

University of Rennes 1
UMR CNRS 6553
263 Avenue du Gal Leclerc
CS 74205
35042 Rennes Cedex
FRANCE

November 23th, 2009

Report on the thesis presented by Michaela BOROVSANKA

Michaela BOROVSANKA PhD Thesis entitles 'Physiological and molecular adaptations during diapause development and overwintering in a heteropteran bug, *Pyrrhocoris apterus*' is made of 4 main chapters: an introduction (15 pages long), 7 published papers, perspectives, and it finishes with a presentation of the abstracts of posters/talk that were presented in international conferences. One more published paper is also presented in this last chapter.

Michaela Borovanska's research falls in a general area that has been unfortunately somewhat neglected in the last two decades – animal physiological ecology – and that nevertheless promises important scientific insights (as is indicated by much of M. Borovanska's research). Michaela Borovanska's casts her research in the sub-discipline of stress physiology, which intersects with ecology in attempts to characterize and explain the population dynamics within their geographic ranges. The particular stress in which she specializes – exposure to low temperature – is particularly timely regarding the current climate changes. She examined physiological and molecular adaptations in response to harsh winter conditions in a species that enters diapause during late summer and persists in a state of low temperature quiescence during winter months. For many years, insect ecophysiologicalists have had a good understanding of the lethal and sub-lethal effects of cold stress at the phenotypic level, and of the different molecules that are synthesised to perform various cryoprotective roles. However, until recently, we have been lacking a clear understanding of the molecular and in some cases, the genetic bases of our observations. To bridge the gap between ecology, physiology and molecular biology, we need to apply an integrated suite of techniques to address these problems.

Michaela Borovanska's research manifests a remarkable degree of coherence and has progressed from an initial interest in the physiological and biochemical changes of the mechanisms occurring in response to cold temperatures in the linden bug *Pyrrhocoris apterus* to the mechanistic (molecular) basis of such tolerance (repair of chill injuries).

Overall, I found the introduction well written, but I have the feeling that it would have gained in clarity by adding some figures. For instance, there's a good description of the adjustment of cell membrane composition as well as for the main enzymes involved in the cryoprotectant biosynthesis, but adding some figures explaining changes that occur at the membrane level and summarizing the main metabolic pathways involved in the polyols synthesis would have helped the reader. At first, I thought that some information were lacking in the introduction. However, my opinion changed when I finished reading the whole manuscript: the introduction ensures a good understanding of the work by giving the

needed scientific basis to the reader. Additional information are then found in the following papers, and I found this really pleasant, since it avoids repetition usually found in thesis mainly composed by published papers.

The main body of this thesis includes 7 published papers, and, in one of them, Michaela Borovanska is the only author, demonstrating her ability to conduct her own research from the beginning to the end. I enjoyed reading all of these papers. Experiments are conducted with care and each of us gives new insights into the physiological, biochemical and molecular basis of insect cold hardiness.

My main critics will be on the chapter 3. Regarding the big amount of work that has been nicely conducted, I felt a bit disappointed when reading the perspectives (< 1page). I should add that Michaela Borovanska developing research programs suggest many other interesting directions that she has not mentioned. For instance, it's really fascinating that the Pahsp 70 mRNA increases during the warm period of the FTR (paper 7), but that the protein could not be expressed (paper 7) whereas it assists the repair of chill injuries after heat stress (paper 6). Did you plan conducting further experiments to determine why the expression of the mRNA encoding this protein didn't result in an accumulation of the Pahsp 70 protein over time? In addition, and as stated in the introduction, all the studied processes are under hormonal regulation. Do you have an idea of the hormonal signal that leads to the transcription of Pahsp 70 mRNA? It starts increasing as soon as the insects were heat stressed, and stopped when they were returned to optimal thermal conditions. This suggests that it is triggered by temperature itself and not by an amount of accumulated injuries *per se*. As you were able to inject RNAi (and even polyols!) in that species, injecting precursors of some of the main hormones known as being involved in the heat stress response (like dopamine or octopamine for instance) would be of particular interest. It would help determining the possible hormonal cascade initiating the activation of the Pahsp 70 mRNA transcription. Do you think that would be possible? Examining the hormonal regulation of the metabolic activities and more particularly the regulation of the enzymes involved in the cryoprotectant synthesis in the fat body would also be a nice perspective regarding the researches you conducted to date.

It is also noteworthy that Michaela Borovanska has collaborated substantially with other researchers at Ceske Budejovice, and at European universities beyond Czech Republic, in projects that benefit from the particular talents of each collaborator and could probably not have been conducted by any one researcher working in isolation.

In sum, the steady growth, impressive breadth, and original nature of Michaela Borovanska research, combined with her ability to collaborate fruitfully with colleagues on a variety of research topics, indicate that. She certainly merits presenting her work to the committee and gets the Doctor graduation.

David Renault

C.N.R.S.
Université de Rennes 1
UMR CNRS "ECOBIO"
Bâtiment 1A
Campus de Beaulieu
35042 RENNES CEDEX



Biologické centrum AV ČR

Branišovská 31/1160, 370 05 České Budějovice

Telefon: 387 775 924, Fax: 385 310 338, E-mail: bc@bc.cas.cz

Oponentský posudek na Ph.D. Thesis Michaely Borovanské "Physiological and molecular adaptations during diapause development and overwintering in a heteropteran bug, *Pyrrhocoris apterus*"

Hlavní součástí předkládané práce je soubor 7 originálních prací publikovaných v recenzovaných mezinárodních časopisech. Hlavním cílem, kterému jsou věnovány čtyři publikace, bylo objasnit vztah mezi polyoly, včetně souvisejících enzymů a jejich transkriptů a chladovou rezistencí ploštic *Pyrrhocoris apterus*. Detailně jsou analyzovány změny v hladinách těchto molekul ve vztahu k diapauze, diapauznímu vývoji a chladové aklimaci. Jedna práce řeší vliv diapauzního vývoje, chladu a ztráty vody na změny v membranových fosfolipidech a dvě nejnovější práce jsou věnovány potenciální úloze heat shock proteinů při přežívání nediapausních ploštic v nízkých teplotách. Kromě toho jsou přiloženy abstrakty z mezinárodních konferencí a publikace výsledků získaných během pobytu v zahraničí.

Soubor prací je uveden obsáhlým přehledem literatury svědčícím o dobré celkové orientaci autorky v problematice diapauzy a chladové odolnosti. Summary je složeno ze zkrácených abstraktů jednotlivých prací. Domnívám se, že souhrnné vyhodnocení celkového vědeckého přínosu předložených publikací by umožnilo uvést v soulad nová zjištění, která se pochopitelně v jednotlivých publikacích částečně překrývají nebo jsou zdánlivě rozporná (na př. str. 103: ad (1) "in response to cold treatment the activity of *a* form GP ase decreased" vs. ad (2) "GP ase inactive *b* form was activated upon transition to 0 °C) a zároveň by byl daleko přehledněji vystižen přínos doktorandky k problematice. Summary v současné rozdělené podobě (chapter 3, str. 103-106) ztěžuje čtenáři udělat si takový celkový dojem. Forma shrnutí použitá v autoreferátu se zdá být vhodnější. Je škoda, že chybí kapitola Diskuze konfrontující autorčina zjištění s výchozími hypotézami a současným stavem vědeckého oboru, i když některé věty tohoto typu lze nalézt v Introduction.

Publikace samotné jsou dobře napsány a přinášejí nové důležité poznatky především o molekulárních mechanismech diapauzního vývoje a chladové odolnosti. Mám pouze jeden dotaz: Proč jste vztah mezi heat shock proteiny a chladovou odolností začala řešit nejdříve u nediapauzních ploštic, jejichž schopnost chladové aklimace je ve srovnání s diapauzními plošticemi postatně menší?

Celkově hodnotím práci velmi kladně. Autorka zvládla celou řadu moderních metod fyziologie a molekulární biologie a získala nové zajímavé výsledky. Předkládaný soubor publikací splňuje veškeré požadavky na doktorskou (Ph.D.) práci a plně ji doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích, 30.11.2009

Doc. RNDr. Magdalena Hodková, CSc.

Oponentský posudek na disertační práci

Autor: RNDr. Michaela Borovanská

Titul: Physiological and molecular adaptations during diapause development and overwintering in a heteropteran bug, *Pyrrhocoris apterus*

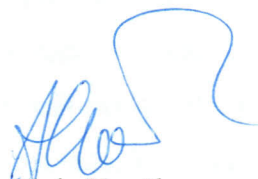
Práce Mgr. Michaely Borovanské předložená pro získání titulu PhD na Přírodovědecké fakultě Jihočeské University je komentovaným souborem 7 publikací a 4 abstraktů z konferencí tematicky zaměřených na ekologii a fyziologii hmyzí hibernace. Tento základní soubor pracuje s klasickým objektem těchto studií, jímž se stala, a to velkým přičiněním právě školícího pracoviště doktorandky, ruměnice pospolná *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera, Pyrrhocoridae). K souboru prací je dále připojena práce týkající se biologie zimování žížaly druhu *Dendrobaena octaedra*, kterou autorka publikovala na zahraničním pracovišti. Práce týkající se vlastní problematiky doktorandské práce byly publikovány v letech 2004-2009 v časopisech *Physiological Entomology* (if=1.533), *Journal of Insect Physiology* (if=2.155), *Journal of Experimental Biology* (if=2.981), *European Journal of Entomology* (if=0.913), *PLoS ONE* a *Cryo Letters* (if=1.193). Doktorandka je jedinou autorkou u jedné z prací, u dalších prací je kolektiv autorů dvoučlenný (1 práce), tříčlenný (3 práce), čtyřčlenný (1 práce) a pětičlenný (1 práce), přičemž doktorandka se vždy podílela na publikacích velkým podílem, významně plánovala design experimentů, připravovala materiály a vykonala většinu experimentální práce. První výsledky byly publikovány v roce 2004. Doktorandská práce tudíž shrnuje výsledky za nejméně šestileté období výzkumné činnosti. Všechny výsledky prošly náročným recenzním řízením před přijetím k publikaci. Jejich odborný přínos byl tak hodnocen přísnějšími a spravedlivějšími měřítky, než bych mohl uplatnit sám v tomto posudku. Necítím proto potřebu vyjadřovat se k formální nebo obsahové stránce jednotlivých publikací. Již scientometrické hodnocení vědeckého výkonu doktorandky, dle mého názoru, zcela zdůvodňuje udělení titulu PhD.

Nicméně bych chtěl podat ještě krátké zhodnocení předkládaného souboru prací. Soubor publikací předložený jako doktorandská práce je dobře tematicky vymezen, jednak subjektem výzkumu (ruměnice pospolná), jednak zkoumanou problematikou (fyziologie diapausy). Zkoumanou problematiku je možno shrnout z jednotícího pohledu, který autorka sama podává v úvodu doktorandské práce (15 stran doplněných c. 200 citacemi). Zkoumána byla jednak

klasická problematika školitelského pracoviště, mechanismy a časový průběh biochemických reakcí v zimním období a s tím spojené změny resistance k nízkým teplotám, dále pak problematika heat shock proteinů. Doktorandka vycházela z již dříve získaných dobrých znalostí fyziologie zimování ruměnice a řešila několik vybraných problémů, které spolu souvisí tím, že se odehrávají v období zimování. Jako velmi zajímavou část hodnotím problematiku vlivu kolísavých teplot (zatím málo zkoumáno) a úlohy hsp proteinů při reparaci chladového poškození (nové ve studiu *P. apterus*, i když zatím výsledky s jejich indukci byly negativní).

K výběru temat ani k metodice nemám připomínky. Jako námět k diskusi kladu otázku, která souvisí s prací EJE (2008) 105: 145-152 studující sezonní změny aktivity tří enzymů. Na rozdíl od pokusů s laboratorně chovanými zvířaty našla autorka v přírodních populacích ohromnou variabilitu, tak velkou, že nebyly v delších časových úsecích nalezeny významné rozdíly v průměrných hodnotách z jednotlivých dat. Ptám se tudíž, v čem vidí autorka příčinu této variability. Je možné, že se jedná o věkovou závislost? V materiálu ze září, který tvoří kohorta stejného věku je, na rozdíl od všech ostatních vzorků, variabilita malá. Dále: lze při tak ohromné variabilitě předpokládat nějaký vliv sledovaných faktorů na fitness zvířat? T.j. mohou být někteří jedinci determinováni k smrti v některém období přezimování právě kvůli nepříznivému titru jednoho nebo více enzymů? Probíhá taková selekce v podmínkách přezimování? Vím, že to nebylo sledováno, nicméně názor autorky by mne velmi zajímal.

Předložená práce je výsledkem víceleté výzkumné činnosti doktorandky v oboru ekologie, fyziologie a biochemie diapausy *Pyrrhocoris apterus*. Publikace zahrnuté v doktorandské práci svědčí o příkladné péči a široké informovanosti doktorandky v problematice oboru a o jejích tvůrčích schopnostech. Předložený text splňuje všechny nároky kladené na doktorandskou práci. Scientometrické ukazatele naznačují, že autorka zdárně vykročila k tomu, aby se stala uznávaným členem mezinárodní vědecké komunity daného oboru. Doporučuji, aby doktorandská práce byla přijata k oponentnímu řízení a po jeho úspěšném zakončení byl autorce udělen obhajovaný titul.



Alois Honěk