



MASARYKOVA UNIVERZITA  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**  
ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE

**Česká sbírka mikroorganismů (CCM)**

tel.: +420 549 491 430 • fax +420 543 247 339

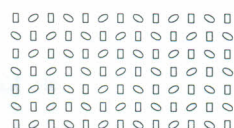
e-mail: [ccm@sci.muni.cz](mailto:ccm@sci.muni.cz) • <http://www.sci.muni.cz/ccm>

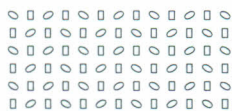
**Věc: Posudek oponenta na dizertační práci RNDr. Tomáše Tymly: „Diversity, phylogeny and phylogeography od free-living amoebae“**

Dizertační práce RNDr. Tomáše Tymly se týká problematiky diverzity a fylogeneze améb. Práce je psána v anglickém jazyce celkem „čtivou“ angličtinou, a je koncipována jako komentovaný soubor impaktovaných publikací k danému tématu. Hned v úvodu bych chtěl vyzdvihnout jejich počet (sedm), který považuji já osobně za nadstandardní pro doktorské práce. U tří publikací je uchazeč prvním autorem a většina jich je z letošního roku 2016. Práce byly podpořeny řadou národních i mezinárodních projektů, podíl uchazeče na zpracování a publikaci výsledků je sumarizován u každé publikace. Tyto publikace jsou v tezích vhodně uvedeny rozsáhlým úvodem, což svědčící o velmi kvalitní teoretické přípravě uchazeče pro řešenou problematiku.

Cíle jsou jasně a dostatečně formulovány do tří zájmových oblastí (améby jako patogen ryb; diverzita a fylogeografie améb; améby jako hostitel prokaryot) a zvolený metodický postup plně pokrývá řešenou problematiku. Rozsah izolovaných a studovaných mikroorganismů je odpovídající a z publikovaných výsledků je vidět uchazečovo komplexní zaměření na řešenou problematiku a koncepčnost při řešení zvoleného tématu. Jako klad práce vidím velmi náročné cíle, které byly stanoveny, zpracování velikého množství vzorků a použití řady různých metodologických přístupů k dosažení zvolených cílů (morfologická kritéria i molekulárně biologické techniky). Analýza dosažených výsledků prokázala odbornou erudici a znalost problematiky ekologie, typizace a klasifikace améb, což dokumentuje uvedený seznam publikovaných článků. Text je sepsán výstižně a srozumitelně, drobných nepřesností je v textu tezí minimum - např. na str. 12 chybí vysvětlení pro zkratku „COI gene“.

Jako oponent tedy kladně hodnotím rozsah a kvalitu dizertační práce, což prokazuje schopnost samostatné vědecké práce uchazeče ve výzkumné oblasti. Vzhledem k tomu, že výsledky RNDr. Tymly byly již publikovány v časopisech s vysokým IF a prošly náročným recenzním řízením, není třeba detailně diskutovat odborné aspekty práce. Níže uvedené poznámky a dotazy mají sloužit spíše jako náměty do diskuze





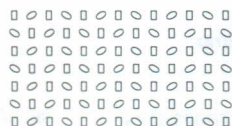
**K uchazeči mám několik následujících otázek k tématice předložené práce:**

1. Jaká je dle uchazeče úloha RB mikroorganismů v ekosystému (str. 6)?
2. Jsou validní jména prokaryotních vnitrobuněčných symbiontů (str. 15)?
3. Jak je to s validací jmen prvoků (str. 39)?
4. A poslední dotaz se týká tzv. bipolárního rozšíření améb, kde se nabízí spousta otázek k řešení a diskuzi. Neuvažuje uchazeč studovat FLA v jeskynních vodách?

Při posuzování předložené disertační práce jsem neshledal žádné závažné nedostatky, které by se týkaly metodiky, pracovních postupů nebo hodnocení dosažených výsledků. Konstatuji tedy, že dle mého názoru uchazeč prokázal tvůrčí schopnosti v dané oblasti výzkumu, a že posuzovaná disertační práce jednoznačně splňuje požadavky standardně kladené na disertační práci. Na základě uvedených skutečností **doporučuji** komisi pro obhajoby doktorských disertačních prací, aby přijala tuto práci k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení přiznala RNDr. Tomáši Tymlovi vědeckou hodnost Ph.D.

Doc. RNDr. Ivo Sedláček, CSc.

13.12. 2016





**MISSISSIPPI STATE**  
UNIVERSITY™

COLLEGE OF ARTS & SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL SCIENCES

P.O. Box GY  
295 E Lee Blvd  
Mississippi State, MS 39762

P. 662.325.2406  
F. 662.325.7939

[www.biology.msstate.edu](http://www.biology.msstate.edu)

School of Doctoral Studies in Biological Sciences  
University of South Bohemia  
Ceské Budějovice Faculty of Science

December 10, 2016

Dear Tomas Tysl's Dissertation Graduate Committee,

It is with great pleasure that I write this review of the Ph.D. thesis entitled "Diversity, phylogeny and phylogeography of free-living amoebae" authored by Tomas Tysl. This body of work represents a significant amount of novel research with respect to the evolution of amoeboid protists. Amoeboid protists are understudied microbes that inhabit nearly all environments known. The emergence of a new expert, in Mr. Tomas Tysl, on this topic is a very exciting progression in the field of protistology.

For me this dissertation is somewhat difficult for me to review after the fact as an external reviewer. The reason for this is that of the 7 internal body chapters all are peer-reviewed and published at the time of my review. This is no less than a remarkable achievement. I am very impressed by this at the time of my submission of my thesis I had 4 of my 5 body chapters published. Thus, I was in a very similar situation where my committee and reviewers had little substantive input possible. Nonetheless, I think that it is very important that over the course of Tomas' PhD research I was actually a blind peer-reviewer of at least 2 of these chapters when they were being reviewed for publication initially. I am very familiar with Tomas' work and have kept up with this important body of work. I see no issues with the work in of itself.

Two issues that I have with this dissertation are the Introduction chapter and the concluding remarks/future directions section. In my view these, again which are the only non-published pieces of this thesis, do not seem to fit well with the rest of the work. For example, the introduction focuses primarily on the cosmopolitan theory of microbial biodiversity by Finlay and Fenchel later challenged by many others including Foissner. To my estimation, this topic was not adequately addressed throughout the body of work given the amount of focus within the introduction. In my opinion, it would have been a more straightforward introduction to primarily focus on the various groups of amoeboid microbes reviewing the phylogenetics, systematics, and general diversity of these protists. Although this was superficially done in the introduction, more detail could have made this chapter more straightforward and a more logical introduction to the body chapters. I must say that I found the introduction to be well written and quite readable, it was just not the most appropriate introduction to the body. Conversely, the concluding remarks section although very succinct and directly relatable to the body, it was too terse in my opinion. I do not know what the norm is for Czech dissertations, but as a scientist this is one of few times that you can reflect on your body of work and provide a great amount of detail about what your work has contributed to science. I think that for all scientists this is an important exercise and rarely do we get to (or must) do this. If this dissertation was editable, I would insist that Tomas consider doing this. However, given the state of the dissertation, I am more than happy to accept this as is.

Because each of the body paragraphs has been published, I believe that it is not a very worthwhile activity for me to provide a synopsis of each individual chapter. I believe in the peer-review process and I do not think it is necessary to provide frivolous review of the chapters. It is very impressive that Tomas has become an expert in so many topics with respect to amoeboid protists. His dissertation has focused on the three major groups of amoebae, Rhizaria, Amoebozoa, and Heterolobosea. In addition to being an expert on these amoebae, he has been able to get his papers published in the top journals in our field, and in a very impactful journal in general biology (*Scientific Reports*). I am confident that Tomas' career in Biology will lead to even more great discoveries and I am excited to continue to follow his progress.

Please let me know if you have any further questions.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'MWB', is written over a horizontal line.

Matthew W. Brown, Ph.D.  
Assistant Professor, Biological Sciences

V Jílovém u Prahy, 13. 12. 2016

**Oponentský posudek na dizertační práci RNDr. Tomáše Tymly „Diversity, phylogeny and phylogeography of free-living amoebae“**

Dizertační práce Tomáše Tymly je poměrně heterogenní a kromě v názvu deklarované diverzity, fylogeneze a fylogeografie (ve skutečnosti však spíše biogeografie) volně žijících měňavek se zabývá i jejich patogenním potenciálem a prokaryotickými symbionty.

Domnívám se, že tato heterogenita není na škodu, naopak svědčí o širokém záběru autora.

Dizertační práce je složena z devíti sekcí, z nichž první, „General introduction“, má za úkol uvést čtenáře do kontextu přiložených publikací. Z mého pohledu trpí tato úvodní sekce dvěma nedostatky, které z ní činí nejslabší část práce:

1. Zcela chybí definice pojmu „Free-living amoebae“. Ačkoli jde o poměrně často používaný termín v části parazitologické literatury, práce by si takovou definici zasloužila, protože organismům „FLA“ jsou přisuzovány určité obecné vlastnosti („FLA sexuality“, „mechanisms involved in diversification of FLA“ apod.). Přitom již v prvního souvětí je patrné, že půjde o nějakou sběrnou skupinu organismů, které spolu nemají mnoho společného: „In the contemporary view of evolution, free-living amoebae (FLA) are considered a heterogeneous group of eukaryotic microorganisms that share some morphological and biological characteristics but differ substantially in many others.“ Jistě nejsou míněny všechny volně žijící měňavkovité organismy – v tom případě by text „To date, the comparatively most detailed information has been collected from the diversity within ... Amoebozoa ... and ... Excavata [ještě silněji vyjádřeno v následujícím textu]“ byl nesmyslný a taxony Amoebozoa a Excavata by nejspíš měly být nahrazeny dírkonožci a mřížovci, o jejichž diverzitě a evoluci je toho známo nesrovnatelně více. Je zvláštní, že do FLA patří Cercozoa, ale ne právě třeba příbuzná skupina Foraminifera (zástupci obou skupin jsou převážně/pouze volně žijící). Podle mého dojmu z celé práce by používaná definice mohla znít např.: „měňavky a améboflageláti (protože *Naegleria* není měňavka), kteří byli nalezeni na povrchu vodních (nebo i suchozemských?) živočichů a je možné je kultivovat na pevných médiích. Jsou to alespoň potenciálně amfizoické organismy“. Pokud je to nějak takto a FLA je skutečně pouze sběrná skupina organismů spojených hlavně (pouze?) metodikou výzkumu, nemá tento termín žádný biologický význam a podle mě nemá smysl pokoušet se nalézt

nějaké obecné „pravdy“ ohledně FLA, o což se autor snaží v poslední sekci „Perspectives of future research“. Mohl by se autor k této kritice vyjádřit?

2. Úvodní sekce je velmi stručná, až telegrafická, a místy příliš zjednodušující. Domnívám se, že to plyne z poměru její délky k množství témat, kterým se věnuje. Autor vtěsnil na 13 stran obecné texty o druhových konceptech, diverzitě mikroorganismů, environmentální diverzitě, hypotéze „rare biosphere“, biogeografii a fylogeografii mikroorganismů a specializované části zabývající se diverzitou FLA a prokaryotickými symbionty FLA. Lepší by bylo věnovat celou úvodní sekci diverzitě FLA, případně ji výrazně rozšířit (na 13 stranách snad ani nelze kvalitně zpracovat takové množství tak širokých témat; na druhou stranu je sympatické, že se autor zabývá tolika odlišnými problémy). Jako příklad přílišného zjednodušení jsem vybral text „Pure culture had become the most frequent way to describe and determine a substantial part of microorganism diversity until an introduction of more advanced methods“. To platí pro prokaryotické organismy, ne však pro eukaryotické mikroorganismy. Výzkum diverzity (nejen) nejvíce studovaných skupin volně žijících heterotrofních protist, např. nálevníků nebo dírkonošců, byl vždy založen spíše na metodách nezávislých na kultivaci. Právě skupiny, kterými se zabývá předložená práce, tvoří v tomto ohledu výjimku.

Kapitola „Diversity of FLA“, která je z hlediska práce klíčová, není příliš pochopitelná právě bez předchozí znalosti složení této sběrné skupiny. Autor zde vybral některé linie FLA (podle jakého klíče?) a shrnul historii výzkumu jejich diverzity. V některých případech nedošel až do současnosti – např. podrobně rozepisuje důvody, proč byly skupině Vannellida v roce 2007 rozeznány čtyři rody, ale nezmiňuje popis (podle mě) velmi důležitého rodu *Paravannella* z r. 2014, Tetramitia jsou dnes rozděleny do osmi linií, nikoli sedmi (ta osmá, *Creneis*, byla v r. 2014 popsána v mém týmu), přivítal bych citaci objevu měňavkového stádia u podkmene heteroloboseí Pharyngomonada z r. 2013 (v této publikaci byl objeven i potenciální třetí podkmen heteroloboseí, opět jsou to měňavky). K těmto částem se navíc příliš nehodí začátek kapitoly „Diversity of FLA“, který popisuje vývoj znalostí do poloviny 20. století. Zdá se mi, že je zde používán poněkud jiný koncept FLA než ve zbytku kapitoly – jakoby šlo o všechny „klasické“ gymnaméby. Je tomu tak?

Části II – VIII sestávají z celkem sedmi článků, jichž je T. Týmľ spoluautorem. Všechny byly publikovány v kvalitních časopisech s IF, za pozornost stojí zejména Environmental Microbiology a Scientific Reports. T. Týmľ je prvním autorem čtyř článků (včetně publikace ve Sci Rep) a korespondenčním autorem jednoho článku. Jeho podíl na výzkumu a sepisování

rukopisů je práci jasně deklarován pro každý článek zvlášť. Kromě toho je (dle autoreferátu) T. Týmľ spoluautorem dalších 7 článků v časopisech s IF, které netvoří součást dizertační práce. Jestliže jsem v předchozí části posudku kritizoval, nyní je čas začít chválit. Kvalita publikací zahrnutých do dizertační práce podle mého názoru bohatě vyvažuje nedostatky úvodní části. Je zjevné, že RNDr. Týmľ má neobyčejný záběr sahající od izolace všemožných volně žijících měňavek do kultur (zdánlivě jednoduchá technika, ve skutečnosti celosvětově provozovaná pouze několika týmy), přes jejich morfologickou a molekulární charakterizaci po výzkum jejich prokaryotických symbiontů a studium jejich patogenního potenciálu. Zde se nezapře vliv jeho školitele a školitelky, kteří jsou známí svou precizností.

Všechny přiložené články považuji za kvalitní. V článku o cerkozyích rodu *Rhogostoma* autoři podle mě správně vyvozují, že z jejich dat nelze jednoznačně usoudit, že právě druh *R. minus* byl původcem studované choroby žaber duhových pstruhů, ale že se mohlo jednat o sekundární infekci. Nepochybuji o tom, že mnozí jiní autoři by bez přemýšlení prosazovali opak. V případě článků o rodech *Neovahlkampfia*, *Copromyxa* a *Vermistella* jde o zcela zásadní příspěvky k poznání diverzity těchto významných linií měňavek (významných z hlediska fylogenetické pozice – *N.* a *V.* tvoří hluboké linie heteroloboseí resp. amébozoí s malým počtem popsáných druhů, anebo bionomie – *C.* má agregativní mnohobuněčnost). Dva články se věnují biogeografii, což je téměř opomíjená oblast biologie améb (vynecháme-li dírkonošce a mřížovce), navíc celkem přesvědčivě ukazují, že také u měňavek (jak mořských, tak sladkovodních) se můžeme setkat se zajímavým bipolárním rozšířením (i když viz níže). Konečně poslední dva články se věnují prokaryotickým symbiontům mořských měňavek, dosud zcela opomíjenému tématu (přitom symbiontům sladkovodních měňavek je věnována velká pozornost). Protože se autorům posledního článku podařilo zachovat symbiózu i v laboratorních podmínkách, zpřístupňují ji detailnímu studiu, což považuji za obzvláště cenné.

K článkům mám následující otázky/připomínky:

1. Mohl by autor shrnout své názory na barcoding čeledi Vahlkampfiidae založený na sekvencích ITS navržený Dr. De Jonckheere? Já osobně mám s tímto konceptem velký problém.
2. V článku o rodu *Vermistella* se nejprve operuje s tím, že tento rod má bipolární rozšíření, přitom byl „environmentálně chycen“ také z hlubokomořského vzorku u břehů Venezuely.

Tento fakt v diskusi trochu zapadl (i když je tam zmiňován). Mohl by autor podrobněji vysvětlit, proč si myslí, že *Vermistella* má bipolární rozšíření?

3. Některé druhy/izoláty rodu *Copromyxa* v kultuře provozují agregativní mnohobuněčnost, jiné ne. Totéž je známo u rodu *Acrasis* (myšleno v širším pojetí, zahrnujícím i *Allovahlkampfia*). Mohl by se autor zamyslet nad tím, jakými způsoby lze tyto měňavky přinutit, aby se shlukovaly?

4. Volně žijící měňavky jsou známými hostiteli řady prokaryot, včetně bakterií patogenních pro člověka. I když i u jiných protist (např. nálevníků) je také známo mnoho druhů prokaryotických symbiontů (míněno široce, včetně parazitů), měňavky ze skupiny Lobosa se zdají být výjimečné tím, že v jejich buňkách dlouhodobě přežívají i nespecifické druhy symbiontů, které by pravděpodobně byly v buňkách jiných protist zabity a stráveny. Má autor nějakou hypotézu, proč tomu tak je?

Závěrem konstatuji, že RNDr. Tomáš Týmle prokázal schopnost kvalitní vědecké práce. Předložená práce podle mého názoru splňuje požadavky kladené na dizertační práce. I přes kritické připomínky ji s bez váhání doporučuji k obhajobě.

doc. RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.

Katedra zoologie PřF UK

Viničná 7

128 44 Praha 2

