



BIOLOGICKÉ CENTRUM AV ČR, v. v. i.

Parazitologický ústav

adresa: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice

telefon: +420 387 775 403

fax: +420 385 310 388

IČ: 60077344 | DIČ: CZ60077344

číslo účtu: 5527231/0710, ČNB České Budějovice

www.paru.cas.cz | e-mail: paru@paru.cas.cz

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Kateřiny Polákové „Diverzita anaerobních nálevníků podtřídy Scuticociliatia a jejich symbiontů“

Kateřina Poláková se ve své diplomové práci zaměřila na skupinu anaerobních nálevníků z podtřídy Scuticociliatia. To se ukázalo jako skvělá volba, díky níž se podařilo odhalit novou rozmanitou linii nálevníků. Diplomantka se zabývala morfologickou charakterizací a fylogenetickými vztahy těchto nálevníků z anoxického prostředí. Zvládla řadu metodických postupů zahrnující kultivaci nálevníků, následnou morfologickou dokumentaci v nativu, barvicí techniky a elektronovou mikroskopii. V neposlední řadě metody molekulární taxonomie včetně bioinformatických analýz a také analýz amplikonového sekvenování mikrobiomů se snahou o identifikaci bakteriálních ektosymbiontů.

Práci považuji za vynikající jak po obsahové tak po formální stránce. Rozsah práce je úctyhodný, přes 150 stran včetně obsáhlého seznamu referencí. Úvod a literární přehled je sepsán přehledně a výstižně, čtenář je dobře uveden do dané problematiky. Diplomová práce je doplněna velmi kvalitní a kompletní obrazovou dokumentací výsledků zahrnující fotodokumentaci nálevníků v nativu, barvených protargolem a nitrátem stříbra. Skenovací elektronová mikroskopie dokonale dokumentuje ektosymbiotické bakterie na povrchu nálevníků včetně detailů jako jsou filamentózní spoje u bakterií. To je doplněno snímky ultrastruktury, na kterých je například velmi zajímavá poloha MRO a endosymbiontů. Kdyby byla morfologická charakteristika vybraných kmenů ještě doplněna o perokresby, jako jsou např. převzaté kresby na obr. 3 v úvodu práce, byla by dokumentace naprosto dokonalá. Stejně tak velmi dobře jsou zpracovány a prezentovány výsledky z fylogenetických analýz a také bioinformatických analýz bakteriálního mikrobiomu. Práce je napsána velmi dobrou angličtinou. Celkově psaný projev je na vysoké úrovni.

K práci mám několik málo připomínek a dotazů:

- 1) Metodika je velmi podrobná a důkladně zpracována. Impozantní je sbírka scuticociliálních kmenů nálevníků – viz. tab 11. Zajímalo by mě, jestli se některých sběrů autorka práce také účastnila?
- 2) V metodice jsem neshledal žádný nedostatek, pouze u amplikonového sekvenování jsem postrádal více informací. Byly vzorky před sekvenováním poolovány? Byly použity barkódované primery, tak aby bylo možno vzorky posléze demultiplexovat? Kolik vzorků/PCR produktů bylo zpracováno a kolik readů (paired end?) bylo sekvenováno (kolik

readů v přepočtu na vzorek)? Jaký byl treshold počtů readů, který jste stanovili jako věrohodný?

- 3) Před amplikonovým sekvenováním mikrobiomu jste se pokusili o Sangerovo sekvenování, které se neukázalo být vhodné pro tento účel. Překvapuje mě, že bez předchozího klonování byly chromatogramy z přímého sekvenování PCR produktů vůbec použitelné. Byla opravdu kvalita výsledných sekvencí ze Sangerova sekvenování dobrá?
- 4) Na obr. 14 (str. 61) v popisku k fylogenetickému stromu je uvedeno, že sekvence z environmentů jsou reprezentovány jen GenBank přístupovým číslem – žádná taková sekvence ovšem v tomto stromu není.
- 5) Kapitola 4.2 v oddíle výsledků obsahuje řadu odkazů na literaturu a srovnává dosažené výsledky s touto literaturou. To si myslím, že by mělo být spíše podstatou diskuze.
- 6) V oceánech byla objevena extrémní diverzita diplomem (Flegontov a kol. 2016). Na str. 56 zmiňujete, že jste zaznamenali výskyt i jiných protist včetně euglenoidů – setkali jste se také v nějakém studovaném vzorku právě s diplomemami?
- 7) Velmi zajímavá část práce je studium mikrobiomu pomocí amplikonového sekvenování. Neuvažovali jste také o amplikonovém sekvenování vlastních ciliátů bez předcházející kultivace, tj. původních vzorků sedimentů? Kultivace možná selektuje jen určité druhy ciliátů a metabarkódováním by se možná dala zjistit ještě větší diverzita. Nicméně chápu, že by v tomto případě chyběla jakákoli morfologická dokumentace.

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

V Českých Budějovicích, 3. 7. 2020

RNDr. Ivan Fiala, Ph.D.