

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ  
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**BRNO 2016**

**TAMARA MIFKOVÁ**

**Mendelova univerzita v Brně**  
**Agronomická fakulta**  
Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství

---



**Aplikace molekulárních metod na identifikaci nekrofágních  
zástupců řádu Diptera, typických pro Jihomoravský kraj**  
Diplomová práce

*Vedoucí práce:*

doc. Ing. Marie Borkovcová, Ph.D.

*Vypracovala:*

Bc. Tamara Mifková

---

Brno 2016

## ZADÁNÍ

### Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci *Aplikace molekulárních metod na identifikaci nekrofágních zástupců řádu Diptera, typických pro Jihomoravský kraj* vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....  
podpis

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce doc. Ing. Marii Borkovcové, Ph.D. a konzultantu Ing. Čěňku Horeckému za odborné vedení, všestrannou pomoc a důležité podněty při vypracovávání. Mé díky patří i Ing. Pavlu Tóthovi, Ph.D. z Ústavu pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství za pomoc při anatomicko-morfologické identifikaci a Mgr. Radku Michalkovi za cenné rady při statistickém zpracování dat. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým nejbližším - rodině, přátelům a partnerovi za jejich neustálou podporu, bez níž by tato práce rovněž nevznikla.

## **ABSTRAKT**

Nekrofágní hmyz hraje významnou roli především v kriminalistické praxi, a to hlavně při určování doby smrti. Tato práce si kládla za cíl monitorovat zástupce řádu Diptera na vybraných lokalitách Jihomoravského kraje – Sokolnice a Rakvice. Dále byli tito zástupci identifikováni anatomicko-morfologickými a molekulárně-genetickými metodami, které byly mezi sebou porovnány. K tomuto účelu bylo nutné izolovat DNA, amplifikovat úsek genu cytochromoxidázy I (*COI*) pomocí metody PCR a dalším zpracováním získat sekvence vybraných jedinců z mitochondriálního genomu. Ve výsledcích pokusu se více shodovaly s morfologickou identifikací výstupy databáze BOLD, než výstupy z databáze BLAST. Anatomicko-morfologickým sledováním nelze vždy přesně určit rod a druh nekrofága, je totiž závislé nejen od vývojového stádia hmyzu a jeho stavu, ale i od odborné znalosti determinátora. Proto je vhodnější využít kombinaci anatomicko-morfologických a molekulárně-genetických metod determinace, což potvrzují výsledky této diplomové práce.

**Klíčová slova:** forenzní entomologie, Diptera, mrtvé tělo, DNA barcoding

## **ABSTRACT**

Necrophagous insects plays an important role, especially in forensic practice, especially in determining the time of death. This work was aimed to monitor necrophagous species of the Diptera order in selected localities of South Moravian Region – Rakvice and Sokolnice. Furthermore, these necrophagous species were identified with anatomical-morphological and molecular genetic methods, which have been compared to each other. For this purpose it was necessary to isolate a DNA segment and amplify cytochrome oxidase I (*COI*) gene by the PCR method and with further processing to obtain the sequence of selected individuals from the mitochondrial genome. The results of the experiment more coincided with morphological identification database BOLD outputs than with outputs from the BLAST database. Anatomical and morphological identification cannot always accurately determine the genus and species necrophags, the assesment is not dependent not only on the development stage of the insect and its condition, but also on the expertise of the determinator. Most accurater results are achieved with use the combination of anatomical and morphological and molecular-genetic methods of determination, which is confirmed by the results of this thesis.

**Keywords:** forensic entomology, Diptera, corpse, DNA barcoding

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b>	<b>10</b>
2.1	ENTOMOLOGIE	10
2.2	OBECNÁ CHARAKTERISTIKA ŘÁDU DIPTERA	10
2.2.1	FORENZNĚ VÝZNAMNÍ ZÁSTUPCI	11
2.2.2	MORFOLOGIE DIPTERA	15
2.3	FÁZE ROZKLADU MRTVÉHO TĚLA	17
2.3.1	ČERSTVÁ MRTVOLA	17
2.3.2	POČÁTEČNÍ POSMRTNÉ ZMĚNY	18
2.3.3	POKROČILÉ POSMRTNÉ ZMĚNY	19
2.4	VLNY OSÍDLENÍ TĚLA NEKROFÁGNÍ FAUNOU	20
2.4.1	1. SUKCESNÍ VLNA – ČERSTVÉ TĚLO	20
2.4.2	2. SUKCESNÍ VLNA – TĚLO NADMUTÉ	20
2.4.3	3. SUKCESNÍ VLNA – TĚLO BIOLOGICKY AKTIVNÍ / FERMENTACE TUKŮ	21
2.4.4	4. SUKCESNÍ VLNA – TĚLO BIOCHEMICKY AKTIVNÍ / FERMENTACE PROTEINŮ („SÝROVÁ FERMENTACE“)	21
2.4.5	5. SUKCESNÍ VLNA – TĚLO V POKROČILÉM ROZKLADU / ČPAVKOVÁ FERMENTACE	21
2.4.6	6. SUKCESNÍ VLNA – VYSYCHÁNÍ ZBYTKŮ MĚKKÝCH TKÁNÍ	21
2.4.7	7. SUKCESNÍ VLNA – KOSTERNÍ ZBYTKY	22
2.4.8	8. SUKCESNÍ VLNA	22
2.5	POUŽITÍ MOLEKULÁRNÍCH METOD PRO IDENTIFIKACI ZÁSTUPCŮ ŘÁDU DIPTERA	24
2.5.1	BARCODING	24
<b>3</b>	<b>CÍL PRÁCE</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA</b>	<b>29</b>
4.1	POPIS KADAVERŮ	29
4.2	POPIS LOKALIT	29
4.2.1	SOKOLNICE	29
4.2.2	RAKVICE	30
4.3	SBĚR A UCHOVÁNÍ NEKROFÁGNÍ FAUNY	31

<b>4.4</b>	<b>LABORATORNÍ ZKOUMÁNÍ ENTOMOLOGICKÉHO MATERIÁLU PODLE MORFOLOGICKÝCH ZNAKŮ</b>	<b>31</b>
4.4.1	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ PŘI ANATOMICKO-MORFOLOGICKÉ IDENTIFIKACI	32
<b>4.5</b>	<b>IZOLACE DNA</b>	<b>32</b>
<b>4.6</b>	<b>MĚŘENÍ KVALITY A KONCENTRACE DNA</b>	<b>32</b>
<b>4.7</b>	<b>PCR</b>	<b>33</b>
<b>4.8</b>	<b>PCR PRIMERY</b>	<b>34</b>
<b>4.9</b>	<b>SEPARACE MOLEKUL GELOVOU ELEKTROFORÉZOU</b>	<b>35</b>
<b>4.10</b>	<b>SEKVENOVÁNÍ PCR PRODUKTŮ</b>	<b>36</b>
<b>4.11</b>	<b>DATABÁZE BOLD A BLAST</b>	<b>37</b>
<b>4.12</b>	<b>STATISTICKÁ ANALÝZA</b>	<b>38</b>
<b><u>5</u></b>	<b><u>VÝSLEDKY A DISKUZE</u></b>	<b><u>40</u></b>
<b>5.1</b>	<b>ANATOMICKO-MORFOLOGICKÁ DETERMINACE</b>	<b>40</b>
<b>5.2</b>	<b>KONTROLA KONCENTRACE A ČISTOTY DNA</b>	<b>41</b>
<b>5.3</b>	<b>OVĚŘENÍ PŘÍTOMNOSTI PCR PRODUKTU</b>	<b>42</b>
<b>5.4</b>	<b>SEKVENOVÁNÍ PCR PRODUKTŮ</b>	<b>43</b>
<b>5.5</b>	<b>MOLEKULÁRNĚ-GENETICKÁ IDENTIFIKACE</b>	<b>45</b>
<b>5.6</b>	<b>POROVNÁNÍ SHODY VÝSLEDKŮ PROGRAMŮ BLAST A BOLD S ANATOMICKO-MORFOLOGICKOU DETERMINACÍ</b>	<b>47</b>
<b>5.7</b>	<b>VLIV ČISTOTY VZORKU A KONCENTRACE DNA NA PRAVDĚPODOBNOST SPRÁVNÉ DETERMINACE</b>	<b>48</b>
<b>5.8</b>	<b>VLIV DATABÁZE A ČELEDI NA PRAVDĚPODOBNOST SPRÁVNÉ DETERMINACE</b>	<b>48</b>
<b><u>6</u></b>	<b><u>ZÁVĚR</u></b>	<b><u>50</u></b>
<b><u>7</u></b>	<b><u>SEZNAM LITERATURY</u></b>	<b><u>51</u></b>
<b><u>8</u></b>	<b><u>SEZNAM OBRÁZKŮ</u></b>	<b><u>60</u></b>
<b><u>9</u></b>	<b><u>SEZNAM TABULEK</u></b>	<b><u>61</u></b>
<b><u>10</u></b>	<b><u>SEZNAM ZKRATEK</u></b>	<b><u>62</u></b>
<b><u>11</u></b>	<b><u>PŘÍLOHY</u></b>	<b><u>63</u></b>



# 1 ÚVOD

Forenzní entomologie je důležitá v kriminalistické praxi. Primárně je využívána při stanovování posmrtného intervalu u mrtvých těl, kdy sleduje bezobratlou faunu, která ostatky osídlila. Za nejdůležitější bezobratlé jsou v tomto oboru považováni zástupci řádu dvoukřídlých (Diptera), kteří svojí činností přispívají k rozkladu těl již v jeho časných fázích. Jsou to čeledi zmíněného řádu, které lze nalézt na lidských ostatcích i na mršinách zvířat. Zastoupení jednotlivých druhů není ovlivněno původem mrtvého těla, ale okolním prostředím, ve kterém se vyskytuje.

Práce se zabývá možnostmi využití závěrů anatomicko-morfologického a molekulárně-genetického zkoumání forezně významných druhů hmyzu. Zhodnocuje výsledky sběru vajíček, larev, pupáří a dospělců, které byly nejdříve anatomicko-morfologicky a později molekulárně-geneticky determinovány. K tomu účelu byla založena dvě pokusná pole v Jihomoravském kraji, ze kterých byly v několika fázích vývoje odebrány vzorky. Ty byly dále zpracovány a využity pro zhodnocení možností obou způsobů determinace a vyhodnocení rozdílů, zejména rychlosti a přesnosti jednotlivých metod.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Entomologie

Entomologie (z řeckého εντομος, entomon "hmyz" a -λογία, -logia) je odvětví zoologie, které se zabývá studiem hmyzu. Tato věda pracuje i s poznatky dalších oborů, jako jsou například molekulární genetiky, biochemie, systematika, fyziologie, vývojová biologie, ekologie, morfologie, zemědělství, forenzní vědy aj. (Lilholt, 2015).

#### Forenzní entomologie

Forenzní entomologie se zabývá studiem hmyzu při vyšetřování trestných činů. Hmyz, zejména nekrofágní (živící se mrtvým tělem jiného živočicha), je přitahován k rozkládajícímu se tělu již od časného stádia (Joseph *et al.*, 2011). Pro určité dvoukřídle je typické období, ve kterém se na těle vyskytují. Je to podmíněno rozkladnými produkty, které tento hmyz lákají (Hirt, 2015).

Larvy se po druhově specifické době zakuklí a procházejí vývojem, na jehož konci je dospělý jedinec, který vyletí z kukly. Fáze zakuklení trvá přibližně 8–10 dnů od naklazení vajíček. Přítomnost prázdných kukel (pupáří) na těle znamená, že uplynula nutná doba pro vývoj mouchy (Hirt, 2015).

Tím, že se studují populace hmyzu a jejich vývojová larvální stádia, forenzní vědci mohou odhadovat post mortem index (PMI)<sup>1</sup>, jakoukoliv změnu polohy mrtvol, příčinu nebo dobu smrti (Joseph *et al.*, 2011). Pro rychlou a přesnou identifikaci nekrofágního hmyzu přispívají i moderní metody DNA a to hlavně z důvodu často velmi obtížné nebo dokonce nemožné morfologické identifikace (Amendt *et al.*, 2004; Aly & Wen, 2013).

### 2.2 Obecná charakteristika řádu Diptera

Dvoukřídle (Diptera) patří k rozsáhlým a druhově velmi bohatým řádům hmyzu, na světě se odhaduje jejich počet na více než 100 000 druhů (Doskočil, 1977). Jedná se o velmi malý až středně velký hmyz o délce těla 1–45 mm se savým a bodavým ústním ústrojím (Amann, 1995; Šefrová, 2006). Na hlavě jsou většinou velké složené oči (Daněk, 1990). Dvoukřídle mají jen jeden pár blanitých křídel, která jsou obvykle

<sup>1</sup> Post mortem interval je časové období od doby smrti do nalezení těla (Byrd & Castner, 2010).

velká, průhledná s dobře vyvinutými podélnými žilkami, ale s omezeným počtem příčných žilek. Zadní křídla jsou přeměněna v paličkovitá kyvadélka (Amann, 1995; Šefrová, 2006). Kráčivé nohy jsou na konci s drápky, u much s přichytnými polštářky. Tělo je chitinizované, tuhé, zadeček často měkčí (Daněk, 1990).

U řádu Diptera probíhá proměna dokonalá (Daněk, 1990; Laštůvka, 2004). Samička klade buď jednotlivě nebo ve shlucích kulatá, oválná nebo větvenovitá vajíčka (Daněk, 1990). Larvy jsou převážně bělavé, beznohé a většinou také bez hlavy. Kukly jsou mumiové bez pouzdra nebo soudečkovité, tj. po posledním svlékání larvy uzavřené pokožkou a přeměněné ve výrazně segmentovaný soudeček (Amann, 1995). Během vývoje procházejí nejčastěji čtyřmi, vzácně více instary. Význam dvoukřídých je značně široký a rozmanitý (Šefrová, 2006). Bývají časní kolonizátoři mršin (bzučivkovití) a pozitivně se uplatňují také jako konzumenti rostlinných zbytků (octomilky), výkalů (výkalnicovití, mouchovití) a dalších (Šefrová, 2006; Farinha *et al.*, 2014).

### 2.2.1 Forezně významní zástupci

#### **Čeleď: Bzučivkovití (Calliphoridae)**

Bzučivkovití jsou považováni za důležitý zdroj informací v lékařských, veterinárních a forezních oborech (GilArriortua *et al.*, 2014). Tato čeleď jako první kolonizuje rozkládající se těla (Park *et al.*, 2013). V ČR žije 52 druhů. Jedná se o středně velké, silné mouchy, délka 4 mm–1,5 cm. Nejčastější barvou je kovově zelená, či modrá (Buchar, 1995; McGavin, 2005). Tělo je pokryto hojnými štětinami (Daněk, 1990).

Bzučivky najdeme na hniјících látkách, mršinách, výkalech ale i květech, kde bzučivka klade hromádky slepených, bělavých a podlouhlých vajíček o délce 1,5 mm (Daněk, 1990; Rietschel, 2011). Larvy jsou bílé nebo světle žluté, měkké, vpředu velmi zúžené a vzadu tupě uťaté. Kolem těla, které je dlouhé až 15 mm mají pásy drobných trnů (Daněk, 1990; McGavin, 2005).

Vyvíjejí se v mršinách, masu, sýrech, rozkládajících se rostlinných látkách, výkalech i v otevřených ranách živočichů včetně člověka (Buchar, 1995). Po 7–8 dnech se zakuklí. Soudečkovitá červenohnědá kukla (pupárium) má vzadu 12 zoubků. Za dalších 10–12 dní se z kukly líhne dospělý jedinec (Daněk, 1990). Bzučivkovití mají 12 chromozómů, a to deset autozómů a chromozomy X a Y (Park *et al.*, 2013).

Bzučivka umrlčí (*Cynomya mortuorum* Linnaeus, 1761)

Běžná bzučivka, jejíž larvy se vyvíjejí v tlejícím mase, zdechlinách a také v lidských výkalech (McGavin, 2005). Barva těla je tmavě kovově modro-zelená, hlava je žlutá. Délka těla je 8–15 mm (Haupt & Haupt, 1998).

Bzučivka obecná (*Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830)

Nejběžnější bzučivka ve městech, kde se její larvy vyvíjejí ve zdechlinách živočichů (McGavin, 2005). Středně velká, statná, modře opalizující moucha o délce těla 10–14 mm. Hlava je široce oválná s velkýma hnědočervenýma očima a s krátkými štětinkovitými tykadly a u samečka s červeným nebo temně hnědým čelním proužkem. Hrud' je štítovitě vyklenutá, ochlupená, temně modrá, s jemnými podélnými proužky. Velká průhledná křídla s jednoduchou žilnatinou drží bzučivka obecná deltovitě nazad. Křídla přesahují kovově modrý, lesklý zadeček (Rietschel, 2011). Vajíčka klade pouze na čerstvé mrtvoly lidí či zvířat, kde dosud rozklad tkání příliš nepokročil. Obvykle to bývá do 48 hodin po smrti (Daněk, 1990).

Bzučivka zlatá (*Lucilia caesar* Linnaeus, 1758)

Středně velká, zavalitá moucha o délce těla 6–11 mm. Hlava je široce oválná, s velkýma červenýma očima. Hrud' je dlouze štítovitá, s černými brvami, zadeček je poměrně krátký a široký. Kovově zelenavé zbarvení celého těla má různé lesklé tóny od modrozelené a fialově zelené po vylíhnutí až po smaragdově zelené odrazy, u starších jedinců i měděně narudlé. Křídla sedící mouchy směřují deltovitě dozadu. Zadeček je řídko pokryt černými štětinkami (Obr. 14). Samičky kladou žlutavá vajíčka na zdechliny, fekálie a kvasící kuchyňské odpadky (Rietschel, 2011). Na mrtvá těla jsou vajíčka kladena do dvou dnů po smrti (Daněk, 1990). Larvy se mohou objevit také v zanedbaných hnisajících ranách, v nichž bezděčně podporují proces hojení (Rietschel, 2011).

*Lucilia illustris* Meigen, 1826

Délka těla u dospělců je přibližně 6–8 mm. Hrud' a břicho se zeleně nebo modře lesknou, zatímco nohy jsou černé. Dospělé jedince přitahují především čerstvé mršiny, kam kladou své larvy. Lze je ovšem nalézt i v blízkosti exkrementů (Byrd & Castler, 2010).

### **Čeleď: Mouchovití (Muscidae)**

Většina much je nenápadně zbarvená, má dlouhé štíhlé nohy a tmavé štětiny po těle. Vyskytuje se celosvětově hlavně na květinách, trusu či tlejících látkách. V ČR žije 50 druhů. Larvy mají zúženou hlavu a tupě utátný zadeček (McGavin, 2005).

Moucha domácí (*Musca domestica* Linnaeus, 1758)

Poměrně malá moucha o délce těla 7–8 mm. Základní zbarvení je tmavě šedé, tělo je řídko ochlupené. Hlava je při pohledu shora široce zaokrouhlená, s velkýma červenýma očima, které se na čele nestýkají. Hrud' je šedočerná, se čtyřmi černými podélnými proužky, zadeček je převážně žlutavý až bělavý, s černou kresbou. Průhledná křídla s oblým hrotem směřují dozadu, „vnitřní“ podélné žíly před okrajem křídla uhýbají a nedosahují jeho okraje (Rietschel, 2011). Odchovává potomstvo v kvasících organických látkách (McGavin, 2005).

Rody: *Ophyra* a *Hydrotaea*

*Ophyra* se vyskytuje na mršinách v období od května do října. Délka těla je 6,5–8 mm. Tělo a nohy jsou vždy černé, někdy se vyskytuje stříbrný lesk. *Hydrotaea* je většinou synantropní. Hojně se vyskytuje na hničících látkách a výkalech (Doskočil, 1977). Zástupci rodu *Hydrotaea* jsou velmi užiteční při výpočtu post mortem indexu (PMI). Převážně se uplatňují při zjišťování drog, nebo zda nedošlo k manipulaci s mrtvým tělem (Byrd & Caster, 2010).

### **Čeleď: Slunilkovití (Fanniidae)**

U nás se nachází přes 30 druhů slunilek. Jsou často synantropní (Doskočil, 1977). Ve starší literatuře lze najít tuto čeleď i jako podčeleď čeledi Mouchovití (Muscidae).

Rod: Slunilka (*Fannia*)

Často jsou mylně považované za mouchu domácí. Larvy jsou nápadné dlouhými výrůstky na těle, jež jsou na zadečku dvojkřanné (Obenberger, 1955). Převážně se jedná o koprofágní mouchy (Doskočil, 1977).

### **Čeled': Masařkovití (Sarcophagidae)**

Masařkovití jsou považováni za forenzně důležitý hmyz pro vyšetřování posmrtného intervalu (PMI), avšak jsou často opomíjeni (Pai *et al.*, 2014). Jedná se o středně velké mouchy s řídkým, ale výrazným ochlupením, šachovitě matně stříbrošedě a modročerně vzorkované na zadečku, kde je poslední článek ohnutý dolů. Hrud' je podélně bíle pruhovaná (Buchar, 1995; McGavin, 2005; Rietschel, 2011). Oči jsou cihlově červené (Daněk, 1990).

Larvy mají špičatou hlavu, tupý zadeček a na těle pruhy jemných trnů (McGavin, 2005). Jsou výlučnými konzumenty, tj. nekrofágy i saprofágy (živí se rozkládající organickou hmotou) (Daněk, 1990). Vyvíjejí se v rozkládajících organických látkách, zvláště v mase, mršinách, výkalech i v hnoji. Samičky rodí larvy prvního stádia – kladou je nebo pouštějí za letu. Z více než 120 našich druhů je jedním z nejhojnějších masařka obecná (Buchar 1995, McGavin, 2005). Masařkovití jsou často spojováni s přenosem rektálních a urogenitálních chorob (GilArriortua *et al.*, 2014).

Masařka obecná (*Sarcophaga carnaria* Linnaeus, 1758)

Čelní a obličejová část hlavy vystupuje zvláště u samic mezi oči dopředu a je stříbrně lesklá, s polokulovitými velkými černými až hnědočervenými očima. Křídla jsou průhledná, trojúhelníková, se zřetelnými žilkami a směřuje podélně dozadu nad zadeček (Rietschel, 2011).

### **Čeled': Sýrohlodkovití (Piophilidae)**

Dospělci jsou malé až středně velké štíhlé mouchy, s délkou těla 2,5–6,0 mm. Barevné provedení těla je velmi variabilní, od žluté až po černou, často lesklé černé se žlutými znaky na hlavě a končetinách (Daněk, 1990; Barták, 2009;). Samička nedlouho po vylíhnutí oplozena a klade bělavá, úzká až 1 mm velká vajíčka (Daněk, 1990). Larvy žijí v různých substrátech, ale nejčastěji se vyskytují na exponovaných tělech v pokročilém stádiu rozkladu (Barták, 2009).

Sýrohlodka drobná (*Piophila casei* Linnaeus, 1758)

Tmavá muška, velká 4–5 mm, s lesklými černými až bronzově hnědými protáhlými zadečky, jehož strany jsou téměř rovnoběžné. Na hlavě je čelo leskle černé, oči cihlově červené. Nohy jsou černé, někdy je střední a zadní pár červenožlutý. Průhledná křídla překrývají v klidu celý zadeček (Daněk, 1990).

### **Čeled': Pestřenkovití (Syrphidae)**

Obvykle větší pestře zbarvení dvoukřídle napodobující některé bodavé blanokřídle. Jsou výborní letci, dokáží se udržet ve vzduchu na jednom místě nebo při letu rychle mění směr (Šefrová, 2006). Dospělé mouchy se objevují od konce dubna do začátku června, některé i později (Obenberger, 1955). Pestřenky jsou u nás v četných druzích všude hojné. Tělo je tmavě, kovově i černě zbarveno, zadeček má světlé příčné proužky nebo skvrny v různém počtu, někdy je však skoro tmavý (Obenberger, 1955). Larvy pestřenkovitých kolonizují mrtvé tělo ve vodním prostředí (Lindren *et al.*, 2015).

### **Čeled': Hrbilkovití (Phoridae)**

Drobné 0,5–6 mm dlouhé hnědé, černé nebo žlutavé mušky se tak nazývají proto, že mají výrazně vyhrbenou hrud'. Jejich hlava je malá, plochá a silně posunutá dolů (Obenberger, 1955; McGavin, 2005). Zadní stehna jsou často zploštělá a nápadně velká. Štětinky na těle jsou peřité (McGavin, 2005). Vajíčka jsou kladena a larvy se vyvíjejí na zdechlinách, tlejících látkách, houbách nebo parazitují na jiném hmyzu, plžích, mnohonožkách nebo červech. Larvy jsou protáhlé, kónické a často mají ostnaté výrůstky (Obenberger, 1955; McGavin, 2005). V ČR žije přibližně 150 druhů (McGavin, 2005).

## **2.2.2 Morfologie řádu Diptera**

Morfologická diagnóza na základě vnějších znaků může být velmi obtížná, vzhledem k fyzické podobnosti, zejména ve vývojových stádiích. Tyto jedince je třeba často chovat až do stádia dospělce, které je pro identifikaci příznivější (Saloña-Bordas, 2015). Tělo hmyzu je složeno z článků, které splnutím tvoří tři základní oddíly (Pokorný & Šifner, 2004).

### **2.2.2.1 Hlava (Caput)**

Velká a pohyblivá (Šefrová, 2006), většinou pravidelně kulovitěho tvaru. Nejnápadnější jsou velké složené oči, které dávají hlavě charakteristický tvar. U samců se oči stýkají, kdežto u samic jsou oči vpředu rozděleny čelem a nedotýkají se. Zadní část hlavy (záhlaví) bývá rovná nebo konkávní (Doskočil, 1977). Ústní ústrojí je sací, někdy

přizpůsobené k lízání či bodání (Šefrová, 2006). U čeledi Muscidae se setkáváme se silným sosákem, který je tvořen sklerotizovaným spodním pyskem. Čelistní makadla (*maxiální palpy*) jsou běžně označována jako „makadla“ (Doskočil, 1977).

#### **2.2.2.2 Hrud' (Thorax)**

Skládá se ze tří článků: středohrudi (*mesothorax*), která se skládá z dorsální (zadní) a pleurální (boční) strany, předohrudi (*prothorax*) a zadohrudi (*metathorax*) (Doskočil, 1977; Rosický & Daniel, 1989). Většina hrudi bývá často ochlupená. Pravidelné sety chlupů jsou často přesně pojmenované (Doskočil, 1977). To využívá většina autorů pro přesnou identifikaci.

Křídla jsou vždy blanitá (Doskočil, 1977). V mnoha případech je průběh žilnatiny křídel konstantní a použitelný jako determinační znak (Pokorný & Šifner, 2004). Na středohrudi se nachází pouze 1. pár a 2. pár křídel je přeměněn v kyvadélka (haltery), které slouží k vyvažování. Křídelní žilnatina se skládá z žilek, které se označují velkými písmeny (C, Sc, R, M, Cu, A). Indexy u těchto písmen označují číslo větve konkrétní žilky, nebo typ srůstu jednotlivých větví (Obr. 15 v kapitole 11 Přílohy). Malými písmeny se označuje pouze několik příčných žilek, které se nachází mezi hlavními žilkami (h, m-cu). Jednotlivá pole jsou označována velkými písmeny podle žilky, která je shora ohraničuje (Obr. 16 v kapitole 11 Přílohy). Nejvýznamnější jsou první a druhé basální pole (BR a BM) a pole diskoidální (D) (Doskočil, 1977). Žilky jsou sklerotizované a poskytují křídlu oporu při letu (Smrž, 2013). Pro systém a určování na křídlech jsou důležité i blanité laločnaté výběžky u báze křídla. Pokud se nachází na křídle, je to tzv. alulu, blíže ke křídelní bázi je křídelní šupina a na hrudi se jedná o hrudní šupinu (Doskočil, 1977).

Nohy jsou ve třech párech. První pár je často posunut více dopředu (Doskočil, 1977). Končetiny jsou štíhlé, kráčivé (Rosický & Daniel, 1989). Skládají se z kyčle (*coxa*), příkyčlí (*trochanter*), stehna (*femur*), holeně (*tibia*) a chodidla (*tarsus*), které je tvořeno 5 články. Na konci nese dva drápky a dva polštářky. Nohy často nesou, hlavně na stehnech a holeních, chlupy, trny či sety, jejichž postavení je též velmi využívaným systematickým znakem (Doskočil, 1977).



### **2.2.2.3 Zadeček (Abdomen)**

U primitivnějších forem je tvořen max. 11 články (Pokorný & Šifner, 2004), u vyšších dvoukřídlých je zpravidla 4–5 článků. Ostatní články jsou zasunuty dovnitř zadečku a tvoří u samic nepravé teleskopické kladélko. U samečků tvoří tzv. pomocné ústrojí k páření (Šefrová, 2006). Na konci zadečku vyúsťuje trávicí a rozmnožovací soustava (Rosický & Daniel, 1989).

## **2.3 Fáze rozkladu mrtvého těla**

### **2.3.1 Čerstvá mrtvola**

Krevní oběh ustává a nepokračuje proudění krve do těla. Kůže a sliznice světlají ihned po smrti. Vzhledem k tomu, že cirkulace krve ustala, tkáně a buňky jsou zbaveny kyslíku a začínají umírat. Různé buňky mají různou dobu umírání (př. buňky mozku umírají již 3–7 minut po smrti, zatímco kožní buňky je možné odebírat ještě 24 hodin po smrti a stále rostou na laboratorních kulturách) (Gunn, 2009).

#### **2.3.1.1 *Algor mortis (posmrtné zchlazení)***

Vztahuje se k chladnutí těla po smrti. Mrtvé tělo má tendenci vyrovnávat teplotu prostředí / okolí (Dolinak *et al.*, 2009). Ochlazuje se teoreticky rychlostí 1 °C / hod, za předpokladu, že se jedná o dospělého jedince o normální váze a teplota okolí je kolem 20 °C. Rychlost ochlazení se zvyšuje v případě, že se jedná o jedince trpícího podvýživou nebo pokud je okolní teplota nízká nebo pokud je větrno. Míra chladnutí u obézního jedince je naopak nižší. Stejně tak je tomu, pokud je okolní teplota vysoká (Segen's Medical Dictionary, 2016).

#### **2.3.1.2 *Livor mortis (posmrtné skvrny)***

Vznikají klesáním krve do nejspodnějších částí těla, kde se usazuje rovnoměrně v kapilárách - tím se stávají viditelnými. Nejdříve tvoří malé ostrůvky a až později se slévají do velkých ploch (Štefan & Hladík, 2012). Mrtvolné skvrny (*livores*) mají za normálních okolností červenofialovou barvu. Kůže v horních částech těla je naopak bledá. Nejdříve jsou patrné za ušními boltci a po obou stranách krku (Kokavec, 1987).

### **2.3.1.3 Rigor mortis (posmrtná ztuhlost)**

K ochabnutí svalstva dochází ihned po smrti, a to jak hladkého, tak i příčně pruhovaného (Štefan & Hladík, 2012). V okamžiku smrti ztrácí všechny svaly své přirozené napětí (Hirt, 2015). K úplnému vývinu posmrtné ztuhlosti dochází zpravidla za 6–8 hodin. Doba trvání posmrtné ztuhlosti závisí na metabolickém stavu při smrti a na různých faktorech, jako je velikost těla a okolní teplota (Amendt *et al.*, 2004). Nejdříve lze pozorovat na bránici a srdečním svalu (již po 30 minutách). Dále na mimickém a kosterním svalstvu (za 45–90 minut po zástavě krevního oběhu). Za 1–3 hodiny se ztuhlost objevuje na šijovém a žvýkacím svalstvu. Tuhnutí pokračuje k horním a dolním končetinám, což trvá 4–9 hodin. Vytrácet se *rigor mortis* začíná ve stejném pořadí po 48 hodinách (Kokavec, 1987).

### **2.3.2 Počáteční posmrtné změny**

Projevují se odbarvením povrchu kůže, shromažďováním plynů v tělní dutině a nadouváním těla. V této fázi je typické působení mikrobů a nekrofágní fauny, která napomáhá rychlejšímu rozkladu (Gunn, 2009).

#### **2.3.2.1 Osyhání**

Je podmíněno ztrátou vody, která se odpařuje z povrchu těla. Nejlépe je patrné na rtech, spojivkách (při otevřených očích) a genitálu (Štefan & Hladík, 2012). Vyskytuje se rovněž všude tam, kde došlo k porušení či ztrátě pokožky např. při manipulaci s mrtvolou (Hirt, 2015).

#### **2.3.2.2 Autolýza**

Samonatrávení vlastními enzymy, které se vyskytují ve všech buňkách uvnitř lyzozomů (Mačák *et al.*, 2012). Tkáň ztrácí odolnost vůči vlastním enzymům neprodleně po smrti (Štefan & Hladík, 2012). Začínají probíhat nekoordinované fermentativní pochody, při nichž enzymy uvolněné z buněk štěpí především bílkoviny a sacharidy (Kokavec, 1987). To vyvolává hluboké změny v buněčných a tkáňových strukturách, ke kterým nejrychleji dochází např. v nadledvinách, pankreasu, na sliznici žaludku a střev, a to díky množství enzymům, které obsahují (Štefan & Hladík, 2012).

### **2.3.3 Pokročilé posmrtné změny**

Ztráta kůže a měkkých tkání, což má za následek vysychání a tím i zpomalení procesu rozkladu. Na těle není patrná kůže ani měkké tkáně. Rozkládány jsou i tkáně jako např. chrupavky, nehty, vlasy, prostata nebo děloha (Gunn, 2009).

#### **2.3.3.1 Hniloba**

Hniloba je rozklad bílkovin účinkem hnilobných mikrobů (Mačák *et al.*, 2012), kteří se nacházejí převážně ve střevním traktu (Hirt, 2015). Jedná se o anaerobní bakterie, koliformní organismy a mikrokoky, kterým prospívá vymizení kyslíku a snížené pH. První známkou hniloby je zelené zbarvení kůže v oblasti podbřišku, kde je kůže nejbližší tlustému střevu. Měkké tkáně obličej jsou odulé a oči jsou působením hnilobných plynů vytlačovány z hlavy (Hirt, 2015). Nejdolnější z vnitřních orgánů jsou proti hnilobě plíce, srdce, ledviny, prostata, netěhotná děloha a močový měchýř (Kokavec, 1987). Největším ukazatelem této fáze je zvýšená přítomnost brouků a snížení dominance much (Diptera) na těle (Gennard, 2007).

#### **Difuze tekutin a plynů**

Posmrtná difuze tekutin je spojena s tvorbou posmrtných skvrn. Z autolyzovaných erytrocytů je uvolněn hemoglobin, který následně proniká do podkoží. Významnější projev této difuze je ovšem později ve fázi hniloby. Tkáněmi snadněji pronikají i plyny, které jsou tvořeny střevními bakteriemi. Nejčastěji jsou to plyny metan, čpavek, sirovodík a oxid uhličitý. V období za 3 až 5 dní je patrná síť podkožních cév, které mají špinavě zelenou barvu. V pozdější fázi rozkladu jsou i orgány naplněné plynem, což lze zjistit pohmatem (Hirt, 2015).

#### **2.3.3.2 Tlení**

Tlení je na rozdíl od hniloby, kde působí anaerobní bakterie, procesem aerobním (Hirt, 2015). Toto oxidativní posmrtné rozkládání těla probíhá v řádech měsíců a let. Podílí se na něm některé bakterie, plísně, kvasinky a nižší houby (Kokavec, 1987).

## 2.4 Vlny osídlení těla nekrofágní faunou

Pro účely této diplomové práce jsou v kapitole podrobněji popsány pouze sukcesní vlny, které navazují na počáteční rozklad mrtvého těla a blíže se vztahují k řádu Diptera. Ostatní sukcesní vlny jsou popsány pouze okrajově.

### 2.4.1 1. sukcesní vlna – čerstvé tělo

Představuje počátek sukcese bezprostředně po smrti, ojediněle již během umírání (Šuláková, 2014). Na mrtvé tělo nalétávají nekrofágní mouchy, které jsou přitahovány pachem potu, krve a čerstvého masa (Daněk, 1990). Nastává masivní kolonizace hmyzem, která je spojena s kladením vajíček samičkami much hlavně ve chvíli, kdy se objevují krváceniny. Tedy tehdy, pokud smrt nastala poraněním (Daněk, 1990; Štefan & Hladík, 2012).

Nejvýznamnějšími zástupci nekrofágní fauny, kteří se v této vlně nacházejí na mrtvém těle, jsou muchovití (Muscidae) a bzučivkovití (Calliphoridae). Konkrétněji moucha domácí (*Musca domestica*), bzučivka obecná (*Calliphora vicina*), bzučivka rudohlavá (*Calliphora vomitoria*), *Calliphora uralensis*, *Lucilia caesar*, *Musca autumnalis*, *Muscina stabulans*, a další běžné druhy patřící do čeledi muchovití a bzučivkovití (Daněk, 1990).

### 2.4.2 2. sukcesní vlna – tělo nadmuté

Vyskytuje se u ležícího těla ihned, jakmile se v těle začnou tvořit zapáchající plynné látky, které tělo nadouvají (Daněk, 1990). Za optimálních podmínek může tato fáze nastat do několika hodin (Šuláková, 2014). Destrukční činnost sukcesní kolonizace způsobená larvami much z 1. vlny nadále pokračuje a přidávají se zástupci další významné čeledi masařkovití (Sarcophagidae). Nejčastěji se můžeme setkat s druhy *Sarcophaga carnaria*, *Sarcophaga serbica*. Z čeledi bzučivkovití se jedná o druhy *Cynomya mortuorum* a *Protophormia terraenovae* (Daněk, 1990). V některých případech (př. vlivem prostředí) mohou v roli hlavních kolonizátorů zástupci čeledi Muscidae nahradit čeleď Calliphoridae (Šuláková, 2014).

### **2.4.3 3. sukcesí vlna – tělo biologicky aktivní / fermentace tuků**

Tato vlna je charakteristická ztekucováním substrátu a zahrnuje proces zmýdelnění a fermentaci proteinů (Šuláková, 2014). Tuky se enzymaticky štěpí na glycerol a vyšší mastné kyseliny. Převážně se tvoří kyselina máselná, která má velmi nepříjemný zápach (Kokavec, 1987; Daněk, 1990). V této vlně stále pokračuje činnost larev zmíněných much z čeledí: masařkovití, mouchovití a bzučivkovití. Již od počátku 3. vlny na mrtvé tělo nalétávají biofágové tj. organismy živící se čerstvou, živou potravou (Jelínek & Zicháček, 2006), kteří se živí již zmíněnými larvami (Daněk, 1990).

### **2.4.4 4. sukcesní vlna – tělo biochemicky aktivní / fermentace proteinů („sýrová fermentace“)**

Tato vlna se vyznačuje hlavně čpavkovou fermentací zbytků měkkých tkání (Šuláková, 2014). Bývá nazývána též jako sýrová fermentace, protože je hmyz lákán hnilobným zápachem připomínajícím zápach sýru (Daněk, 1990). Z much láká převážně drobné mušky sýrohlodky (Piophilidae) a octomilky (Drosophilidae). Konkrétně se jedná o druhy sýrohlodka drobná (*Phiopila casei*) a octomilka velká (*Drosophila funebris*). Na těle nadále zůstávají aktivní larvy čeledí slunilkovití (Fanniidae), kmitalkovití (Sepsidae) nebo pestřenkovití (Syrphidae) (Daněk, 1990; Šuláková, 2014).

### **2.4.5 5. sukcesní vlna – tělo v pokročilém rozkladu / čpavková fermentace**

Bílkoviny jsou odbourávány až na aminokyseliny. Dekarboxylací vytvářejí tzv. biogenní aminy. Ty spolu s dalšími rozkladnými produkty bílkovin, např. sirovodíkem, amoniakem atd., se podílejí na vzniku hnilobného zápachu (Kokavec, 1987). Dochází k uvolňování amoniaku z mrtvého těla, což ukazuje na to, že rozklad dosáhl stádia čpavkové fermentace. V hnilobných bílkovinných látkách lze v našich podmínkách nalézt jedince řádu Diptera patřící do čeledi hrbilkovití (Phoridae) a mouchovití (Muscidae). Nejčastěji to je moucha *Hydrotaea ignava* a hrbilka *Phorra aterrima* (Daněk, 1990).

### **2.4.6 6. sukcesní vlna – vysychání zbytků měkkých tkání**

Toto období nastává kolem jednoho roku po úmrtí (Daněk, 1990). Pokud je tělo v zemi v průběhu 1–2 let bývá dutina hrudní i břišní široce otevřena. Většina žlázových, dutých

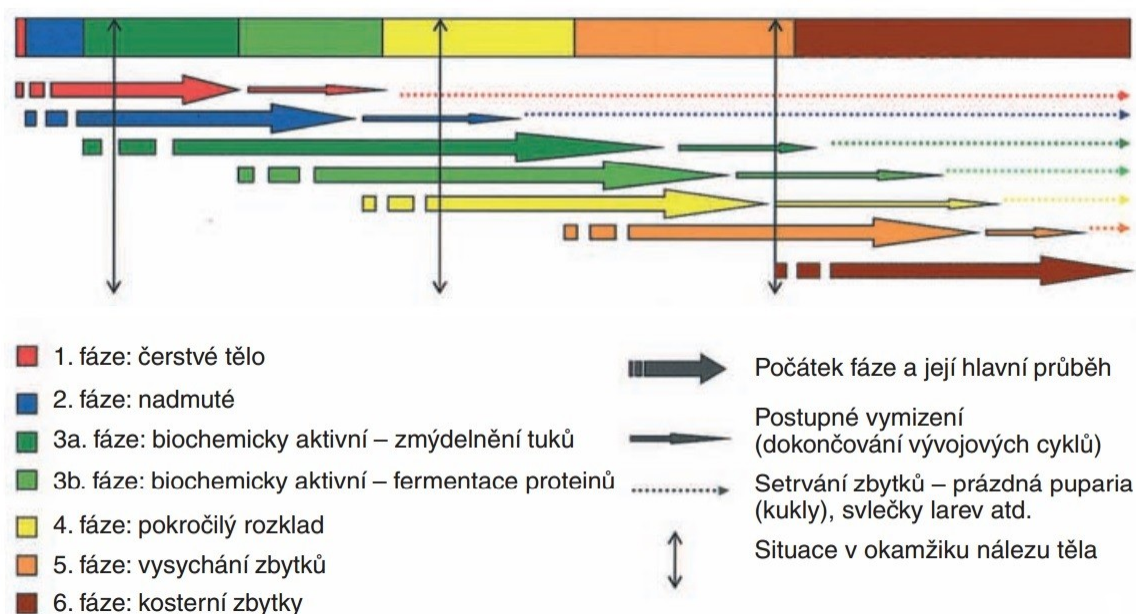
orgánů a měkkých tkání je rozložena (Šuláková, 2014), zůstává viditelné pouze vazivo a šlachy (Kokavec, 1987). Tělo se místy jeví jako kostra (Daněk, 1990).

#### 2.4.7 7. sukcesí vlna – kosterní zbytky

Je to období, kdy je mrtvola zcela vysušena. Objevuje se zde hmyz, který vyhledává mršiny, kosti, rohovinu, sušené maso, peří atd. Zástupci řádu Diptera se zde již neobjevují (Daněk, 1990).

#### 2.4.8 8. sukcesní vlna

Na mrtvole starší než 3 roky, která leží v otevřeném terénu, lze i v této fázi rozkladu nalézt zástupce nekrofágní fauny. Převážně se jedná o různé druhy roztočů (Acari) (Daněk, 1990). Po době 7–10 let u dospělého a 4–5 let u dítěte zůstávají z těla jen jednotlivé kosti s částečně zachovalými chrupavkami a úpony šlach. Po 20 letech jsou zachovány pouze kosti, v některých případech i vlasy (Kokavec, 1987).



Obr. 1 Schématické znázornění sukcesních vln (fází) (Šuláková, 2014)

Tab. 1 *Shrnutí zastoupených čeledí, rodů a druhů řádu Diptera v jednotlivých sukcesních vlnách*

Sukcesní vlna	Čeleď	Rod	Druh
1.	Calliphoridae	<i>Lucilia</i>	<i>caesar</i>
		<i>Calliphora</i>	<i>vicina</i> <i>vomitorea</i> <i>uralensis</i>
	Muscidae	<i>Musca</i>	<i>domestica</i> <i>autumnalis</i>
		<i>Muscina</i>	<i>stabulans</i>
	2.	Sarcophagidae	<i>Sarcophaga</i>
Calliphoridae		<i>Cynomia</i>	<i>mortuorum</i>
		<i>Protophormia</i>	<i>terraenovae</i>
3.		Calliphoridae	<i>Lucilia</i>
	<i>Calliphora</i>		<i>vicina</i> <i>vomitorea</i> <i>uralensis</i>
	Muscidae	<i>Musca</i>	<i>domestica</i> <i>autumnalis</i>
		<i>Muscina</i>	<i>stabulans</i>
	Sarcophagidae	<i>Sarcophaga</i>	<i>carnaria</i> <i>serbica</i>
Calliphoridae	<i>Cynomia</i>	<i>mortuorum</i>	
	<i>Protophormia</i>	<i>terraenovae</i>	
4.	Fanniidae	<i>Phiopila</i>	<i>casei</i>
	Drosophilidae	<i>Drosophila</i>	<i>funnebris</i>
	Piophilidae		
	Syrphidae		
	Sepsidae		
5.	Syrphidae	<i>Phorra</i>	<i>aterrima</i>
	Muscidae	<i>Hydrotaea</i>	<i>ignava</i>
6.	Běžně se nevyskytují		
7.	Běžně se nevyskytují		
8.	Běžně se nevyskytují		

## 2.5 Použití molekulárních metod pro identifikaci zástupců řádu Diptera

### 2.5.1 Barcoding

Primární cíle DNA barcodingu se zaměřují na shromáždění referenčních knihoven sekvencí čárových kódů (barcoding) známých druhů. Současné výsledky ukazují, že tyto knihovny budou velmi účinné při identifikaci v rámci živočišné říše. Rozlišení druhů touto metodou přináší účinnost až 95 % (Ratnasingham & Hebert, 2007).

DNA barcoding je standardizovaná taxonomická metoda, která využívá krátké sekvence DNA, jako diagnostický biomarker organismů k jejich identifikaci (Hebert, 2003; Ferri, 2009). Za standardní marker je brán segment přibližně 600 bazických párů na 5' oblasti mitochondriálního genu cytochromoxidázy I (*COI*) (Lv *et al.*, 2014). Velmi důležitým rysem obecně živočišného mitochondriálního genomu, a tedy i genu *COI*, je nepřítomnost intronů, což umožňuje velmi jednoduché namnožení zvoleného úseku (Záveská Drápková, 2012).

Pro praktické využití DNA barcodingu (čárového kódu) musí konkrétní region genu splňovat tři kritéria: (1.) obsahovat dostatečnou variabilitu mezi druhy, (2.) být dostatečně krátký, aby mohl být sekvenován v jedné reakci, a (3.) obsahuje konzervativní oblast pro univerzální primery (Ferri, 2009).

#### 2.5.1.1 Barcoding u řádu Diptera

Průměrná velikost genomu u forenzně relevantních zástupců řádu Diptera se pohybuje v širokém rozmezí od 425,8 Mbp až 1 197,4 Mbp (Picard *et al.*, 2012). DNA barcoding sdružuje dva odlišné a relativně nezávislé aspekty: (1.) může být použit pro identifikaci a přiřazení neznámého exempláře k druhům, které byly již dříve popsány a (2.) usnadnit objevení nových druhů (Whitworth, 2007). Pro tyto aspekty se kromě standardního markeru *COI* také například používají i další geny (mitochondriální i jaderné). Mezi nejužívanější markery u řádu Diptera patří 28S jaderná ribozomální DNA nebo geny 12S, 16S a 18S mitochondriální ribozomální DNA (Vogt, 2002; Peterson *et al.*, 2007; Han & Ro, 2009; Pai *et al.*, 2014; Zajac *et al.*, 2016;).



### 2.5.1.2 Mitochondriální DNA

Mitochondriální genom DNA je kruh o velikosti asi 16 500 párů bází (méně než 0,001 % velikosti jaderného genomu). U různých živočišných druhů se příliš neliší (Alberts *et al.*, 2007). Mitochondrie vytvářejí aerobní energii přeměnou organických molekul, tzv. „oxidativní metabolické procesy“. Jsou „téměř jistě“ vyvinuty z prokaryotických buněk, které vytvořily symbiotický vztah s hostitelskou buňkou. Tyto jednobuněčné organismy s sebou nesou vlastní genom, včetně schopnosti aerobního metabolismu. Následkem tohoto jevu mají mitochondrie vlastní genom (Snustad & Simmons, 2009).

Mitochondriální DNA (mtDNA) dělí na těžké (guanin bohaté) a lehké (cytosin bohaté) vlákno (Jemt *et al.*, 2011). Kóduje nejdůležitější bioenergetické geny. To způsobuje, že vady mtDNA dopadají na široké spektrum buněčných funkcí (Iborra *et al.*, 2004). Mitochondrie pravděpodobně obsahují kopie DNA, díky čemuž může být počet molekul mitochondriální DNA v jedné buňce vysoký, např. v oocytech obratlovců se může vyskytovat až  $10^8$  kopií mtDNA (Snustad & Simmons, 2009).

Jeden z potenciálně největších výhod mtDNA pro forenzní entomologii je při určování druhu. Hlavně vajíčka a larvy je u mnoha forenzně významných druhů dvoukřídlého hmyzu zvláště obtížné odlišit morfologicky. Nesprávná nebo nejistá identifikace může vážně poškodit nebo bránit vyšetřování (Byrd & Castner, 2010).

### Cytochromoxidáza I

Složky dýchacího řetězce, které jsou zakotveny ve vnitřní membráně mitochondrií, jsou obsaženy ve čtyřech komplexech (Murray, 2012). Cytochromoxidáza je enzym, který katalyzuje přenos elektronů z cytochromu na kyslík v dýchacím řetězci v mitochondriích. Jedná se o hemoproteiny, jehož prostetická skupina obsahuje 1 kation mědi (Dobrota, 2012). Cytochromoxidáza I je složena z 12 podjednotek a je umístěna napříč vnitřní mitochondriální membránou. Člení se do enzymatického komplexu IV (*Lékařská chemie a biochemie, 1991*).

Mitochondriální gen kódující protein cytochrom c oxidázy podjednotky I (*COI*), se ukázal být velmi informativní pro identifikaci jak na úrovni rodové, tak i druhové (Mengual *et al.*, 2008). 648 bp oblast cytochrom c oxidázy I genu (*COI*) tvoří primární sekvenci čárových kódů pro členy živočišné říše (Ratnasingham & Hebert, 2007). Z mitochondriálních genů je cytochrom c oxidáza I (*COI*) údajně nejvíce zachovaný

gen (Nzelu *et al.*, 2015). Při determinaci pomocí markeru *COI* je možné izolovat DNA ze všech vývojových stádií dvoukřídlých - dospělce, kukly, larvy (Shearer & Coffroth, 2007).

### **Cytochromoxidáza II**

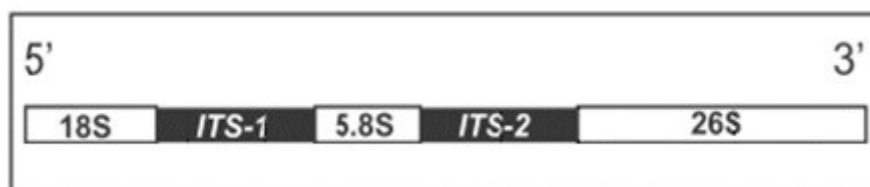
Cytochromoxidáza polypeptid II je mitochondriální protein, který je rozhodující složkou oxidativní fosforylace. Je kódován mitochondriální DNA, syntetizován v mitochondriích a nachází se v jejich vnitřních membránách (Torrioni *et al.*, 2006).

### **Cytochrom b**

Cytochromy jsou hemoproteiny obsahující železo, které během oxidace a redukce osciluje mezi  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$ . Podílí se na přenosu elektronů v dýchacím řetězci. Kromě tohoto řetězce se nachází v endoplazmatickém retikulu (cytochrom *b*<sub>5</sub>). Má schopnost měnit kyslík na superoxid (Murray, 2012). Sekvence genu cytochrom *b* se často využívá při studiu obratlovců (Byrd & Castner, 2010).

#### **2.5.1.3 Jaderné geny**

Ribozomová RNA (rRNA) je strukturní a katalytická složka ribozomů a slouží k převádění nukleotidové mRNA (mediátorová RNA) do sekvencí aminokyselin polypeptidu. Vzniká transkripcí a nepodléhá translaci (Snustad & Simmons, 2009). Pro využití v molekulární fylogenetice se využívá lokus genomu pro rRNA, který nekóduje protein a zároveň je stále součástí ribozomů. Z hlediska evoluce jsou geny pro rRNA velmi podobné u všech organismů. Přepis této RNA probíhá jako jedna delší RNA, která v sobě obsahuje úseky pro 3 molekuly rRNA. Konkrétně pro 18S rRNA, 5.8S rRNA a 28S rRNA. Tyto úseky jsou odděleny sekvencemi ITS-1 a ITS-2 (internal transcribed spacer) (Doležal, 2014).



Obr. 2 Tři kódující oblasti s dvěma vmezeřenými sekvencemi ITS-1 a ITS-2 jaderné ribozomalní DNA (Polans & Saar, 2002)

U eukaryotních organismů se vyskytují čtyři hlavní typy genů pro rRNA. Jsou to: gen *5S*, který kóduje 120 bází dlouhou rRNA. Gen *5.8S* kódující 160 bází dlouhou rRNA. *18S* gen kóduje 1,8 kb dlouhou rRNA a gen *28S*, který kóduje 4,7kb dlouhou rRNA (Snustad & Simmons, 2009).

Mezi další významné jaderné geny patří:

**CAD** (Carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase )

Multifunkční protein, který iniciuje a řídí *de novo* biosyntézu pyrimidinu u zvířat a je nezbytný pro buněčnou proliferaci. Rozluštění struktury a funkce CAD je potenciálně využitelné při léčbě rakoviny. Nicméně prozatím neexistují žádné podrobné informace o struktuře (Grande – García *et al.*, 2014).

**EF-1 $\alpha$**  (Elongation factor 1 $\alpha$ )

Vysoce konzervativní nukleární kódující gen, který může být použit pro zkoumání nově se tvořících rozdílů proměnné délky sekvencí v důsledku přítomnosti různých, rychle se rozvíjejících intronů (Sanchis *et al.*, 2001). Jedná se o gen výborně se hodící pro fylogenetické analýzy (Zajac *et al.*, 2016).

**DDC** (Dopa decarboxylase)

Kóduje dopadekarboxylázu, která má u řádu Diptera několik funkcí. Gen je umístěn ve středu velkého hustého seskupení 18 funkčně příbuzných genů, na levém rameni chromozomu II. Produkt tohoto genu katalyzuje dekarboxylaci dopa na dopamin. Dopamin je katecholamin, který hraje zásadní roli, jako neurotransmitter, který ovlivňuje chování při páření, plodnost, cirkadiální rytmy, sekreci žláz s vnitřní sekrecí, agresi, učení a paměť. U hmyzu se dopamin také podílí na pigmentaci kůžičky a sklerotizaci (Tatarenkov & Ayala, 2007).

**PER** (Period)

Protein kódující gen, který je umístěný na chromozomu X (GenBank, 2016). U řádu Diptera poskytuje nedílnou součást biologické rytmicity. V sekvenci proteinu se nachází repetice threonin – glycinu (Thr-Gly), jejichž význam prozatím není známý (Peixoto *et al.*, 1998).

### **3 CÍL PRÁCE**

Sběr a determinace zachycených dvoukřídých na dvou až třech lokalitách v Jihomoravském kraji pomocí klasických anatomicko-morfologických metod a současně také pomocí metod molekulárně-genetických.

Dílčí cíle:

1. Zhodnocení možností obou způsobů determinace a vyhodnocení rozdílu zejména rychlosti a přesnosti jednotlivých metod.
2. Zhodnocení možnosti využití získaných informací pro kriminalistickou praxi.

## **4 MATERIÁL A METODIKA**

### **4.1 Popis kadaverů**

Farinha *et al.* (2014), zkoumali několik možných variant návnad a výsledkem jejich zkoumání bylo, že nejvíce preferovanou návnadou pro forenzně významný hmyz je svalstvo. Proto byl jako návnada pro obě lokality zvolen kur domácí (*Gallus gallus f. domestica*), který byl zakoupen chlazený v běžném obchodním řetězci. Těla byla vykuchána, bez hlavy, běháků, orgánů dutiny břišní a měla odstraněné peří. Hmotnost na začátku pokusu činila 1970 g a 1984 g. Kadaver na lokalitě Sokolnice byl položen 6.6.2015, na lokalitě Rakvice pak 13.6.2015.

### **4.2 Popis lokalit**

Obě lokality se nacházejí v Jihomoravském kraji, klimatická oblast T4 (teplá oblast). Tato území byla zvolena pro jejich rozdílný, ale v jistých aspektech i totožný krajinný charakter. Lokality jsou vzdáleny od obytné zástavby a jejich nejbližší okolí obklopuje zemědělsky využívaná půda.

#### **4.2.1 Sokolnice**

Obec se nachází v okrese Brno – venkov a úřadem spadá pod obec s rozšířenou působností Šlapanice. Fytogeografickým členěním se obec řadí do Hustopečské pahorkatiny a její geomorfologická jednotka spadá do Dyjsko-Svrateckého úvalu. Nadmořská výška obce se pohybuje od 240 do 245 m n. m. Průměrná denní teplota je 9,2 °C a srážky se pohybují v rozmezí 500 až 550 mm za rok (Quitt, 1976).



Obr. 3 Lokalita Sokolnice (foto: Ing. Pavel Macháň, Ph.D.)

#### 4.2.2 Rakvice

Nacházejí se v okrese Břeclav. Pod obec Rakvice katastrálně spadá přírodní památka Jezírko Kutnar, kde konkrétně pokus probíhal. Jedná se o vodní plochu s příslušností vlastního chráněného území. Přírodní památkou bylo vyhlášeno 4. 7. 1956. Jedná se o bioregion Dyjsko-moravský, fytogeografickým členěním se jedná o Dyjsko-svratecký úval, geomorfologická jednotka je Dolnomoravský úval. Kutnar se nachází v nadmořské výšce 160 m n. m. Průměrná roční teplota je zde 9,5 °C a množství srážek je zde 550 mm (PP Jezírko Kutnar, 2016; Rakvice, 2016).



Obr. 4 Lokalita Rakvice, jezírko Kutnar (foto: Ing. Pavel Macháň, Ph.D.)

Na fotografiích z obou lokalit (Obr. 3 a Obr. 4) jsou vyznačena místa pokusů červenými šipkami. Tyto šipky ukazují na místa přesného uložení kadaverů. Fotografie byly pořízeny vždy těsně před položením kadaveru.

### **4.3 Sběr a uchování nekrofágní fauny**

Stejně tak, jak uvádí Doskočil (1977), byl sběr dospělců prováděn obvyklými sběracími metodami. Tedy za pomoci jemné sítky nebo, a to převážně, smýkací sítí. U vývojových stádií probíhal sběr za pomoci laboratorních rukavic a entomologické pinzety.

Pro usmrcování byl použit octan ethylnatý, který byl uchováván v zavařovací sklenici s dřevěnými pilinami. K usmrcování hmyzu sloužily páry, které octan ethylnatý produkoval. Jedinci byli sbíráni do 2,0ml zkumavek, tzv. ependorfek, do kterých byl následně přidán 40% roztok formaldehydu, který sloužil ke konzervaci vzorků. Takto zpracované vzorky byly uchovávány v mrazácích na Ústavu morfologie, fyziologie a genetiky zvířat při teplotě -21 °C, dokud neproběhlo zkoumání anatomicko-morfologické a následně molekulárně-genetické.

### **4.4 Laboratorní zkoumání entomologického materiálu podle morfologických znaků**

Veškerý nasbíraný entomologický materiál byl v našem případě usmrcený. Vzorky byly odebrány z přímo z kadaveru, lože kadaveru a bezprostředního okolí. Výhoda usmrceného vzorku je v možnosti dlouhodobého skladování bez ztráty vypovídací hodnoty (Štefan & Hladík, 2012).

Autorka diplomové práce nemá žádné vzdělání v oblasti entomologie nebo anatomie a morfologie hmyzu, proto byla veškerá morfologická identifikace dospělců porovnávána s odbornou literaturou: Obenberger (1955); Doskočil (1977); Nihei & De Carvalho (2009); Rochefort *et al.* (2015) a konzultována s entomologem (nikoliv však dipterologem) Ing. Pavlem Tóthem, Ph.D. z Ústavu pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství.

Identifikace vzorků v nižších stádiích vývoje pro daný druh je ještě více náročné, než identifikace dospělých jedinců, kvůli malému množství pozorovatelných znaků. Obecně tedy bývají jedinci chováni až do stádia dospělého pro následně snadnější

taxonomickou identifikaci (Meiklejohn *et al.*, 2013). To v našem případě nebylo kvůli okamžitému usmrcení a konzervaci vzorků umožněno. Proto byly pro identifikaci nižších vývojových stádií využity tyto zdroje: Szpila (2010); Szpila & Villet (2011).

#### **4.4.1 Přístrojové vybavení při anatomicko-morfologické identifikaci**

Anatomicko-morfologické zkoumání probíhalo konkrétně v laboratoři entomologie za využití stereomikroskopu značky OLYMPUS SZX 9 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Mikroskop umožňuje zvětšení v rozmezí 12,6× až 114× (uvádí výrobce). Následně byli všichni nasbíraní jedinci fotografováni fotoaparátem značky Canon 5D (Canon Inc., Tokyo, Japan) s objektivem Canon EF 100mm f / 2,8 Macro USM (Canon Inc., Tokyo, Japan). Fotoaparát disponuje plnoformátovým digitálním snímačem o rozlišení 12,3 Megapixelů. Objektiv dosahuje při nejkratší zaostřovací vzdálenosti 0,31 m zvětšení 1:1.

#### **4.5 Izolace DNA**

Před každou izolací byli zpracovávaní jedinci zbaveni formaldehydu, aby nedocházelo ke kontaminacím. Izolace DNA byla prováděna pomocí kitu od firmy Top-Bio, s.r.o. (Praha, Česká republika) "Column DNA Lego kit". DNA byla izolována z celého těla jedince, které bylo rozmělněno pomocí jednorázové plastové tyčinky (pestle). Takto zpracované vzorky byly vystaveny působení proteinázy K, která byla přidána k roztoku L1 (200ul L1 + 10ul proteinázy K), po dobu dvou hodin. K dalším modifikacím oproti standardnímu protokolu při provádění izolace nedošlo.

#### **4.6 Měření kvality a koncentrace DNA**

Měření kvality vyizolované DNA probíhalo pomocí 1% agarózové gelové elektroforézy. Do uvařeného gelu s jamkami, vloženého do elektroforetické vany, byly pipetovány 4 µl DNA smíchané s 1 µl sacharózy s bromfenylovou modří, která slouží k vizualizaci pipetovaného vzorku. K celkové vizualizaci agarózového gelu byl přidán ethidium bromid (EtBr) o koncentraci 0,5 µg / ml.

Koncentrace DNA byla přesně změřena pomocí ultrafialové (UV) absorbanční spektrofotometrie přístrojem NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Množství UV záření absorbovaného roztokem DNA je přímo úměrné množství



DNA ve vzorku. Absorbanci obvykle měříme při 260 nm a při této vlnové délce absorbance ( $A_{260}$ ) o hodnotě 1,0 odpovídá 50  $\mu\text{g}$  dvouvláknové DNA / ml. Absorbance v UV oblasti může také sloužit k ověření čistoty preparátu DNA. V čistém vzorku DNA je poměr absorbancí při 260 nm a 280 nm ( $A_{260} / A_{280}$ ). Poměr nižší než 1,8 ukazuje, že získaná DNA je kontaminována, a to buď proteiny, nebo fenolem (Brown, 2007).

## 4.7 PCR

Reakční směs PCR byla připravována na ledu, kde bylo k reakční směsi přidáváno 1  $\mu\text{l}$  DNA, přičemž výsledný objem reaktantů byl 10  $\mu\text{l}$ .

Pro přípravu PCR reakční směsi byly použity následující reagenty:

- PPP Master Mix (Top-Bio, s.r.o., Praha, ČR) – 150 mM Tris-HCl (pH 8,8), 40 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,02 % Tween 20, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 400  $\mu\text{M}$  každý dNTP, 100 U / ml *Taq* DNA polymeráza, barvivo, stabilizátory a aditiva
- Primery (IDT Inc., Coralville, USA) – zásobní roztok 100 pmol /  $\mu\text{l}$ , pracovní roztok 10 pmol /  $\mu\text{l}$
- Ultračistá  $\text{H}_2\text{O}$  (Top-Bio, s.r.o., Praha, Česká republika)

Tab. 2 Složení reakční směsi PCR pro 1 vzorek

Reagencie	Množství v $\mu\text{l}$	Finální koncentrace
dH <sub>2</sub> O	3,2	
PPP Master mix	5	1 ×
Mg <sup>2+</sup>	0,4	1 mM
Primer F	0,2	0,2 $\mu\text{M}$
Primer R	0,2	0,2 $\mu\text{M}$
DNA	1	20 - 50 ng
<b>Celkové množství</b>	10	-

## 4.8 PCR primery

PCR primery byly převzaty z práce Horecký *et al.*, 2015. Ředění primerů probíhalo dle přiloženého protokolu od firmy IDT Inc. (Coralville, USA).

Tab. 3 PCR primery (Horecký *et al.*, 2015)

Primer	Sekvence 5' - 3'	Počet nukleotidů	T <sub>m</sub> Oligo	% GC
Dip_F1	GTA TAG TAG AAA ACG GAG CTG	21	56,0	43
Dip_F2	GCT TCT GTT GAT TTA GCT ATT	21	55,9	33
Dip_R1	AAT CAA CTA AAA ATC TTA ATT CC	23	56,7	22
Dip_R2	ACT GTA AAT ATA TGA TGA GCT CA	23	56,1	30
Dip_R3	GCT ATA ATA GCA AAT ACA GCT C	22	56,2	36

V tabulce se nacházejí konkrétní sekvence dlouhých primerů použitých v reakční směsi PCR. Dále jsou zde uvedeny hodnoty, které jsou rozhodující při tvorbě primerů, jako je počet nukleotidů, teplota tání (T<sub>m</sub>) a % nukleotidů G a C.

### Testované kombinace primerů:

Dip\_F1 + Dip\_R1 625bp

Dip\_F1 + Dip\_R2 538bp

Dip\_F2 + Dip\_R3 752bp

Tab. 4 Podmínky, za kterých probíhala PCR

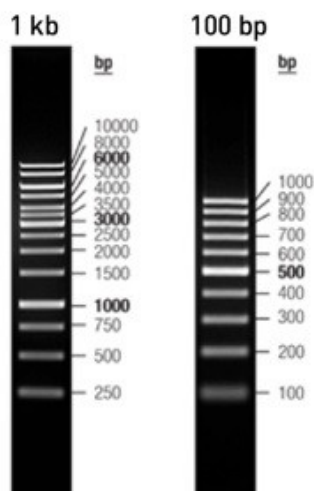
Fáze PCR	Teplota (°C)	Doba trvání	Počet cyklů
Úvodní denaturace	95°C	3 min.	
Denaturace	95°C	40 s.	
Annealing	49°C	40 s.	40
Elongace	72°C	1 min.	
Závěrečná elongace	72°C	5 min.	
Chlazení	4°C	∞	

Pro amplifikace úseku genu *COI* byly použity automatické cykly ABI Verity 96 Well a GeneAmp 9700 od firmy Life Technologies Corp., Carlsbad, USA. Po ukončení amplifikace byl PCR produkt uchovávan při teplotě -20 °C, dokud nebyl použit k dalším reakcím. Ověření výsledku PCR reakce bylo provedeno pomocí 3% gelové agarózové elektroforézy (viz kapitola 4.9).

## 4.9 Separace molekul gelovou elektroforézou

Elektroforéza je technikou, která využívá rozdílů v elektrickém náboji k rozdělení molekul ve směsi (Brown, 2007). V našem případě byla využita pro ověření výsledků izolace, jak již bylo uvedeno v kapitole 4.6, a na ověření přítomnosti PCR produktu. Konkrétně šlo o techniku gelové agarózové elektroforézy, na které se po amplifikaci produktu určila velikost amplifikovaných fragmentů genu *COI*.

V praxi je velikost molekul DNA, které mohou být separovány, dána složením gelu (Brown, 2007). Pro kontrolu izolace byla zvolena 1% koncentrace gelu a 3% koncentrace gelu pro kontrolu amplifikace. K přípravě gelu byl použit 1x TBE pufr firmy Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA) a agaróza „Agarose SERVA for DNA electrophoresis“ firmy SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Germany). K barvení DNA na agarózových gelech byl použit ethidium bromid (EtBr) od firmy Top-Bio, s.r.o. (Praha, Česká republika), kdy se jednalo o zásobní roztok 5 mg / ml a konečná koncentrace v gelu činila 0,5 µg / ml. V obou případech byl při nanášení vzorků použit nanášecí pufr, který se skládá z H<sub>2</sub>O, bromfenolové modři, 40% sacharózy a 100x TE pufru od firmy Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA). Pro přímou vizualizaci nebylo potřeba přidávání vizualizačních aditiv, poněvadž v reakční směsi se nachází PPP Master mix, který tato aditiva obsahuje. Po napipetování vzorků a hmotnostních markerů firmy Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US), které slouží k zjištění velikostí PCR fragmentů a kontrolu izolace, do jamek gelu probíhala vlastní elektroforéza v 1x TBE pufru při napětí 4 V / cm po dobu 30 minut. Velikost jednotlivých markerů jsou znázorněny na obrázku (Obr. 5). Pro vizualizaci izolované DNA byl použit Electronic UV Transilluminator od firmy Ultra LÜM Inc. (Claremont, USA). Fotografie gelů byly pořízeny na fotoaparátu značky Canon PowerShot G6 (Canon Inc., Tokyo, Japan). Vizualizaci PCR fragmentů byla umožněna UV transluminátorem E-BOX VX5 od české firmy SCHOELLER INSTRUMENTS, s.r.o., (Praha, Česká republika).



Obr. 5 Velikosti použitých hmotnostních markerů “GeneRuler™ 1 kb” a “100 bp DNA ladders”

#### 4.10 Sekvenování PCR produktů

Původ amplifikovaných úseků byl verifikován pomocí přímého sekvenování PCR produktů. Tyto produkty byly purifikovány MinElute PCR Purification Kit od firmy Qiagen GmbH (Hilden, Germany), dle protokolu výrobce. Ověření koncentrace PCR produktů bylo provedeno na spektrofotometru NanoDrop 2000 od firmy Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA). BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 od firmy Life Technologies Corp. (Carlsbad, USA), byl dle návodu výrobce použit na přípravu sekvenační reakční směsi. Výsledný objem činil 10  $\mu$ l (Tab. 6). Množství DNA potřebné pro sekvenační reakci bylo určeno na základě koncentrace a velikosti PCR produktu (Tab. 5).

Tab. 5 Množství PCR produktu (ng) pro přípravu 10  $\mu$ l sekvenační reakční směsi

Velikost PCR produktu	Potřebné množství pro sekvenační reakci
100 – 200 bp	1 – 3 ng
200 – 500 bp	3 – 10 ng
500 – 1 000 bp	5 – 20 ng
1 000 – 2 000 bp	10 – 40 ng
> 2 000 bp	40 – 100 ng

Tab. 6 Složení sekvenační reakční směsi

Reagencie	Množství
Reakční mix	2 $\mu$ l
Pufř	1 $\mu$ l
Primer	0,16 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	do 10 $\mu$ l
Purifikovaný PCR produkt	dle Tab. 2
<b>Celkové množství</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>

Pro amplifikaci templátu byl použit termálním cykler GeneAmp®PCR System 9700 od firmy Life Technologies (Carlsbad, USA). Podmínky amplifikace jsou popsány níže (Tab. 7).

Tab. 7 Podmínky, za kterých probíhala amplifikace templátu

Fáze amplifikace	Teplota (°C)	Doba trvání	Počet cyklů
Úvodní denaturace	96°C	1 min.	
Denaturace	96°C	10 s.	
Annealing	45°C	5 s.	25
Elongace	60°C	4 min.	
Chlazení	4°C	$\infty$	

Po amplifikaci byla z důvodu odstranění neinkorporovaných terminátorů, tj. značených dideoxynukleotidů, hotová sekvenační směs purifikována pomocí BigDye® XTerminator™ Purification Kit firmy Life Technologies, Carlsbad, USA dle protokolu výrobce. Vzorky byly analyzovány pomocí kapilární elektroforézy s využitím genetického analyzátoru ABI PRISM 3500 firmy Applied Biosystems, Foster City, California, USA. Konečné zpracování dat bylo provedeno pomocí programu Chromas (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia) a identifikovány bioinformatickými databázemi BLAST a BOLD.

#### 4.11 Databáze BOLD a BLAST

BOLD - The Barcode of Life je databáze, která si klade za cíl shromáždit sekvence úseku genu *COI* o délce 658 bp a tím vytvořit ze všech žijících druhů vysoce komplexní databázi, která by mohla být použita při identifikaci druhů. Podobně jako u jiných databází DNA, spolehlivost BOLD závisí na počtu zastoupených druhů a na kvalitě

kontrolních sekvencí uložených v databázi (Rolo *et al.*, 2013). Dostupná je na adrese [www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org).

Všechna klíčová data a získané sekvence jednotlivých druhů jsou ve formě kopií poskytovány také organizacím jako NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory) a DDBJ (DNA DataBank of Japan) ihned, jakmile jsou výsledky připraveny k publikování (Ratnasingham & Hebert 2007).

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool je jedním z nejvíce známých, široce používaných a dostupných bioinformatických nástrojů, dostupný na webových stránkách NCBI (National Center for Biotechnology Information), konkrétně na adrese <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> (Casey, 2005; Johnson *et al.*, 2008). Slouží k porovnání dvou genových nebo dvou proteinových sekvencí a hledá oblasti lokálních podobností mezi těmito sekvencemi. BLAST jako první porovnává nukleotidové sekvence nebo sekvence proteinových aminokyselin k cílovým databázím. Tyto cílové databáze obsahují stovky nebo tisíce archivovaných sekvencí. Výsledek analýzy BLAST může být použit k odvození funkčních a evolučních vztahů mezi sekvencemi (Casey, 2005).

#### **4.12 Statistická analýza**

V několika po sobě následující sukcesních vlnách, které jsou popsány v kapitole 2.4, bylo sbíráno velké množství jedinců v různých vývojových stádiích. Vzorky byly odebrány z lokality Sokolnice v počtu 35 kusů, stejné množství bylo odebráno i z lokality Rakvice. Jeden odebraný vzorek z lokality Rakvice nebylo možné kvůli kontaminaci laboratorně zpracovat. Dalším vzorkem, který nebyl do statistické analýzy započítán, byl vzorek z lokality Sokolnice, ze kterého nevznikl žádný PCR produkt. Ze stejného důvodu byl vyřazen i ze seznamů identifikovaných jedinců. Celkový počet statisticky analyzovaných vzorků byl 68. Podrobnější výčet anatomicko-morfologicky a následně molekulárně-geneticky identifikovaných jedinců se nachází v kapitole 5.

Veškeré statistické analýzy byly provedeny v programu R od R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (R Development Core Team, 2014). Vzorky, které byly determinovány databázemi BLAST a BOLD shodně s morfologickou determinací a se spolehlivostí alespoň 98 % byly považovány za určené, zatímco vzorky

určené jinak než při morfologické determinaci a / nebo se spolehlivostí méně než 98 % byly považovány za neurčené.

Byl zkoumán vliv databáze, čistoty vzorku a koncentrace DNA na pravděpodobnost správné determinace na úrovni druhu a čeledi. Ke zkoumání vlivu zmíněných charakteristik na pravděpodobnost správné determinace byla použita metoda „Generalized Estimating Equations“ (GEE), což je nadstavba zobecněných lineárních modelů pro data obsahující autokorelaci (Pekár & Brabec 2012). Jako bloková proměnná vystupovala identita vzorku a bylo předpokládáno, že korelace uvnitř bloku je konstantní, jelikož v něm vystupovala pouze dvě měření (Pekár & Brabec 2012). Bylo použito GEE s binomickým rozdělením chyb a logitovou link funkcí (GEE-b), protože data měla Bernoulliho rozdělení (Pekár & Brabec 2009). V případě zjišťování spolehlivosti determinace na úrovni druhu vystupoval v lineárním prediktoru kromě hlavních efektů databáze, čistoty vzorku a koncentrace DNA i všechny jejich možné dvojně a jedna trojná interakce. Jednotlivé členy byly odnímány na základě jejich signifikance a pravidla marginality (Pekár & Brabec 2009).

K porovnání spolehlivosti identifikace mezi čeleděmi byly vybrány takové čeledi, u kterých bylo provedeno alespoň pět pozorování kvůli dostatečné statistické inferenci. V případě zjišťování spolehlivosti determinace na úrovni čeledi vystupoval v lineárním prediktoru efekt čeledi a databáze. Následné porovnání mezi skupinami bylo provedeno pomocí „treatment“ kontrastů.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky práce byly zjištěny pomocí anatomicko-morfologické a molekulárně-genetické determinace. Tyto dvě metody byly mezi sebou srovnávány z hlediska časové náročnosti a přesnosti identifikace. V kapitole jsou dále popsány i další faktory, které mohly mít na využívané metody vliv.

### 5.1 Anatomicko-morfologická determinace

Tab. 8 *Výsledek anatomicko-morfologická identifikace*

vzorek	Lokalita Sokolnice	vzorek	Lokalita Rakvice
1	<i>Sarcophaga carnaria</i>	35	Muscidae
2	<i>Lucilia illustris</i>	36	Muscidae
3	<i>Lucilia illustris</i>	37	Calliphoridae
4	<i>Lucilia caesar</i>	38	<i>Hydrotaea</i>
5	<i>Chrysomya albiceps</i>	39	<i>Hydrotaea</i>
6	<i>Fannia canicularis</i>	40	<i>Hydrotaea</i>
7	<i>Fannia</i>	41	<i>Fannia</i>
8	<i>Sarcophaga carnaria</i>	42	<i>Hydrotaea</i>
9	<i>Parapiophila vulgaris</i>	43	<i>Hydrotaea</i>
10	Piophilidae	44	<i>Hydrotaea</i>
11	Piophilidae	45	Phoridae
12	<i>Piophila australis</i>	46	Calliphoridae
13	<i>Lucilia caesar</i>	47	
14	<i>Chrysomya albiceps</i>	48	Sepsidae
15	<i>Lucilia caesar</i>	49	Sepsidae
16	<i>Lucilia sericata</i>	50	Muscidae
17	<i>Lucilia caesar</i>	51	Sepsidae
18	<i>Musca domestica</i>	52	<i>Fannia</i>
19	<i>Parapiophila vulgaris</i>	53	<i>Calliphora vicina</i>
20	Phoridae	54	<i>Chrysomya albiceps</i>
21		55	<i>Lucilia sericata</i>
22		56	<i>Hydrotaea dentipes</i>
23	Sepsidae	57	Muscidae
24	Sepsidae	58	Muscidae
25	<i>Fannia</i>	59	Calliphoridae
26	<i>Lucilia sericata</i>	60	Sepsidae
27	<i>Hydrotaea</i>	61	<i>Lucilia caesar</i>
28	<i>Sarcophaga</i>	62	<i>Calliphora vomitoria</i>
29	Calliphoridae	63	<i>Lucilia caesar</i>
30	Calliphoridae	64	<i>Calliphora vomitoria</i>
31	<i>Lucilia illustris</i>	65	<i>Calliphora vicina</i>
32		66	<i>Lucilia illustris</i>
33		67	
34	Sepsidae	68	

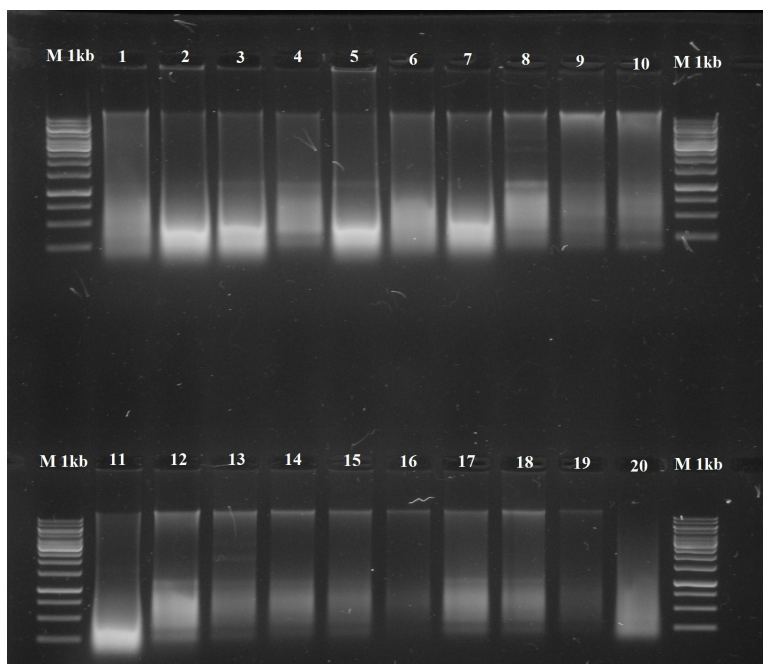


Prázdná místa v tabulce 8 znamenají absenci anatomicko-morfologické identifikace. Nemožnost identifikace způsobovalo hlavně znehodnocení vzorků, způsobené nevhodným skladováním a manipulací při sběru. Jednalo se hlavně o poškozená křídla a absenci ochlupení na místech, která jsou pro identifikaci některých rodů (zejm. moučovití, masařkovití) a druhů zásadní. Tyto faktory ovlivnily také časovou náročnost determinace, která se jimi úměrně prodlužovala. Dalšími faktory, které prodlužovaly čas při identifikaci jedinců, byly nutnost nastudování morfologických a anatomických znaků všech předpokládáných čeledí, které se mohly na pokusném objektu vyskytnout, a orientace v odborné entomologické terminologii.

## **5.2 Kontrola koncentrace a čistoty DNA**

V příloze je uvedena tabulka, která uvádí koncentraci a čistotu vzorků, jež byly vybrány pro izolace a další molekulárně-genetické zpracování. Data vypovídající o koncentraci a čistotě DNA byla získána pomocí přístroje NanoDrop 2000 od firmy Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA).

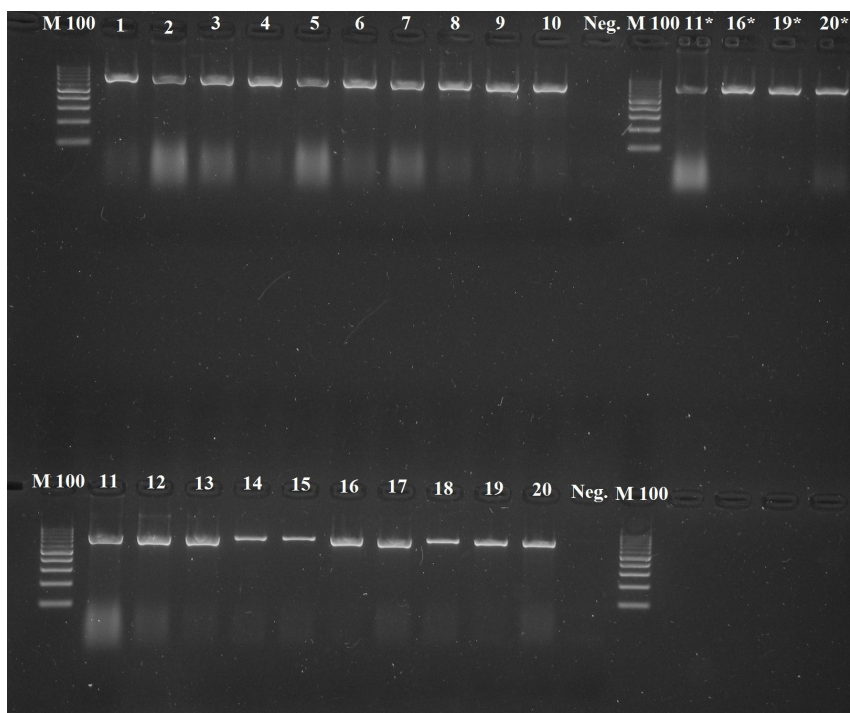
Kontrola izolace DNA z vybraných zástupců řádu Diptera byla provedena dle protokolu výrobce, jak je uvedeno v kapitole 4.5. Na obrázku jsou vizualizovány výsledky izolace DNA pomocí gelové agarózové elektroforézy. Koncentrace a čistoty DNA jednotlivých dílčích vzorků jsou uvedeny v tabulce (Tab. 11). U všech vzorků můžeme pozorovat tzv. „smear“, který poukazuje na degradaci DNA. Degradace DNA by mohla být zapříčiněna, jak uvádí Sperling *et al.* (1994) například dlouhým obdobím uchovávání vzorků ve formaldehydu.



Obr. 6 DNA izolovaná z těl vybraných jedinců

Pro další molekulárně-genetické analýzy kvalita vzorků 1 – 20 postačovala, což prokazuje zejména koncentrace DNA (ng /  $\mu$ l), která byla naměřena 208,7833 a čistota DNA ( $A_{260} / A_{280}$ ) jejíž průměr těchto vzorků činil 2,1135. Tyto hodnoty byly spočítány dle tabulky (Tab. 11).

### 5.3 Ověření přítomnosti PCR produktu

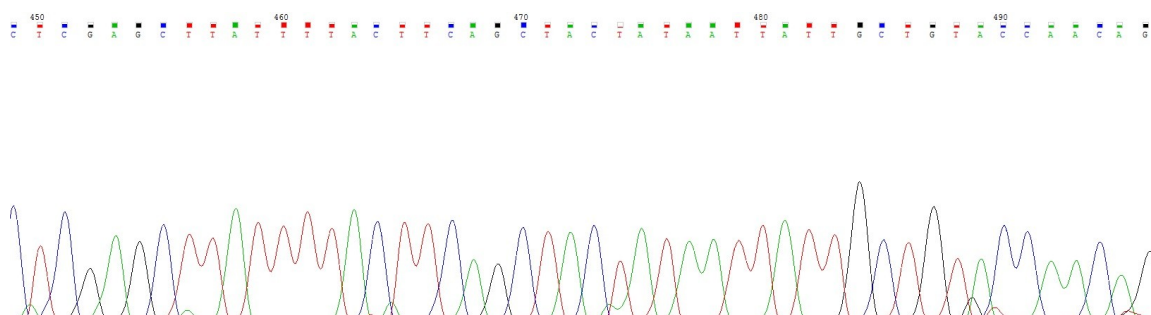


Obr. 7 Výsledek amplifikace PCR produktu

Na fotografii lze pozorovat zachycení dlouhých fragmentů 752 bp za použití kombinace primerů “Diptera F2” + “Diptera R3”. Do vzorků označených \* bylo přidáno rozdílné množství MgCl. Dle Debnath *et al.* (2010) je hořčík nutným kofaktorem termostabilní DNA polymerázy, a koncentrace hořčíku je rozhodujícím faktorem, který může ovlivnit úspěch amplifikace. Proto byl proveden gradient koncentrace hořčíku, který sloužil k optimalizaci množství případně přidávaného hořčíku do reakční směsi PCR. Pro kontrolu kontaminací primerů, reagensů a DNA byla provedena negativní kontrola (Neg.). Použitý teplotní profil byl „Diptera\_barcoding“ (ABI Veriti 96 Well, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).

## 5.4 Sekvenování PCR produktů

Identifikace amplifikovaných PCR produktů proběhla metodou přímého sekvenování, které je uvedeno v kapitole 4.10. Vizualizace výsledku z automatického sekvenátoru proběhla v programu Chromas (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia, Obr. 8).

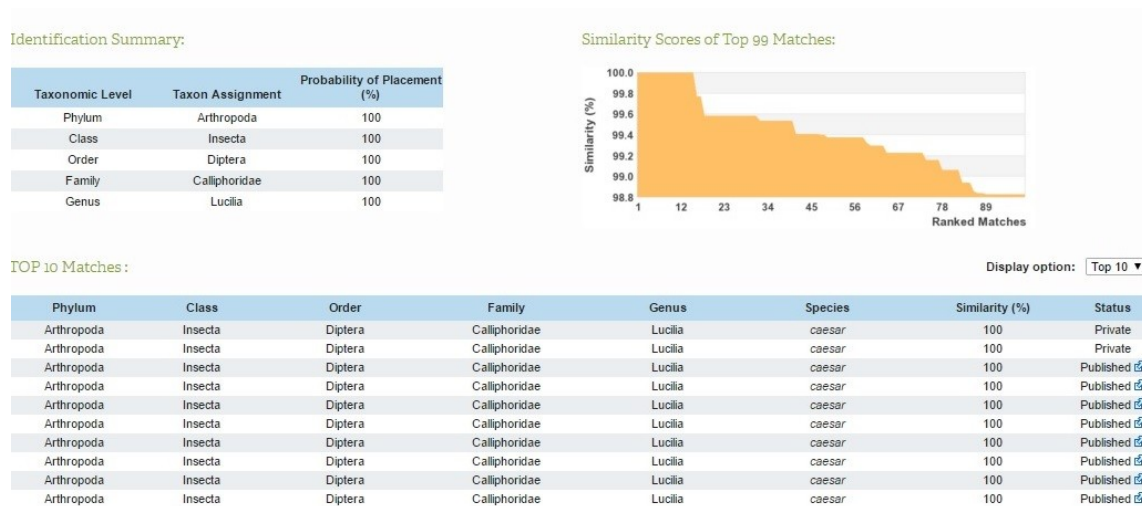


Obr. 8 Výstup z programu Chromas

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lucilia caesar voucher ENTOMOFOR:CAPV_LUCA32 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1310	1310	98%	0.0	99%	<a href="#">KJ394848.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lucilia caesar voucher ENTOMOFOR:CAPV_LUCA13 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1310	1310	98%	0.0	99%	<a href="#">KJ394831.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lucilia caesar voucher ENTOMOFOR:CAPV_LUCA52 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1304	1304	98%	0.0	99%	<a href="#">KJ394867.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lucilia caesar voucher ENTOMOFOR:CAPV_LUCA49 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1304	1304	98%	0.0	99%	<a href="#">KJ394864.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lucilia caesar voucher ENTOMOFOR:CAPV_LUCA54 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1299	1299	98%	0.0	99%	<a href="#">KJ394869.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lucilia caesar voucher ENTOMOFOR:CAPV_LUCA40 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1299	1299	98%	0.0	99%	<a href="#">KJ394855.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lucilia caesar voucher ENTOMOFOR:CAPV_LUCA21 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1299	1299	98%	0.0	99%	<a href="#">KJ394838.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lucilia caesar voucher ENTOMOFOR:CAPV_LUCA8 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1299	1299	98%	0.0	99%	<a href="#">KJ394828.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lucilia caesar voucher ENTOMOFOR:CAPV_LUCA2 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1299	1299	98%	0.0	99%	<a href="#">KJ394822.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lucilia caesar voucher ENTOMOFOR:UKM_G9 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1295	1295	98%	0.0	99%	<a href="#">KF225237.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lucilia caesar voucher ENTOMOFOR:CAPV_LUCA51 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1293	1293	98%	0.0	99%	<a href="#">KJ394866.1</a>

Obr. 9 Výstup databáze BLAST

Na obrázku (Obr. 9) lze vidět výstup z databáze BLAST, která ukazuje 99% shodu s výchozím vzorkem 15 (Obr. 14), anatomicko-morfologicky identifikovaným jako bzučivka zlatá (*Lucilia caesar*).



Obr. 10 Výstup databáze BOLD

Z výstupu databáze BOLD (Obr. 10) pro referenční vzorek 15 (*Lucilia caesar*) lze vyčíst, že shoda pro prvních 14 dříve identifikovaných vzorků je 100 %. Procentuální shoda s množstvím porovnávaných sekvencí klesá.

## 5.5 Molekulárně-genetická identifikace

Seznam nalezených a následně identifikovaných jedinců pomocí molekulárně-genetických metod je uveden v tabulkách (Tab. 9 a Tab. 10). Kvůli signifikantně vyšší shodě (kapitola 5.6) s anatomicko-morfologickou determinací, byly zvoleny výsledky zpracované pomocí databáze BOLD.

Tab. 9 *Jedinci nalezení na lokalitě Sokolnice*

Lokalita Sokolnice		
Vzorek	Latinský název	Český název
1	<i>Sarcophaga albiceps</i> Meigen, 1826	
2	<i>Chrysomya albiceps</i> Wiedemann, 1819	
3	<i>Chrysomya albiceps</i> Wiedemann, 1819	
4	<i>Lucilia caesar</i> Linnaeus, 1758	bzučivka zlatá
5	<i>Chrysomya albiceps</i> Wiedemann, 1819	
6	<i>Fannia canicularis</i> Linnaeus, 1761	slunilka pokojová
7	<i>Fannia canicularis</i> Linnaeus, 1761	slunilka pokojová
8	<i>Sarcophaga argyrostoma</i> Robineau-Desvoidy, 1830	
9	<i>Parapiophila vulgaris</i> Fallén, 1820	
10	<i>Stearibia nigriceps</i> Meigen, 1826	
11	<i>Parapiophila vulgaris</i> Fallén, 1820	
12	<i>Protopiophila latipes</i> Meigen, 1838	
13	<i>Lucilia caesar</i> Linnaeus, 1758	bzučivka zlatá
14	<i>Chrysomya albiceps</i> Wiedemann, 1819	
15	<i>Lucilia caesar</i> Linnaeus, 1758	bzučivka zlatá
16	<i>Lucilia sericata</i> Meigen, 1826	bzučivka zelená
17	<i>Lucilia caesar</i> Linnaeus, 1758	bzučivka zlatá
18	<i>Musca domestica</i> Linnaeus, 1758	moucha domácí
19	<i>Parapiophila vulgaris</i> Fallén, 1820	
20	<i>Musca domestica</i> Linnaeus, 1758	moucha domácí
21	<i>Sarcophaga carnaria</i> Linnaeus, 1758	masařka obecná
22	<i>Sarcophaga carnaria</i> Linnaeus, 1758	masařka obecná
23	<i>Stearibia nigriceps</i> Meigen, 1826	
24	<i>Parapiophila vulgaris</i> Fallén, 1820	
25	<i>Fannia canicularis</i> Linnaeus, 1761	slunilka pokojová
26	<i>Lucilia sericata</i> Meigen, 1826	bzučivka zelená
27	<i>Hydrotaea similis</i> Meade, 1887	
28	<i>Sarcophaga albiceps</i> Meigen, 1826	
29	<i>Calliphora vicina</i> Robineau-Desvoidy, 1830	bzučivka obecná
30	<i>Calliphora vicina</i> Robineau-Desvoidy, 1830	bzučivka obecná
31	<i>Lucilia sericata</i> Meigen, 1826	bzučivka zelená
32	<i>Calliphora vomitoria</i> Linnaeus, 1758	bzučivka rudohlavá
33	<i>Pollenia rudis</i> Fabricius, 1794	bzučivka zední
34	<i>Liopiophila varipes</i> Meigen, 1830	

Tab. 10 Jedinci nalezení na lokalitě Rakvice

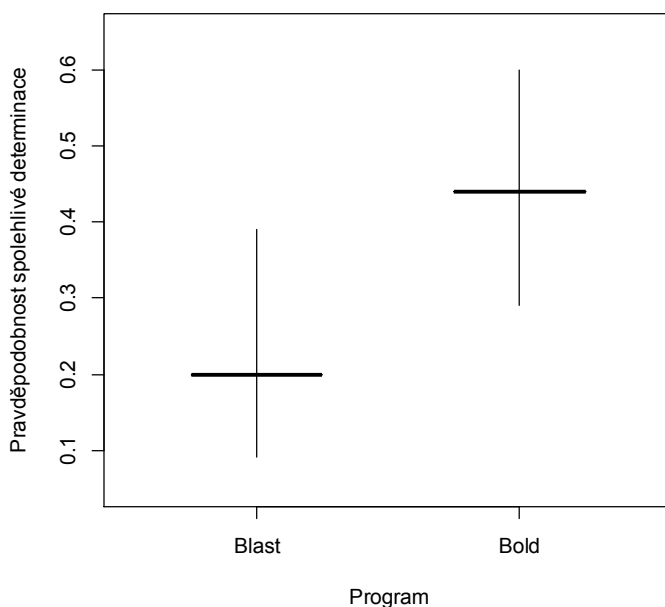
Lokalita Rakvice		
Vzorek	Latinský název	Český název
35	<i>Hydrotaea dentipes</i> Fabricius, 1805	
36	<i>Hydrotaea dentipes</i> Fabricius, 1805	
37	<i>Ophyra aenescens</i> Wiedemann, 1830	moucha dravá
38	<i>Hydrotaea ignava</i> Harris 1780	moucha lesklá
39	<i>Hydrotaea ignava</i> Harris 1780	moucha lesklá
40	<i>Hydrotaea ignava</i> Harris 1780	moucha lesklá
41	<i>Hydrotaea ignava</i> Harris 1780	moucha lesklá
42	<i>Hydrotaea dentipes</i> Fabricius, 1805	
43	<i>Hydrotaea ignava</i> Harris 1780	moucha lesklá
44	<i>Fannia canicularis</i> Linnaeus, 1761	slunilka pokojová
45	<i>Protopiophila latipes</i> Meigen, 1838	
46	<i>Lucilia illustris</i> Meigen, 1826	
47	<i>Sarcophaga carnaria</i> Linnaeus, 1758	masařka obecná
48	<i>Protopiophila latipes</i> Meigen, 1838	
49	<i>Liopiophila varipes</i> Meigen, 1830	
50	<i>Sarcophaga carnaria</i> Linnaeus, 1758	masařka obecná
51	<i>Protopiophila latipes</i> Meigen, 1838	
52	<i>Stearibia nigriceps</i> Meigen, 1826	
53	<i>Calliphora vicina</i> Robineau-Desvoidy, 1830	bzučivka obecná
54	<i>Lucilia caesar</i> Linnaeus, 1758	bzučivka zlatá
55	<i>Lucilia caesar</i> Linnaeus, 1758	bzučivka zlatá
56	<i>Muscina prolapsa</i> Harris, 1780	
57	<i>Fannia armata</i> Meigen, 1826	
58	<i>Fannia armata</i> Meigen, 1826	
59	<i>Lucilia sericata</i> Meigen, 1826	bzučivka zelená
60	<i>Parapiophila vulgaris</i> Fallén, 1820	
61	<i>Lucilia caesar</i> Linnaeus, 1758	bzučivka zlatá
62	<i>Protophormia terraenovae</i> Robineau-Desvoidy, 1830	
63	<i>Lucilia caesar</i> Linnaeus, 1758	bzučivka zlatá
64	<i>Protophormia terraenovae</i> Robineau-Desvoidy, 1830	
65	<i>Calliphora vicina</i> Robineau-Desvoidy, 1830	bzučivka obecná
66	<i>Lucilia sericata</i> Meigen, 1826	bzučivka zelená
67	<i>Calliphora vicina</i> Robineau-Desvoidy, 1830	bzučivka obecná
68	<i>Hydrotaea dentipes</i> Fabricius, 1805	

V tabulkách (Tab. 9 a Tab. 10) není u některých vzorků český název uveden, protože existuje pouze v latinském jazyce. Stejně jako výsledky této práce i například Gunn (2009); Byrd & Castner (2010); Joseph *et al.* (2011), uvádějí, že nejčastěji se vyskytující a tedy forenzně nejvýznamnější čeledi řádu Diptera jsou bzučivkovití (Calliphoridae), a mouchovití (Mouchovití), jak je znázorněno i v obrázku (Obr. 17 v kapitole 11 Přílohy). Další zjištěné čeledi jsou sýrohlodkovití (Piophilidae),

masařkovití (Sarcophagidae) a slunilkovití (Fanniidae). Mezi předpokládané forenzně významné čeledi které uvádí i Obenberger (1955); Daněk (1990); Šuláková (2014) a v souboru vzorků se nevyskytly, jsou octomilkovití (Drosophilidae), kmitalkovití (Sepsidae), pestřenkovití (Syrphidae) nebo hrbilkovití (Phoridae).

## 5.6 Porovnání shody výsledků programů BLAST a BOLD s anatomicko-morfologickou determinací

Databáze BOLD vykazovala signifikantně vyšší shodu s anatomicko-morfologickou determinací, než databáze BLAST ( $GEE-b$ ,  $X^2_1 = 7,9$ ,  $P = 0,005$ , Obr. 11).



Obr. 11 Porovnání spolehlivosti determinace mezi dvěma programy.

Horizontální úsečky vyjadřují průměr a vertikální úsečky jsou 95% intervaly spolehlivosti. Nízké hodnoty shody determinace jsou pravděpodobně ovlivněny nižší přesností anatomicko-morfologické identifikace. Souhrně pro obě databáze odpovídá úspěšnost shody molekulárně-genetických metod identifikace s anatomicko-morfologickou identifikací na úrovni druhu pouze z 32,5 %.

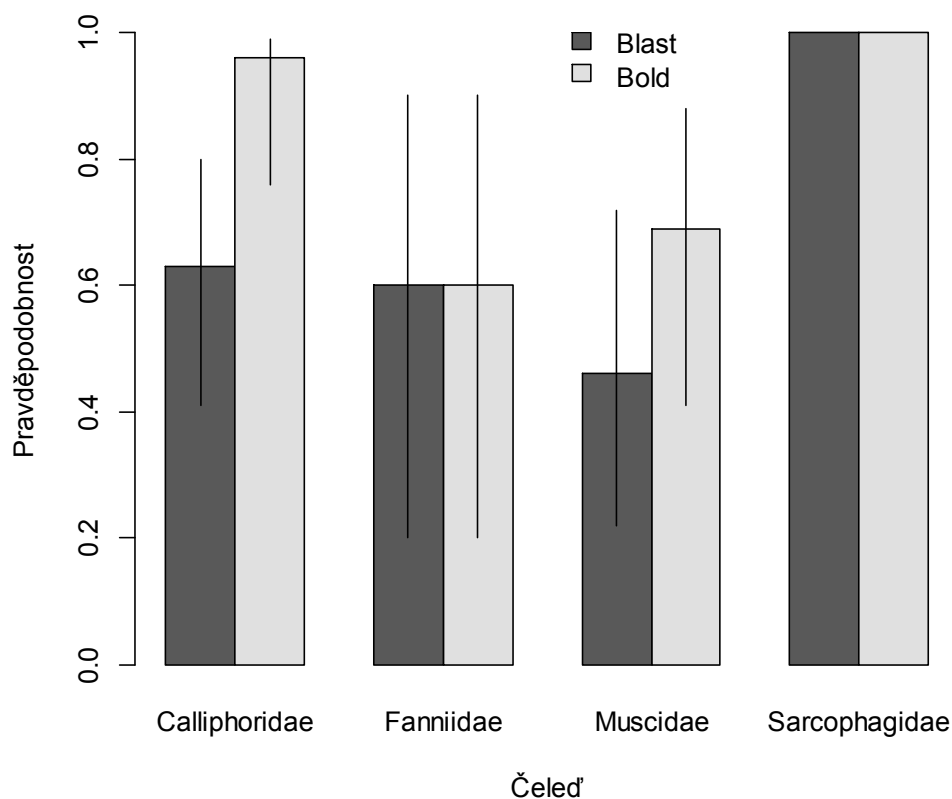
## **5.7 Vliv čistoty vzorku a koncentrace DNA na pravděpodobnost správné determinace**

Čistota vzorku (GEE-b,  $X^2_1 = 0,2$ ,  $P = 0,64$ ) ani koncentrace DNA (GEE-b,  $X^2_1 = 0,6$ ,  $P = 0,42$ ) neměly žádný výrazný vliv na pravděpodobnost správného určení. Pro získání sekvence DNA je zapotřebí projít velkým množstvím postupů a kroků, které mohou mít vliv na kvalitu izolované DNA. Na výslednou determinaci tedy koncentrace a čistota DNA nemusí mít vůbec vliv. I vzorky o vysoké čistotě a koncentraci mohou být znehodnoceny následnou manipulací a zpracováním. Například, jak uvádí Romeika & Yan (2013), kvantifikace DNA může být výrazně ovlivněna inhibitory PCR, které mohou být snadno získány se vzorkem v průběhu extrakce DNA. Inhibitory pak může zabránit proces amplifikace. K běžným inhibitorům nalezených ve forenzních vzorcích patří hematin, indigo, melanin, kolagen, kyselina tříslová, huminové kyseliny a fosforečnan vápenatý. Inhibitory mohou být nejen v rozporu s PCR amplifikací, přičemž jsou falešně negativní, ale také způsobit problémy s amplifikací STR (krátké tandemové repetice), které jsou využívány při identifikaci osob.

## **5.8 Vliv databáze a čeledi na pravděpodobnost správné determinace**

Databáze BOLD vykazoval signifikantně vyšší shodu s anatomicko-morfologickou determinací než program BLAST (GEE-b,  $X^2_1 = 12$ ,  $P < 0,001$ , Obr. 12). Různé čeledi dvoukřídle byly identifikovány s různou spolehlivostí (GEE-b,  $X^2_3 = 4095$ ,  $P < 0,001$ , Obr. 12). Nejspolehlivěji byla identifikována čeleď Sarcophagidae (kontrasty,  $P < 0,001$ ), následně Calliphoridae (kontrasty,  $P < 0,001$ ), která však nebyla odlišná od čeledí Fanniidae a Muscidae (kontrasty,  $P > 0,13$ ). U čeledi Sepsidae nebyl správně identifikován ani jeden vzorek. Souhrně pro obě databáze odpovídá úspěšnost shody molekulárně-genetických metod identifikace s anatomicko-morfologickou identifikací na úrovni čeledi 63,64 %.





Obr. 12 Porovnání pravděpodobnosti správné identifikace mezi dvěma programy a čtyřmi čeleděmi dvoukřídých.

V případě čeledi Sepsidae, která není vyobrazena, nebyl správně identifikován ani jeden vzorek žádným programem. Výška sloupce zobrazuje predikované pravděpodobnosti a chybové úsečky jsou 95% intervaly spolehlivosti. Nulová úspěšnost identifikace čeledi Sepsidae byla pravděpodobně způsobena nízkými znalostmi morfologie a při identifikaci docházelo k záměně za čeď Piophilidae. Při identifikaci mohl být negativním faktorem také nedostatek rozpoznávacích znaků, způsobený například sběrem, uchováváním nebo velkým znečištěním vzorku.

## 6 ZÁVĚR

Pro forenzní entomologii je přesná identifikace zkoumaných jedinců velmi důležitá. Zvláště to platí pro řád Diptera, který je v kriminalistické praxi při výpočtu posmrtného intervalu nezastupitelný. Zkoumání jedinců standardně probíhá pod mikroskopem a na základě morfologických znaků lze určit, o jakého jedince se jedná. Pokud je toto znemožněno je třeba použít molekulárně-genetických metod, které zahrnují izolaci, amplifikaci a sekvenaci DNA.

Pro získání entomologického materiálu byla založena pokusná pole na lokalitách Sokolnice a Rakvice. Hlavním cílem bylo identifikovat forenzně významné zástupce pomocí klasických anatomicko-morfologických metod a současně také pomocí metod molekulárně-genetických. K tomuto účelu bylo nutné izolovat DNA a dalším zpracováním získat sekvence vybraných jedinců z mitochondriálního genomu. Při zpracování výsledků bylo zjištěno, že čistota a koncentrace DNA neměla na konečnou identifikaci vliv. Pro porovnání spolehlivosti identifikace byly využity dvě databáze, zabývající se barcodingem a to BOLD a BLAST. S výsledky anatomicko-morfologické identifikace se více shodovala databáze BOLD. Souhrně pro obě databáze odpovídá úspěšnost shody molekulárně-genetických metod identifikace s anatomicko-morfologickou identifikací na úrovni druhu pouze z 32,5 %, na úrovni čeledi pak z 63,64 %.

Anatomicko-morfologická identifikace pro účel rozeznávání forenzně nejvýznamnějších čeledí řádu Diptera se ukázala jako dostačující pouze na úrovni čeledí. Na úrovni druhu se neprokázala jako vhodná kvůli hodnotám shody v porovnání se zmíněnými databázemi. Z časového hlediska byly shledány obě metody srovnatelné. Proto na základě získaných výsledných údajů této práce doporučuji pro identifikaci nekrofágního hmyzu v kriminalistické praxi použití nejlépe kombinace molekulárně-genetických a anatomicko-morfologických metod, aby bylo dosaženo při vyšetřování trestných činů co nejpřesnějších výsledků.

## 7 SEZNAM LITERATURY

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. 2007: *Molecular biology of the cell*. 5. vyd. New York: Garland Science, 1392 s.

AMANN, G. 1995: *Hmyz v lese: kapesní obrazový atlas*. Překlad Vlastimil Kučera. Vimperk: Nakladatelství J. Steinbrener, 344 s.

AMENDT, J., KRETTEK, R., ZEHNER, R. 2004: Forensic entomology. *Naturwissenschaften* [online]. 91(2), 51-65 s. [cit. 2015-02-25]. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00114-003-0493-5>

ALY, S.M., WEN, J. 2013: Molecular identification of forensically relevant Diptera inferred from short mitochondrial genetic marker. *Libyan Journal of Medicine*, 8(1), 1-2 s.

BARTÁK, M. 2009: Piophilidae Macquart, 1835. V: Jedlička L., Kúdela M. & Stloukalová V. (eds): *Checklist of Diptera of the Czech Republic and Slovakia. Electronic version 2*. <<http://zoology.fns.uniba.sk/diptera2009>>

BYRD, J. H., CASTNER, J. L. 2010: *Forensic entomology the utility of arthropods in legal investigations*. 2. vyd. Boca Raton: Taylor & Francis.

BUCHAR, J. 1995: *Klíč k určování bezobratlých*. Praha: Scientia, 285 s.

BROWN, T. 2007: *Klonování genů a analýza DNA: úvod*. Olomouc: Univerzita Palackého, 408 s.

CASEY, R. M. 2005: "BLAST Sequences Aid in Genomics and Proteomics". Business Intelligence Network.

DANĚK, L. 1990: *Možnost využití entomologie v kriminalistice*. Brno: Kriminalistický ústav VB, 142 s.

DEBNATH, M., PRASAD, G. B. K. S., BISEN, P. S. 2010: *Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities*. Netherlands: Springer.

DOBROTA, D. 2012: *Lekárska biochémia: vysokoškolská učebnica*. Martin: Osveta, 723 s.

DOLEŽAL, T. 2014: Kde v DNA nalézáme rozdíly, zodpovědné za obrovskou diverzitu života? [cit.23.2.2015]. Dostupné z <http://www.prf.jcu.cz/data/files/254/1037zmb6pdf.pdf>

DOLINAK, D., MATSHES, E. W., LEW, E. O. 2005: *Forensic pathology: principles and practice*. Boston: Elsevier/Academic Press, 616 s.

DOSKOČIL, J. 1977: *Klíč zvířeny ČSSR*. Díl V: Dvoukřídli. Praha: ČSAV, 373 s.

FARINHA, A., DOURADO, C. G., CENTEIO, N., OLIVEIRA, A. R., DIAS, D., REBELO, M. T. 2014: Small Bait Traps as Accurate Predictors of Dipteran Early Colonizers in Forensic Studies. *Journal of Insect Science*. 14(77), 1-16 s. Dostupné z: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1673/031.014.77>

FERRI, G. 2009: Species Identification Through DNA “Barcodes”. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 3 (13), 421 – 426 s.

GENBANK. *The National Center for Biotechnology Information* [online]. NCBI-National Center for Biotechnology Information, U. S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA [cit. 2016-04-14]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>

GENNARD, D.E. 2007: *Forensic entomology*. London: Wiley, 224 s.

GILARRIORTUA, M., SALOÑA BORDAS, M.I., KÖHNEMANN, S., PFEIFFER, H., DE PANCORBO, M.M. 2014: Molecular differentiation of Central European blowfly species (Diptera, Calliphoridae) using mitochondrial and nuclear genetic markers. *Forensic science international*, 242, 274-282 s.

GUNN, A., 2009: *Essential forensic biology*. 2. vyd. Chichester, UK: Wiley-Blackwell, 436 s.,

GRANDE-GARCÍA, A., LALLOUS, N., DÍAZ-TEJADA, C., RAMÓN-MAIQUES, S. 2014: Structure, Functional Characterization, and Evolution of the Dihydroorotase Domain of Human CAD. *Structure* [online]. 22(2), 185-198 s., [cit. 2015-03-23]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969212613004280>

HAUPT, J., HAUPT, H. 1998: Fliegen und Mücken. *Deutsche Entomologische Zeitschrift* [online]. 1999, 46(1), 111 s., [cit. 2015-03-01]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mmnd.19990460107>

HAN, H-Y., RO, K-E. 2009: Molecular phylogeny of the family Tephritidae (Insecta: Diptera). *Molecules and Cells* [online]. 27(1), 55-66 s., [cit. 2015-02-22]. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10059-009-0005-3>

HEBERT, P. D. N., CYWINSKA, A., BALL, S. L., DEWAARD, J. R. 2003: Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. 270(1512), 313-321 s., [cit. 2015-02-08]. Dostupné z: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.2002.2218>

HIRT, M. 2015: *Soudní lékařství*. Praha: Grada, 240 s.

HORECKÝ, Č., PODHORNÁ, J., HORECKÁ, E., KNOLL, A., BORKOVCOVÁ, M. 2015: *Molecular genetics as a tool for forensic entomologists*. Poster session presented at the 7th European Academy of Forensic Science Conference, Praha, CZ.

IBORRA, F. J., KIMURA, H., COOK, P. R. 2004: The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC Biology*, 2, 9 s.

JELÍNEK, J., ZICHÁČEK, V. 2006: *Biologie pro gymnázia: (teoretická a praktická část)*. 8., rozš. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 575 s.

JEMT, E., FARGE, G., BÄCKSTRÖM, S., HOLMLUND, T., GUSTAFSSON, C. M., FALKENBURG, M. 2011: The mitochondrial DNA helicase TWINKLE can assemble on a closed circular template and support initiation of DNA synthesis. *Nucleic Acids Research*. 39(21), 9238-9249 s.

JOHNSON, M., I. ZARETSKAYA, Y. RAYTSELIS, Y. MEREZHUK, S. MCGINNIS, T. L. MADDEN. 2008: NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research* [online]. 3, W5-W9, [cit. 2016-03-19]. Dostupné z: <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkn201>

JOSEPH, I., MATHEW, D. G., SATHYAN, P., VARGHEESE, G. 2011: The use of insects in forensic investigations: An overview on the scope of forensic entomology. *Journal of Forensic Dental Sciences* [online]. 3(2), 89 s., [cit. 2015-02-25]. Dostupné z: <http://www.jfds.org/text.asp?2011/3/2/89/92154>

KOKAVEC, M. 1987: *Súdne lekárstvo: učebnica pre lekárske fakulty*. Martin: Osveta, 172 s.

LAŠTŮVKA, Z. 2004: *Zoologie pro zemědělce a lesníky*. 3., dopl. vyd. Brno: Konvoj, 264 s.

*Lékařská chemie a biochemie, 1991: celostátní vysokoškolská učebnice pro studium lékařských fakult v ČSFR, studijní obor všeobecné lékařství, dětské lékařství a hygiena*. Praha: Avicenum. Učebnice pro lékařské fakulty.

LILHOLT, A. 2015: *Entomological Gastronomy*. Lulu Publishing: Lulu.com, 63 s.

LV J., WU S., ZHANG Y., CHEN, Y., FENG, CH., YUAN, X., JIA, G., DENG, J., WANG, C., WANG, Q., MEI, L., LIN, X. 2014: Assessment of four DNA fragments (COI, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). *Parasites & Vectors* [online]. 7(1), 93 s., [cit. 2015-02-08]. Dostupné z: <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/93>

MAČÁK, J., MAČÁKOVÁ, J., DVOŘÁČKOVÁ, J. 2012: *Patologie*. 2., dopl. vyd. Praha: Grada, 376 s.

MCALPINE, J.F. 1981: Morphology and terminology – Adults. V McAlpine, J.F.; Peterson, B.V.; Shewell, G.E.; Teskey, H.J.; Vockeroth, J.R. & Wood, D.M. (eds.) *Manual of Nearctic Diptera*. 1, 9-63 s.

MCGAVIN, G. 2005: *Hmyz: pavoukovci a jiní suchozemští členovci*. Překlad Helena Kholová. Praha: Knižní klub, 256 s.

MEIKLEJOHN, K.A., WALLMAN, J.F., DOWTON, M. 2013: DNA Barcoding Identifies all Immature Life Stages of a Forensically Important Flesh Fly (Diptera: Sarcophagidae). *Journal of forensic sciences*, 58(1), 184-187 s.

MENGUAL, X., STÅHLS G., ROJO, S., 2008: First phylogeny of predatory flower flies (Diptera, Syrphidae, Syrphinae) using mitochondrial COI and nuclear 28S rRNA genes: conflict and congruence with the current tribal classification. *Cladistics* [online]. 2008, 24(4), 543-562 s., [cit. 2015-03-13]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1096-0031.2008.00200.x>

MURRAY, R. K. 2012: *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vyd., nakl. Galén. Překlad Bohuslav Matouš. Praha: Galén, 730 s.

NIHEI, S. S., DE CARVALHO, C. J. B. 2009: The Muscini flies of the world (Diptera, Muscidae): identification key and generic diagnoses. *Zootaxa* 1976, 1–24 s.

NZELU, CH. O., CÁCERES, A. G., ARRUNÁTEGUI-JIMÉNEZ, M. J., MÁXIMO F. L – R., YANEZ - TRUJILLANOF, H. H., DEYSI V. L-C, HOLGUÍN MAURICCIH, C.E. KATAKURAA, K., HASHIGUCHII, Y., KATO H. 2015: DNA barcoding for identification of sand fly species (Diptera: Psychodidae) from leishmaniasis-endemic areas of Peru. *Acta Tropica* [online]. 145, 45-51 s. [cit. 2015-03-09]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X15000236>

OBENBERGER, J. 1955: *Entomologie*. Praha: ČSAV. Práce Čs. akademie věd, 776 s.

PAI, C.-., KURAHASHI, H., DENG, R.-., YANG, C.-., 2014: Identification of forensically important sarcophagidae (Diptera) by DNA-based method coupled with morphological characteristics. *Romanian Journal of Legal Medicine*, 22(3), 209-214 s.

PARK, S.H., PARK, C.H., ZHANG, Y., PIAO, H., CHUNG, U., KIM, S.Y., KO, K.S., YI, C.-., JO, T.-., HWANG, J.-. 2013: Using the developmental gene bicoid to identify species of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae). *BioMed Research International*. 2013, 8 s.

PEIXOTO, A. A., HENNESSY, J. M., TOWNSON, I., HASAN, G., ROSBASH, M., COSTA, R., KYRIACOU, C. P. 1998: Molecular coevolution within a *Drosophila* clock gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95(8), 4475-4480 s.

PEKÁR, S., BRABEC, M. 2009: *Moderní analýza biologických dat 1. Zobecněné lineární modely v prostředí R*. Scientia, 225 s.

PEKÁR, S., BRABEC, M. 2012: *Moderní analýza biologických dat 2. Lineární modely s korelacemi v prostředí R*. Muni Press, 256 s.

PICARD, C. J., JOHNSTON, J. S., TARONE, A. M., 2012: Genome Sizes of Forensically Relevant Diptera. *Journal of Medical Entomology* [online]. 49(1), 192-197 s., [cit. 2016-03-22]. Dostupné z: <http://jme.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1603/ME11075>

POKORNÝ, V., ŠIFNER F. 2004: *Atlas hmyzu*. Praha: Paseka, 71 s.

POLANS, N.O., SAAR, D.E. 2002: ITS sequence variation in wild species and cultivars of pea. *PISUM GENETICS*. 2002(34), 9-14 s.

PP Jezírko Kutnar. AOPK ČR. [online][cit. 2015-09-29]. Dostupné z: [http://drusop.nature.cz/ost/chrobjekty/zchru/index.php?frame&SHOW\\_ONE=1&ID=147AOPK\\_CR](http://drusop.nature.cz/ost/chrobjekty/zchru/index.php?frame&SHOW_ONE=1&ID=147AOPK_CR)

QUITT, E. 1976: Klimatické oblasti ČSR. Mapa 1:500 000. Brno: Geografický ústav ČSAV.

R Development Core Team R. 2014: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <http://www.R-project.org>.

*RAKVICE: oficiální stránky obce* [online], 2016: Současnost: Současný stav obce Rakvice. Chomutov: Galileo Corporation s.r.o., [cit. 2015-04-14]. Dostupné z: <http://www.rakvice.cz/obec-1/informace-o-obci/soucasnost/>



RATNASINGHAM, S., HEBERT, P. D. N. 2007: BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7, 355–364 s.

ROMEIKA, J. M., YAN, F. 2013: Recent Advances in Forensic DNA Analysis. *J Forensic Research*. 12 (001).

RIETSCHER, S. 2011: *Hmyz: 3 znaky: klíč ke spolehlivému určování*. 3. vyd. Překlad Dalibor Povolný. Čestlice: Rebo. Průvodce přírodou (Rebo), 240 s.

ROCHEFORT, S., GIROUX, M., SAVAGE, J., WHEELER, T.A. 2015: Key to Forensically Important Piophilidae (Diptera) in the Nearctic Region. *Canadian Journal of Arthropod Identification*. 27(1). Dostupné z: [http://www.biology.ualberta.ca/bsc/ejournal/rgsw\\_27.html](http://www.biology.ualberta.ca/bsc/ejournal/rgsw_27.html)

ROLO, E. A., OLIVEIRA, A. R., DOURADO, C. G., FARINHA, A., REBELO, M. T., DIAS, D., 2013: Identification of sarcosaprophagous Diptera species through DNA barcoding in wildlife forensics. *Forensic Science International* [online]. 228(1-3), 160-164 s., [cit. 2015-03-22]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073813001242>

ROSICKÝ, B., DANIEL, M. 1989: *Lékařská entomologie a životní prostředí*. Praha: Academia, 437 s.

SANCHIS, A., MICHELENA, J. M., LATORRE, A., QUICKE, D. L. J., GÄRDENFROS, U., BELSHAW, R., 2001: The phylogenetic analysis of variable-length sequence data: elongation factor-1a introns in European populations of the parasitoid wasp genus *Pauesia* (Hymenoptera: Braconidae: Braconidae: Aphidiinae). *Mol. Biol. Evol.* 18, 1117–1131 s.

SALOÑA-BORDAS, M. I., CAINÉ, L. M., PINHEIRO, F., DE PANCORBO, M. M. 2015: Technical Note: “Mitochondrial and nuclear DNA approaches for reliable identification of *Lucilia* (Diptera, Calliphoridae) species of forensic interest from Southern Europe”. *Forensic Science International*. 257(12), 393-397 s. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037907381500434X>

*Segen's Medical Dictionary.*, S.v. "algor mortis." [cit. 2016-03-07]. Dostupné z: <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/algor+mortis>

SMRŽ, J., 2013: *Základy biologie, ekologie a systému bezobratlých živočichů*. V Praze: Karolinum, 194 s.

SNUSTAD, D., SIMMONS, M. J. 2009: *Genetika*. Překlad Jiřina Relichová. Brno: Masarykova univerzita, 894 s.

SPERLING, F. A. H, ANDERSON, G. S., HICLEY, D. A. 1994: A DNA-Based Approach to the Identification of Insect Species Used for Postmortem Interval Estimation. *Journal of Forensic Science*. 39(2), 418-420 s.

SZPILA, K. 2010: Key for the Identification of Third Instars of European Blowflies (Diptera: Calliphoridae) of Forensic Importance. *Current Concepts in Forensic Entomology* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 43 s., [cit. 2015-02-29]. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-9684-6\\_3](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-9684-6_3)

SZPILA, K, VILLET, M H. 2011: Morphology and Identification of First Instars of African Blow Flies (Diptera: Calliphoridae) Commonly of Forensic Importance. *Journal of Medical Entomology* [online]. 48(4), 738-752 s., [cit. 2015-02-29]. Dostupné z: <http://jme.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1603/ME10238>

ŠEFROVÁ, H. 2006: *Rostlinolékařská entomologie*. Brno: Konvoj, 260 s.

ŠTEFAN, J., HLADÍK J., 2012: *Soudní lékařství a jeho moderní trendy*. Praha: Grada, 448 s.

ŠULÁKOVÁ, H. 2014: Forenzní entomologie – když smrt je začátek. *Živa*. Academia, 2014, 5, 250-256 s.

TATARENKOV, A., AYALA, F. J. 2007: Nucleotide variation at the dopa decarboxylase (Ddc) gene in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *J. Genet.* 86, 125-137 s.

TORRONI, A, ACHILLI, A., MACAULAY, V., RICHARDS, M., BANDELT, H. 2006: Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. *Trends in Genetics* [online]. 22(6), 339- 345 s., [cit. 2016-02-14]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168952506001181>

VOGT, L. 2002: Weighting indels as phylogenetic markers of 18S rDNA sequences in Diptera and Strepsiptera. *Organisms Diversity & Evolution* [online]. 2(4), 335-349 s., [cit. 2016-02-22]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1439609204700483>

WHITWORTH, T. L, DAWSON, R. D., MAGALON, H., BAUDRY, E. 2007: DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. 274(1619), 1731-1739 s., [cit. 2015-02-11]. Dostupné z: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.2007.0062>

ZAJAC, BK., MARTIN-VEGA, D., FEDDERN, N., FREMDT, H., E CASTRO, CP., SZPILA, K., RECKEL, F., SCHÜTT, S., VERHOFF, MA., AMENDT, J., ZEHLER, R. 2016: Molecular identification and phylogenetic analysis of the forensically important family Piophilidae (Diptera) from different European locations. *Forensic Science International* [online]. 259, 77-84 s., [cit. 2015-02-22]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073815005253>

ZÁVESKÁ DRÁPKOVÁ, L. 2012: Čárový kód života. *Vesmír*. 91(2), 96-99 s.

## 8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Schématické znázornění sukcesních vln (fází) (Šuláková, 2014)	22
Obr. 2 Tři kódující oblasti s dvěma vymezenými sekvencemi ITS-1 a ITS-2 jaderné ribozomalní DNA (Polans & Saar, 2002)	26
Obr. 3 Lokalita Sokolnice (foto: Ing. Pavel Macháň, Ph.D.)	30
Obr. 4 Lokalita Rakvice, jezírko Kutnar (foto: Ing. Pavel Macháň, Ph.D.)	30
Obr. 5 Velikosti použitých hmotnostních markerů “GeneRuler™ 1 kb” a “100 bp DNA ladders”	36
Obr. 6 DNA izolovaná z těl vybraných jedinců	42
Obr. 7 Výsledek amplifikace PCR produktu	42
Obr. 8 Výstup z programu Chromas	43
Obr. 9 Výstup databáze BLAST	43
Obr. 10 Výstup databáze BOLD	44
Obr. 11 Porovnání spolehlivosti determinace mezi dvěma programy.	47
Obr. 12 Porovnání pravděpodobnosti správné identifikace mezi dvěma programy a čtyřmi čeleděmi dvoukřídlých.	49
Obr. 13 Larvy řádu Diptera na pokusném objektu (foto: Ing. Pavel Macháň, Ph.D.)	63
Obr. 14 Vzorek č. 15 bzučivka zlatá ( <i>Lucilia caesar</i> ) (foto: Ing. Pavel Macháň, Ph.D.)	63
Obr. 15 Žilnatina křídla u řádu Diptera (McAlpine, 1981)	64
Obr. 16 Pole křídla u řádu Diptera (McAlpine, 1981)	64
Obr. 17 Četnost čeledí a druhů získaného materiálu z lokalit Sokolnice a Rakvice	66

## 9 SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Shrnutí zastoupených čeledí, rodů a druhů řádu Diptera v jednotlivých sukcesních vlnách _____	23
Tab. 2 Složení reakční směsi PCR pro 1 vzorek _____	33
Tab. 3 PCR primery (Horecký et al., 2015) _____	34
Tab. 4 Podmínky, za kterých probíhala PCR _____	34
Tab. 5 Množství PCR produktu (ng) pro přípravu 10 µl sekvenační reakční směsi ____	36
Tab. 6 Složení sekvenační reakční směsi _____	37
Tab. 7 Podmínky, za kterých probíhala amplifikace templátu _____	37
Tab. 8 Výsledek anatomicko-morfologická identifikace _____	40
Tab. 9 Jedinci nalezení na lokalitě Sokolnice _____	45
Tab. 10 Jedinci nalezení na lokalitě Rakvice _____	46
Tab. 11 Zjištěná koncentrace a čistota z izolované DNA _____	65

## 10 SEZNAM ZKRATEK

BOLD	The Barcode of Life
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	base pair, páry bází
CAD	Carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase
COI	cytochromoxidáza I
ČR	Česká republika
DDBJ	DNA DataBank of Japan
DDC	Dopa decarboxylase
DNA	Deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
EF-1 $\alpha$	Elongation factor 1 $\alpha$ , elongační faktor 1 $\alpha$
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EtBr	ethidium bromid
GC	guanin, cytosin
GEE	Generalized Estimating Equations
GEE – b	GEE s binomickým rozdělením chyb
ITS	Internal transcribed spacer
m n. m.	metrů nad mořem
Mbp	mega base pairs, milion párů bází
mRNA	Messenger RNA, mediátorová RNA
mtDNA	Mitochondrial DNA, mitochondriální DNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Neg.	Negativní kontrola
PER	Period
PCR	Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce
PMI	Post Mortem Index / Inteveal, posmrtný interval
pmol	pikomol
RNA	Ribonucleic acid, ribonukleová kyselina
rDNA	Ribosomal DNA, ribozomální DNA
rRNA	Ribosomal RNA, ribozomální RNA
STR	Short Tandem Repeats, krátké tandemové repetice
Thr – Gly	threonin – glycin
Tm	teplota tání
UV	ultrafialové
USA	Spojené státy americké

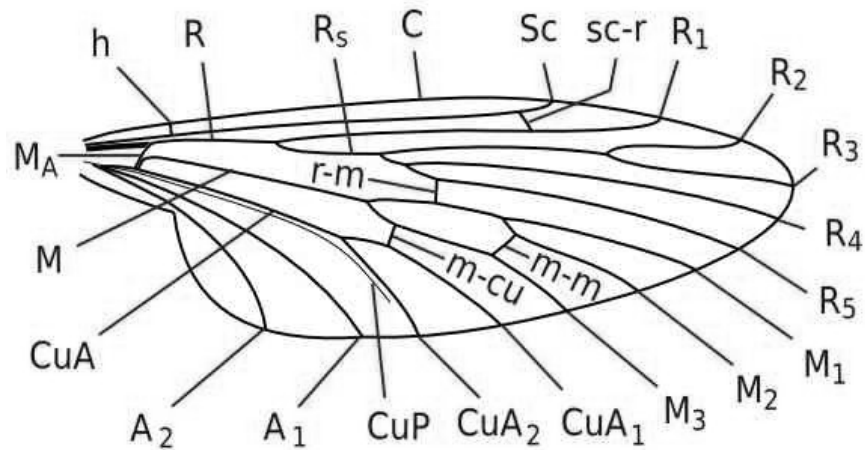
## 11 PŘÍLOHY



Obr. 13 Larvy řádu Diptera na pokusném objektu (foto: Ing. Pavel Macháň, Ph.D.)

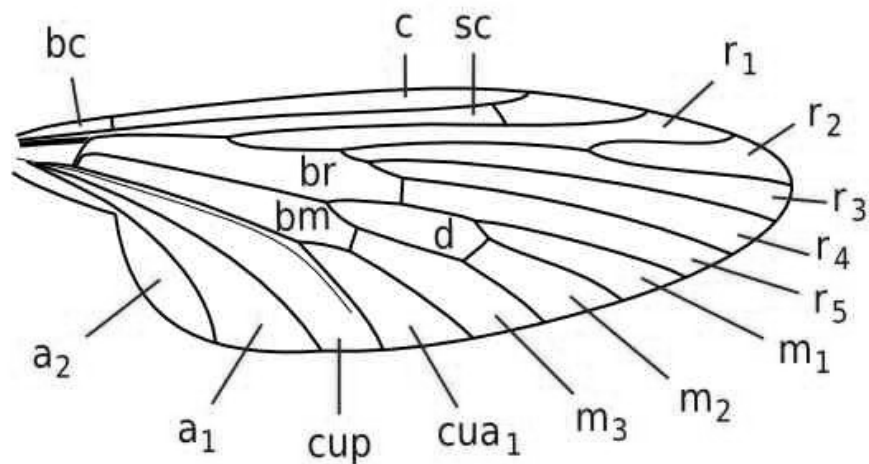


Obr. 14 Vzorek č. 15 bzučivka zlatá (*Lucilia caesar*) (foto: Ing. Pavel Macháň, Ph.D.)



Obr. 15 Žilnatina křídla u řádu Diptera (McAlpine, 1981)

**A<sub>1</sub>**: anal; **C**: costa; **CuA<sub>1-2</sub>**: branches of anterior cubitus; **CuP**: posterior cubitus; **h**: humeral; **M<sub>1-3</sub>**: branches of media; **m-cu**: medial-cubital; **m-m**: medial; **R<sub>1</sub>**: anterior branch of radius; **R<sub>s</sub>**: radial sector; **R<sub>2-5</sub>**: branches of radial sector; **r-m**: radial-medial; **Sc**: subcosta; **sc-r**: subcostal-radial; **bm**: basal medial; **br**: basal radial; **cup**: posterior cubital; **d**: discal.



Obr. 16 Pole křídla u řádu Diptera (McAlpine, 1981)

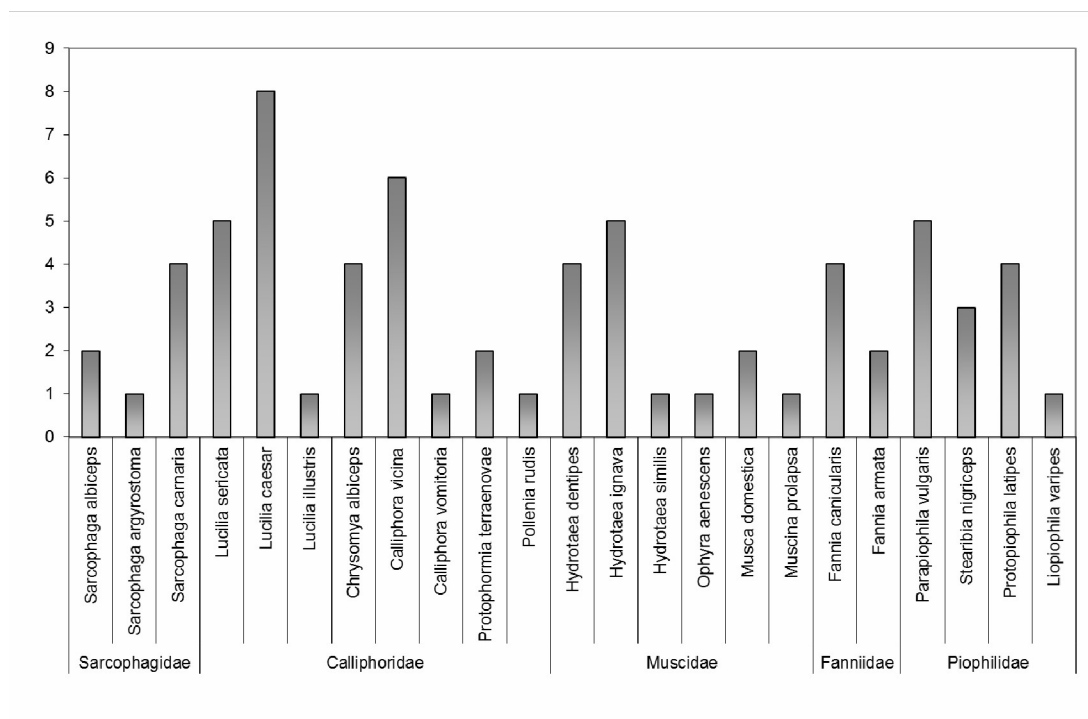
**a<sub>1-2</sub>**: anal; **bc**: basal costal; **bm**: basal medial or second basal; **br**: basal radial or first basal; **c**: costal; **cup**: posterior cubital; **cua<sub>1</sub>**: anterior cubital; **d**: disc or discal; **m<sub>1-3</sub>**: medial; **r<sub>1-5</sub>**: radial; **sc**: subcostal.



Tab. 11 Zjištěná koncentrace a čistota z izolované DNA

Vzorek	Jedinec	Koncentrace DNA (ul)	Čistota DNA (A260 / A280)	Poznámka
1	<i>Sarcophaga albiceps</i>	165,8	2,08	
2	<i>Chrysomya albiceps</i>	759,1	2,18	
3	<i>Chrysomya albiceps</i>	421,8	2,18	
4	<i>Lucilia caesar</i>	133,5	2,12	
5	<i>Chrysomya albiceps</i>	785,7	2,28	
6	<i>Fannia canicularis</i>	77,1	2,08	
7	<i>Fannia canicularis</i>	91,7	2,06	
8	<i>Sarcophaga argyrostoma</i>	598,1	1,84	kukla
9	<i>Parapiophila vulgaris</i>	168,9	2,19	
10	<i>Stearibia nigriceps</i>	51,8	2,15	
11	<i>Parapiophila vulgaris</i>	65,7	2,14	
12	<i>Protopiophila latipes</i>	49,3	2,09	
13	<i>Lucilia caesar</i>	80,8	1,71	
14	<i>Chrysomya albiceps</i>	58,2	1,95	
15	<i>Lucilia caesar</i>	76,4	2,13	
16	<i>Lucilia sericata</i>	34,5	2,14	
17	<i>Lucilia caesar</i>	755,6	2,26	
18	<i>Musca domestica</i>	234	2,25	
19	<i>Parapiophila vulgaris</i>	61,2	2,17	
20	<i>Musca domestica</i>	13,8	2,27	
21	<i>Sarcophaga carnaria</i>	1,8	8,14	
22	<i>Sarcophaga carnaria</i>	1,3	-69,51	
23	<i>Stearibia nigriceps</i>	53,9	2,23	
24	<i>Parapiophila vulgaris</i>	37,3	2,4	
25	<i>Fannia canicularis</i>	96,3	2,21	
26	<i>Lucilia sericata</i>	289,1	2,08	
27	<i>Hydrotaea similis</i>	145,3	2,12	
28	<i>Sarcophaga albiceps</i>	86,1	1,98	
29	<i>Calliphora vicina</i>	163,4	2,15	larva
30	<i>Calliphora vicina</i>	257,5	1,72	kukla
31	<i>Lucilia sericata</i>	19,8	1,81	kukla
32	<i>Calliphora vomitoria</i>			směsné báze
33	<i>Pollenia rudis</i>			směsné báze
34	<i>Liopiophila varipes</i>	33,4	2,09	
35	<i>Hydrotaea dentipes</i>	210,3	2,14	
36	<i>Hydrotaea dentipes</i>	440,1	2,21	
37	<i>Ophyra aenescens</i>	142	2,17	
38	<i>Hydrotaea ignava</i>	289,4	2,25	
39	<i>Hydrotaea ignava</i>	262,4	2,24	
40	<i>Hydrotaea ignava</i>	176,2	2,21	
41	<i>Hydrotaea ignava</i>	761	2,21	
42	<i>Hydrotaea dentipes</i>	496	2,21	
43	<i>Hydrotaea ignava</i>	571,5	2,21	

44	<i>Fannia canicularis</i>	128,3	2,1	
45	<i>Protophila latipes</i>	43	2,14	
46	<i>Lucilia illustris</i>	10,6	2,45	
47	<i>Sarcophaga carnaria</i>	17,6	2,36	
48	<i>Protophila latipes</i>	32,9	2,18	
49	<i>Liopiophila varipes</i>	33,4	2,09	
50	<i>Sarcophaga carnaria</i>	25,1	2,2	
51	<i>Protophila latipes</i>	41,3	2,19	
52	<i>Stearibia nigriceps</i>	66	2,16	
53	<i>Calliphora vicina</i>			
54	<i>Lucilia caesar</i>	143,1	2,17	
55	<i>Lucilia caesar</i>	132,2	2,25	
56	<i>Muscina prolapsa</i>	453	2,25	
57	<i>Fannia armata</i>	142,2	2,15	
58	<i>Fannia armata</i>	109,2	2,1	
59	<i>Lucilia sericata</i>	109,7	2,2	
60	<i>Parapiophila vulgaris</i>	92,2	2,18	
61	<i>Lucilia caesar</i>	303,1	2,23	
62	<i>Protophormia terraenovae</i>	108,6	2,15	
63	<i>Lucilia caesar</i>	199,6	2,22	
64	<i>Protophormia terraenovae</i>	177,5	2,19	
65	<i>Calliphora vicina</i>	98,5	1,7	larva
66	<i>Lucilia sericata</i>	516,6	2,24	kukla
67	<i>Calliphora vicina</i>			směsné báze
68	<i>Hydrotaea dentipes</i>			směsné báze



Obr. 17 Četnost čeledí a druhů získaného materiálu z lokalit Sokolnice a Rakvice