konkrétního nepíše. Z textu na str. 6 by mohlo vyplývat, že se jedná vlastně o tentýž izolát jako RM 11 (CCMP3155). Jaký je tedy původ izolátu RM 24?
3. Původ obrázků 1, 2 a 3 (mikrofotografie izolátů CT 11, CT 24 a typového izolátu *C. velia*) není v práci uveden. Pokud jsou tyto obrázky výstupem předložené práce, nejsou zde uvedeny příslušné použité metody (důležité především v případě TEM). Pokud jsou obrázky přejaty z jiné publikace, popř. byly věnovány kolegym, měla by být tato skutečnost zmíněna. Kromě toho podle obr. 2 náleží jedna buňka izolátům CT11 i CT24 a na obr. 1 a 3 vlevo je podle popisek směsná kultura těchto izolátů. Mohla by toto autorka ujasnit?
4. Co je „akumulační tělíčko“? Je to totéž jako „putative cyst residuum“ v článku Oborník M et al. (2011) Protist: 115-130? Vzhledem k tomu, že jde z hlediska předložené práce o významnou (vlastně nejvýznamnější) strukturu, postrádám jakékoli vysvětlení a citaci vztahující se k tomuto „akumulačnímu tělíčku“.

Předložená práce si klade dva cíle:

I. Osvojit si základní metody molekulární biologie a molekulární fylogenetiky.

II. Molekulárně fylogeneticky charakterizovat dva izoláty podobné druhu *Chromera velia*.

Z kapitoly Metody (3 strany) vyplývá, že první cíl byl splněn. Většina použitých metod je popsána dostatečně, i když je zde možno najít i několik nepřesností, např. chybí složení lyzačního pufru a koncentrace některých chemikálií (X-gal a IPTG, ampicilin), autorka bez vysvětlení používá nepříliš srozumitelný výraz „srovnávací PCR“. Zvláštním dojmem působí popis cyklu PCR, kde je uvedeno, že teplota nasedání primerů byla „XX °C“. Zde chybí odkaz na tab. 1, která je na jiné straně a udává mj. annealingovou teplotu pro jednotlivé případy. Největší problém kapitoly spatřuji v nedostatečné charakterizaci amplifikovaných genů. V textu se nikde neobjevuje, které geny to vlastně jsou a na straně 9 jsou označeny prostě jako „potřebné geny“. Pouze v tab. 1 (přehled použitých primerů) se objevují označení „18S rRNA“ a „23S rRNA“, ve druhém případě však není jasné, zda se jedná o mitochondriální nebo plastidový gen. Hloubavější čtenář může dojít ke správnému závěru studiem názvů primerů – pLSU1F a pLR3100.

Kapitola Výsledky obsahuje dva fylogenetické stromy – strom genu pro jadernou SSU rRNA a strom genu pro plastidovou LSU rRNA. U obou obrázků postrádám informaci, ke kterému genu se vztahují. To sice vyplývá z textu, ale informační hodnota obrázků je podstatně snížena. K těmto stromům mám několik otázek:

5. Autorka zjistila, že typový izolát *C. velia* se od izolátů CT 11 a CT 24 liší v SSU rDNA ve třech nukleotidech. Dále uvádí, že zjištěný rozdíl odpovídá vnitrodruhové variabilitě *C. velia*. Proč tedy ve fylogenetické analýze použila pouze jedinou sekvenci *C. velia*, která sama nemá z hlediska vnitrodruhové variability žádnou vypovídající hodnotu? Jak by vypadal fylogenetický strom, kdyby do datasetu byly zařazeny všechny dostupné sekvence rodu *Chromera*?

6. Proč je u SSU rDNA ukázána ML topologie a u LSU rDNA MP topologie? Použitý model GTR + Γ při MP analýze v programu DNAPARS (popisek obrázku 5) je zřejmě chyba.

7. Jak může být 5 rozdílů mezi sekvencemi LSU rDNA *C. velia* a dvou nových izolátů zodpovědných za jejich tak dlouhé větve (viz obr. 5)? Podle měřítka délky těchto větví odpovídají mnoha stovkám substitucí. Mohlo to být způsobeno neúplnými sekvencemi, kdy neurčitě báze jsou v některých případech kódovány jako samostatný znak? Přestože izoláty CT 11 a CT 24 mají identickou sekvenci LSU rDNA, vytvářejí na obr. 5 krátké větve. Jak je to možné?

8. Autorka nikde nediskutuje blízký příbuzenský vztah obrněnek a části výtrusovců v analýze plastidové LSU rDNA (viz obr. 5). Jedná se o standardní topologii známou i z již publikovaných studií?

V krátké diskusi (o málo delší než jedna strana) autorka dospívá k závěru, že na základě svých výsledků nemůže rozhodnout, zda nové izoláty patří přímo do druhu *C. velia*. Z následného Závěru vyplývá, že se spíše přiklání k tomu, že CT 11 a CT 24 skutečně jsou konspicivické s typovým izolátem *C. velia*. Podle mého názoru však z výsledků vyvstává řada dalších otázek, které mohly (a možná měly) v diskusi také zaznít, např.:

– co znamená zjištění, že původní izolát RM 11 je vlastně směska nejméně dvou nepříliš příbuzných organismů, pro již publikovaná data? Patří všechny publikované sekvence „skutečnému“ organismu RM 11, anebo mohou některé patřit i organismu CT 11?

– mohl být rozdíl v akumulacním tělísku (obalenost vs. neobalenost membránou) způsoben odlišnou fází životního cyklu u pozorovaných buněk?

– v práci není nikde uvedeno, zda jde o axenické kultury. Pokud ne, mohla by být interakce s různými druhy bakterií zodpovědná za odlišnou morfologii různých izolátů?

Citovaná literatura sestává z více než 70 citací. Všechny použité prameny jsou náležitě citovány. Skripta Kaliny a Váni (2005) nepovažuji za vhodný pramen pro bakalářskou práci.

Z předložené bakalářské práce Haliny Steblové vyplývá, že autorka si během studia skutečně osvojila základní molekulárně biologické a fylogenetické metody a dovedla je využít při řešení konkrétního úkolu. Na druhou stranu práce samotná má řadu problémů. Chápu, že některým z nich se nebylo možno vyhnout, protože se pravděpodobně jedná o autorčinu první práci tohoto typu. Na druhé straně se jiným dalo vyhnout pečlivou kontrolou nebo hlubšími úvahami nad koncepcí práce. Příslušné komisi doporučuji kladné přijetí práce a navrhuji hodnocení na rozhraní „velmi dobře“ a „dobře“.

RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.
Katedra zoologie PřF UK
Viničná 7
128 44 Praha 2

