

**Posudek na dizertační práci mgr. Vladimíra Půži: "Mezidruhová kompetice a hostitelské spektrum entomopatogéních hlístovek (Steinernematidae, Nematoda)".**

---

Mgr. Půža si zvolil za objekt svých studií téma velmi aktuální - hmyzí patogeny, jejichž výzkum má v naší zemi hlubokou tradici, zejména díky guru oboru, prof. Weiserovi, jehož role nejen v naší, ale celosvětové entomologii je zcela mimořádná. Jeho žáci pak tento obor rozvíjeli dále, jak potvrzuje svoji práci i školitel, dr. Mráček. Hmyzí patogeni totiž nepředstavují pouze zajímavý objekt zoologický a také interakční, ale možnost pro aplikovanou zoologii v současné době se vzrůstajícím významem jako způsob bezreziduálního zásahu proti tzv. škůdcům. To v přírodě hraje a bude hrát stále významnější roli.

Jádro práce tvoří tři publikace v časopisech s vyšším IF, pro zoologické obory s vysokým IF. Dva rukopisy tento výčet doplňují.

Tyto publikační výstupy jsou rámovány i kapitolami úvodními, včetně uvedení do současné situace v oboru a stanovení pracovních cílů, a závěrečné, tedy souhrnu výsledků studií. Uvedení do problematiky podává autor stručně, ale výstižně, a to ve všech myslitelných aspektech. Kromě historie výzkumu a taxonomie seznamuje čtenáře, a to lehce i nespecialistu, se specifickým principem parazitace, tedy interakcí s bakteriemi a jejich úloze jako patogena a producenta toxinů, ale i potravy pro hlístovky, životními cykly parazitů a zejména s hostitelským spektrem tvořícím jeden ze základních kamenů celé práce. Zajímavou u hlístovek se jeví možnost využívat i mrtvý hmyz simultánně jako potravní zdroj, tedy problém sahající až ke kořenům vzniku parazitace u hlístic. Pozoruhodnou stránku představuje i interakce mezi dvěma různými druhy hlístovek. To potvrzuje i stále výrazněji se prosazující názor o motoru většiny procesů v přírodě - o interakcích mezi organizmy různých, ale i stejných skupin. Tím zasahuje autor i do tolikrát skloňovaného problému, do sféry biodiverzity, jejíž podstatu možná časem začnou chápat dokonce i novináři. Závěrem této úvodní kapitoly autor pregnantně stanovuje cíle či, chceme-li, hypotézy práce.

Těžko budu znovu posuzovat kvality publikovaných prací prošlých jistě přísným a objektivním procesem peer-review v obou renomovaných časopisech. Dva přiložené rukopisy se pak zabývají právě podstatným problémem, tedy interakcí jak parazitů,

tak jejich vlivem na bilanci parazitace a mrchožroutství hlístovek, jakož i dalších živočichů (střevlící, kovařící, plži). Konečně třetí z publikovaných prací řadu těchto problémů řeší také.

Autor na konci práce jasně a bez zbytečných fantazií shrnuje výsledky svých studií ve stanovených aspektech. Zde velmi realisticky hodnotí, ale i naznačuje další cesty, resp. nutnost dalších pozorování. Závěry o rezistenci či naopak náchylnosti k infekcím u potenciálních hostitelů mohou přispívat i k aplikovaným důsledkům (srov. s hlísticí *Phasmarhabditis hermaphrodita* používané k omezení druhu *Arion lusitanicus!*). Studie koexistence a působení na hostitele u dvou druhů hlístovek pak naznačuje nejen způsob invaze do hostitele a průběhu parazitace, ale rozdělení či spíše ovládnutí nik v něm. To je důležité především pro pochopení existence či neexistence hostitelské specializace. Významně působí skutečná parazitace či spíše výskyt dvou druhů hlístic v potenciálním hostiteli na hmyzího mrchožrouta.

Literatura jako podklad pro úvodní kapitoly práce pokrývá dostatečně přednesenou problematiku a i kvantitativně (což ovšem není rozhodující) představuje dobrý zdroj dalších informací.

Práce je psána stručně, čtivě i pro nespecialistu, a přitom profesionálně pro obor. Jako oponent bych měl povinnost hledat chyby či nesrovnalosti, nicméně při struktuře práce by to byl úkol hodně obtížný a v podstatě principiální až schválnostní. Proto se spíše zeptám na některé zajímavosti:

- zde pouze připomínka: publikované práce a celou problematiku prostupuje metodika. Možná, že by nebylo od věci v úvodní kapitole stručně metody charakterizovat.
- v práci autor naznačuje poměrně široké spektrum hostitelů při laboratorní infekci. Jak to vypadá v tomto ohledu v přírodě? Obecně půdní organizmy vynikají agregovanou distribucí. Může být korelována distribuce potenciálních hostitelů a hlístovek? Jak na tento fenomén reagují v práci zmíněné nematofágní houby?
- mezi obranné reakce hostitele patří kupříkladu zvýšená defekace (*Liriomyza*). jedná se o cílenou činnost či tento druh patří k častěji defekujícím. Jinak řečeno - jedná se to reakci na parazitaci či obecnou funkci.
- za další obranný mechanismus považuje autor mandibuly. Přesto hlístovky pronikají i ústním otvorem. Existuje na to nějaká taktika? Například rychlé vniknutí (u hlístic si ji nedovedu představit) či maskování se v jiné potravě?



- existuje i různá strategie invaze pro různé hostitele (pavouk x sekáč x střevlík x klíště)?

- v čem spočívá imunitní odezva hostitele, je celulární či biochemická?

- studovala se interakce mezi původní bakteriální mikroflórou hostitele a invazí asociovaných bakterií hlístovek do hostitele?

Výše zmíněné otázky představují spíše témata pro diskusi nespecialisty v entomopatogenech iniciovaná prací a šetřící mu čas pro studium specializované literatury.

Závěr: Předložená dizertační práce mgr. Vladimíra Půži dokládá autorovu dobrou orientaci v oboru včetně literatury, jeho zvládnutí příslušných technik na vysoké úrovni a schopnost vědecky nejen stanovovat hypotézy, ale z práce vlastní pak činit reálné závěry a výstupy pro základní, ale i aplikovaný výzkum bez zbytečných spekulací. Proto doporučuji předloženou práci jako podklad k získání titulu PhD dle platných předpisů.



prof. RNDr. Jaroslav Smrž, CSc.

oponent

Katedra zoologie PŘF UK Praha

Katedra biologie UKH Hradec Králové



**Oponentský posudek na dizertační práci Vladimíra Půži „Mezidruhová kompetice a hostitelské spektrum entomopatogenních hlístovek (Steinernematidae, Nematoda)“**

---

Předložená dizertační práce zpracovává tematiku entomopatogenních hlístovek, které jsou v dnešní době často používané v biologické ochraně rostlin. O kompetici jednotlivých druhů v přirozeném prostředí i za laboratorních podmínek není známo mnoho informací, proto práce shrnuje současné znalosti a přináší řadu nových údajů. Náplní práce jsou tedy mezidruhové rozdíly mezi hostiteli, kompetice a koexistence hlístovek v jednom hostiteli, vyhledávání hostitele (živého i mrtvého) a obranné mechanismy proti jiným organismům (jiným „scavengers“).

V dizertační práci je řada originálních výsledků, o jejich kvalitě svědčí také to, že publikované články již prošly recenzním řízením v kvalitních zahraničních časopisech (Journal of Invertebrate Pathology IF=2,0; Behavioural Processes IF=1,4). Zajímavé jsou zejména pokusy s živými a mrtvými hostiteli, kde se ukazují různé strategie hlístovek při hledání hostitele i význam imunitní odpovědi při rezistenci vůči hlístovkám u živého hmyzu. Obsáhle jsou rozepsány příklady hmyzích přirozených hostitelů včetně případů, kdy se jedná spíše o laboratorní modely (švábi i nejpoužívanější zavíječ voskový), škoda, že kvůli malému množství přirozených hostitelů nešlo stanovit rozdíly v mortalitě hostitelů při použití různých dávek hlístovek (studie 3). Originální výzkum se týká také mechanismů bránícím mrtvé hostitele od konzumace jinými „scavengery“. V diskuzních částech jsou navrženy zajímavé hypotézy, pro ověření některých z nich ale bude potřeba ještě shromáždit další experimentální data. Autor musel zvládnout řadu experimentálních metodik, jako jsou mikroskopie, sběr hlístovek pomocí pastí, laboratorní kultivace hlístovek a hostitelů, nákaza v laboratorních podmínkách, identifikace atd.

Dizertační práci tvoří obecný úvod a komentovaný soubor 3 publikací a 2 manuskriptů připravených pro publikaci. V úvodu o 7 stranách autor popisuje systematické zařazení, životní cyklus a jiné obecné charakteristiky hlístovek. Na závěr práce jsou shrnuty výsledky z publikací a manuskriptů na 3 stranách. Po formální stránce tato práce plně odpovídá standardům kladeným na doktorskou dizertační práci, metodiky jsou v publikacích dostatečně popsány, výsledky zřetelně prezentované a dokumentované originálními grafy a obrázky, text je velmi přehledný a naprosto srozumitelný, bez překlepů. Autor používal anglickou odbornou literaturu (66 citací pouze v úvodu, další literatura je uvedena u jednotlivých publikací).

K předkládané práci nemám zásadní námítky, následně uvádím jen drobné připomínky a několik dotazů:

- V úvodní části bych uvítal podrobnější informace o životním cyklu doplněné případně názornými schématy (viz např. Ehlers 2001, Burnell a Stock 2000) společně se zmínkou o specifickém typu rozmnožování pomocí tzv. „endotokia matricida“.
- V mém výtisku práce jsou prohozené studie 4 a 5.
- Byly již manuskripty uvedené v práci přijaty k publikaci v některém časopise?



- V práci mi chybí seznam publikací autora s uvedením také konferenčních příspěvků, teprve z autoreferátu k dizertační práci jsem se dozvěděl o 12 přednáškách nebo posterech, kde je V. Půža autor nebo spoluautor a také o dalších dvou publikacích (Nguyen, Půža, Mráček 2007; Půža, Mráček 2007), které v dizertační práci nebyly zmíněny.
- Hlístovky registrují látky vylučované potenciálním hostitelem a pohybují se po jejich gradientu (str. 2), je něco známo o jaké látce se jedná a jak je tomu u mrtvých hostitelů – jsou hlístovky schopné takto lokalizovat i mrtvý hmyz?
- U mrtvého hmyzu jsou jasně zvýhodněné hlístovky hledající aktivně hostitele („cruiser“), v přirozených podmínkách tedy např. *S. carpocapsae* jako zástupce opačné strategie („ambusher“) pravděpodobně mrtvý hmyz nenajde?
- Práce pojednává o mezidruhové kompetici hlístovek, jak je tomu ale z pohledu jejich symbiotických bakterií? Jedná se o nemato-bakteriální komplex, kdy nelze symbiotické organismy striktně oddělit. Jsou rozdíly pokud se použijí dva druhy hlístovek sdílející jeden druh bakterie a mezi dvěma druhy s různými druhy bakterií? Pokud se jedná o nákazu jednoho hostitele více hlístovkami současně, pravděpodobně převládne také jeden druh bakterie (produkci antibiotik) nebo bude v hostiteli směs několika druhů bakterií? Může dojít tímto způsobem k přirozené výměně symbiotických bakterií v následující generaci za jiné? Jak by vypadala kompetice axenických hlístovek, tj. s vyloučením vlivu symbiotických bakterií?
- Co se týká používání nepůvodních druhů v biologické ochraně rostlin, existují příklady zavlečení nepůvodních druhů s negativním efektem na původní druhy hlístovek? Stejně tak může nastat šíření nové kombinace hlístovka x bakterie v případě záměny symbiotických bakterií za nepůvodní druh (to probíhá cíleně v komerční sféře, kdy je možné získat účinnější kombinaci pro kontrolu hmyzích škůdců)?
- Jaký je vliv teploty – např. pokud jsou teplomilnější druhy znevýhodněny při nižších teplotách? Dojde potom k přednostnímu vývoji hlístovek s optimum blíže dané teplotě? Jsou výsledky dosažené v laboratoři srovnatelné s přirozeným prostředím s kolísáním teploty?

Dizertační práce Vladimíra Půži představuje rozsáhlou a metodicky i časově náročnou studii. Autor v ní dále dokazuje, že má velký přehled o literárních údajích a dovede své výsledky s těmito údaji srovnávat, kriticky je hodnotit a diskutovat. Předkládaná práce jednoznačně splňuje požadavky kladené na tento typ práce, proto ji **doporučuji ke schválení** jako jeden z předpokladů k udělení titulu Ph.D.



V Brně 19.11.2009

RNDr. Pavel Hyršl, Ph.D.



## OPONENTSKÝ POSUDEK NA DOKTORSKOU DISERTAČNÍ PRÁCI

**Název práce:** Mezidruhová kompetice a hostitelské spektrum entomopatogenních hlístovek (Steinernematidae, Nematoda)

**Autor:** Mgr. Vladimír Půža

**Oponent:** RNDr. Ladislav Háněl, CSc.

### **Formální stránka práce:**

Studie má jednu z možných forem předkládání doktorských disertačních prací. Skládá se z úvodní části a vymezení cílů práce, článků publikovaných v časopisech a rukopisů a ze shrnutí výsledků a závěrů. Práce je přehledně a logicky uspořádána s výjimkou přehození studií 4 a 5, po straně 46 tak následuje strana 56 a po straně 59 strana 47.

### **Věcná stránka práce:**

Disertace obsahuje řadu tématicky navazujících studií o výskytu, biologii a ekologii entomopatogenních hlístic se speciálním zaměřením na druhy *Steinernema affine* a *Steinernema kraussei*. U obou druhů hlístovek bylo zjištěno, že jsou schopny napadat široké spektrum hmyzích hostitelů. Některé skupiny hmyzu se ukázaly odolné proti infekci hlístovkami, které však byly schopné osídlit jejich mrtvá těla a následně se v nich množit. Zároveň byla zjištěna silná dominance *S. affine* nad *S. kraussei* při směsných infekcích hmyzích hostitelů. Oba druhy jsou však schopny koexistovat ve stejném ekosystému, kde *S. kraussei* je schopná vyhýbat se přímé kompetici se *S. affine*. Případná primární infekce hostitele druhem *S. kraussei* může usnadnit druhotnou infekci druhem *S. affine* a mrtvá těla napadených hmyzích hostitelů se jeví odpudivá pro případné mrchožrouty. Studie tak komplexním způsobem přispívá k poznání života dvou druhů hlístovek, které jsou přirozenými regulátory hmyzích populací. Výsledky mohou najít uplatnění při základním výzkumu jiných druhů hlístovek a při vývoji metod biologické kontroly hmyzích škůdců. Studie má ve svém základě dvě publikace, kde je dr. V. Půža prvním autorem, a jednu práci, kde je druhým autorem, v mezinárodně uznávaných časopisech. Lze předpokládat, že po některých úpravách budou podobně publikovány i manuskripty, kde je dr. V. Půža prvním autorem. Další dvě práce, které nejsou přímou součástí disertace, publikoval v Journal of Invertebrate Pathology. Zúčastnil se řady vědeckých konferencí v České republice a v zahraničí. Jeho celkovou vědeckou činnost při studiu entomopatogenních hlístic hodnotím jako velmi dobrou.

### **Poznámky k obsahu práce:**

Níže jsou uvedeny některá opomenutí spíše formálního rázu, která však nemají vliv na celkový věcný obsah práce. Dále je zde několik připomínek k manuskriptům, kde jsou některé nejasnosti a na které by nejspíše upozornila většina recenzentů posuzujících rukopisy zaslané do tisku.

- V anotaci aj. je zvykem podat vysvětlení použitých zkratk; zde uvést zkratku (EPN) za „entomopathogenic nematodes“.
- Str. 8 – 13, 35 – 39, 52 – 54 – někde jdou uvedeny celé názvy časopisů, jinde jejich zkratky.
- Ratana et al. (1991) na str. 7 nebo Retana et al. (1991) na str. 11?
- str. 10. – práce Kaya a Koppenhöfer (1996) je v seznamu literatury uvedena dvakrát, na str. 5 dole je Kaya a Koppenhöfer (1996) a na str. 6, třetí odstavec, je Kaya a Koppenhöfer



(1996b). Jde o citaci téže práce nebo o chybějící odkaz na (1996b) nebo záměna s Koppenhöfer a Kaya (1996b) na str. 10?

- Str. 10 – Práci Kaya a Stock (1997) jsem nenasel citovanou v textu.
- Str. 26 – 28 – Úvod podává přehled poznatků o souběžné infekci jednoho jedince hmyzího hostitele vícero druhy hlístovek. Většina recenzentu by nejspíše navrhla stručnější text, je zde několikanásobné opakování stejných citací k témuž tématu: Koppenhöfer a Kaya (1996a) čtyřikrát, Koppenhöfer et al. (1995) třikrát, Půža a Mráček (2009) třikrát.
- Str. 27, odstavec 3, str. 33, odstavec 2 a str. 38 – Peters (1995) nebo Peters (1996)?
- Str. 28 – Material and methods, Seasonal dynamics. Z textu není jednoznačně poznat kolik Petriho misek s půdou a housenkami bylo inkubováno ke každému odběrovému datu při dvou teplotách. Druhá věta druhého odstavce umožňuje také výklad, že 200 cm<sup>3</sup> půdy bylo rozděleno mezi vícero misek. Pokud šlo o dvě misky a rozumím-li věci správně, pak by bylo jednoznačnější napsat např.: Two Petri dishes were filled with 200 cm<sup>3</sup> of soil from each composite sample, one Petri dish was incubated at 15°C, the second one at 22°C. Potom by platilo  $n = 3$  pro každou vrstvu půdy v každém ze tří odběrů a dvou inkubačních teplotách. Jednoznačnost v počtu opakování je důležitá pro posouzení výpovědní hodnoty statistických testů. U testovacích statistik (v tomto případě  $F$ ; str. 30, 3. Results, Seasonal dynamics) je vhodné uvádět stupně volnosti a místo  $p < 0.00$  raději  $p < 0.01$  nebo  $p < 0.001$  pokud rozpor s nulovou hypotézou vyšel „velmi silně“ průkazný. Tutéž poznámku mám ke Studii 4. Byly nějaké rozdíly v produkci hlístovek závislé na inkubační teplotě? Obecně by bylo lépe mluvit např. o potenciální abundanci IJs v půdě nepřímo zjištěné pomocí galleriových pastí. Přímé odhady IJs lze učinit některou z metod pro studium volně žijících stádií hlístic.
- Str. 28, odstavec 4, řádek 6 – byli počítáni pouze dospělci? Na posledním řádku odstavce se píše o „abundance of EPNs per 1 square meter (ind.m<sup>-2</sup>)“. V kapitole 3. Results. Seasonal dynamics se potom píše o „IJs.m<sup>-2</sup>“, rozumím-li správně jde o „infective juveniles (ind.m<sup>-2</sup>)“ jak je psáno na vertikální ose Fig. 1 na str. 44. Zde by bylo dobré sjednotit terminologii používanou v kapitole Metodika s terminologií kapitoly Výsledky popř. vysvětlit, proč Fig. 1 na str. 44 udává „IJs“ a Fig. 2 na str. 45 „EPN“ (čemuž bych rozuměl dospělí + nedospělí jedinci).
- Str. 29, odstavec 3 – citace Lloyd (1967) a Campbell et al. (1996) chybí v References.
- Str. 34, odstavec 2 – citace Mráček a Sturhan (2000) chybí v References nebo je zde záměna se Sturhan a Mráček (2000).
- Str. 35, odstavec 1 – citace Koppenhöfer et al. (1996a) chybí v References. Wang et al. (2004) nebo Wang et al. (1994) v References?
- Str. 40 – V legendě k Table 1 se píše o „density“, ale není uvedeno k čemu se vztahuje. Na str. 29, kapitola „Host range“ třetí věta prvního odstavce uvádí „mean frequency less than 10 ind.m<sup>-2</sup>“. Jde tedy i v Table 1 o jedince na metr čtvereční? Pátý sloupec není „mean frequency“ ale zjevně „mean density“, tedy průměry řádkových hodnot sloupců 2, 3 a 4.
- Str. 42 – K Table 2 se píše „for Drosophilidae only 5 specimens...“ ale v buňce sloupce „mortality, S. k“ a řádku „Drosophilidae“ je „6 / 0“. To, že pro ostatní skupiny bylo použito 10 jedinců, lze vyčíst z textu, ale jednoznačnější by bylo třeba napsat „Ten specimens for each family and treatment were used except for Drosophilidae where only 5 specimens were available“. Proč je někde uváděna „0“, jinde „-“ a část sloupce „Nr. hosts, S. k“ je prázdná? – Podobně na str. 55 v Table 1.
- Str. 44. – v legendě k Fig. 1. je vhodné napsat co znamenají zkratky „S. k. a S. a.“ a nutné napsat co znamenají úsečky v grafu (SD, SE nebo CI ?).
- Str. 46. – Fig. 3 neznázorňuje „number of patches“ ale „percentage of patches“.



- Str. 47 – v nadpise vypadlo písmeno v „entomopatogenic“.
- Str. 48 a str. 53 – „Le Beck“ nebo „Lebeck“?
- Str. 49 – Statsoft Inc. (1995) je opomenuto v references.
- Str. 49, odstavec 4 – Zde se píše o pozorování vyvíjejících se hlístic přes kutikulu, ale podle mých zkušeností není kutikula larev Elateridae (drátovců) snadno průhledná. Z technického hlediska, používal se k tomu např. binokulár se silným spodním osvětlením nebo jiný způsob?
- Str. 55, Table 1 – Zde se uvádí „mean progeny production“. Předpokládám, že se jedná „mean progeny production per host individual“ stejně jako v Table 2 na str. 42. Ve výsledcích, str. 50, odstavec 1, se píše „higher percentages of hosts were infested in Eppendorf tubes“. Nabízí se tedy otázka, zda nebyl také rozdíl v „mean progeny production“; tabulka 1 podává pouze jedno číslo pro obě „arenas“ dohromady (totéž Table 2 na str. 42). Na str. 49, konec odstavce 4, se píše „The whole experiment had two replicates“ – Table 1 tedy zahrnuje výsledky z obou?
- Summary of Ph.D. thesis: V přepisu abstraktu 2 jsou některé názvy druhů psány kurzívou, jiné nikoliv, plus drobné tiskové chyby jinde. V oddílu References měly být latinské názvy druhů a rodů kurzívou a práci Poinar a Leutenegger (1968) jsem nenalezl citovanou v textu.

#### ZÁVĚR:

Podle mého úsudku předložená doktorská disertační práce splňuje náležitosti být podkladem k udělení vědecké hodnosti Ph.D.

V Českých Budějovicích  
18. 11. 2009

RNDr. Ladislav Háněl, CSc.  
Ústav půdní biologie  
Biologické centrum AV ČR, v.v.i.  
České Budějovice