

Oponentský posudek na bakalářskou práci Marty Jedyčkové

Fylogeneze améb čeledi Flabellulidae

Předložená bakalářská práce se zabývá problematikou flabellulidních améb a jejich fylogenetickými vztahy.

Bakalářská práce je zpracována poměrně detailně a bez zbytečných pasáží. Oceňuji její přehlednost a úpravu, pěkně se čte. Obsahuje pouze malé množství gramatických chyb a překlepů. Začíná poněkud netradičně kapitolou Cíle práce, což není vůbec na škodu, jelikož je hned od začátku jasné, co má čtenář očekávat. Cíle jsou jasně formulovány a splněny. Dosazené výsledky jsou zřejmé. Ve studii Martina využila několik molekulárních markerů (SSU rDNA, COX1, aktin, α -tubulin, Hsp90, elongační faktor-1 α) a dokázala věrohodně rekonstruovat fylogenezi. Před velice zdařilou diskusí na úctyhodných sedmi stranách (!) smekám. Diskuse je dobře strukturována a opírá se o vlastní výsledky. Seznam použité literatury čítá 8 stran původních i zcela recentních publikací, všechny jsou citovány v textu.

K práci samotné si neodpustím několik poznámek, které by mohly posloužit spíše jako vodítko/informace do budoucna:

- Některá použitá slovní spojení jsou spíše úsměvná, nebo ne zcela běžná; například:
„nově získané sekvence by mohly vnést více jasnosti do problému...“
„v programu ClustalX byly sekvence slazeny dohromady a vytvořen alignment.“
„sekvence vytvářejí v představách o fylogenezi nejasnosti.“
„mnou získané sekvence spadají do čeledi...“; „vzorek spadá do skupiny, linie“; „zapadá do linie...“
„fylogenetické analýzy spoléhaly na sekvence...“
„skupina se nezdá být monofyletická z důvodu obsažení rodu *Saccamoeba*...“
„plovoucí formy mají kulovitý sférický tvar“
„studované vzorky tvoří dvě linie, které nejsou sesterské, ale blízko u sebe.“
„do skupiny Flabellulidae jsou také zapleteny sekvence...“
„flabellula sedící mimo původní postavení.“
„analýza aktinu utváří velmi vysokou podporu...“
„tato práce obohatila nynější sbírku genových sekvencí...“
- Možná by stálo za to zaměnit sled kapitol 3.2.2.2. Morfotyp a 3.2.2.3. Morfologie Flabellulidae, jelikož kapitola Morfologie vysvětluje vzhled a funkci veškerých struktur v buňce améby, a kapitola Morfotyp by poté lépe a srozumitelněji navazovala.
- Pokud už je uveden obrázek jádra dělicího se mesosomaticky, pro názornost bych obdobně uvítala i obrázky uroidu a mitochondrie.
Na str. 19 je uvedeno, že dle Bovee a Sawyer, 1979 se u druhu *Flabellula patuxent* vyskytují trojvrstevné cysty, na obrázku je však cysta dvojvrstevná.

- Nepřesné termíny:
„trofozoit druhu *Flabellula* sp.“ (*Flabellula* je označena jako „sp.“, tím pádem druh není znám)
„agarový gel“ (jedná se o agarózový gel)
- Kapitola 4.3.1. „Amplifikace vybraných proteinů pomocí PCR“ by se měla nazývat „Amplifikace vybraných genů pomocí PCR“, jelikož zde autorka hovoří i o SSU rRNA.
- Zatímco podstata PCR a gelové elektroforézy je v Metodice pěkně a podrobně popsána, už tomu tak není u ligace, transformace a PCR screeningu. Několik vět o tom, k čemu v těchto krocích dochází, by nebylo na škodu. Rovněž by u transformace (nebo v kapitole Klonování) stálo za to stručně zmínit, že jste použila tzv. modro-bílou selekci, a na jakém principu je založena. Pokud vím, tak bílé kolonie neobsahují PCR produkt, nýbrž plasmid s vloženou cizí DNA.
- Ve fylogenetických stromech na obr. 21 a 22 by bylo vhodné pro názornost vyznačit (např. barevnými obdélníky) celou skupinu Leptomyxida i Tubulinida, na obr. 23 pak i další skupiny améb, nejen Leptomyxida.
- Kapitola 5.1. Použité primery nepatří do Diskuse, obsahuje pouze výsledky.

K práci mám následující dotazy:

1. Na straně 15 v kapitole 3.2.2.4. tvrdíte, že „Flabellulidae jsou pravděpodobní patogeni až komenzálové ryb a bezobratlých. Pokud by se tato patogenita potvrdila, nebyla by tak drastická jako u jiných parazitických druhů“. Na základě čeho se tak domníváte?
2. Na stranách 17-20 uvádíte výčet a stručnou charakteristiku několika druhů rodu *Flabellula*, *Paraflabellula* a *Flamella*. Podle čeho jste dané druhy vybírala? Existuje i více popsaných druhů než je tento výčet? Mají jednotlivé rody také svoje „typové druhy“ („type species“)?
3. V tabulce I na straně 23 mi není jasné, co máte na mysli sloupečkem s názvem „druh“. Co v daném případě tento sloupec značí? Determinaci na základě morfologie? Co znamenají pomlčky? Nebylo možné určit? Původ některých vzorků není též znám? Proč?
4. Dále mám několik otázek k Metodice, tyto informace v jinak podrobném textu chybí. Ethidium bromidem jste barvila jednotlivé vzorky, nebo gel? Kolik PCR produktu jste nanášela na gel? U kterých genů jste přistupovala ke klonování? Šly všechny zaklonovat stejně dobře? V jaké koncentraci jste používala ampicilin při klonování? Jaký grafický program jste použila pro úpravu fylogenetických stromů?
5. Jak dlouhé byly úseky jednotlivých genů, které se vám podařilo osekvenovat? Jak dlouhé byly výsledné alignmenty použité pro analýzy?
6. Podle čeho jste vybírala vzorky pro konkaténát? Proč byl vybrán např. vzorek ROD4G, když podle tabulky I na straně 23 nevíme, o jaký organismus se jedná?
V práci se sice nedozvím, jak vypadal dataset pro gen COX1, avšak dle taxonů v datasetech pro SSU rRNA a aktin lze usuzovat, že do konkaténátu by bylo možné zařadit i další vzorky, např. NETC3, S3M27, R1TT nebo ROD5G.
7. Byl pouhý 1 milion generací v BI analýze dostačující? Pokud ano, na základě čeho tak můžete usuzovat?

8. Když jste použila aminokyselinový model v ML analýze, nezkoušela jste ho (nebo model kodonový) použít i v analýze BI?
9. V diskusi na str. 46 uvádíte, že „V průběhu práce byla také provedena fylogenetická analýza založená na sekvencích genu pro COX1. Tato analýza sice vznikla, ale nevede k dobře rozlišenému stromu: bootstrapová podpora větví je nízká.“
Fylogenetický strom COX1 však není uveden ve výsledcích, rovněž se nedozvíme, zda byla provedena i BI analýza (hovoříte jen o bootstrapové podpoře). Přestože podpora větvení byla nízká, jedná se o bakalářskou práci a ne o publikaci, takže by bylo vhodné prezentovat i tento strom. Rovněž tím pádem nevíme, jaké a kolik taxonů COX1 dataset obsahoval, a zda by nebylo možné vybrat pro konkaténát i další taxony/vzorky čeledi Flabellulidae.

I přes uvedené připomínky práci považuji za velice kvalitní a jednoznačně ji **doporučuji** k obhajobě.

Jana Kvičarová

MVDr. Jana Kvičarová, Ph.D.

V Českých Budějovicích, 21. května 2015