

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci

Kristýna Štefková: **Proteolytické enzymy středního střeva diapauzních a aktivních dospělců lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*).**

Oponent: Vladimír Košťál
Biologické centrum AV ČR, Entomologický ústav a
Jihočeská Univerzita v Č.B., Přírodovědecká fakulta

Formální stránka:

Rozsah předložené diplomové práce je standardní. Bohužel, většina ostatních formálních parametrů práce značně zaostává za věcným obsahem a tím, zbytečně, znehodnocuje vynaložené úsilí studentky. Práce působí dojmem předběžné verze, která ještě neprošla několika nutnými koly korektur. Nebudu uvádět seznam drobností, který zabírá 8 stránek mých poznámek, a který proberu osobně se studentkou a se školitelem. Omezím se na několik obecných výtek:

- 1) Čtenář nemá být postaven do role detektiva a nemá v textu hledat, nemá si domýšlet významy vět, nemá luštit rébusy tabulek a obrázků.
- 2) Volba použitých termínů, slovních obrátů a stylu není místy šťastná, jinde je až zavádějící.
- 3) Číslování kapitol a názvy kapitol nejsou vždy logicky a výstižně zvoleny.
- 4) Grafická úprava není bez chyb. Například není vhodné zařadit ihned po nadpisu kapitoly obrázků.
- 5) Několik obrázků je členěno do panelů A, B, C. Ty však nejsou označeny (což někdy čtenář vyluští, jindy ale, např. u obrázku č. 3, jen se značnými obtížemi až po studiu textu).
- 6) Prezentace dat není přehledná, jednoznačná. Např. v popisku k obrázku č. 5 se uvádí, že se jedná o sběr brouků ze srpna. Z tabulek a textu je však jasné, že šlo o sběr v říjnu. Tato informace je ovšem zcela klíčová pro hodnocení výsledků. Doprovodný graf teplot je v příloze (ta je o 15 stran dále v textu) a ukazuje teploty od října do března – přičemž pro pokus jsou relevantní jen teploty od října do ledna.
- 7) V práci je také nemalý počet gramatických chyb, překlepů a dokonce i pozůstatků pracovních poznámek.

Celkově je pro mě formální stránka práce zklamáním.

Věcná stránka:

Po věcné stránce práce přináší velmi zajímavé výsledky, i když se většinou jedná o údaje pouze předběžné, které potřebují důkladnou verifikaci a rozpracování. Následuje rozbor po kapitolách:

Úvod má dvě poměrně zdařilé sekce o morfologii a vývojovém cyklu lýkožrouta. Sekce o přezimování a diapauze je již znatelně slabší (ačkoli se jedná o centrální téma práce). Chybí hlubší a podrobnější analýza současných znalostí založená na relevantních přehledových pracích, popřípadě knihách z příslušného oboru. Sekce Vývojový a rozmnožovací potenciál je velmi chaotická. Množství teplotních dat je uváděno bez logického sledu a bez pokusu o uspořádání. Sekce "Fyziologie trávení ..." je věcně více-méně v pořádku. Ovšem navrhuji opět studovat současné přehledové práce: např. klíčové review od autorů

Terra & Ferreira (1994) je k dispozici v nové, přepracované verzi z roku 2005. Chybí údaje u amylázách. Poslední dvě sekce, tedy "Přirozená obrana ..." a zvláště pak "Ochrana", jsou jen velmi zhruba nahozené. Působí velmi nedokončeně a nedostatečně.

Cíle práce byly stanoveny zajímavě a přitom splnitelně.

Metodika strádá slabou formální kvalitou textu. Od logického uspořádání textu až po četné detaily. Nicméně lze obecně konstatovat, že zvolené metodické přístupy byly správné a odpovídající stanoveným cílům a předběžnému charakteru celé studie. Mám několik připomínek:

- 1) Skladování celých brouků pro budoucí analýzy v -18°C se mi nejeví jako optimální. Bylo by lepší zvolit buď nižší teplotu (-80°C), nebo, ještě lépe, vypitvat cílové orgány, homogenizovat je v příslušném pufru, přidat stabilizátor proteinů (glycerol, sacharózu, BSA, apod.) a poté skladovat při -80°C . Jde o to zabránit případné degradaci a denaturaci studovaných enzymů.
- 2) Použití brouků z feromonových lapačů pro následné analýzy. Šlo o brouky živé, či mrtvé? Pokud byli mrtví, je opět velmi pravděpodobný vliv degradace vzorku.
- 3) Je třeba uvádět složení jednotlivých pufrů (např. Ringerova roztoku nebo roztoku podle Brittona & Robinsona). Je třeba uvádět chemickou identitu použitých látek a výrobce (nejen např. označení E-64).
- 4) Testování celkové proteolytické aktivity ve středním střevě bylo provedeno v rozmezí pH 5 až 11. Možná by stálo za to rozšířit měření i do oblasti $\text{pH} < 5$, protože celá třída kyselých aspartátových proteináz má pH optimum právě tam. (Ačkoli je zřejmé, že pH středního střeva je spíše neutrální až mírně alkalické).
- 5) Aktivita některých trávicích enzymů, konkrétně amyláz, by mohla být vyšší v předních oddílech střeva (slinné žlázy).
- 6) Extrakce "fenolů" pomocí 50% metanolu patrně není specifická pouze pro fenolické látky. Do extraktu se jistě dostane celá škála jiných látek. Nejvýznamějšími obrannými látkami smrku jsou asi resiny obsahující směs terpenoidů (α a β pinen, limonen, myrcen a další). Lze je snadno například přimíchávat do umělé diety.
- 7) Brouci i larvy se mohou do značné míry živit hyfami dřevokazných hub. To by například mohlo vysvětlovat, proč přidavek samotného lýka do agarové diety nevyvolává proteolytickou aktivitu střeva. Střevo může "čekat" až na přísun proteinů z hub.
- 8) Ve studii je srovnáváno velké množství pokusných variant: 4 lokality; různá data odběru; brouci z lapačů, lapáků a z chovu; světlí a tmaví brouci; s plným a prázdným střevem; slunce a stín, 4 umělé diety, extrakty "fenolů", atd. Obecně platí, že méně je někdy více. Kritická selekce dat, které si již "zaslouží" prezentaci a naopak odfiltrování dat, která jsou ještě velmi neúplná, by asi práci prospělo.
- 9) Použité inhibitory proteináz byly: (a) pepstatin – ten je účinný zejména proti kyselým aspartátovým proteinázám, jejichž aktivita nebyla v práci podchycena ($\text{pH} > 5$); (b) E-64 – účinný zejména proti cysteinovým proteinázám s pH optimum 5 – 7 (v pořádku); (c) chybí použití vhodného inhibitoru serinových proteináz s pH optimum > 7 , kde právě bylo nalezeno maximum celkové proteinázové aktivity.

Výsledky jsou, přes všechnu chaotičnost jejich prezentace, zajímavé a označil bych je dokonce za velmi nové, přínosné a cenné, i když zatím jen velmi předběžné.

- 1) Hned úvodní sekce slibuje popis změn během roku (ponechám stranou, že jde o změny pouze během chladné sezóny). Obrázek č. 1 však nabízí údaje pouze z jediného odběrového data, 23. září. Slíbené výsledky jsou uvedeny, asi (?), v Tabulce č. 3.

Tabulka je však až neúnosně nepřehledná. Data jsou uvedena pouze zvýrazněním textu, bez jakýchkoli číselných hodnot.

- 2) pH optimum proteinázové aktivity zjištěné azokaseinovou metodou je relativně vysoké (pH ~ 11). Při použití specifických substrátů se však neaktivnější složkou koktejlu jeví aminopeptidázy s pH optimem pH ~ 6 – 9. Zde se nabízí celkem jednoduchá možnost dalšího testování aktivity aminopeptidáz (metalloproteináz) pomocí chelačních činidel jako je např. EDTA.
- 3) Testování pepstatinu v rozmezí pH 9 – 11 se zdá být metodicky nejasné, když ten má inhibovat hlavně kyselé proteinázy. Neúčinnost E-64 (proti cysteinovým proteinázám) poukazuje na přítomnost zejména serinových proteináz (trypsin, chymotrypsin, apod.).
- 4) Hodnocení celulázové aktivity by bylo zajímavé také u diapauzních brouků, kteří přijímají potravu, posunují ji střevem, ale není jasné CO tráví, když proteinázová aktivita je neměřitelná.
- 5) Výsledky vývoje lýkožroutů za nízkých teplot jsou velmi cenné, ačkoli chybně prezentované (obr. č. 5).

Diskuse se nese v duchu celé práce. Bohužel tedy není příliš dobře uspořádaná. Podle mého soudu jde o souhru dvou faktorů, které se klíčově podepisují na celkovém vyznění práce:

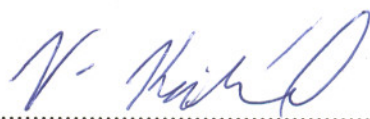
- 1) chabá formální struktura, viditelně zapříčiněná ne snad neznalostí, ale spíše nedostatkem času a trpělivosti při přípravě práce;
- 2) relativně velké množství získaných dat, jež objektivně není lehké uspořádat.

Celkové zhodnocení:

Zatímco výše uvedený fakt č. 1) je jasnou výtkou, fakt č. 2) je jasným kladným argumentem pro celkové hodnocení. Považuji za důležité, že práce ukazuje zimní období jako velmi významné pro pochopení celkové populační dynamiky lýkožrouta smrkového. Nedospělá stádia se evidentně vyvíjejí i za nízkých teplot, s prahem kolem 5°C. Koncem prosince nebo dokonce až v lednu tak může být paradoxně "dokončena" tzv. neúplná 2. generace brouků. Je pravděpodobné, že nedospělá stádia mohou také přežít celou zimu a dokončit vývoj až na jaře. Samotná imaginální diapauza se jeví jako metabolicky aktivní stav, kdy brouci přijímají potravu, posunují ji střevem, ale není dosud zřejmé, které živiny tráví. Studium proteinázové aktivity bylo touto prací poměrně dobře započato. Amylázy nebyly ve středním střevě detekovány. Aktivita celuláz byla prozatím pouze předběžně potvrzena. Další enzymy, zejména chitinázy pro trávení houbových pletiv, by mohly být ještě přidruženy do plánu. Podstatné je, že během diapauzy je zastaven vývoj gonád, který pokračuje až po jarním úživném žíru a výletu brouků.

Po pečlivém posouzení doporučuji přijmout předloženou diplomovou práci jako podklad pro obhajobu a výslednou známku doporučuji zvážit až podle úrovně prezentace a po zodpovězení připomínek uvedených v této recenzi.

V Českých Budějovicích
dne 14. května 2010



.....
Vladimír Košťál

Posudek magisterské diplomové práce Bc. Kristýny Štefkové:

"Proteolytické enzymy středního střeva diapauzních a aktivních dospělců lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*)".

Vedoucí práce: RNDr. Petr Doležal, Ph.D.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta

Studentka se ve své práci zaměřila na řešení otázek proteolytické aktivity lýkožrouta smrkového, a to ve vztahu ke složení potravy, obranných reakcí napadeného hostitele a vývojového cyklu samotného lýkožrouta. Samostatná část řešení byla věnována také určení teplotního vývojového prahu lýkožrouta smrkového.

Práce je členěna do jednotlivých kapitol, přičemž je dodrženo obvyklé členění vědecké studie. V úvodu jsou popsány základní charakteristiky způsobu života l. smrkového, včetně naznačení studované problematiky proteolytické aktivity a vztahu patogen – hostitel. Rovněž je zde v krátkosti zmíněn i způsob ochrany lesa před lýkožroutem smrkovým.

Cíle práce jsou jasně definovány a logicky stanoveny k zodpovězení studovaného tématu.

Metodika podrobně osvětluje zvolené postupy při řešení jednotlivých otázek.

Ve výsledcích jsou graficky zpracována naměřená data, s uvedením logických závislostí a závěrů z nich vyplývajících. Tyto jsou pak hodnoceny v diskuzi. Význam studované problematiky, případně i přínos pro využití v praxi, je stručně naznačen v závěru práce.

K práci mám následující konkrétní připomínky:

Členěním předkládané magisterské diplomové práce na jednotlivé kapitoly tato splňuje obvyklé členění vědeckých prací. Nicméně v samotném úvodu (první odstavec úvodu) by měla být zmínka o naléhavosti či důvodu zvoleného tématu práce. Ve větě: „Při silném přemnožení však brouci osidlují i zdravé dřeviny ...“ by mělo být použito „stromy“ namísto „dřeviny“. Na straně 7 je problematicky uvedeno, že chodby požerku l. smrkového jsou umístěny „vertikálně“. Vhodnější termín je „podélně s osou kmene“, neboť brouci zakládají požerky i na zlomech, vývratech, pokáceném dříví apod. Níže je uvedeno, že požerek má hvězdovitý tvar a obvykle je dvouramenný. Za hvězdovitý požerek jsou označovány požerky s rozbíhajícími se matečnými chodbami na všechny strany (hvězdovitě), jako je tomu např. u lýkožrouta lesklého (*Pityogenes chalcographus*), u l. smrkového je přílehlavější označení „požerek podélný“ (vzhledem k ose kmene). Většinou tento požerek bývá třiramenný. Na straně 10 na konci (oddíl 1.5.1) by bylo vhodnější místo termínu „zvířat“ použít „živočichů“. Poslední část úvodu, 1.7 Ochrana, je silně redukována, a zdaleka tak neodpovídá ani praxi, ani teoretickým předpokladům úspěšné ochrany lesních smrkových porostů před lýkožroutem smrkovým. V tomto smyslu je začlenění této části do úvodu práce nadbytečné, jinak je potřeba se podrobněji seznámit s lesnickou problematikou a více využít lesnickou literaturu, např. autorů V. Zumr, P. Zahradník a dalších. U některých konstatování chybí odkazy na literaturu, např. v již zmíněné části 1.7. Nadpisy jednotlivých částí úvodu by měly zřetelněji vyjadřovat, o čem se v nich jedná, např. namísto „morfologie“ použít „morfologie lýkožrouta smrkového“ apod.

Části metodiky by měly být logicky seřazeny vzhledem k posloupnosti vytčených cílů práce, stejně tak i zpracování výsledků. Ve zvoleném uspořádání musí čtenář složitě hledat výsledky k jednotlivým cílům. Rovněž by bylo vhodnější, aby místo termínu „assay“ byl používán v tomto typu práce např. termín „test“, nebo „metoda“, nebo jiný vhodný český ekvivalentní výraz.

V kapitole 3.1 je uvedeno, že „u přeživších brouků bylo pitvou určeno stáří brouků“. K tomuto bodu jsem nenašel žádný komentář ve výsledcích.

V kap. 3.2 je uvedeno: „Odběr byl prováděn od srpna do března z lapáků a feromonových lapačů.“ (obdobně také v kap. 4.1). Tomuto konstatování je možno porozumět až po shlednutí výsledků, např. tab. 3. Zde by bylo jistě zapotřebí podrobnější vysvětlení v metodice, neboť přes zimu se ani lapače, ani lapáky nepoužívají, l. smrkový prostě v této době nelétá. Rovněž konstatování „v okolí Národního parku Šumava“ je zavádějící, když brouci byli odebíráni i přímo v národním parku.

Ve výsledcích v kap. 4.1 - obr. 1, 4.3 - obr. 2, 4.6 – obr. 3 chybí u grafů označení typu A, B, C, byť je toto použito v legendě. V práci by měly být užívány termíny jednotně, např. floém *versus* lýko (kap. 4.2). V kap. 4.8 jsem neshledal souvislost mezi obr. 4 – graf C a tab. 4 C, zejména pro sloupce 2, 6 a 12 týdnů.

Při vytváření seznamu literatury je třeba dbát na jednotnost způsobu citací, zejména u citací knižních publikací, kde často chybí rozsah stran, nebo je tento uveden na jiném místě apod.

V práci se vyskytuje celá řada překlepů a nejasností textu, ať už jednoduššího typu, jako čárky, tečky apod., ale i zavádějících, jako např. na str. 8 ve větě „Stádium kukly zahrnuje asi 60 % celého preimaginálního vývoje, stádium vajíčka a kukly po 20 %“. Zřejmě by měla věta znít „Stádium larvy zahrnuje asi 60 %“. Obdobně ve větě na str. 9: „Annala (1969)již při teplotě 5°C pozoroval přijímání teploty.“, by spíše mělo být „potravu“ na konci věty. Náhodně byla zjištěna špatná citace použité literatury v textu – viz str. 34, kap. 5.1 (Hahn (2007)). Jinak z přehledu literatury a jejího zpracování v textu je zřejmé, že studentka využila nejenom nejmodernějších poznatků z oboru, ale rovněž i historických pramenů a údajů; nejstarší citovaná literatura je datována již v druhé polovině 19. století.

V celé práci je třeba jednotně psát číselné údaje a jednotky, za číslem má být vždy mezera.

Závěr:

Výše uvedené nedostatky, nebo upozornění, se týkají ve většině případů formálních nedostatků práce, a to zejména při jejím písemném zpracování. Naopak, z výsledků jednotlivých šetření jednoznačně vyplývá značný objem vykonané laboratorní i terénní práce, výsledky jsou přehledně, stručně a jasně zobrazeny, vyhodnoceny a komentovány. Zjištění jsou v mnoha ohledech nová, originální a při pokračování výzkumu na dané téma mohou být velkým přínosem nejen v základním výzkumu, ale i v praktické ochraně lesa smrkových porostů před napadením lýkožroutem smrkovým. Mnohá zjištění jednoznačně a na základě standardních výzkumných metod dokládají, i když prozatím jen v počátcích (zmíněná naléhavost pokračování výzkumu), odvěké pravdy či spíše praktické zkušenosti, ke kterým často chybí vědecké podklady. V ochraně smrkových porostů před lýkožroutem smrkovým je jarní období a ochranná opatření v době prvního rojení lýkožrouta zcela zásadní. Základní poznatky o fyziologickém stavu l. smrkového během zimního období a zejména na jaře mohou mít zcela zásadní vliv na uplatňování obranných opatření, potažmo tedy i na ekonomickou stránku ochrany lesa. Uchazečka splnila zadané cíle, ukázala dovednost při teoretickém i praktickém pořizování a zpracování výsledků a splnila tak studijní a výzkumné předpoklady. Přes početné formální nedostatky zpracování hodnotím práci kladně, a vzhledem k rozsahu a kvalitě vlastní laboratorní a terénní práce doporučuji magisterskou diplomovou práci k obhájení.

Ve Strnadlech dne 21. 5. 2010

Ing. Miloš Knížek, Ph.D.

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v.v.i

Strnady 136

252 02 Jíloviště