

Oponentský posudek na diplomovou práci Anety Maršíkové „**Haemogregariny parazitující u želv rodu *Pelusios*: fylogenetické vztahy, morfologie a hostitelská specifita**“

Ve své diplomové práci se Aneta Maršíková zabývala výskytem parazitů rodu *Haemogregarina* u sladkovodních želv rodu *Pelusios*. Práce se skládala ze dvou částí – morfologické dokumentace stádií v krevních roztěrech a z molekulárně taxonomické analýzy poskytnutých vzorků.

Práci považuji za velmi zdařilou jak po obsahové tak po formální stránce. Rozsah práce je dostačující, 53 stran bez referencí a příloh. Chválím i obrazovou dokumentaci haemogregarin ze světelného mikroskopu na několika tabulích i grafické ztvárnění stromů. Celkově psaný projev je na vysoké úrovni. Velmi se mi líbila kapitola 5.2. (diskuze) konfrontující zjištěnou morfologii haemogregarin s literárními údaji.

K práci mám jen několik dotazů a připomínek:

1/ Úvod práce je napsán srozumitelně, čtivě a velmi podrobně. Oceňuji i podrobné údaje o hostitelích. Na straně 13 se mluví o modelovém organismu *Haemogregarina stepanowi* v souvislosti s vývojovým cyklem haemogregarin u želv. Čekal bych tedy na Obr. 4 schéma tohoto životního cyklu a ne cyklu rybí haemogregariny, která navíc, jak se v práci uvádí, nazahrnuje ve svém ŽC běžné hostitele.

2/ V úvodu se mi líbí i detailnější informace o hostitelích. Uvádíte, že v roce 2010 byla publikována práce naznačující možnou parafýlii rodu *Pelomedusa*, ovšem se zařazením jediného druhu r. *Pelusios* v analýze. Z pozdějších prací je zřejmé, že existují sekvence více druhů r. *Pelusios* – řeší tyto práce otázku parafýlie r. *Pelomedusa*? Popřípadě nechystáte se na fylogenetickou analýzu těchto želv, když máte k dispozici poměrně velké množství unikátního DNA materiálu z těchto želv?

3/ Tabulka 1 zahrnuje již neplatný druh *P. seychellensis*.

4/ V kapitole 3.2.2. metodiky se udává důvod pro použití nested PCR to, že získané sekvence ze standardní PCR byly krátké a obsahovaly špatný signál. Tento problém by se dal možná řešit lépe zaklonováním PCR produktů. Navíc by se tím dala zjistit případná vnitrodruhová variabilita (smíšená infekce) sekvenováním více klonů.

5/ Na obrázku 8 je v popisku uvedeno, že je zde konsensus stromů analýzy MP namapován na BI topologii – prosím o vysvětlení, tady žádný konsensus MP stromů nevidím.

6/ Ve druhém odstavci diskuze je řečeno, že pomocí BI a ML byly získány shodné topologie. Tyto stromy zobrazené na obrázcích 8 a 9 ale nemají úplně shodnou topologii. Rozdíly jsou i správně popsány ve výsledcích.

Přes vznesené připomínky, které jsou opravdu jen málo významné, považuji práci za vynikající a doporučuji vřele k obhajobě.

V Českých Budějovicích, 20. 5. 2016



RNDr. Ivan Fiala, Ph.D.

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Anety Maršíkové

„Haemogregariny parazitující u želv rodu *Pelusios*: fylogenetické vztahy, morfologie a hostitelská specifita“

Diplomová práce Anety Maršíkové na 68 stranách s pomocí více než stovky vědeckých článků velmi precizně zpracovává problematiku haemogregarin u vodních želv (rod *Pelusios*) se zaměřením na jejich identifikaci a fylogenetické vztahy.

V rozsáhlé úvodní části stručně charakterizuje výhody i úskalí využití molekulárních metod a fylogenetických analýz, dále se pečlivě věnuje charakteristice rodu *Haemogregarina* vč. vývojových cyklů a v neposlední řadě také jejich mezihostiteli, želvám rodu *Pelusios*. V další části následují velmi detailně stanovené cíle, na které navazuje opět velmi pečlivě zpracovaná kapitola Materiál a metodika. Výsledky fylogenetických i morfologických analýz jsou vhodně doplněny obrazovou dokumentací. Kapitola Diskuze následně srovnává nově získané poznatky s dosud známými či chybějícími informacemi a porovnává možnosti jednotlivých metod. Závěr shrnuje dosažené výsledky a naplnění cílů, kdy byla potvrzena monofylie rodu *Haemogregarina*, na základě fylogenetických analýz doplněných morfologií nalezených stádií v krevních nátěrech byla zjištěna existence dvou skupin (pravděpodobně druhů) *Haemogregarina* u rodu *Pelusios* a nad to, bohužel však bez možnosti mikroskopické detekce, byl prvně popsán záchyt r. *Hepatozoon* u těchto želv.

Po formální stránce je předložená práce připravena pečlivě, má vynikající jazykovou úroveň i strukturu a zdařilé grafické zpracování. Celková úprava předložené práce odpovídá požadavkům kladeným na závěrečnou diplomovou práci.

Co se týká hodnocení obsahové stránky, cíle byly jasně formulovány i splněny, metodika byla zvolena správně, k postupu řešení nemám výhrady, práce s odbornou literaturou je dobře zvládnutá.

Metodické části práce jsou velmi dobře propracované a zřetelně ukazují na vysoké zapojení studentky do všech uvedených analýz.

Za vysoce hodnotné považuji, že se autorka a její školitelé nebáli zaměřit na model, který nepatří ani ekonomicky, ani zdravotně k těm nejvýznamnějším a doplnili touto studií dosud

chybějící informace „na poli haemogregarin“. Oceňuji, že práci plánují doplnit o sekvence mitochondriálních genů a publikovat.

Celkově se jedná o diplomovou práci velmi kvalitní s jasným přínosem, a proto práci doporučuji k obhajobě.

Na autorku mám následující dotazy:

1. Může použití antikoagulantů při odběrech krve ovlivnit následné zpracování vzorků (izolaci DNA; PCR)?
2. Velmi pečlivě bylo provedeno morfologické vyhodnocení pozitivních krevních nátěrů, byla také hodnocena parazitémie (množství parazitů v krvi konkrétních jedinců)?
3. Lze pomocí molekulárních metod či mikroskopického vyšetření stanovit případné mixinfekce více druhů haemogregarin nebo různých krevních parazitů?
4. S ohledem na pelusie odchycené v přírodě a držené v zajetí, jaká je doba přetrvávání stádií haemogregarin v organismu (krvi) mezipřijímatelů?
5. Pokud by bylo v databázích stejné množství dostupných sekvencí, preferovala by autorka pro fylogenetické analýzy využití jaderných nebo mitochondriálních markerů?

V Brně, dne 13.5. 2016



.....
MVDr. Lada Hofmannová, Ph.D.

Ústav patologické morfologie a parazitologie
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno
Tel.:541 562 264
hofmannoval@vfu.cz
www.vfu.cz