

Oponentský posudek na diplomovou práci **Jana Kamiše** „Fylogenetické vztahy kokcií parazitujících u myši temnopásé (*Apodemus agrarius*) na základě sekvencí COX 3 genu“

Ve své bakalářské práci se Jan Kamiš zabýval posouzením využitelnosti mitochondriálního genu pro odhalení fylogenetických vztahů u hlodavčích kokcií rodu *Eimeria*, konkrétně se jednalo o cytochrom c oxidázu podjednotku 3 analyzovanou buď samostatně nebo v kombinaci s již zavedeným molekulárním markerem - cytochrom c oxidázu podjednotku 1.

V úvodu autor detailně popisuje molekulární markery obecně využívané ve fylogenetických analýzách organismů, včetně kokcií a dále charakterizuje modelové organismy studie. I když je úvod poměrně rozsáhlý, je napsán velmi čtivě a čtenář dostane ucelený přehled o dané problematice. Práce je po formální stránce v pořádku a je psána velmi dobrou češtinou s minimem překlepů a nepřesností v terminologii. Jako příklad uvádím nesprávné použití termínu protozoí pro označení Protist. Dosažené výsledky odpovídají vytyčeným cílům.

K práci mám následující konkrétní otázky a připomínky.

1. V úvodu autor popisuje dvě prvotně popsání hlodavčích eimerií (A a B) lišících se přítomností nebo absencí rezidia oocysty. Nejnovější studie Mácové a kol. (2018) ukázali, že se kokcie z hlodavčích čeledí Muridae a Arvicolidae člení do třech monofyletických skupin na základě jejich hostitelské specifity. Bylo by možné upřesnit, které z těchto později definovaných skupin jsou ty původní linie A a B a hlavně jestli je reziduum oocysty i nadále považováno za významný znak pro jejich členění?

2. Uvědomuji si, že vztahy hlodavčích eimerií jsou již publikované, ale pro mne jako neznalce fylogeneze této skupiny by bylo zajímavé se dozvědět něco víc o faktorech klastrování druhů v jednotlivých skupinách, konkrétně co se týče biologické nebo jiné relevance tohoto seskupování, např. jestli existuje ještě nějaký další znak kromě hostitelské specifity na základě kterého druhy klastrují uvnitř těchto skupin nebo se dělí do podskupin? - např. vývojový nebo morfologický znak, geografie?

3. Uvádíte, že „pokud ani po třetím pokusu nebyla sekvenace úspěšná, vzorek byl vyřazen“. Neuvažovali jste o zaklonování PCR produktů a jejich následném osekvenování? Tato metoda by navíc mohla pomoci odhalit případné smíšené infekce vícero druhů eimerií. S tím souvisí i další otázka, jestli jste neuvažovali o navržení primerů specifických pro vaše jednotlivé linie hlodavčích eimerií a následný skrining všech vzorků pro odhalení míry smíšených infekcí případně detekci pozitivních vzorků zvláště v případě slabých infekcí, které by mohli uniknout vaší pozornosti?

4. Jsou u COX3 a COX1 kokcií dokumentované pseudogeny a jestli ano, jak závažný by mohl být jejich vliv na provedené fylogenetické analýzy?

5. V metodice mi chybí informace, na jakém typu dat (jestli nukleotidy nebo aminokyseliny) byly založeny vaše analýzy. Nabyla jsem dojmu, že se jednalo o nukleotidy. Jestli je to tak, já osobně by jsem upřednostnila v případě protein-kódujících genů založit analýzy na aminokyselinových datech nebo alespoň zalignovat data na základě aminokyselin a potom je převést zpátky do nukleotidů. Vzhledem k tomu, že studie je fylogeneticky orientovaná, možno by navíc stálo za zkoušku srovnat výsledky analýz založených na obou typech dat v případě, že takové analýzy nebyly dosud provedeny. Navíc mohlo být otestováno, jaký vliv na výsledky analýz má vyhození třetí nejvíc variabilní pozice kodonu z alignmentu.

6. Jak byla stanovena 25% hladina burn-inu v Bayesovské analýze?

7. Jestli se nemýlím, topologie stromů založených na COX3 a COX1 u skupiny „alorani“ je více méně stejná až na to, že nejbazálnější sekvence AA\_21847, která nabourává monofylii této skupiny u COX3, chybí v COX1 analýze. Proč tento vzorek u COX1 chybí a myslíte si, že jeho přítomnost by mohla ovlivnit monofylii skupiny „alorani“ u COX1 genu?

8. Považujete narůst podpory klastrování skupin eimerií za natolik signifikantní, aby bylo doporučeno amplifikování sekvencí dvou genů u této skupiny parazitů?

9. Jak naložíte se získanými daty v budoucnu? Plánujete publikování dat případně bude studie ještě nějakým způsobem rozšířena?

Bakalářskou práci považuji za zdařilou a doporučuji vřele k obhajobě s hodnocením výborně.

V Českých Budějovicích, 10. 5. 2019

RNDr. Pavla Sojková, Ph.D.

