

Oponentský posudek na diplomovou práci Anety Trefancové „Morfologické znaky a populačně-genetická struktura kokciidií parazitujících u hrabošovitých hlodavců; objasnění původu isosporových infekcí u hrabošovitých hlodavců“

Ve své magisterské práci se Aneta Trefancová zabývala morfologickou a morfometrickou analýzou oocyst kokciidií u hrabošovitých hlodavců, jejich fylogenezí a populační analýzou. Dále původem isospor nalezených v trusu hrabošů dvou rodů *Myodes* a *Microtus* (parazitický původ nebo pasáž trávícím traktem).

Magisterská práce je na velmi vysoké úrovni. Její součástí jsou dva (!) publikované (!) prvoautorské (!) rukopisy, které byly otištěny v kvalitních parazitologických impaktovaných časopisech a klidně by mohly být i stěžejní součástí PhD práce. Úvod je sepsán přehledně a výstižně, čtenář je dobře uveden do dané problematiky. Cíle jsou výstižné a jasné, možná podle mého názoru až příliš rozsáhlé a podrobné, hlavně podkapitola 2.2 obsahuje podrobné dílčí kroky (v podkapitole 2.1 tyto detaily uvedeny nejsou). Metodika správně popisuje postupy k dosažení daných cílů. Ve výsledcích bych vytknul zbytečné zmínky o tom, kdo se všechno podílel na odchycích hostitelů – je jasné, že odchyty bývají většinou týmovou prací a stačí spolupracovníkům poděkovat jednou na začátku diplomové práce – jak je i učiněno zde.

K předložené práci mám následující připomínky/dotazy:

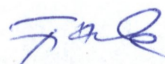
- 1) Trochu nelogicky je podle mého názoru umístění publikovaných článků v textu magisterské práce. Například článek o *I. svecica* je vložený na konec kapitoly „4.2.2.2. Morfologie a morfogenetická analýza oocyt“, před kapitolou „4.2.2.3. Fylogenetické analýzy“. V obsahu umístění článků úplně chybí a jejich dohledání může působit trochu problémy. Rukopisy bych doporučil vložit jako přílohu na konec práce, usnadnilo by to orientaci v textu.
- 2) Fylogenetické analýzy tří genů představují velmi kvalitní základ pro odhalení fylogenetických vztahů kokciidií. Nicméně je škoda, že nebyla provedena konkatenovaná analýza těchto genů, která by mohla přinést lepší rozlišení fylogenetických vztahů kokciidií. Netestovali jste také společnou analýzu všech tří genů jestli by nepřinesla lepší rozlišení studovaných kokciidií?
- 3) V tabulce 1 na straně 88 nejsou odděleny jména autorů popisu druhů čárkou od letopočtu popisu. Tato tabulka není graficky příliš zdařilá. Jeden příklad za všechny - poslední řádek desátý sloupec obsahuje slovo „presen“ a chybějící „t“ je na straně 89 v pokračování tabulky. Pokud je tabulka rozdělena na více stránek (v tomto případě na čtyři) mohlo by být pro lepší přehled uvedeno vždy záhlaví na každé straně – jak je například u tabulky Table 5 na str. 53. Tabulky (2 až 9) by měly být samovysvětlující - popisky k tabulkám by měly obsahovat vysvětlivky všech zkratk uvedených v tabulce (i když je seznam zkratk uvedený na začátku práce).
- 4) V diskusi na straně 108 se dává do souvislosti to, že by denní doba vylučování trusu během dne u ptáků by mohla být ovlivněna parazity. Toto je určitě skvělá manipulační teorie, ale podle mě velmi nepravděpodobná. Jaké by mohlo být více

pravděpodobnější vysvětlení toho, že ptáci vylučují více trusu ráno a pak v odpoledních hodinách a večer?

- 5) Porovnáním COI sekvencí isospor z ptáků a hlodavců nebyla nalezena žádná shoda. Toto tvrzení není podle mého názoru správné, předpokládám, že nějakou podobnost sekvence mít musely. Jaká byla skutečná procentuální podobnost těchto sekvencí?
- 6) Jedním z cílů práce bylo porovnání genů a jejich vhodnost pro využití k odhalování vnitrodruhové variability u blízce příbuzných druhů. Možná by stálo za to se pokusit analyzovat fylogenetický signál nějakým sofistikovaným programem – existuje takový program?

Diplomovou práci Anety Trefancové považuji za vynikající a vřele ji doporučuji k obhajobě s hodnocením výborně.

V Českých Budějovicích, 16. 5. 2019



RNDr. Ivan Fiala, Ph.D

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Anety Trefancové

„Morfologické znaky a populačně-genetická struktura kokciidií parazitujících u hrabošovitých hlodavců; objasnění původu isosporových infekcí u hrabošovitých hlodavců“

Bc. Aneta Trefancová ve své diplomové práci zpracovala na 156 stranách problematiku kokciidií u hrabošovitých hlodavců velmi precizně.

Úvodní část práce je věnována kokciidiím hlodavců, jejich fylogenezi a morfologii oocyst zejména ve vztahu k eimeriím a isosporám. tak, aby úvod plynule navázal na cíle práce. Bc. Aneta Trefancová si ve své práci kladla za cíl provést morfologické a morfometrické analýzy oocyst kokciidií nalezených v trusu hrabošovitých hlodavců, rekonstruovat jejich fylogenetické vztahy, porovnat morfologii oocyst s výsledky fylogenetických analýz, analyzovat populační strukturu těchto kokciidií, a na základě sekvencí mitochondriálních genů rekonstruovat a interpretovat haplotypové sítě. V neposlední řadě bylo jejím cílem také objasnit původ isosporových oocyst v trusu hrabošovitých hlodavců.

Ke splnění těchto cílů se autorce podařilo nashromáždit značné množství materiálu z téměř 700 odchycených hlodavců z různých míst Evropy. Tento soubor doplnila materiálem z 374 hlodavců, který získala v rámci své bakalářské práce. Metodická část její práce dále vyžadovala pečlivé vyhodnocení nasbíraného materiálu pomocí koproskopických metod, mikroskopické determinace oocyst, izolace DNA, PCR na několika genových markerech, sekvenaci a rozsáhlé fylogenetické analýzy. Pro dosažení cíle objasnit původ isosporových infekcí u hrabošovitých hlodavců, se autorka musela vypořádat se získáním vzorků z ptáků a ještě také zvládnout problematiku experimentálních infekcí.

Ve výsledcích jsou velmi podrobně zpracovány lokality a počty odchycených hlodavců, následně přehledněji uvedené v tabulce 11, ze které je patrné i kolik se u jednotlivých skupin podařilo získat sekvencí pro markery 18S rRNA, COI a COIII využitých dále ve fylogenetických analýzách. Fylogenetická analýza 18S rRNA z 65 sekvencí kokciidií hrabošovitých hlodavců potvrdila, že tento gen, ačkoli je u řady druhů kokciidií jediným dostupným v Genbanku, není vhodným markerem pro studium vnitrodruhové variability či blízkce příbuzných druhů kokciidií. Jako dostatečný se neukázal ani nově studovaný marker COIII. Fylogenetické analýzy, které autorka provedla, ukázaly jako nejvhodnější marker COI. Tento gen prokázal největší variabilitu a nejlepší vnitřní členění jednotlivých linií (I-V). Autorka se tedy dále zabývá morfologií oocyst ve vztahu k liniím vymezeným v analýzách COI a dokládá morfologickou variabilitu velmi zdařilou fotodokumentací oocyst.

Výsledky, které poukázaly na pasážování oocyst nikoli skutečné infekce isosporami u hrabošovitých hlodavců autorka již publikovala v článku nazvaném „Isosporan oocysts in the faeces of bank voles (*Myodes glareolus*; Arvicolinae, Rodentia): real parasites, or pseudoparasites?“ a na základě získaných poznatků z této části práce také submitovala rukopis popisující nový druh isospory ze slavíka modráčka. Článek i submitovaný rukopis jsou součástí výsledků a autorka se na ně odkazuje dále v diskuzi, kde získané výsledky a celou řešenou problematiku vhodně hodnotí a následně stručně shrnuje v Závěru. Práci kromě tabulek uzavírá rozsáhlý výčet literárních zdrojů.

Celková úprava předložené práce odpovídá požadavkům kladeným na diplomovou práci. Po formální stránce je předložená práce zpracovaná velmi pečlivě. Za zdařilé považuji zejména její grafické zpracování (fotodokumentace, perokresba, fylogenetické stromy).

Po obsahové stránce je, dle mého názoru, předložená diplomová práce nadstandardní. Práce s odbornou literaturou byla velmi dobře zvládnutá, a ačkoli byla zvolena značně komplikovaná problematika, cíle práce byly jasně formulovány a splněny. Metodika a postup řešení byly zvoleny velmi vhodně a umožnily na základě výsledků vyvození konkrétních závěrů.

Velmi dobře propracovaná metodika a výsledky zřetelně ukazují na vysoké zapojení Bc. Anety Trefančové nejen do počítačových analýz, ale také na její zapálenost pro danou problematiku jak při terénním sběru materiálu, tak i při mikroskopickém hodnocení morfologie jednotlivých oocyst.

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

Na autorku mám několik následujících dotazů:

1. Na straně 6 uvádíte, že se nepohlavní stádia kokcidie rodu *Isospora* dříve označované jako *Atoxoplasma* vyvíjejí jak v krvi (extraintestinální stádia), tak v buňkách trávicího traktu. Jelikož se krev skládá z tekuté plazmy a buněk (červené krvinky, bílé krvinky, krevní destičky), mohla byste přesně specifikovat lokalizaci vývoje extraintestinálních stádií v krvi?
2. Na straně 10 píšete: „Přestože vysporulované oocysty dokáží přežít téměř nemožné, zcela fatální jsou pro ně příliš vysoké teploty, přímé působení UV záření, a nedostatek vlhkosti (vysychání) (Belli a kol. 2006). Jak ovlivňují oocysty naopak velmi nízké teploty? Mohla by zde být nějaká souvislost s nulovým zachytem kokcií u hlodavců (*M. mystacinus*) z Norska?
3. V metodice postrádám informaci o inokulační dávce - počtu oocyst, které byly použity k experimentálním infekcím. Byla tato dávka známa? Lze množství podaných oocyst alespoň řádově odhadnout? Také údaje o množství nalezených oocyst kokcií a jejich stádiu vysporulovanosti oocyst (alespoň u izolátů použitých k infekci) by bylo vhodné zmínit již v kapitole metodiky. Informace o nízkých počtech a částečném vysporulování oocyst isospor byla zmíněna v diskuzi, tak předpokládám, že tato data byla známa.

4. Vzhledem k tomu, že na rozdíl od některých vzácných druhů volně žijících zvířat, není problém získat trávicí trakt u hojně rozšířených hlodavců, případně provést experimentální infekce, doporučila byste v dalších studiích kromě determinace oocyst (morfologie + identifikace genových markerů 18S rRNA, COI) k řešení problematiky identifikace druhů kokcií hlodavců zároveň také determinaci lokalizace endogenního vývoje a morfologii endogenních stádií jako to bylo v minulosti využito např. u eimerií myši domácí? Jaké jsou výhody či nevýhody zahrnutí sledování endogenní fáze cyklu kokcií pro určování druhů?

V Brně, dne 7.5. 2019



.....
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