



BIOLOGY CENTRE ASCR, v. v. i.

Institute of Entomology

address: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

phone: +420 387 775 211

fax: +420 385 310 354

www.entu.cas.cz

IBAN: CZ24 0800 0000 0000 0606 3942

SWIFT: GIBACZPX

e-mail: entu@entu.cas.cz

VAT No. CZ60077344

Review of PhD Thesis: "Energy metabolism and enzymatic activity in the *Ips typographus* in relation to diapause" by Kristýna Štefková

General Thoughts:

This Thesis represents a solid piece of work on two topics that are linked by insect model, the spruce bark beetle, *Ips typographus* and by focusing on overwintering period. Firstly, development of immature stages of the bark beetle during overwintering period is studied. Secondly, basic description of digestive enzymatic capacity in the gut of bark beetle, with particular emphasis on digestion of cellulose, is presented.

The part on overwintering of immature stages was published in the European Journal of Entomology. The studies on enzymatic activities are summarised in two manuscripts, one submitted to the Journal of Insect Science, and second one prepared for submission. The number and quality of publication outputs is sufficient according to standards in the Faculty of Science, University of South Bohemia.

Strengths:

The Thesis is standardly organized and graphically well designed. The text flows logically, the Thesis is written in relatively good English. The amount of typos and other small errors is acceptably low. The experimental part was conducted carefully, the methods are sufficiently described in individual manuscripts, the results are statistically treated and interpreted correctly. The quality of research is approved by publication in EJE and two other manuscripts are, to my opinion, also meeting the publication standards in impacted journals in the field of general and applied entomology.

Three most valuable contributions to the research field of bark beetle biology are:

1. Clarification of long-debated question on overwintering of immature stages of *Ips typographus*.
2. Solid basic description of seasonal changes in digestive capacity in the bark beetle gut.
3. Preliminary analysis of cellulase activity in the foregut of *Ips typographus*.

Weaknesses:

The chapter of Introduction is, at most of its parts, too superficial. Most topics are only sketched. The text provides only basic information not exceeding the level of detail in general textbooks. For instance:

2.1. Biology: Of the whole biology of bark beetles, only voltinism and mass outbreaks are briefly mentioned. Information on other bark beetle species is completely missing. What is the position of *Ips typographus* in its taxonomic family, or in the guild of sapro-xylophagous beetles? Life cycle and basic ecology should be at least schematically outlined.

2.2. Energy metabolism during hibernation: Given that this is the main topic of the Thesis, this sub-chapter is weak (1page). While general definition of diapause is provided, no details on diapause in *Ips typographus* are mentioned. The information content of this part is reduced to the facts that spruce bark beetles probably feed during overwintering and that the major energy depots are accumulated in the form of lipids, glycogen and



BIOLOGY CENTRE ASCR, v. v. i.

Institute of Entomology

address: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

phone: +420 387 775 211 fax: +420 385 310 354

www.entu.cas.cz

IBAN: CZ24 0800 0000 0000 0606 3942

SWIFT: GIBACZPX

e-mail: entu@entu.cas.cz

VAT No. CZ60077344

proteins ...

2.3. Effects of temperature: It should be more clearly specified: 'effects on what'? Otherwise, the topic is too broad. Climatic changes are mentioned, but no clear relation to the Thesis is presented. Yes, study on overwintering of immature stages can influence our thinking on impacts of climate change on bark beetle populations. But ideas and hypotheses are missing. Further, no presentation of the temperature effects on the rate of physiological process, including energy spending, enzymatic activities or breakdown of major nutrients, is given.

2.4. Development of *Ips typographus*: The text is reduced on brief discussion of LDT and heat summation and, again, providing only very basic information without discussing different approaches, mathematical models, including the available complex models developed specifically for phenology of *Ips typographus* (such as PHENIPS).

2.5. Functional morphology of the alimentary canal is only sketched. Basic division to foregut, midgut and hindgut is provided ...

2.6. Biochemistry of digestion: This part is probably best managed of the whole Introduction. The enzymes are classified to major functional groups, substrate specificity is briefly characterized, and current knowledge in bark beetles on each functional group is mentioned.

Aims and scope are formulated descriptively (describing the parts of the Thesis). The author could take the opportunity and try finding a single, strong and unifying topic for the whole Thesis. For instance: What role the winter feeding and food digestion may have on overwintering survival and population dynamics of *Ips typographus* in the light of climate change?

Discussion Questions:

Chapter II.

Paper in EJE:

1. Your data indicate that larvae and pupae continue feeding and development (metamorphosis) during autumn and winter months. Decreasing numbers of immature stages over time, however, may be explained either as proceeding to adult stage (the explanation you seem to prefer) or mortality. How did you differ between the two possible explanations?
2. Initial numbers of individuals, as well as proportions of different ontogenetic stages, per dm², did vary considerably (compare Figs. 1 and 2 in the paper). Moreover, initial numbers were unknown, which limits the precision of results. Nevertheless, I agree that your data suggest that at least some part of immatures can develop to adults during winter. You specify this part as 'significant' in the Abstract. Your Figs. 1a) and 2a), however, seem to suggest that the winter development might be restricted to permissive situations only: high temperature (10°C) and/or sunny stands.

Chapter III.

Submitted to JIS:

3. Did you separate gut walls and gut contents in your dissections?



BIOLOGY CENTRE ASCR, v. v. i.

Institute of Entomology

address: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

phone: +420 387 775 211 fax: +420 385 310 354

www.entu.cas.cz

e-mail: entu@entu.cas.cz

IBAN: CZ24 0800 0000 0000 0606 3942

SWIFT: GIBACZPX

VAT No. CZ60077344

4. In the Introduction, the cellulases are presented as a complex of several activities. Which particular activity of this complex was analyzed using the commercial kit? Can you briefly outline the biochemical principle of this kit (substrates, analyzed products)?
5. Highest cellulase activity was detected in the foregut. Could't this be because some exogenous (fungal?) cellulases are ingested together with the food and, later, 'killed' by protein digestion in the midgut?
6. What exactly leads you to propose that the cellulase activity is endogenous in *Ips typographus*?

Chapter IV.

Manuscript:

7. This is really solid piece of work. Good basic description. Just one question: relating seasonal patterns of enzymatic activity to calendar time is not very informative. Could you possibly add into the graphs the bark beetle generations? Why there is a systematic decrease seen in all activities during summer (June and July)?

Conclusion:

I recommend this Thesis as good quality basis for awarding the PhD degree to Kristýna Štefková.

In České Budějovice, 25 May 2017

prof. Ing. Vladimír Košťál, CSc.
Biology Centre CAS, Institute of Entomology

Posudok dizertačnej práce.

Názov práce: Energy metabolism and enzymatic activity in the *Ips typographus* in relation to diapause.

Autor: Mgr. et Mgr. Kristýna Štefková

Školiteľ: RNDr. Petr Doležal, Ph.D.

Pracovisko školiteľa: School of Doctoral Studies in Biological Sciences, University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Science

Aktuálnosť zvolenej témy:

V súvislosti s rozpadom smrekových ekosystémov je výskum biológie lykožrúta smrekového veľmi aktuálny. Vzhľadom na náročnosť je výskum metabolizmu a enzymatickej aktivity tohto druhu pomerne vzácny. Získané poznatky sú nové. V súvislosti s výskumom dopadov klimatických zmien je výskum biológie prezimovania zvlášť dôležitý.

Metódy spracovania:

Použité metódy výskumu a použité štatistické metódy zodpovedajú cieľom dizertačnej práce a stavu poznania v danej vednej oblasti.

Dosiahnuté výsledky:

Dosiahnuté výsledky zodpovedajú cieľom dizertačnej práce.

Splnenie cieľa:

Dizertačná práca splnila predložené ciele.

Prínos výsledkov práce pre rozvoj vedy a možnosti ich využitia:

Vzhľadom k mojej odbornej špecializácii sa k práci vyjadrujem z hľadiska lesníckej entomológie a ochrany lesa. Hlavným prínosom práce je výrazné rozšírenie poznatkov o prezimovaní lykožrúta smrekového. Tieto poznatky sú dôležité pre výskum dopadov klimatických zmien, ako aj pre praktickú ochranu lesa. Výsledky z výskumu metabolizmu majú tiež potenciál na využitie v ochrane lesa. Získané výsledky sú nové a predstavujú významný prínos pre základný výskum aj pre praktické aplikácie.

Pripomienky a otázky:

- 1) **Strana 29 (Kapitola II):** V práci sa uvádza použitie sekcií smreka na výskum vývoja lykožrúta. Boli použité sekcie ošetrené proti vysychaniu? Napríklad voskom (parafínom) na reze?
- 2) **Strana 29 - 31 (Kapitola II):** Prečo sa na terénne overenie použili podmienky len okolí Českých Budějovic? Možno by bolo zaujímavé urobiť výškový transekt.

- 3) **Kapitoly III a IV:** Aký má vzťah uvedený výskum metabolizmu k výskumu anti-feedantov pre lykožrúta smrekového?
- 4) **Strana 70 (Kapitola V, odporúčanie I) :** Z hľadiska ochrany lesa je dôležitá hlavne ťažba a asanácia čerstvo napadnutých stromov v mesiacoch máj až september. Čerstvo napadnuté stromy sa dajú relatívne ľahko asanovať. Pri ťažbe v zime, dochádza často k opadávaní kôry, v ktorej sú lykožrúty. Asanácia je viac menej nemožná. Z toho dôvodu je dôležité sústrediť ťažbu napadnutých stromov do mesiacov máj až október. Podľa mojich poznatkov sa v lesníckej praxi odstraňujú všetky napadnuté stromy, nezávisle od zimujúceho vývojového štádia lykožrúta.

Záverečné zhodnotenie práce:

Celkovo možno konštatovať, že práca je kvalitne spracovaná. Získané výsledky sú nové a veľmi hodnotné. Na základe predloženej práce navrhujem udelenie akademického titulu Ph.D.

Vo Zvolene 19.6.2017

Ing. Rastislav Jakuš, Ph.D.



Oponentský posudek disertační práce Mgr. et. Mgr. Kristýny Štefkové:

„Energy metabolism and enzymatic activity in the *Ips typographus* in relation to diapause“

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

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Katedra Fyziologie živočichů

Uchazečka se ve své práci zaměřila na řešení dvou významných otázek spojených s fyziologií lýkožrouta smrkového, a to na základě studia jeho přežívání a vývoje při zimních teplotách v laboratorních a terénních podmínkách, a enzymatické aktivity při trávení – pochodech při trávení v jednotlivých částech trávicího traktu, identifikaci a lokalizaci trávicích enzymů a měření enzymatické aktivity v průběhu celého roku v porovnání se sezónním chováním. Kromě úvodních kapitol je předložená práce zpracována ve formě sestavy tří publikací, z čehož první práce ve formě již publikovaného příspěvku v *European Journal of Entomology* a další dva příspěvky ve formě připraveného rukopisu. Také z tohoto důvodu je celá práce předkládána v anglickém jazyce. Ve všech případech byly získané výsledky konfrontovány s dosud publikovanými výsledky a jsou zvýrazněna nová vlastní zjištění. V jednotlivých kapitolách nechybí ani příměr k dosud používané praxi a nástin případného možného praktického využití nových poznatků.

Předložená práce je logicky rozčleněna do jednotlivých oddílů, postupně, stručně ale přehledně uvádějících celou šíři studované problematiky. Je dodrženo obvyklé členění vědecké studie. Cíle a zaměření práce jsou jasně definovány a logicky stanoveny. V úvodních kapitolách je zhodnocen současný stav poznání řešené problematiky. Metodika je podrobně osvětlena vždy v jednotlivých časopiseckých příspěvcích. Díky formě předkládané práce jsou výsledky jednotlivých oddílů vždy vhodně konzultovány a srovnávány s publikovanými výsledky jiných autorů, čímž dostáváme ucelený současný obraz stavu zjištění dané problematiky. Celkové zhodnocení studie je stručně uvedeno v závěru práce, i s určitou mírou generalizace výsledků.

K práci mám následující konkrétní připomínky (pro přehlednost zpracováno v bodech podle jednotlivých kapitol (oddílů), případně stránek), u kterých bych uvítal vyjádření uchazečky:

1.1

- Konstatování o přemnožení l. smrkového ve smyslu rozdělení Česka na jižní a severní část je poněkud překvapující a neobvyklé, zejména pak evidujeme-li již řadu posledních let výrazný rozdíl mezi přemnožením tohoto druhu (obecně kůrovců na smrku) ve východní části, na Moravě a ve Slezsku, oproti západní části, Čechám. Zajisté existují i rozdíly v rámci Čech, ale podstatně méně výrazné, uvedené rozdělení patrně pochází z dlouhodobě složité a zpolitizované situace v Národním parku Šumava.

1.3

- V první větě je uvedena možnost zimování „všech vývojových stadií“ l. smrkového. Nejsem si vědom, že by některý z autorů uváděl možnost přezimování vajíček. V pozdějším textu, např. na str. 18, je tato skutečnost již uváděna správně. Zde bych rád zdůraznil, že způsob přezimování ve stadiu larvy, kukly a dospělce, tedy i dvou preimaginálních stadií, není nový poznatek získaný během studia, ale potvrzení již známé skutečnosti. Tato fakta byla publikována například již v práci Pfeffera – *Fauna ČSR – Kůrovci* (1955), nebo v pozdější době také např. v knižní publikaci Švestka, Hochmut, Jančařík – *Praktické metody v ochraně lesa* (1996) a rovněž

v metodických pokynech pro lesnickou praxi – letácích LOS (Lesní ochranné služby). Je však pravdou, že v předkládané práci jsou tato fakta doložena konkrétním zhodnocením získaných dat.

2.

- Zde bych rád vyzdvihl výborné zpracování všech částí oddílu 2. Je málo autorů, kteří dokáží tak stručně a přitom výstižně postihnout nejzákladnější fakta daného tématu

2.6

- Zvolený odkaz „1“ na poznámku pod čarou není v textu dostatečně nápadný, vypadá spíše jako překlep, bylo by vhodnější použít např. typ horního indexu.

Chapter II, poslední odstavec publikovaného článku (strana 32)

- Rozhodně lze polemizovat s tvrzením, že v současné lesnické praxi v ochraně lesa nejsou aktivní kůrovcové stromy v zimním období považovány za nebezpečné pro další období. Postupy v ochraně lesa jednoznačně ukládají povinnost zpracovat kůrovci napadené stromy do konce března, jinými slovy, po konci března by se v lesích neměly vyskytovat žádné aktivní kůrovcové stromy, právě z důvodu výletu nové generace brouků z takto napadených stromů. Tato skutečnost vyplývá z dat stanovení kalamitního základu pro následující období, tedy období od 1. 8. do 31. 3. Dokončování vývoje I. smrkového pod kůrou v zimním období je také lesníkům známo, nicméně překvapivá jsou nová zjištění vývoje i za velmi nízkých teplot, i při 0 °C. Rovněž zde platí obdobné konstatování jako u bodu 1.3 výše, že tato fakta jsou doložena konkrétním zhodnocením získaných dat v předkládané práci.

Celkově

- Není zřejmé, zda uvedení grafů bez zvýrazněných os v celé předkládané práci bylo úmyslem. Pro lepší přehlednost by bylo vhodné osy doplnit.
- Rovněž není zřejmé, zda formát citací literatury byl dán, např. uvedení zkratk křestních jmen bez teček se jeví jako neobvyklé. Nicméně tento formát, stejně jako předcházející, bude patrně vycházet z pravidel pro formát ve zvolených časopisech pro publikování výsledků.

Závěr:

Velice kladně hodnotím nové poznatky v obou hlavních částech předkládané práce, jako jsou překvapivá zjištění možného vývoje I. smrkového i za velmi nízkých teplot a v oblasti enzymatické aktivity při trávení, zejména pak indikaci existence schopnosti I. smrkového trávit celulózu. Rozšiřuje se tak významně náhled do způsobu života těchto titěrných tvorečků, kteří však již dokázali nadělat vrásky bezpočtu generací nejen lesníků. Nově zjištěné poznatky, v řadě případů zcela primární, jsou přínosné nejen pouze v oblasti základního výzkumu, ale případným využitím v zásahu do potravních procesů pro vývoj možných nových, „moderních“ obranných metod v praxi. Celkově je práce velice precizně zpracována s výbornou jazykovou úpravou. Uchazečka má navíc jedinečnou schopnost velmi stručně, ale přitom velmi výstižně postihnout uváděnou problematiku, což je zejména zřejmé v úvodních a obecných oddílech předkládané práce. Vzhledem ke zvolenému tématu, obecně lýkožroutu smrkovému, bych doporučil při zpracovávání praktických podkladů užší spolupráci, nebo alespoň konzultaci uchazečky s výzkumnými či vědeckými pracovníky v oboru ochrany lesa, případně i vybranými lesníky z praxe. Nicméně z předkládané práce je zřejmé, že uchazečka danou problematiku chápe a že tyto nedostatky neměly přímý vliv na zjišťované parametry.

Z výsledků jednotlivých sledování vyplývá zvládnutí stanovených cílů. Výsledky jsou přehledně, stručně a jasně uvedeny, zobrazeny, vyhodnoceny a komentovány, dokonce již

připraveny ve formě rukopisů pro vědecké časopisy (jeden příspěvek dokonce již publikovaný).

Uchazečka celkově splnila zadané cíle, prokázala dovednost při teoretickém i praktickém pořizování a zpracování výsledků. Disertační práci hodnotím celkově velmi kladně a doporučuji k obhájení.

Ve Strnadech dne 12. 6. 2017

Ing. Miloš Knížek, Ph.D.

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

Strnady 136

252 02 Jíloviště