

Posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. A. Bednářové „Životní strategie motolic (Digenea) se zaměřením na vývojové stadium cercarie“

Předložená práce se zabývá velmi zajímavým tématem. Jako model byly zvoleny 3 druhy motolic, jejichž prvním mezihostitelem je *Lymnaea stagnalis*. Práce je zpracována na 29 stranách vlastního textu, 14 stranách citované literatury a 23 stranách příloh. Při čtení jsem měl velmi naléhavý pocit, že by přehlednosti velmi prospělo, kdyby přílohy byly včleněny přímo do textu, dílem do metodiky a dílem do výsledků. Podle mne jsou přílohy (kromě nečetných výjimek) pozůstatkem z předkomputerových dob; v této práci je to dovedeno do extrému a ve vlastních výsledcích není jediná tabulka ani graf.

Členění práce je věnována i další připomínka: všechny tradiční součásti práce kromě závěru jsou rozděleny na kapitolu 1 a kapitolu 2 podle 2 nosných témat; působí to nezvykle.

Úvod

Podle mého názoru jde o nejzdařilejší kapitolu, Andrea cituje úctyhodnou řádku prací (doufám, že je opravdu prostudovala). Možná by si zasloužil publikování jako review; pro tento účel by však bylo nutné některé citace zkonkretizovat: nejen vyjmenovat, kdo se kterým problémem zabýval, ale stručně „vypíchnout“, co zjistil. Odkud je čerpána informace, že v našich podmínkách je nejčastějším druhým mezihostitelem *Plagiorchis elegans* larva komára *Culex molestus*? Já tomu nevěřím: larvy tohoto synantropního druhu se vyvíjejí v tak malých vodních tělesech, že v nich nežijí měkkýši.

Bohužel, i u tak rozsáhlého literárního přehledu došlo k tomu, že je citována řada prací obecných a tematicky vzdálených, ale chybějí některé práce týkající se právě zvolených modelových druhů.

Například

Manga-González, M. Yolanda, González Lanza, Camino a Kanev, I., 1994: *Lymnaea truncatula*, intermediate host of some Plagiorchiidae and Notozotylidae species in León, NW Spain., *Journal of Helminthology* 68(2): 135-141

Autoři se zabývali sezónní dynamikou larválních stádií několika motolic včetně *P. elegans* a *O. ranae* a vztahem k velikosti plže. Dospěli k zajímavým zjištěním a srovnání s jejich výsledky by práci prospělo.

Carvalho G.A. se v několika publikacích věnovala strategiím plagiorchisů v prvním a druhém mezihostiteli, citována není ani jednou.

Absenci práce Voutilainen A, 2010: Interactive effects of predation risk and parasitism on the circadian rhythm of foraging activity in the great pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda: Lymnaeidae) *Ann. Limnol. - Int. J. Lim.* 46:217-223, zabývající se interakcemi *D. pseudospataceum* a *P. elegans* s *L. stagnalis* bych odpustil (vyšla v listopadu), avšak v elektronické podobě dle údajů autora „visí na netu“ už od srpna.

Chybí také např. práce:

Seppala O, A. Karvonen, and E. T. Valtonen, 2007 Phenotypic Variation in Infectivity of *Diplostomum spathaceum* Cercariae Within a Population, *J. Parasitol.*, 93: 1244–1246 zaměřená sice zejména na změny v infektivitě cercárií, ale sledující i variabilitu jejich vylučování z plovatek.

Cíle práce:

Ve stanovení cílů vidím určitý problém a nedovedu posoudit, zda to je věc autorky nebo školitelky. V cílech jsou položeny otázky typu:

„Dochází během roku ke změnám v produkci cercárií z měkkýšů?“

Já bych očekával otázku položenou takto:

„K jakým změnám v produkci cercárií dochází během roku a proč?“

U dalších 3 položených otázek je to stejné. Byl by to problém pouze formální a rád bych jej vůbec nezmiňoval, kdyby se ovšem autorka nespokojila s odpovědí na takto položenou otázku typu „Výsledky této studie prokazují, že jak množství cercárií, tak jejich velikost se během ročního období mění.“ a nesnaží se zobecnit, jak se mění (najít v tom nějakou zákonitost) a diskutovat, z jakých důvodů se to či ono mění právě takto.

Materiál a metodika:

V přehledu lokalit jsou charakterizovány rybníky a v závěru charakteristiky jsou uvedeni živočichové, kteří v nich žijí. To je správné a logické, vzhledem k tomu, že cercárie v nich hledají své druhé mezipřehostitele. Ale seznam zvířat je dostatečný jen v případě obojživelníků (4 druhy žab); dále jsou vyjmenovány jen 3 (!) druhy ptáků a z ryb je uveden pouze kapr! Vzhledem ke skutečnosti, že druhým mezipřehostitelem *Diplostomum pseudospathaceum* jsou ryby, uvítal bych informaci o dalších rybách na lokalitě. Hlavně však postrádám informace o bezobratlých přítomných na lokalitě, vzhledem k potenciálním druhým mezipřehostitelům *Opisthio glyphe* a *Plagiorchis*. Jací tam žijí další měkkýši, kromě plovatek? Jací tam žijí další bezobratlí, třeba larvy pakomárů, či jiný vodní hmyz?

U jednotlivých plovatek byl zjišťován jejich objem (pro další přepočty) a to tak, že byla změřena výška a šířka ulity a k výpočtu objemu byl použit vzorec pro kužel (nikoliv pro jehlan, jak je uvedeno na str. 12). Myslím, že snadněji by bylo možno objem měřit ponořením do ocejchované odměrky s vodou.

Za „bonus“ považuji to, že část z vyšetřených jedinců byla předtím označena. Bylo možno u označených jedinců odhadnout jejich věk, případně délku infekce? Ta by mohla množství i velikost cercárií ovlivnit značně, vybavuji si, že jsme o tom diskutovali na semináři, ale v práci jsem o tom zmínku nenašel.

U pokusu, ve kterém se srovnává vyplouvání cercárií v terénu a v laboratoři postrádám popis způsobu, jak bylo dosaženo srovnatelných teplot? Očekával bych, že teplotám naměřeným v terénu bude přizpůsobena teplota v nádobách v laboratoři (třeba nastavení ve vodní lázni). Místo toho se zdá, že rozdíly v teplotách byly vypočítávány? Jestli ano, nepochopil jsem jak (jistě nejde o spojitý proces). Nebo byla vždy v laboratoři teplota vody 17 °C, jak by vyplývalo z diskuse na str. 23 (a přitom stejná teplota byla i v nádobkách umístěných pod žárovkou)? Předpokládám, že se k pokusu vztahuje tabulka 4 (není to z ní jasné), podle které v terénu teplota vody kolísala od 11,1 do 26,5 °C. Pak se však můžeme pravděpodobně oprávněně domnívat, že rozdíly zjištěné v terénu a v laboratoři byly způsobeny právě zejména rozdílnými teplotami. Tento výsledek by jistě bylo možno jednoduchým pokusem (v laboratoři) potvrdit.

Analýza dat:

Jde o velmi důležitou část práce, protože z vypočtených dat jsou (anebo spíše mohly by být) vyvozovány závěry. Ač se nepovažuji za experta ve statistice (pokud ji potřebuji, chodím se radit za někým zběhlejším), i k této části mám připomínky.

Např. str. 17: „Hranice pro zamítnutí nulové hypotézy byla stanovena na $p > 0,05$ “ mělo by být buď $p = 0,05$, anebo $p < 0,05$.

(nejlépe: "hladina významnosti byla stanovena na $\alpha = 0,05$.")

Nejednotný je zápis stupňů volnost (např. str. 18,19)

str. 18, poslední odstavec: signifikantní rozdíl, přitom $p = 0,07618!!!$)

str. 19, první odstavec: „Byl proveden Tukey HSD test (tab. 6), který potvrzuje, že signifikantně nejvyšší množství cercárií bylo vyprodukováno na podzim.“ Přitom samotný test pouze odhalil, že se významně liší jen počet vyplavených cercárií na jaře a na podzim. Canoco: je nedostatečně popsáno.

Co bylo vysvětlovanou proměnnou?

V práci je uvedeno, kolik variability bylo vysvětleno, ale variability čeho? Z textu ani z obrázků to poznat nelze.

Obrázky vypadají, že rozměry těla jsou vysvětlovanou proměnnou, ale v textu se píše, že byly použity jako vysvětlující proměnná.

Jak (a proč) se rozhodovalo mezi lineárními (PCA, RDA) a unimodálními analýzami (CA, CCA)?

V práci se tvrdí:

"Pro zjištění, která z použitých proměnných (roční období, hostitel) lépe vysvětluje variabilitu v datech (tzn. má větší vliv na velikost cercárií) byla provedena analýza hlavních komponent (PCA, Principal Component Analysis)."

Tuto analýzu nelze použít ke stanovení vlivu vysvětlujících proměnných, k tomu je nutno použít některou omezenou analýzu (RDA nebo CCA), zatímco PCA je neomezená.

Použití statistiky a závěrů z ní vyvozených považuji za velmi mlhavé a nedostatečně popsané.

Výsledky

Několik dotazů mám k výběru tělesných rozměrů. Chápal bych délku a šířku těla, i ocásku (i když každý, kdo pozoroval živou cercárii ví, jak se zejména rozměry ocásku mění: asi dost záleží na momentu, kdy byla fixací usmrcena. Proč nebyl u xiphidiocercárií vybrán stilet? Ze všech rozměrů je nejstálější a kdyby se jeho délka měnila, mohlo by ta snad opravdu něco znamenat.

Má autorka nějakou pracovní hypotézu k rozměrům přísavek? Nemyslím vysvětlení, co jejich variabilita znamená, ale co by teoreticky mohla znamenat.

Byla zjištěna nějaká závislost velikosti cercárií a jejich počtem v hostiteli? I o tomto problému jsme diskutovali na semináři, ale v práci jsem jej nenašel, snad kromě zmínky na str. 24 v diskusi, kde je to však jen v kategorii úvah. Ze získaných dat by to však bylo možno zjistit, myslím.

Diskuse:

Prosím o vysvětlení, jak máme rozumět tvrzení, že pomocí regrese bylo spočítáno, že množství cercárií *P. elegans* bylo negativně korelováno s teplotou. Tedy čím tepleji, tím méně cercárií? To však platí jen pro určitý interval a nelze to zevšeobecnit. V diskusi bych uvítal více souvislostí (aspoň hypoteticky možných) mezi zjištěnými skutečnostmi (např. maximem vyplouvání *P. elegans* v noci) a výskytem či chování druhých meziphostitelů. O to přece při sledování „strategie“ jde zejména, že?

Závěr:

Strana se závěrem je nejslabším místem diplomové práce. Přečetl jsem si jej (docela pochopitelně) jako první a získal o práci dost negativní obrázek, který se pak při čtení ostatních částí částečně vylepšil. Závěr je nekonkrétní, rozplizlý a upovídáný. Jak se může v závěru ocitnout věta:

„Nicméně biologické charakteristiky v procesu produkce cercárií se pravděpodobně budou lišit mezi jednotlivými taxony a každý druh bude zřejmě reagovat více či méně odlišným způsobem.“ ?

Podobných „perel“ je tam víc, hojně se tam vyskytuje kondicionál. Proč studentka nezvolila obvyklý způsob závěrů v bodech, jako prostý výčet „uchopitelných“ výsledků. Velmi bych uvítal, kdybychom na obhajobě klasické stručné závěry viděli.

Formální a jazyková stránka:

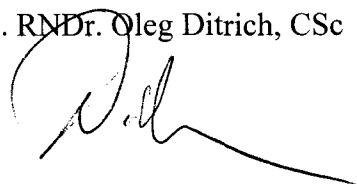
Je kladem práce, vyskytuje se minimum překlepů a chyb. Někdy dělá studentce potíže shoda přísudku s podměttem (např.: onemocnění by se mohla šířit, nikoliv „mohli šířit“). Přesto se domnívám, že práce byla sepsána a odevzdána narychlo a bez komunikace se školitelkou a spolupracovníky, kterým je za připomínky děkováno. Pochybují, že by si nikdo nevšiml chyb v jednotkách (tabulky 1, 2, 3), ze kterých to vypadá, že plovatky byly půlmetrové! Naopak, spočítané objemy plžů jsou zas neuvěřitelně malé, 5 - 10 mm³. Také pochybují, že by školitelka pustila ten již zmíněný závěr nebo onu mlhavou statistiku.

Závěr posudku:

Přes velké množství připomínek (některé jsou závažné, jiné méně) konstatuji, že Andrea kus práce odvedla, metodiky zvládla a určité výsledky získala (i když je do textu dost ukryla). Práci doporučuji k obhajobě. Pokud jde o navrhovanou známku, rád bych počkal až na obhajobu, protože očekávám, že Andrea aspoň některé z věcí, které postrádám v prezentaci doplní a že odpoví na dotazy a připomínky (bližší vysvětlení volby statistických metod, vysvětlení, jak to bylo s teplotou vody při pokusu s *D. pseudospathaceum* apod.).

V Českých Budějovicích dne 21.1.2010

Doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc



Posudek na diplomovou práci:

Téma: **Životní strategie motolic (Digenea) se zaměřením na vývojové stádium cercárie**

Autor: Bc. Andrea Bednářová

Diplomová práce Andrey Bednářové byla vypracována na Přírodovědecké fakultě JU v Českých Budějovicích pod vedením RNDr. Anny Faltýnkové, PhD. Cíle diplomové práce jsou jednoznačně vymezeny a zahrnují problematiku (1) sezónních změn v produkci a velikosti cercárií tří druhů motolic z plovatky bahenní *Lymnaea stagnalis*, (2) denních rytmů v uvolňování cercárií, a (3) u druhu *Diplostomum pseudospathaceum* pak vliv laboratorních podmínek na uvolňování cercárií z hostitelského plže.

Diplomová práce má celkem 67 stran a je standardně členěna. V úvodní části je na základě literárních zdrojů podán přehled o faktorech ovlivňujících produkci a uvolňování cercárií a stručná charakteristika studovaných druhů parazitů. Úvod, jehož součástí je také literární přehled, je napsán velmi stručně a výstižně. Stručnost textu je patrná i v dalších kapitolách diplomové práce, zde bych však ocenila trochu detailnější popis. Obzvláště v kapitole Materiál a metodika pak čtenář nenachází některé důležité informace, které mohou následně vést k nedorozumění. Diplomová práce dále obsahuje 14 tabulek a 25 obrázků umístěných v zadní části práce jako příloha.

K předložené diplomové práci mám následující dotazy a připomínky:

1. Mohla by autorka lépe přiblížit, jakým způsobem byl prováděn sběr materiálu na jednotlivých lokalitách? Nepodařilo se mi v textu nikde najít, kolik hostitelů z kterých lokalit bylo hodnoceno. Z kapitoly „Přehled lokalit“ je patrné, že plovatky byly odlovovány na šesti rybnících ve dvou oblastech – na Třeboňsku a Jindřichohradecku. Pro analýzy však byla data ze všech lokalit/rybníků spojena. Přestože obě oblasti spadají do jedné klimatické oblasti jižních Čech, mohou existovat rozdíly v teplotním či chemickém režimu na jednotlivých rybnících např. v závislosti na velikosti rybníku, hloubce či rybí obsádce. Tyto rozdíly mohou následně ovlivnit velikost či sezónní dynamiku v početnosti a fitness hostitelských plžů, a potenciálně také jejich parazitů, jak autorka sama upozorňuje dále v diskusi. Z textu není jednoznačné, zda byly v některé z předešlých studií testovány rozdíly v produkci nebo velikosti cercárií mezi rybníky/oblastmi, čímž by bylo ošetřeno sloučení lokalit.

Z textu také není patrné, zda byl při pravidelném terénním sběru získán materiál ze všech šesti rybníků. V metodice kapitola 3.2.2. je uvedeno, že pro každý druh motolice byli při každém pokusu vybráni 3 měkkýši. Není už však jasné, zda se jedná o 3 plovatky z každého rybníka během každého odběru, anebo 3 plovatky dohromady ze všech rybníků. V Tabulce 1-3 jsou sice počty měkkýšů uvedeny, ale ani ty neodpovídají textu v metodice. Kromě toho, že jsou pravděpodobně spojeny vždy 2 odběry (jako 1 měsíční odběr), počty plovatek v jednotlivých měsících kolísají od 1 do 9.

V grafu s průměrnými teplotami by bylo vhodné uvést směrodatnou odchylku, která by napověděla, zda byly rozdíly v teplotách mezi rybníky zanedbatelné nebo naopak. Dále bych se chtěla zeptat, jaký význam mělo pro předkládanou diplomovou práci stanovení „srovnatelných“ transektů na jednotlivých rybnících.

2. Pro standardizaci počtu cercárií v souvislosti s velikostí hostitele byl použit přepočtení vydělením počtu cercárií objemem hostitele, což předpokládá lineární vztah mezi velikostí (objemem) hostitele a počtem uvolněných cercárií. Byl lineární vztah potvrzen autorkou pro všechny tři druhy studovaných parazitů? Pokud ano, bylo by vhodné uvést v diplomové práci i tyto výsledky jako splnění předpokladu pro standardizaci dat.

3. Popis metodiky analýzy velikosti cercárií v závislosti na sezoně je poměrně neurčitý. Mohla by autorka vysvětlit, proč byla pro hodnocení vlivu sezony a hostitele na rozměry cercárií použita diskriminační analýza? Která data vstupovala do analýz jako vysvětlující proměnné a která jako vysvětlované?

Bylo by možné v analýze použití teploty vody jako kontinuální proměnné namísto ročního období, a objemu hostitele jako kontinuální proměnné namísto kategorické proměnné hostitele jako jedince? Neposkytlo by použití těchto parametrů přesnější informaci o vlivu sledovaných faktorů na velikost cercárií?

Legandy k některým tabulkám týkající se výsledků mnohorozměrných analýz jsou nepřesné a čtenáři neposkytují všechny potřebné informace k orientaci ve výsledcích.

4. V kapitole výsledky a diskuse jsem našla několik drobných nedostatků:

- parametry jednotlivých testů by měly být uváděny jednotně; hodnota F-testu je dostačující zaokrouhlená na dvě desetinná místa, hodnota pravděpodobnosti na tři desetinná místa
- znázornění počtu stupňů volnosti a počtu případů uváděné jako dolní index hodnoty F-testu je v textu nejednotné, občas nekompletní
- rozdíl mezi celkovým počtem uvolněných cercárií u všech tří modelových druhů motolic není signifikantní (kapitola 4.1.2.), přestože autorka uvádí opak
- má hodnocení sezonní dynamiky všech tří druhů motolic dohromady nějaké biologické opodstatnění, obzvláště po zjištění opačného trendu v produkci cercárií v závislosti na teplotě u *P. elegans* a obou druhů *O. ranae* a *D. pseudospathaceum* v předchozích analýzách?
- výsledky post-hoc testu v Tab. 6 neukazují, jak autorka v textu tvrdí, že nejvyšší množství cercárií bylo vyprodukováno na podzim. Z výsledků testu pouze vyplývá, že produkce cercárií byla vyšší na podzim než na jaře.
- co autorka myslela termínem „těsně nesignifikantní“? Hodnoty v Tab. 12 rozhodně okrajovou významnost ani nenaznačují.
- u Repeated Measures ANOVY bych doporučovala uvedení celého modelu v textu
- sledování denní dynamiky vyplouvání cercárií ukázalo na pokles mezi prvním a druhým intervalem u *P. elegans*, ale v posledním intervalu se nelišilo (viz výsledky) – což je chybně interpretováno v diskusi

5. Ve výsledcích mě zaujal rozdíl v sezonní dynamice vyplouvání cercárií *D. pseudospathaceum* mezi první a druhou studií. Z výsledků v první studii je patrný nárůst množství cercárií na podzim, oproti tomu ve studii druhé dochází na podzim k poklesu počtu cercárií. Na základě srovnání s literaturou výsledky z roku 2008 (vrchol produkce cercárií v letních měsících) spíše odpovídají výsledkům ostatních autorů. Čím si autorka tuto meziroční změnu v trendu vysvětluje?

6. Zajímavým výsledkem diplomové práce bylo zjištění, že stimulace hostitele světlem a teplem způsobuje pokles v množství vyplouvaných cercárií ve srovnání s hostitelem

ponechaným při přirozené světelné periodě. Mohl by jedním z možných vysvětlení být úhyn a rozložení některých cercárií způsobený vyšší teplotou, které by mohlo ovlivnit celkový počet cercárií vyprodukovaných za 24 h? Je známa životnost cercárií studovaných druhů motolic? Byl trend vyššího počtu cercárií u nestimulovaných hostitelů konstantní po celých 24 h nebo nebyl vůbec sledován?

Autorka se při psaní textu nevyhnula určitému množství překlepů, pravopisných chyb a nepřesných interpretací. Z množství dat hodnocených v diplomové práci je však zjevné, že šlo o mimořádně časově náročnou práci a autorka musela terénním i laboratorním sběrům věnovat značné úsilí. Přestože v posudku uvádím především určité diskutabilní pohledy na některé problémy, předloženou diplomovou práci hodnotím jako poměrně zdařilou. Autorka splnila vymezené cíle a získané výsledky představují významný přínos pro poznání některých aspektů problematiky sezónních a denních rytmů v produkci cercárií motolic. Diskuze je přiměřená problematice a autorka práce využila všech dostupných informací ke konfrontaci s vlastními výsledky. Proto předloženou práci doporučuji k obhajobě.

Brno 19.1.2010

Mgr. Markéta Ondračková, PhD.

