

Oponentský posudek na diplomovou práci Marty Jdličkové

Lokalizace a kvantifikace rybomorky *Sphaerospora molnari* (Myxozoa) u kapra obecného

Předložená diplomová práce řeší problematiku lokalizace a kvantifikace vývojových stádií rybomorky *Sphaerospora molnari* v různých tkáních a orgánech kapra obecného pomocí experimentálních infekcí. Práce je rozhodně zajímavá a přináší mnoho nových poznatků o vývoji stádií rybomorek ve svých meziphostitelích, rybách.

Diplomová práce čítající 72 stran včetně přehledu literatury a příloh je zpracována velmi přehledně a detailně. Cíle práce, uvedené na samém začátku práce, jsou jasné a stručně formulovány, a splněny. Šestnáctistránkový úvod obsahuje všechny zásadní informace týkající se dané problematiky, nejsou zde žádné zbytečné „pasáže navíc“. Vložené obrázky jsou dobré kvality. Použitá metodika je adekvátní a je zřejmé, že byla pečlivě připravena a propracována včetně promýšlení nejrůznějších detailů. Dosažené výsledky jsou jasné a obsahují originální data. Velmi zdařilá diskuse na úctyhodných sedmi a půl stranách je dobře strukturována a opírá se o vlastní výsledky.

K práci mám následující poznámky:

Práce obsahuje jen poměrně malé množství gramatických chyb, nejčastěji v podobě shody přísudku s podmětem (např. nachází → nacházejí, vyvíjí → vyvíjejí – např. strany 6, 7, 30) a čárek mezi souvětími.

Poté, co je poprvé uveden celý latinský název organismu, se již v textu dále uvádí jen zkratkou názvu rodu. Tedy například *Sphaerospora molnari*, a poté již pokaždé *S. molnari*, taktéž například *Tetracapsuloides bryosalmonae* či *Myxobolus cerebralis*, a ne jednou tak, podruhé onak (např. na stranách 3, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 17, 18, 21, 27, 32, 33, 35, 38).

V průběhu celé práce je u některých organismů či taxonomických skupin uveden autor popisu (například u Myxozoa, *S. molnari*, *Cyprinus carpio*, *Buddenbrockia plumatellae*), u jiných – většiny - pak již chybí. Bylo by vhodné dát si na toto pozor a psaní názvů sjednotit – buď vše s autory popisu (ideálně), nebo vše bez nich.

Jelikož je práce psána v českém jazyce, použila bych na straně 5 české názvy taxonomických skupin (a ne Class, Suborder, Family,...), stejně tak bych kapitolu 8 nazvala Použitá literatura nebo Seznam použité literatury, a ne Reference.

Nedokážu si dost dobře představit parazitaci „**intercelulárně** zejména v **epitelových buňkách**“. (strana 13)

Na straně 21 v odstavci 2 uvádíte, že „Výsledné proužky byly podrobeny semi-kvantitativní analýze všech vzorků, která spočívala v rozdělení získaných hodnot do tabulky podle intenzity (0-5), a tyto výsledky byly následně statisticky zpracovány pomocí programu Statistica v. 12.0 software“. K čemu bylo dobré statistické vyhodnocení proužků (bendů) PCR vizualizace na agarózovém gelu? Toto vyhodnocení chybí v kapitole Výsledky.

Ke tvrzení v diskusi na str. 36-37 (poslední odstavec str. 36) bych měla výhradu, a to, že pomocí klasické PCR lze podobně jako u qPCR odlišit vzorek negativní od nefungujícího.

V tomto případě by to bylo možné pomocí specifických primerů amplifikujících DNA hostitele (tj. kapra). Jediná nevýhoda spočívá v tom, že by to byl časově náročnější proces, jelikož by se jednalo o dvě různé PCR (amplifikující gen parazita a amplifikující gen hostitele). Rovněž tak **je** při klasické PCR **možné** stanovit množství (koncentraci) přítomné DNA v PCR produktu, a to například pomocí nanodropu, Qubitu apod. (strana 37 odstavec 2).

PKD je zkratkou pro „proliferative kidney disease“, nikoliv „prolifere kidney disease“, stejně tak DNA je „deoxyribonucleic acid“, nikoliv „deoxyribonucleid acid“.

K práci mám následující dotazy:

- 1) Jaká je četnost výskytu myxozoi u ryb v České republice? (v chovech, ve volné přírodě)
- 2) Napadá *S. molnari* pouze plůdek? Proč?
- 3) Byly někdy provedeny experimentální infekce *S. molnari* i jiných ryb za účelem zjištění/ověření hostitelské specifity?
- 4) Z jakého důvodu se nedaří mikroskopický záchyt stádií z tkání a orgánů, například pomocí histologie? Bylo by tak možné sledovat i patologické změny, které působí daná stadia v jednotlivých tkáních a orgánech?
Tato data by velmi vhodně doplňovala data molekulární.
- 5) Proč byl ke sledování vybrán interval právě 63 dnů? Pokud stadia ještě dále perzistovala ve svalovině, nebylo by vhodné – například pro účely budoucí publikace – sledovat infikované ryby až do úplného vymizení infekce? Máte to v plánu?
- 6) Jak lze interpretovat den 21. na obrázku 12 (strana 28) ve vztahu ke dni 14.?
- 7) Čím si vysvětlujete 2 vrcholy v průběhu infekce u vzorků krve?
- 8) Práce je velice zdařilá a přináší spoustu unikátních dat o lokalizaci rybomorky v orgánech a tkáních. Interpretaci časových údajů bych však brala pro praktické (např. aplikované) účely s rezervou, jelikož se jednalo o infekci intraperitoneální aplikací, k čemuž za přirozených podmínek pravděpodobně nedochází. Nezvažujete po tomto pilotním experimentu, ze kterého máte pěkná základní data, další experiment s intramuskulární nebo intravenózní aplikací stádií *S. molnari*?

I přes vznesené poznámky a připomínky, které jsou dle mého názoru málo významné, práci považuji za velice kvalitní s jasným přínosem, jednoznačně ji **doporučuji** k obhajobě a prozatím hodnotím stupněm „výborně“.

MVDr. Jana Kvičarová, Ph.D.

V Českých Budějovicích, 16. května 2017

Jana Kvičarová

Posudek na diplomovou práci Marty Jdličkové: „Lokalizace a kvantifikace rybomorky *Sphaerospora molnari* (Myxozoa) u kapra obecného“

Předložená diplomová práce popisuje průběh, šíření a kvantifikaci infekce rybomorky v laboratorním modelovém organismu kapru obecném za pomoci mikroskopických a molekulárních metod. Problematika myxozoárních infekcí je intenzivně řešena na pracovišti školitele a výsledky předložené diplomové práce významně přispívají k objasnění komplexnosti životního cyklu rybomorek.

Diplomová práce je tradičně rozdělena do hlavních kapitol cíle práce, úvod, materiál a metody, výsledky, diskuze, závěr, seznam použitých zkratk a použitá literatura, které obsahují celou řadu podkapitol. Navíc jsou součástí práce dvě přílohy ve formě tabulek shrnujících získaná data. Celkový rozsah práce činí 72 stran.

Cíle práce jsou jasně formulovány do tří dílčích bodů, zabývajících se experimentální infekcí kapra obecného v laboratorních podmínkách, zjištěním šíření parazita uvnitř těla hostitele a relativní kvantifikací parazita v těle hostitele.

Úvodní část diplomové práce je zpracována přehledně, přičemž čtenáře postupně seznámí s klasifikací myxozoi, morfologií vývojových stádií a životním cyklem. V další části autorka blíže popisuje v experimentech používaného parazita *Sphaerospora molnari* a jeho hostitele kapra obecného. Tato část práce je zdařile napsaná a nezahluje čtenáře přemírou zbytečných informací a sděluje informace, které jsou nezbytně nutné k pochopení zvoleného přístupu k výzkumu.

Kapitola materiál a metody obsahuje soupis všech hlavních postupů a metod používaných během experimentů samotných či k jejich vyhodnocení.

Výsledky jsou podrobně zpracovány a jsou přehledně rozděleny do jednotlivých podkapitol zabývajících se lokalizací, prescreeningem a relativní kvantifikací parazitů v hostiteli a posléze porovnáním záchytnosti používaných detekčních metod.

V diskuzi, autorka hodnotí své výsledky a konfrontuje je s výsledky ostatních autorů.

Závěr, shrnuje nejdůležitější výsledky, které odpovídají jednotlivým vytyčeným cílům práce.

Neodpustím si konstatovat, že diplomová práce obsahuje jen minimum překlepů, pravopisných a metodických chyb.

K autorce mám několik věcných dotazů:

- 1. Čím si autorka vysvětluje odlišné výsledky získané pomocí PCR a qPCR v jednotlivých orgánech? Porovnání obrázků 12 a 14 ukazuje, že při použití klasické PCR byly 42 DPI nejvíce infekcí zasaženy především svaly, nicméně qPCR odhalila nejvyšší počet parazita v játrech.**
- 2. Čím autorka vysvětlí rozdílné procento relativní míry parazitace žaber uvedené v obrázcích 13 a 14? Předpokládám, že pokud byl použit pro výpočet procenta stejný dataset a obrázek 13 je vlastně výsečí obrázku 14, tak procento míry parazitace bude v odpovídajících si časových intervalech u žaber stejné (viz např. 42 DPI - cca 45 % obrázek 13 vs 13 % obrázek 14).**
- 3. V posledním odstavci autorka konstatuje, že měla nejmenší výtěžnost izolace DNA ze vzorku krve a svalů. Zkoušela autorka i jinou metodu izolace DNA než je fenol-chloroform? Třeba DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)?**

Závěr: Předloženou diplomovou práci považuji za zdařilou, splňující vytyčené cíle. Svědčí o schopnosti autorky pracovat s vědeckou literaturou, plánovat, provádět i vyhodnocovat experimenty a ze získaných výsledků vyvozovat závěry. Výsledky diplomové práce Marty

Jedličkové představují prvotní data nutná pro zdárný průběh dalšího výzkumu v laboratoři školitele.

Předložená diplomová práce Martiny Jedličkové splňuje veškeré požadavky kladené na diplomové práce na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a **doporučuji ji k obhajobě.**

V Českých Budějovicích, 12. 5. 2017

RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.

