

Mgr. Lucie Kučerová, Ph.D.
Biologické centrum AV ČR, v.v.i.
Entomologický ústav
Branišovská 31, České Budějovice 370 05

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Lucie Faktorové

„Multilokusová charakteristika symbiontů entomopatogenních hlístovek rodu *Steinernema*“

Předložená diplomová práce Lucie Faktorové těží z dlouhodobého velmi kvalitního výzkumu Laboratoře entomopatogenních hlístic, který je zaměřen na identifikaci molekulárních markerů vhodných pro výzkum hlístovek a který vede školitelka Martina Žurovcová. Entomopatogení hlístovky jsou dnes široce používány v biologické ochraně pro kontrolu hmyzích škůdců. Jejich životní strategie a symbióza s entomopatogenními baktériemi představuje zajímavý biologický fenomén. Diplomová práce se zaměřuje na testování vybraných molekulárních markerů a identifikaci kmenů u bakterie *Xenorhabdus bovienii*, která se vyskytuje jako symbiont u různých druhů hlístovek rodu *Steinernema*. Získané sekvence molekulárních markerů byly použity pro fylogenetickou a následně pro srovnávací kofylogenetickou analýzu za účelem zjištění úrovně koevoluce uvnitř komplexu entomopatogenních bakterií a hlístovek. Pro rod *Steinernema* nebyly tyto koevoluční vztahy dosud geneticky popsány.

Diplomová práce je velice obsáhlá a vypracovat ji stálo magistrantku jistě nemalé úsilí, které bych tímto chtěla ocenit. Úvod na 15 stranách velmi dobře představuje celou studovanou problematiku, od biologie studovaných druhů, přes aplikované genotypizační metody až k představení studia koevoluce. V metodice je přesně popsána izolace DNA pro hlístovky i bakterie, uvedeny kompletní protokoly a primery použité pro PCR a sekvenování. Celkem byly použity 4 molekulární markery pro hlístovky a testovány 3 molekulární markery pro bakterie. Následně jsou popsány parametry pro použité fylogenetické a kofylogenetické metody. Oceňuji vypracování a porovnání několika fylogenetických metod (distanční, ML, MP) a několika kofylogenetických přístupů. K části Materiál a metody mám pár drobných připomínek:

Všude v Metodice je složení používaných roztoků vypsáno ve formě protokolů (tedy v μ l pracovních roztoků a g použitých látek), což je jistě užitečné, pokud se bude na diplomovou práci navazovat, ale doporučovala bych pro příště spíše běžný zápis v hodnotách koncentrace pro finální roztoky, tak jak se používá v publikacích a mělo by to platit i pro diplomové práce. Na straně 22 není uvedena koncentrace nebo množství použitého velikostního žebříčku na gelovou elektroforézu.

Část Výsledky prezentuje zejména fylogenetické rekonstrukce a kofylogenetické analýzy, vypracované na základě získaných originálních sekvenačních dat. Tady bych měla pár poznámek a doporučení k prezentaci:

Občas nejsou dobře čitelné hodnoty pro statistickou podporu některých větví, protože se překrývají s linkami - pomohla by dodatečná úprava stromů v některém grafickém programu. Pro usnadnění práce toho, kdo výsledky posuzuje, by bylo vhodné dopravit rotaci některých větví, aby pořadí koncových jmen taxonů bylo, co nejpodobnější. Snáz by se tak dala vyhodnotit shodnost topologie. U všech NJ stromů (v příloze) je uvedeno, že délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi. Podle mého názoru by bylo přesnější, že délky větví u distanční metody odpovídají vypočítané genetické vzdálenosti. U MP stromů (také zahrnutých v příloze) je uvedena podobná věta, ale všechny stromy jsou prezentované jen jako topologie a není u nich žádné měřítko.

V části Diskuze jsou pak výsledky celkově vyhodnoceny a konfrontovány s literaturou. Celkem je v práci citováno více než 120 citací.

Celá práce je sepsána velice úhledně a čtivě s drobným množstvím překlepů. Z technických chyb mohu snad jedině vytknout vlouděný překlep v závěru Úvodu na str. 15, kde byla hlístovka rodu *Heterorhabditis* přejmenována na *Heterorhabdus*. Jinde v práci se ale tento překlep nevyskytuje. Pokud chtěla autorka pro označení primerů zachovat tradiční anglické označení, pak doporučuji používat slova v původní anglické verzi „forward“ a „reverse“. Chybně jsou tato slova napsána například na str. 20 nebo 21.

K výsledkům a diskuzi mám následující otázky:

- 1) Obrázek 5 na straně 30 a příloha 9 na straně 72 představuje fylogenetické rekonstrukce bakteriálních izolátů na základě markeru 16S. Statistická podpora (bootstrap) této rekonstrukce je absolutně minimální. Jaká byla zjištěná variabilita markeru 16S, například počet mutací? Na základě prezentovaných dat předpokládám, že variabilita byla velice nízká, a hodnotím kladně rozhodnutí vyřadit marker z další kofylogenetické analýzy.
- 2) Magistrantka ve své práci porovnávala hned tři různé metody pro fylogenetickou rekonstrukci. Která z těchto metod je podle Vás pro prezentovaná data nejméně vhodná a dala nejhorší výsledky?
- 3) V diskuzi je jako jeden z velice zajímavých vědeckých výsledků uvedeno, že se baktérii *X. bovienii* povedlo poprvé identifikovat u neznámého izolátu hlístovky *Steinernema sp. SAKH*, která zřejmě patří k dosud nepopsanému druhu. Vyskytují se u dané hlístovky i jiné bakterie *Xenarhabdus* nebo je zatím k dispozici pouze tento jeden otestovaný vzorek?

Závěrem prohlašuji, že předložená diplomová práce více než splňuje požadavky kladené na diplomovou práci a obsahuje velice kvalitně zpracovaná originální vědecká data a proto ji vřele **doporučuji k obhajobě** a navrhuji známku výborně (1).

V Českých Budějovicích 15.1.2017



Mgr. Lucie Kučerová, Ph.D.

Oponentský posudek diplomové práce

Název práce: Multilokusová charakteristika symbiontů entomopatogenních hlístovek rodu *Steinernema*

Autor práce: Bc. Lucie Faktorová

Vedoucí práce: PaedDr. Martina Žurovcová, Ph.D.

Oponent práce: Mgr. Libor Vojtek, Ph.D.

Diplomová práce Bc. Lucie Faktorové pojednává na 85 číslovaných stranách o srovnání symbiontů entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema* pomocí jejich multilokusové charakteristiky. Práce má klasické členění a jednotlivé kapitoly na sebe logicky navazují. V úvodu práce jsou nejprve obecně popsány entomopatogenní hlístice – jejich systematické zařazení, životní cyklu a hostitelské organismy s následným popisem jejich symbiotických bakterií. Následně v teoretické části pokračuje popis metod vhodných pro genotypizaci s důrazem kladeným na multilokusovou sekvenční typizaci (MLST) jež je studentkou následně využívána v praktické části práce. Na konci teoretické části pak autorka popisuje samotnou koevoluci a metody, jimiž se dá studovat – především kofylogentické metody. V metodické části práce je popsáno několik molekulárně genetických metod využívaných pro samotnou identifikaci hlístic a bakterií jako např. izolace DNA pomocí dvou kitů, PCR (včetně vlastního navržení primerů), elektroforéza, purifikace PCR produktů a jejich následné sekvenování. Metodická sekce je ukončena vysvětlením statistického zpracování získaných výsledků, popisem tvorby jednotlivých fylogenetických stromů a jejich následné využití kofylogenetickými metodami (jak metodami distančními tak i metodou topologickou). Ve výsledkové části nejprve autorka popisuje fylogenetické vztahy hlístic u vícedruhového souboru vzorků – vznik fylogramu symbiotických bakterií použitý v kofylogenetické analýze, která v obou případech (distanční i topologický test) potvrdila možnou koevoluci hostitelů a symbiontů. Stejným způsobem autorka následně porovnává také fylogenetické vnitrodruhové vztahy u *S. feltiae*, kde ovšem žádný ze 3 testů (2 distanční a jeden topologický) nebyl signifikantní, tedy nelze předpokládat kospeciace hlístic a bakterií. Dále následuje rozsáhlá diskuze, závěr a seznam literatury se 145 literárními (většinou cizojazyčnými) a 3 internetovými zdroji. K práci jsou nakonec připojeny i přílohy, jež umožňují podrobnější náhled na výsledky.

Práce je čtivá, po stylistické stránce zcela v pořádku, s minimem pravopisných chyb a překlepů. Grafická stránka je také na dobré úrovni, i když některé obrázky by mohly být ostřejší (např. obr. 6-8, ale i další) a s většími a lépe čitelnými popisky (např. obr. 2). V práci autorka cituje několik diplomových či dokonce bakalářských prací (včetně její vlastní), tomuto bych se já osobně raději vyhnul a nahradil tyto citace buď původními články, nebo

jedná-li se o vlastní výsledky, pak je možné citaci vypustit zcela, bakalářské a diplomové práce jsou většinou pracemi „zkušebními“, mohou se v nich tedy vyskytovat chyby, které se jejich citováním přenáší dále. V seznamu literatury se sem tam také vyskytne menší chyba (např. Fox et al., 1980 – chybí název článku „The phylogeny of prokaryotes.“ a rozsah stran také neodpovídá skutečnosti). Zároveň se v seznamu literatury vyskytuje článek ve francouzském jazyce (Laumond et al., 1979), se kterým bych si já osobně určitě neporadil, nicméně autorka patrně ovládá francouzštinu lépe než já. Zároveň by bylo dobré styl citací v seznamu literatury sjednotit – např. u některých prací se dvěma autory je použit spojovník „a“ (např. Hannula a Hanninen, 2007) a u jiných zcela chybí (např. Nguyen, Smart, 1994). Také by bylo vhodné používat všechny spojovníky buď v českém jazyce, nebo v latinském, ale nemíchat je - u prací s více autory je používána latina, u dvou autorů pak čeština.

Vzhledem k mému zaměření bohužel nemohu hodnotit vhodnost zvolených a používaných metod, nicméně předpokládám, že použité metody jsou v laboratoři, kde autorka práci vykonávala, zavedené a běžně využívané k řešení podobných témat, proto považuji jejich volbu za správnou.

Autorka si v práci vytkla dva jasně definované cíle, které se jí podařilo bez problémů naplnit. Ač nejsem odborníkem v daném oboru, chtěl bych vyzdvihnout především vědeckou stránku práce, která je na velice vysoké úrovni, autorka musela zvládnout jak teoreticky tak prakticky velké množství molekulárně genetických metod a zkombinovat je s metodami bioinformatickými i statistickými. Zorientovat se v takové škále dat a správně je uchopit vyžaduje velký přehled v dané problematice koevolučních vztahů, jež je jistě vykoupěn nemalými časovými nároky. Dalším povedeným dílem je také rozmanitá diskuze, ve které autorka velice věcně a fakticky porovnává své výsledky s doposud zveřejněnými výsledky jiných týmů, přičemž nemá problém ani s opodstatněným zavržením pravděpodobně mylných výsledků publikovaných v minulosti jinými autory.

Jakožto fyziolog mám k práci spíše formální dotazy:

1. Na straně 7 autorka uvádí: „Hlístovky spolu s bakteriemi mohou být vystaveny i silným reakcím hostitele, označovaným jako buněčné či humorální. Mezi tyto reakce se řadí například enkapsulace (Peters a Ehlers, 1994), tedy schopnost hmyzích krevních buněk (hemocytů) shlukovat se kolem parazita a následně ho uzavřít do mnohvrstevné kapsule (Poinar, 1974; Ratcliffe, 1982). Další reakcí může být fagocytóza bakteriálních buněk a jejich zničení pomocí antimikrobiální aktivity hmyzí hemolymfy. Avšak díky tomu, že hlístovky spolupracují se symbiotickými bakteriemi, mohou imunitu hmyzích hostitelů překonávat (Wang a Gaugler, 1999).“ Jakým konkrétním fyziologickým způsobem k překonání imunity hmyzího hostitele dochází?

2. Na straně 19, kapitola 3.1.2 Příprava bakterií a izolace bakteriální DNA autorka uvádí: „Nakažená housenka (cca 24 hodin od infekce) byla povrchově sterilizována po dobu 5 minut v 99% etanolu.“ Zde bych si slovo housenka raději dovolil nahradit termínem larva, nicméně jsem v práci nebyl schopen dohledat o jakou larvu se jednalo. Může studentka použitý druh larev specifikovat?
3. Existuje nějaký druh EPN a zároveň bakterie/í, jež by umožňoval koexistenci dvou či více druhů bakteriálních symbiontů uvnitř hlístice? Nesetkala jste se s podobným experimentem během procházení literatury?
4. Výsledky práce přináší spoustu zajímavých faktů, hodlá autorka zjištěná data v budoucnu publikovat?
5. Bude autorka v řešení otázky koevoluce EPN a jejich symbiotických bakterií nadále pokračovat ve formě Ph.D. studia?

Předložená diplomová práce i přes mé výhrady zcela splňuje nároky kladené na tento druh práce, proto ji **doporučuji** k obhajobě. Díky zmíněným drobným formálním nedostatkům navrhuji hodnocení **B**, nicméně pokud bude prezentace během obhajob v pořádku, určitě se nebráním hodnocení A. Finální známku samozřejmě nechávám na komisi.

V Brně dne 12.1.2017


.....
Mgr. Libor Vojtek, Ph.D.