

Posudek na diplomovou práci Dominiky Kadlečkové „Rozdíly ve viromu včel u různých populací včely medonosné (*Apis mellifera*)“

Dominika Kadlečková se v rámci svojí diplomové práce pustila do velmi nelehkého úkolu, který spočíval především ve velmi podrobném „zmapování“ viromu včely medonosné. S tím se však nespokojila a pokusila se získané výsledky nějakým způsobem vztáhnout i k některým ze sledovaných veličin, jako například k poddruhu včely, geografickému původu či ošetření proti výskytu roztočů *Varroa*. Díky použití velmi citlivé metagenomické metody a opravdu dobře propracované metodice došlo ke generování velkého množství zajímavých dat. Analýza viromu byla provedena velmi pečlivě a autorka se pokusila získaná data diskutovat v rámci různých proměnných. Práce je jistým způsobem především popisná, což je ale v současné fázi vývoje NGS metod a jejich použití v rámci různých hostitelů zcela přirozené. Celkově jsme stále spíše ve fázi zaměřené na kumulaci dat, a k samotné syntéze získaných výsledků a jejich „napasování“ na biologii hostitele se propracováváme velmi pozvolna. To se však jistě časem změní.

Za hlavní přínos předložené práce bych uvedl fakt, že bylo zjištěno, že celkový virom včely medonosné, v němž jsou nejčastěji zastoupené bakteriofágy, je do jisté míry specifický pro dané včelstvo. Což je bohužel pro případné zobecnění výsledků celkem problematické zjištění, nicméně nám nezbyvá nic jiného, než s touto skutečností při našich výzkumech zkrátka počítat. Další důležité výsledky se týkají jednak zjištění řady virů, jejichž výskyt u včel a/nebo z území ČR nebyl dosud znám, dále je pak velmi přínosná a zajímavá analýza dávající do souvislosti (s pozitivní či naopak negativní korelací) výskyt jednotlivých virů nebo jejich skupin. Ocenění si dozajista také zaslouží snaha zaměřit se na vliv výskytu dalších včelích patogenů na složení samotného viromu.

Jako zásadní však vidím problém ve velké heterogenitě mezi vzorky (přestože byly včely sloučeny po devíti, jsou rozdíly mezi těmito „sériemi“ v rámci jednoho včelstva často velmi výrazné). Navíc vůbec nevíme, jaká je dynamika v rámci včelstva – tedy jak se mění virom v průběhu života včely. Může se stát, že jedna náhodně zpracovaná létavka v rámci skupiny „mladušek“ úplně posune virom včel získaných oklepem z plástve (tedy mladušek, pravděpodobně čistíček) apod. Jsem si vědom, že se jedná o metodicky velmi obtížně řešitelný problém, nicméně je škoda, že Dominika o tomto možném úskalí ve své diplomové práci vůbec nehovoří. Zjištěné informace jsou velmi cenné a opravdu zajímavé, nicméně právě heterogenita a naše malé znalosti o dynamice změn viromu v rámci včelstva (v rámci sezony i individuálních pracovních kast včel) mohou činit prezentované závěry značně nejisté.

Práce je napsána celkem čtivě (bohužel ale některé pasáže jsou naopak psány dost těžkopádně), a občas je patrné, že na některých místech zvítězil anglický slovosled.

Níže uvádím rovněž pár formálních chyb:

) vs)

viz.

spp.

Proč nejsou rody kurzívou? Čeledi někdy kurzívou jindy ne. – Jaký je vlastně virologický úzus ???
anglický slovosled, atd. (Aparavirus, Cripavirus, a Triatovirus)

N. apis a ceranae

N. spp

BRV- 1 vs BRV-1

Obrázek 10. čeleď „Unknown“ – červeně označena????

Někdy by bylo z jazykových důvodů vhodnější použít včela (místo *Apis mellifera*) nebo kleštíky (místo *Varroa*) atd.

Tab. 1 – bylo by fajn zařadit i kliniku/patologii

Obr. 4 a 5 – zajímavý, ale je to vlastně nesystematické zařazení, protože u dalších skupin není struktura genomu zobrazena...

Komentáře / Dotazy:

1) Byl publikován negativní vztah mezi AmFV a *C. mellificae* / *L. passim* (v jejich přítomnosti byly zaznamenány nižší titry těchto virů u včel; Hartmann et al., 2015). Bohužel v DP nebyla *Lotmaria* vůbec detekována, což značí, že se asi jednalo o velmi mladé včely, protože u létavek je prevalence velmi vysoká a je velmi nepravděpodobné, že by včelstva byla negativní. Proč vlastně byl výzkum zaměřen pouze na včely z plodového plástu? (Pokud nemají parazity, může být i virom hodně pozměněn....)

2) V některých případech byly PCR na *Varroa* pozitivní, přestože roztoč nebyl vizuálně patrný. Jak je to možné? Nějaká cirkulující DNA ve včele?

3) „Včely tedy nebyly masivně parazitovány a proto usuzuji, že by *Varroa* neměl mít výrazný vliv na složení viromu v naší studii.“ Jak si je ale autorka jistá, že roztoči neopadali cestou, nebo jen nebyli přítomni v okamžiku sběru... Co o tom říká historie včelstev, tj. jestli včelstva negativní na PCR jsou opravdu negativní i dle včelařů?

4) Ověření závislosti viromu na jednotlivých kategoriích: mělo by být demonstrováno, že nebyla významná závislost na sérii (jinak by to byl nějaký bias).

Rovněž by mělo být ošetřeno, zda není vazba mezi proměnnými – tedy např. lokalita a poddruh apod. (třeba že kraňská včela je častěji na jihu apod. – pak by se už nejednalo o nezávislé proměnné apod.).

Je rovněž zajímavé, jak moc se mezi sebou někdy liší jednotlivé biologické replikáty (tedy jednotlivé „série“ ze stejného úlu, případně jak se liší dva úly ze stejného místa (včelstvo 6 a 7).

Jak bylo zohledněno množství roztočů (*Varroa*)?

5) „I spojování 9 včel, v některých případech, nezabránilo tomu, aby zastoupení jednoho viru v knihovně bylo majoritní. Zdá se tedy, že virová nálož a diverzita virů, jsou velmi odlišné u jedinců v jednom včelstvu. Toto je zásadní pozorování pro další studie, kdy bude nutné sledovat viry u izolovaných jedinců nebo spojit pro analýzu viromu NK z velkého množství jedinců.“ Toto se opravdu musí ještě ověřit dalšími metodami; nedává to biologicky ani statisticky moc smysl....

6) „Pozitivní vztah mezi LSV-2 a *Nosema* byl pozorován již dříve spolu s negativním vztahem s *Varroa* (Traynor et al., 2016). Negativní vztah s *Varroa* by mohl být způsoben i kompeticí LSV viru s virem, který je asociován s *Varroa*.“ Bylo toto otestováno – tedy vztah nikoli s *Varroa*, ale s DWV či dalšími viry?

7) „...úroveň parazitace chovaných druhů může ovlivnit složení a přítomnost patogenů u jiných hmyzích druhů v dané oblasti (Lo-ope et al., 2019)“ ... to se ale týká vos, které predují na včelách, takže to je trochu jiný případ. Jsou jiné případy, tedy kdy to zasáhne např. jiné opylovače apod.? Autorka zmiňuje čmeláky v těsné blízkosti včelínů, máme i další příklady?

Na závěr musím s radostí konstatovat, že se mi předložená práce líbila. Zvolené téma je náročné, autorka se však dokázala dostatečně seznámit s problematikou, zvolila vhodné metody pro analýzu získaných dat a vlastní výsledky pak dokázala celkem vhodně začlenit do kontextu současného poznání. Rovněž dokázala nastínit i směry případného dalšího navazujícího výzkumu. Práci proto s radostí doporučuji k obhajobě.

V Praze dne 31. srpna 2020

Doc. RNDr. Jan Votýpka, Ph.D.