BIOLOGICKÉ CENTRUM AV ČR, v. v. i.

adresa: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice
telefon: +420 387 771 111 (ústředna)
+420 387 775 051 (ředitelství)

IČ: 60077344 | DIČ: CZ60077344
číslo účtu: 6063942/0800, Česká spořitelna, a.s.
www.bc.cas.cz | e-mail: bc@bc.cas.cz

Posudek magisterské práce **Bc. Martiny Klojdové** s názvem *Molekulární markery pro detekci genetické variability přírodních populací forenzně významných druhů bzučivkovitých (Calliphoridae, Diptera).*

Autorka si zvolila velmi zajímavé téma se zřejmým aplikačním potenciálem. Možnost použít populačně specifické genetické markery k determinaci geografického původu hmyzu vyvíjejícího se na oběti kriminálního činu by si určitě dokázalo najít uplatnění ve forenzní praxi, např. při odhalování možné *post mortem* manipulace s mrtvolou.

Práce je psána velmi srozumitelným jazykem s minimem překlepů nebo gramatických chyb. Práce je logicky uspořádána a text neobsahuje nepřesnosti nebo nejasná vyjádření, resp. až na několik výjimek (např. nahrnutí prvoků s bakteriemi do jedné věty v odstavci o forenzně významných skupinách hmyzu, str. 4. nepůsobí jasně). Hned na začátku textu se mi velmi líbilo členění na kratší obecný úvod včetně nastínění hlavního cíle práce (tedy jakýsi abstrakt) a poté hlubší uvedení do problému.

Z metodického hlediska oceňuji poměrně velký počet testovaných lokusů, který v kombinaci se čtyřmi druhy hmyzu znamenal poměrně velký objem laboratorní práce. Považuji sice za diskutabilní výběr některých markerů (např. ITS), ale rozumím autorčině snaze pracovat s veškerými dostupnými sekvenčními markery.

Ačkoli se nepodařilo nalézt markery dostatečně informativní pro geografické odlišení populací, práce splnila své zadání, tedy navrhnout a otestovat kandidátní markery. Co jsem však postrádal, jak v úvodu, tak diskuzi, bylo důkladnější zamyšlení se nad rozlišovacími možnostmi zvolených mtDNA a nucDNA lokusů vzhledem k velikosti zkoumaného území, a biologii a evoluční historii daných druhů (hmyz s pravděpodobně velkými populačními velikostmi a solidními migračními schopnostmi). Toto téma je načnuto až na konci diskuze, ale zasloužilo by si hlubší pohled a porovnání v kontextu s dostupnou literaturou. V diskuzi je zmiňována nízká variabilita sekvencí, nedostatečná pro odlišení populací. Variabilita samotných sekvencí však poměrně vysoká je (svědčí o tom poměrně vysoké hodnoty haplotypových diverzit i nenulové hodnoty nukleotidových diverzit). Problém je spíše v nedostatečné segregaci haplotypů mezi populacemi, což souvisí s výše zmíněnými faktory, které v práci byly diskutovány minimálně.

Z hlediska využití testovaných markerů pro populační analýzy by tak připadalo v úvahu jedině využití založené na velkém množství analyzovaných jedinců a frekvencích jednotlivých haplotypů v populacích (assignment analýza). Pro tento typ analýzy samozřejmě nebyl k dispozici dostatek materiálu. Na druhou stranu autorka mohla zmínit možnosti rychle se rozvíjejících high-throughput metod, kterými by se daly hledat variabilní lokusy použitelné pro návrh screeningových panelů (např. obdoba SNP arrays).

Závěrem, předložená práce přes některé nedostatky zcela splňuje obvyklé standardy magisterských diplomových prací studentů Přírodovědecké fakulty JU. Práci proto doporučuji k obhajobě. Obhajoby se

bohužel nemohu zúčastnit, práci navrhuji hodnotit stupněm 2 (lepší dvojka), ale výsledné hodnocení jistě závisí i na výkonu u obhajoby a zodpovězení dotazů.

- U *L. sericata* byla nalezena výrazně nižší hodnota haplotypové a někdy i nukleotidové diverzity pro mtDNA geny než u ostatních druhů. Existuje pro to nějaký biologický, evolučně-historický, nebo jiný důvod?

- Z hlediska využitelnosti molekulárních markerů pro populačně-geografickou analýzu hmyzích druhů je v práci zmíněna teoretická možnost záměny mtDNA sekvencí hmyzu za DNA jejich bakteriálních symbiontů kvůli použití univerzálních primerů. Co ale nukleární kopie vlastní hmyzí mtDNA (tzv. numt)? Jedná se o možný problém u dipter?

- Zaujal mě případ prvního využití forenzní entomologie ze 13. st. v Číně - odhalení srpu vraha pomocí much, které preferovaly srp se skrytými zbyty krve, je o poznání lepší metoda než soudobá evropská metodologie (tzn. nechť Bůh rozhodne - hození podezřelého z mostu v koši a čekání jestli vyplave :) Ale pokusil se někdo čínskou legendu ověřit? Rekonstruovat? Mohl by to být jednoduchý, ale zajímavý experiment :)

Jan Štefka

Laboratoř molekulární ekologie a evoluce
Parazitologický ústav, Biologické centrum AVČR
Branišovská 31, 37005 Č. Budějovice

V Č. Budějovicích 18.5. 2018

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta rybářství a ochrany vod
Zátiší 728/II
389 25 Vodňany

Posudek oponenta diplomové práce

Student:	Bc. Martina Klojdová
Studijní obor:	
Forma studia:	
Název závěrečné práce:	Molekulární markery pro detekci genetické variability přírodních populací forenzně významných druhů bzučivkovitých (Calliphoridae, Diptera)
Oponent závěrečné práce: jméno, příjmení, tituly	Ing. Martin Bláha, Ph.D.
Pracoviště a pracovní zařazení oponenta	JU, Fakulta rybářství a ochrany vod, akademický pracovník

1. Formulace cílů práce

Hodnotí se úvod do řešení problematiky, tedy zdůvodnění potřeby řešení práce a srozumitelnost vytyčených cílů:

Hodnocení (známka): ◉ 1 ○ 2 ○ 3 ○ 4

Komentář k hodnocení (odůvodnění navržené známky). Komentář je povinný.

Zaměření a cíle práce jsou jasně definovány a vychází z potřeby detailnějšího stanovení vnitrodruhové diverzity hlavních druhů nekrofágních much z čeledi bzučivkovitých vzhledem k jejich využití v rámci forenzní entomologie.

2. Způsob řešení práce

Hodnotí se zvolená metodika práce včetně statistické analýzy dat (vhodnost, srozumitelnost, relevantnost, komplexnost), u přehledové práce pak především zvolená obsahová struktura a členění práce, způsob pojetí přehledové práce.

Hodnocení (známka): ◉ 1 ○ 2 ○ 3 ○ 4

Komentář k hodnocení (odůvodnění navržené známky). Komentář je povinný.

Metodika a zvolené postupy odpovídají vytyčeným cílům práce, zahrnující nejprve vytipování vhodných márkrů pro zjištění vnitrodruhové diverzity a následně jejich aplikaci na jedince jednotlivých druhů bzučivek z různých populací. Některé informace (např. konstrukci dendrogramů programem MEGA 6 s výběrem substitutčního modelu) mohli však být uvedeny v metodice a ve vlastních výsledcích už na ně nemuselo být opakovaně odkazováno.

3. Práce s informacemi

Hodnotí se míra a relevantnost použitých informací dostupných v odborné literatuře, jejich aktuálnost, pravdivost, komplexnost a míra vytěžování informací, způsob popisu výsledků a jejich srovnání s dalšími dostupnými informacemi, schopnost vyvozování závěrů.

Hodnocení (známka): ○ 1 ◉ 2 ○ 3 ○ 4

Komentář k hodnocení (odůvodnění navržené známky). Komentář je povinný.

Autorka staví literární rešerši i diskuzní část srozumitelnou formou. Rešeršní část je dostatečně obsáhlá a popisuje velmi dobře problematiku forenzní entomologie a molekulárních metod včetně márkrů běžně používaných při studiu diverzity hmyzu. I přesto mi zde v obou kapitolách chybí část pojednávající o mikrosatelitních márkrech, které jsou pro vnitrodruhovou diverzitu a rozdíly mezi populacemi hojně používány u širokého spektra živočichů. Taktéž pro zástupce čeledi bzučivkovitých lze nalézt studie identifikující mikrosatelitní márkry a popisující diverzitu v rámci určitého území (citace níže).
Výsledková část popisuje jasně získaná data, tabulky jsou přehledné, dendrogramy a haplotypové sítě ukazují jasně použitelnost testovaných márkrů pro dané účely.

Florin a Gyllenstrand 2002, Molecular Ecology Resources 2: 113-116.
Rodriguez a kol. 2009, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 7: 1047-1050.
Torres a kol. 2007, Area-Wide Control of Insect Pests, pp 183-191.

4. Formální zpracování práce

Hodnotí se dodržování jednotného stylu, grafická úprava práce, přehlednost, úroveň jazykového zpracování, dodržování citační normy, kvalita grafů a obrázků atd.

Hodnocení (známka): ◉ 1 ○ 2 ○ 3 ○ 4

Komentář k hodnocení (odůvodnění navržené známky). Komentář je povinný.

Práce je graficky i úrovní jazykového zpracování na standardní úrovni.
Přesto několik připomínek: Zobrazení COI dendrogramu evropských populací zájmových druhů (příloha 10) není příliš čitelné a mohlo či mělo být rozděleno na alespoň 2 části/linie, tak aby byla zachována čitelnost údajů o druzích a lokalitách, když je na ně v práci odkazováno.
Autorka by měla držet jednotný styl při používání slova "konkatenovaný" (z anglického concatenated) a vybraným českým ekvivalentem "spojený" a používat v práci jen jeden z těchto výrazů.

5. Splnění cílů práce

Srovnávají se výsledky práce s vytyčenými cíli a zadáním práce.

Hodnocení (známka): ◉ 1 ○ 2 ○ 3 ○ 4

Komentář k hodnocení (odůvodnění navržené známky). Komentář je povinný.

Zadané cíle jsou splněny a výsledkově podpořeny ačkoliv se nepodařilo pomocí vytipovaných márkrů rozlišit jednotlivé populace analyzovaných druhů bzučivek.

6. Formulace závěrů práce

Hodnotí se srozumitelnost závěrů a jejich relevantnost s ohledem ke zjištěním (vědeckým nebo informačním).

Hodnocení (známka): ◉ 1 ○ 2 ○ 3 ○ 4

Komentář k hodnocení (odůvodnění navržené známky). Komentář je povinný.

Závěry jsou podané srozumitelnou formou s konstatováním vycházejícím z výsledků, kdy se pomocí testovaných markerů nepodařilo odlišit od sebe různé populace v rámci jednotlivých druhů.

7. Odborný přínos práce

Hodnotí se využití práce pro daný obor, její vědeckost či odbornost.

Hodnocení (známka): ○ 1 ◉ 2 ○ 3 ○ 4

Komentář k hodnocení (odůvodnění navržené známky). Komentář je povinný.

Autorka v rámci této práce vytipovala 14 márkrů potenciálně použitelných pro stanovení vnitrodruhové variability bzučivkovitých a následně 11 z nich otestovala. Ačkoliv žádný z těchto márkrů nevykázal dostatečnou variabilitu, aby mohl být použit k rozlišení populací v rámci jednotlivých druhů, je možné všechny úspěšně amplifikované márkry použít k druhovému rozlišení bzučivkovitých, neboť v tomto ohledu vykazovaly konzistentní výsledky. Morfologická determinace vyžaduje značné zkušenosti, je poměrně náročná a je možná víceméně pouze u dospělých jedinců bzučivkovitých, zatímco molekulární metody jsou dnes již standardem ve většině laboratořích napříč různými obory a tak je determinace na úrovni DNA mnohdy efektivnější a při použití vhodných márkrů také přesnější. Výsledky této práce proto také poskytují srovnávací materiál pro případné širší použití testovaných márkrů.

Celkové hodnocení práce:

Návrh hodnocení známkou:
- ◉ **výborně**
- ○ **velmi dobře**
- ○ **dobře**
- ○ **nevyhověl(a)**

Doporučuji práci k obhajobě:
- ◉ **ano**
- ○ **ne**

Otázky k obhajobě:

Otázka k obhajobě 1
(povinné)

Co činí mikrostaelitní márkry tolik vhodnými pro použití v populační genetice, jak probíhá jejich přístrojová analýza a co vše mohou data prozradit krom odlišnosti populací?

Otázka k obhajobě 2
(povinné)

Je možné, že se v kriminalistické praxi ujme i používání dalších, v této práci otestovaných variabilnějších márkrů než je COI, k druhové determinaci bzučivkovitých?

Další připomínky, vyjádření a náměty k obhajobě práce resp. k jejímu dalšímu využití:
(nepovinné)

Vzhledem ke kosmopolitnosti druhů bzučivek, se kterými autorka pracovala, bylo možné předpokládat obtíže s využitím testovaných márkrů pro odlišení jednotlivých populací. Škoda, že autorka nepoužila i dostupné mikrosatelitní márkry a neotestovala je na širším spektru druhů, než pro které jsou původně určeny. Na druhou stranu, množství studií využívající mikrosatelitní márkry pro hodnocení jednotlivých druhů bzučivkovitých je velmi nízké a reálné informace téměř žádné neexistují.

Datum a podpis:

Datum: 10.05.2018

Podpis oponenta závěrečné práce: