

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



Bakalářská práce

Geometrická morfometrika schránek rozsivek

Kateřina Hubáčková

2010

Školitelka: Mgr. Jana Veselá

Poděkování

Především děkuji své školitelce Mgr. Janě Veselé za všestranné vedení při práci, trefné připomínky k polotovarům mých textů a trpělivou pomoc v laboratoři, která obnášela mimo jiné odpovídání na moje neustále se opakující dotazy úplného nováčka. Můj dík patří také konzultantovi Doc. Jiřímu Neustupovi za to, že mě svým entuziasmem přivedl ke studiu algologie a dodal mi potřebné nápady, bez nichž by moje práce nemohla vzniknout. Profesorce Aloisii Poulíčkové děkuji za poskytnutí kultur právě se rozmnoživších rozsivek, bez kterých by uskutečnění mého pokusu mohlo trvat roky. Děkuji i všem kolegům z laboratoře za přátelskou podporu a příjemnou společnost, a samozřejmě své rodině, která mi poskytovala nezbytné zázemí pro studium.

Abstrakt

Tato bakalářská práce obsahuje rešeršní a praktickou část. V literární rešerši se zabývám biologií rozsivek (Bacillariophyceae) s důrazem na problematické oblasti výzkumu. Podrobněji jsou probírány zejména morfologie specifické křemičité schránky a její morfogeneze, životní cyklus, který je charakteristický zejména vegetativní fází, při níž dochází kvůli rigidní buněčné stěně ke zmenšování buněk, a pojetí taxonomie těchto organismů, které je značně komplikované kvůli nejasnému druhovému konceptu. Další část rešerše je věnována geometrické morfometrice, což je rychle se rozvíjející metoda, která přináší zcela nové možnosti pro uchopení a kvantifikaci biologického tvaru.

V praktické části této práce prezentuji výsledky experimentu, který je úvodní studií k práci diplomové a má za cíl osvojit si nástroje geometrické morfometriky a prezentovat možnosti této metody. Tématem je morfologická variabilita tří kmenů penátních rozsivek, kultivovaných za standardních podmínek, studovaná pomocí landmarkových metod. Kladu si otázku, zda malé buňky těsně před sexuálním rozmnožováním, které prošly dlouhou fází vegetativního dělení, mají odlišnou morfologickou disparitu než velké buňky, vzniklé obnovením z auxospory po sexuálním rozmnožování.

Klíčová slova: rozsivky, Bacillariophyceae, životní cyklus, geometrická morfometrika, landmarky, disparita

Abstract

This bachelor thesis includes a theoretical and a practical part. In the theoretical part, I focused problematic parts of research of diatoms biology. I will discuss morphology of specific silica scale and its morphogenesis; life cycle, characteristic by the size diminution in vegetative phasis, and conception of taxonomy of these organisms which is rather complicated because of unclear species concept. Another part presents tools of geometric morphometrics which is rapidly developing method for investigation and quantification of biological shape.

In the practical part, I present the results from own research. This experiment is preliminary study for diploma thesis and its purpose is to appropriate tools of geometric morphometrics and to present advantages of its methods. I will investigate morphological disparity of three strains of pennate diatoms cultivated in standard conditions studied by landmark methos. The aim of this study is to discover if small cells which have gone trough the long phasis of vegetative multiplication and are close to the sexual reproduction have diferent degree of morphological variability than the bigger ones just undergone by sexual process.

Key words: diatoms, Bacillariophyceae, life cycle, geometric morphometrics, landmarks, disparity

Obsah

1 Teoretická část	6
1.1 Úvod.....	6
1.2 Rozsivky.....	6
1.2.1 Charakteristika skupiny.....	7
1.2.2 Morfologie a morfogeneze	7
1.2.3 Životní cyklus.....	11
1.2.4 Systém a druhový koncept.....	12
1.3 Morfometrika.....	13
1.3.1 Úvod.....	13
1.3.2 Tradiční morfometrika	14
1.3.3 Geometrická morfometrika	16
1.4 Shrnutí.....	20
2 Praktická část	22
2.1 Úvod.....	22
2.2 Metody.....	23
<i>Kultivace</i>	<i>23</i>
<i>Tvorba trvalých preparátů a obrazové dokumentace</i>	<i>23</i>
<i>Landmarky</i>	<i>24</i>
<i>Symetrizace</i>	<i>24</i>
<i>Analýza dat.....</i>	<i>25</i>
2.3 Výsledky a diskuse	25
3 Literatura	29

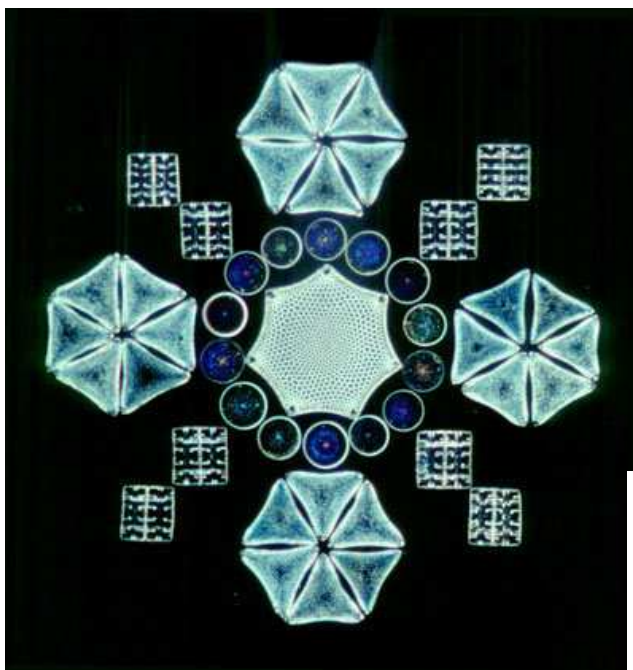
1 Teoretická část

1.1 Úvod

V první kapitole rešeršní části své bakalářské práce se věnuji biologii rozsivek s důrazem na problematické aspekty výzkumu těchto organismů. Zvláštní pozornost je zaměřena na morfologii křemičité schránky a životní cyklus, protože tyto oblasti úzce souvisí s tématem mé budoucí diplomové práce. Dále se detatilněji věnuji taxonomii a druhovému konceptu, protože co se týče rozsivek, ale i protistních organismů obecně, je to téma v současné době snad nejdiskutovanější. Druhá kapitola pojednává o pokroku a metodách geometrické morfometriky, zmiňuje nejdůležitější studie prováděné touto metodou a zabývá se výhodami využití této metody při studiu rozsivek i v algologii obecně.

1.2 Rozsivky

Rozvoj studia mikroskopických organismů šel ruku v ruce se zdokonalováním optické techniky. První známá zmínka o rozsivkách spadá do počátku 18. století, kdy byly na vodních rostlinách pomocí jednoduchých mikroskopů pozorovány drobné částičky, které podle tehdejších nákresů můžeme identifikovat jako rozsivky rodu *Tabellaria* (Round et al., 1990). O rozsivkách se také zmiňuje Antoni van Leeuwenhoek (1632 – 1723), jehož výzkumy byly velkým přínosem pro tehdejší mikrobiologii. Sám vyráběl mikroskopy, které zvětšovaly až 275krát. Jeho nákresy ovšem nejsou tak precizní, abychom mohli usuzovat, o jaké rody se jedná. V první polovině 19. století rozsivky uvádí ve svých pracích několik autorů, ale mylně je řadí mezi živočichy. Přelomová je práce F. T. Kützinga, který ve své monografii *Algarum aquae dulcis germanicarum* (1833-1836) rozsivky klasifikuje jako zástupce rostlinné říše. V následujících desetiletích studium těchto mikroskopických řas zažívá nebývalý rozvoj. Díky ornamentované buněčné stěně a množství různorodých tvarů si získaly mnoho příznivců a zájem o ně se ve vědeckých kruzích stal téměř módní záležitostí. Častou zábavou bylo například vytváření umělecky pojatých preparátů – schránky rozsivek byly na sklíčka skládány do estetických kompozic (obr. 1.).



Obr. 1. Esteticky ztvárněný preparát ze schránek rozsivek (<http://www.stumbleupon.com/to/18YeaZ/talassa.gso.uri.edu/flora/arranged.htm/t:4c646fecc3d50;src:tag:photography>)

V roce 1847 vychází první reference o sexuální reprodukci od George H. K. Twaitese a v tomto období byl také poprvé popsán proces zmenšování během vegetativní fáze životního cyklu. Z druhé poloviny 19. století pochází také velké množství taxonomických a morfologických prací, jejichž výsledky byly až na drobné změny platné i bezmála po sto letech od jejich vydání (Werner, 1976; Round et al., 1990).

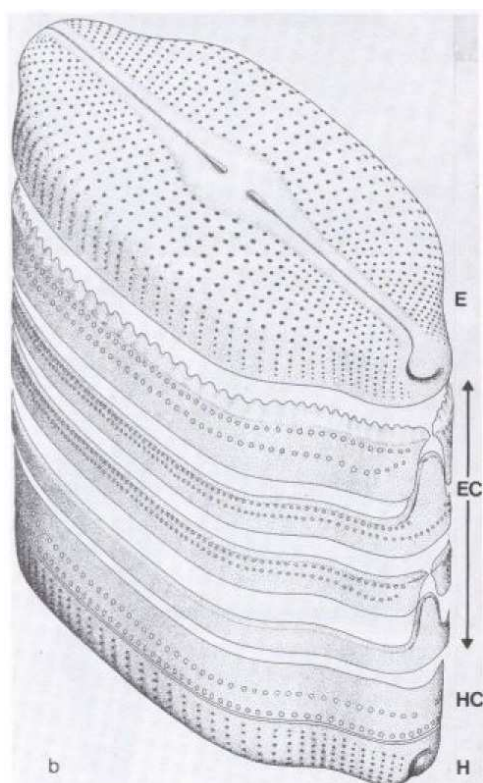
1.2.1 Charakteristika skupiny

Rozsivky jsou široce rozšířené a ekologicky významné jednobuněčné řasy. Žijí samostatně nebo v koloniích, kolonie mohou vykazovat vyšší stupeň organizace (Schmid, 1994). Jsou hlavní složkou bentických a planktonních společenstev po celém světě, vyskytují se v terestrickém, mořském i sladkovodním prostředí (Van Den Hoek et al., 1995). Díky svému hojnému rozšíření a dobře zachovatelné buněčné stěně se dají využít v paleoekologii a při analýzách ekologických problémů, jako jsou klimatické změny, acidifikace a eutrofizace (Stoermer, 1999).

1.2.2 Morfologie a morfogeneze

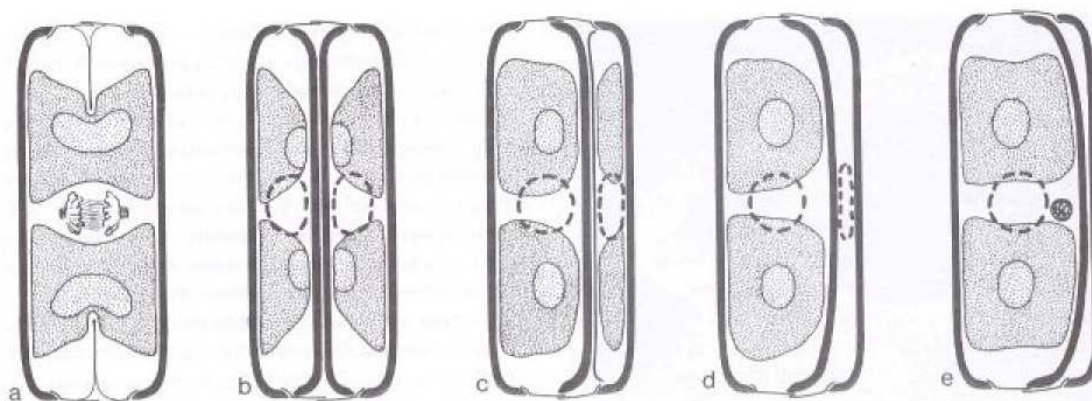
Hlavním charakteristickým znakem rozsivek je jejich buněčná stěna inkrustovaná oxidem křemičitým ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$). Je tvořena dvěma částmi různého stáří, které do sebe

zapadají podobně jako dvě části petriho misky. Starší polovina, epithéka, je větší a překrývá okraj hypothéky. Obě části jsou těsně spojeny cingulem, výměnu látek s okolím zajišťují póry v thékách. Cingulum je tvořeno páskovitými elementy, z nichž část je asociována s epithékou a část s hypothékou, takže jej také dělíme na hypocingulum a epicingulum (obr. 2.). Dohromady tyto struktury tvoří frustulu. Jediný způsob, jak buňka může v pevné schránce zvětšovat svůj objem, je přirůstání pásků hypocingula. Původní velikost frustuly je obnovena pomocí auxospory, která je ve většině případů produkována při sexuálním rozmnožování (Round et al., 1990).



Obr. 2. Struktura křemičité buněčné stěny.
E – epivalva, EC – epicingulum, HC – hypocingulum, H – hypoalva (převzato z Round et al., 1990)

Podle tvaru schránky dělíme rozsivky na dvě hlavní skupiny – centrické a penátní. Centrické, jak jejich název napovídá, mají více os souměrnosti, penátní oproti nim mají maximálně dvě (Schmid, 1994). Symetrie schránek se utváří nesčetnými způsoby a u různých druhů dochází k rozličným a zajímavým konformacím. U penátních rozsivek se může vyskytovat raphe, což je štěrbina vedoucí prostředkem valvy nebo po jejím okraji, sloužící většinou k vylučování slizu, a tedy k pohybu nebo přichytávání se k podkladu (Van Den Hoek et al., 1995). U některých druhů byl pozorován výskyt schránek ve schránkách (obr. 3.). Jednotlivé buňky mohou vyprodukovat určitý počet takovýchto nadbytečných schránek a zdá se, že slouží k vyrovnávání osmotického tlaku prostředí, takže se nejčastěji vyskytují u rozsivek žijících v terestrických či salinních habitatech (Round, 1990).



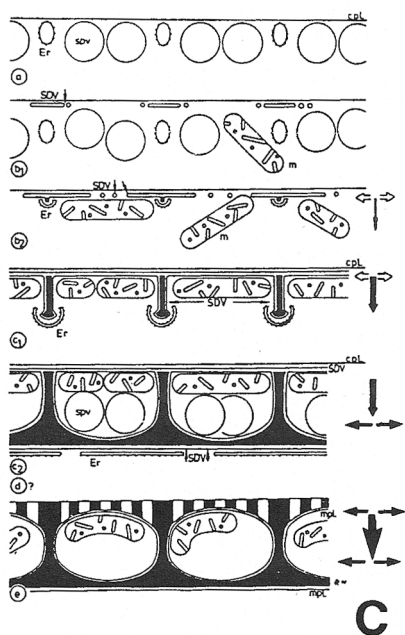
Obr. 3. Vnitřní schránky, rod *Hantzschia* (převzato z Round et al., 1990)

Morfologie frustuly je díky své atraktivitě zřejmě nejprobádanější oblastí biologie rozsivek, jak napovídá bohatá a detailně propracovaná terminologie. Množství studií na toto téma ještě vzrostlo s nástupem elektronové mikroskopie. Pokusy o uchopení tvaru, ornamentace a obrysu mají mnoho forem, přes kvalitativní studie až po morfometriku. Zajímavé jsou studie zabývající se dynamikou tvaru během ontogeneze, jako například morfometrická analýza Theriota a Ladewského (1986), která přináší zajímavé zjištění, že tvar je do jisté míry závislý na délce frustuly a tvarová variabilita stoupá se snižující se délkou, což autoři vysvětlují buď možností, že se ve vzorku vyskytuje více genetických jednotek, nebo že kontrola morfogeneze je přesnější při větší velikosti, nebo je to způsobeno podmínkami prostředí.

Je třeba také zmínit vznik teratologických forem. Rozsivky mají relativně úzké ekologické nároky a nepříznivé podmínky často ovlivňují jejich životní cyklus. Výsledkem je, že v nevhodném prostředí se tvar frustuly vyvíjí jinak než ve vhodných podmínkách. Schránky, které jsou takto deformované a nemají morfologii typickou pro daný druh, nazýváme teratologické (Dziengo-Czaja, 2008). V přírodních podmínkách může být těžké rozpoznat, zdali se jedná o teratogenezi, nebo o polymorfismus či dokonce o nový druh. Z teoretického hlediska však teratologické formy nejsou součástí polymorfismu populace, protože nemají genetickou podstatu a jako nahodilé změny většinou snižují individuální fitness. Oproti tomu polymorfismus, jako adaptivní odpověď na lokální a dočasnou variabilitu prostředí, posiluje schopnost populací čelit proměnám habitatu a je podmínkou přežití (Falasco et al., 2009). V tomto směru je přelomová práce Potapové a Hamiltona (2007), která se zabývá korelací tvaru frustuly rámci několika morfologicky podobných taxonů s ekologickými parametry prostředí pomocí metod geometrické morfometriky. Na morfologii

schránky má samozřejmě vliv zmenšování během vegetativní fáze životního cyklu. Toto omezení způsobuje, že se mění poměr objemů buněčného jádra, cytoplasmy a vakuoly, a to může vést k fyziologické a následně i morfologické heterogenitě klonu (Schmid, 1994).

Morfogenetické studie se obvykle zabývají formováním frustuly, a to zejména proto, že frustula je jedním z nejdůležitějších znaků při identifikaci druhů (Schmid, 1994). Tvorba křemičité části buněčné stěny probíhá uvnitř buňky za pomoci membránových váčků, tzv. silica deposition vesicles (SDV), které mají pravděpodobně původ v Golgiho komplexu. SDV putují směrem k plazmalemě, kde v souhře s mitochondriemi a endoplasmatickým retikulem postupně vytváří druhově specifickou strukturu (obr. 4.). Iniciační poloha SDV je sladěna s polohou jádra a určuje střed valvy. Funkční oblasti valvy, jako jsou póry, raphe a další, vznikají díky schopnosti buňky lokalizovat organely, podílející se na tvorbě, do správných oblastí plasmalemy. Zdá se tedy, že plasmalemma je nositelkou morfogenetické informace pro novou valvu. Není ovšem známo, jak je tato informace přenesena do SDV a pomocných formovacích organel, a jak funguje regulace této trojdimenzionální architektury (Schmid, 1994).



Obr. 4. Schéma tvorby frustuly a exocytózy u penátní rozsivky rodu *Pinnularia* (převzato z Schmid, 1994)

Co se týče bilaterálních rozsivek s raphe, které jsou předmětem praktické části mé práce, dlouho se předpokládalo, že mají stejné morfogenetické dráhy. Postupně se ale v této skupině začala objevovat značná variabilita v uspořádání pórů i v systému raphe, z čehož lze usuzovat, že i morfogeneze může probíhat různými způsoby. Studie E. J. Cox (1999) skutečně

ukazuje, že existují odlišnosti mezi zástupci čeledí. Vývojové podobnosti naopak vykazovali zástupci stejných rodů podle současného systému. Je tedy potřeba, aby morfogeneze u jednotlivých rodů byla detailněji prozkoumána.

1.2.3 Životní cyklus

Od ostatních řas se rozsivky liší svým diplontickým životním cyklem. Po většinu cyklu se mitoticky dělí, a to tak, že při rozdělení schránky oběma thékám doroste menší část. Díky tomu dochází během vegetativní fáze ke zmenšování na místo k růstu, jako je to u většiny organismů. Aby mohl být započat sexuální proces, jsou nutné dva faktory – buňky musí dosáhnout minimální velikosti (30% – 40% z velikosti maximální) a vnější prostředí musí být příznivé. Když jsou tyto podmínky splněny, začnou se tvořit gamety. U centrických rozsivek pak probíhá oogamie, kdežto u penátních je pohlavní proces izogamický. V této fázi také rozlišujeme rozsivky homothalické a heterothalické. Heterothalické rozsivky potřebují k rozmnožování setkání s jinou populací, kdežto homothalické nikoli. Gamety po spojení vytvoří auxosporu, která je i u penátních rozsivek nejdříve izometrická, ale rychle získává bipolární charakter pomocí křemičitých pásků nebo plátků perizonia. Z auxospory se tvoří iniciální buňka, která má oproti vegetativní poněkud pozměněnou morfologii. Díky sexuálnímu procesu se obnoví původní největší velikost a vegetativní cyklus může být opět započat. Nicméně, u několika taxonů bylo pozorováno i asexuální obnovení velikosti. Je také známo, že pokud daná populace promešká velikost, při které se indukuje sexuální proces, tak je odsouzena k zániku, ale v kultuře, v podmínkách bez kompetice a predace, mohou takové kmeny žít roky (Van Den Hoek et al., 1995, Elund & Stoermer, 1997).

Obecně je způsob rozmnožování napříč skupinami velmi podobný, ale existuje mnoho drobných odchylek a variací, obzvlášť u rozsivek majících raphe. Variabilita se projevuje zejména ve způsobu párování buněk, počtu gamet produkovaném jedním gametangiem, v chování a velikosti gamet nebo ve struktuře auxospory. Proces auxosporulace je však velmi neprobádaný. Problém je, že i když předpokládáme přítomnost auxosporulace u valné většiny druhů, zatím máme jen malý počet neúplných pozorování, která se navíc vztahují pouze k dané populaci v daném čase, a nevíme, do jaké míry se dají pozorované procesy zobecnit (Pouličková & Mann, 2006).

Unikátní životní cyklus rozsivek ovšem způsobuje řadu těžkostí v taxonomii a morfologii. Tvar schránky je sice víceméně konstantní, protože po vegetativním dělení hypovalva dorůstá uvnitř epivalvy, ale přesto mohou vznikat nepatrné rozdíly, zejména kvůli

procesu zmenšování nebo vlivu prostředí (Veselá et al., 2009). Identifikace je tím náročnější, čím jsou buňky menší, u nejmenších hrozí dokonce záměna druhu. Také iniciální buňky vzniklé z auxospory jsou velmi odlišné od normálních vegetativních buněk a jsou tedy zdrojem chybných zařazení (Pappas & Stoermer, 2003). Hlavním úsilím taxonomů by tedy mělo být zmapovat změny tvaru během životního cyklu, protože jedině tak získáme představu o organismu jako celku.

1.2.4 Systém a druhový koncept

Historicky je systematika rozsivek založená na morfologii křemičité schránky, neexistuje ale obecná shoda na tom, kde by se měly stanovit hranice mezi druhy. Potřeba popisovat čím dál jemnější rozdíly s sebou přinesla také komplexní terminologii a množství studií založených jak na kvalitativních, tak na kvantitativních metodách (Rhode et al., 2001). Kvalitativní studie poskytují detailní morfologický popis a kresby, ve kterých jsou markantní zejména analogie. Kvantitativní morfometrické studie oproti tomu produkují abstraktní matematické údaje (Zelditch, 2004). Takovéto přístupy k identifikaci jsou založeny na měření délky, šířky, hustoty strií, tvaru protoplastu a analýze obrysu schránky, ale selhávají, když se hodnoty překrývají. Problém je, že viditelné rozdíly se dají těžko kvantifikovat a následná interpretace cizího subjektivního popisu je nejistá. Nejasné je také, zda zjištěné rozdíly v morfologii odpovídají skutečně odlišným skupinám, nebo je to variabilita uvnitř jedné skupiny (Rhode et al., 2001).

Zajímavým pokusem o zjednodušení identifikace je projekt ADIAC – automatic diatom identification and classification. Cílem tohoto projektu bylo vyvinout adekvátní obrazovou databázi a metody pro automatickou identifikaci podle tvaru obrysu schránek, která by se využívala v biomonitoringu, mikropaleontologii a forenzním výzkumu (Buf & Bayer, 2002). ADIAC byl například využit při morfologické analýze komplexu *Sellaphora pupula* (Mann et al., 2004) a jeho účinnost byla porovnávána s analýzou legendrovými polynomy, která byla použita v předchozích studiích. Obrysová analýza segmentů, využívaná v projektu ADIAC, je podle autorů velmi citlivá metoda, která pomáhá odhalit jemné okem nepostřehnutelné rozdíly v morfologii valvy. Metoda legendrových polynomů naproti tomu dovede dobře postihnout hrubší morfologické rozdíly, ale selhává v rozdělení skupin, které jasně definovala obrysová analýza segmentů. Existenci menších skupin podporují i molekulární data a křížící pokusy, což by napovídalo, že reálná diverzita rozsivek je vyšší, než se předpokládalo (Mann, 1999; Mann et al., 2004).

Odhady diverzity rozsivek se pohybují mezi 12 000 až 1 000 000 druhů. Toto velké rozpětí je způsobeno tím, že tradiční druhový koncept předpokládá široké pojetí druhu s kosmopolitním rozšířením. Reprodukční izolace mezi populacemi a molekulární data však ukazují, že tradiční pojetí reálné množství druhů podceňuje (Mann, 1999; Rhode et al., 2001). Současné studie naznačují, že morfologicky definované druhy rozsivek často zahrnují kryptické a semikryptické druhy lišící se navzájem ve svých ekologických nárocích (Orsini et al., 2004). Doklady o semikryptické diverzitě většinou pocházejí z malých a geograficky omezených vzorků, takže je možné, že když se bude zkoumat více vzorků z různých lokalit, pravděpodobně se objeví mnohem více druhů, jako třeba u komplexu *Sellaphora pupula* i *Eunotia bilunaris*, jak prokázala například studie kolektivu Vanormelingen et al. (2007).

V současné době však probíhá diskuse, jakou biologickou informaci přináší disciplíny jako systematika a taxonomie (Becerra, 2003). Pokud pro rozsivky není k dispozici dostatečně přílehavý druhový koncept, je role těchto disciplín sporná. Některé současné studie prokázaly význam tzv. holistického přístupu, který kombinuje tři hlavní přístupy ke studiu druhů – morfologii, křížící experimenty a sekvenování (Vanormelingen et al., 2007), což by mohla být cesta do budoucna. Stejně tak metody geometrické morfometriky mají široké využití na poli taxonomie. Jak ukazuje například studie M. Fránkové a kol. (2009), geometrická morfometrika aplikovaná na sympatrické populace dvou penátních rozsivek *Reimeria sinuata* a *Gomphonema tergestinum*. V této studii se morfologicky problematické typy buněk překrývaly v délce i šířce, takže klasickým měřením nebylo možné je určit s naprostou přesností. Naproti tomu rozlišování obou druhů pomocí landmarkové metody přineslo lepší výsledky korespondující s tradičním popisem druhů. Využitím geometrické morfometriky při studiu rozsivek i obecně v biologii se však budu podrobněji věnovat v následující kapitole.

1.3 Morfometrika

1.3.1 Úvod

Tvarové rozdíly mezi jedinci (v rámci populace, druhu či rodu) nebo jejich částmi mohou mít mnoho příčin, jako ontogenetický vývoj, zranění a nemoci, adaptace na lokální geografické podmínky nebo dlouhodobé evoluční změny. Rozdíly ve tvaru mohou poukazovat na odlišné funkce daných částí, rozdílné odpovědi na selekční tlaky, stejně jako

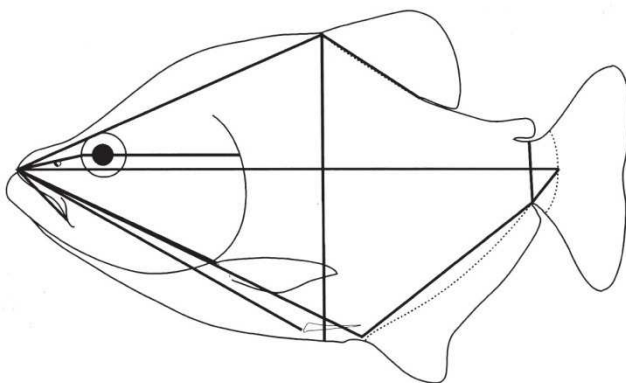
na rozdíly v růstu a morfogenezi. Analýza tvaru proto vždy hrála důležitou roli v mnoha biologických disciplínách (Zelditch, 2004).

Disciplíny jako klasifikace a systematika i obecně pojetí diverzity byly historicky vždy založeny na popisu forem a tvarů. Během počátku dvacátého století došlo k přechodu od popisných disciplín ke kvantitativním. V morfologických studiích se začala využívat kvantitativní data jedné nebo více měřitelných vlastností a tato data pak byla porovnávána. V polovině dvacátého století pak byly kvantitativní metody zkombinovány se statistickými analýzami tvarové variability uvnitř skupin a mezi nimi. To můžeme považovat za počátek moderní morfometrie (Adams & Rohlf, 2004).

Morfometrie je numerická analýza tvaru, v níž se posuzuje více vlastností najednou a dosahuje se tak uceleného pohledu na variabilitu. Může se posuzovat úroveň variability mezi populacemi nebo vztah mezi znaky a ekologickými podmínkami (Sheath, 1989).

1.3.2 Tradiční morfometrie

V šedesátých a sedmdesátých letech se k popisu tvarové variability začaly plně využívat nástroje mnohorozměrné statistiky. Tento přístup nyní nazýváme tradiční morfometrie nebo také mnohorozměrná morfometrie (Adams & Rohlf, 2004). Morfometrická data vycházejí z měření rozměrů objektu, jak vidíme na obrázku 5 (Zelditch, 2004). Metoda, která se používá ke zpracování naměřených hodnot, je například analýza hlavních komponent (PCA - principal component analysis) (Rohlf & Marcus, 1993).



Obr. 5.
Tradiční morfometrie –
měření rozměrů objektu
(převzato ze Zelditch, 2004)

Při kombinaci kvantitativní morfologie a statistiky se objevilo několik úskalí. Častým problémem je alometrie, což je změna tvaru spojená se změnou velikosti objektu. Bylo tedy potřeba vyvinout metodu, která by vliv alometrie dovedla odseparovat. Navrženo bylo několik

metod, ale jejich výsledky se mezi sebou velmi lišily, a tak nebyla nalezena shoda na tom, kterou z nich je možné využívat (Adams & Rohlf, 2004). Ukázalo se také, že výsledky měření se často překrývají, a to i u tvarů, které jsou na první pohled odlišné (Zelditch et al., 2004). Nevýhodou je, že z morfometrických dat není možné rekonstruovat původní tvar a máme k dispozici jen jeho abstraktní reprezentaci (Rohlf & Marcus, 1993). U metod tradiční morfometriky také postrádáme informaci o prostorových vztazích jednotlivých měřených proměnných (Zelditch et al., 2004). V neposlední řadě je těžké posoudit homologie lineárních vzdáleností, protože nebyly definovány homologní body (Adams & Rohlf, 2004).

Z výše vyjmenovaných nedostatků je patrné, že vědci potřebují citlivější metodu, která by dovedla odseparovat vliv alometrie, operovala by s homologními body a díky jemnější analýze by poskytla širší pole pro interpretaci a diskutování výsledků. Geometrická morfometrika tyto předpoklady bezpochyby splňuje, výhodám a aplikacím této metody se budu věnovat v následujících kapitolách.

1.3.2.1 Obrysové metody

Obrysové metody byly v morfometrice používány jako první. Obvykle se nejdříve digitalizují body podél obrysu daného objektu a poté se aplikuje matematická funkce, nejčastěji Fourierova analýza (Adams et al., 2004). Množství studií používalo morfometrickou analýzu obrysu schránky rozsivek. K rozlišení semikryptických druhů byly použity morfometrické metody, jež zahrnují kvantitativní deskriptory, jako jsou legendrové polynomy, fourierova eliptická analýza nebo obrysová analýza segmentů, která byla navržena v rámci projektu ADIAC. Tyto studie ukazují, že získané vlastnosti obrysu zkombinované s mnohorozměrnou analýzou přináší užitečný nástroj pro odhalování jemných morfologických aspektů a pomáhají rozřešit spletité taxonomické otázky (Mann et al., 2004). Analýza pomocí legendrových polynomů se hodí na taxony s relativně jednoduchým obrysem, jako jsou právě rozsivky (Rhode et al., 2001). Legendrové polynomy byly použity při zkoumání reprodukčně izolovaných populací rodu *Meridion* (Rhode et al., 2001).

1.3.3 Geometrická morfometrika

Geometrická morfometrika je v současné době nejúčinnějším nástrojem ke zkoumání biologického tvaru. Oproti tradiční morfometrice máme díky této metodě možnost postihnout tvar jako celek (Neustupa *et al.*, 2007). V geometrické morfometrice je tvar definován jako informace, která zbyde, když jsou z objektu odfiltrovány efekty pozice, rotace a měřítka (Zelditch, 2004). Cílem nového přístupu k morfometrice je udržet informaci o geometrii studovaných struktur, čehož je docíleno pomocí souřadnic landmarkových bodů (Rohlf & Marcus, 1993).

Problém tradiční morfometricky je, že podává informaci spíše o rozměrech, než o tvaru. Informace o tvaru je obsažena v poměrech mezi délkami a je překvapivě složité ji získat (Zelditch, 2004). V geometrické morfometrice můžeme využít funkci thin-plate spline, díky níž je možné nejen snadno separovat velikost objektu, pozici, ale i rotaci. Tato funkce byla navržena Booksteinem (1991), aby postihla rozdíly v polohách landmarků na organismech, a umožňuje automatickou konstrukci transformačních mřížek, podobných D'Arcy Thompsonovým¹ (obr. 6.) (Rohlf & Marcus, 1993).

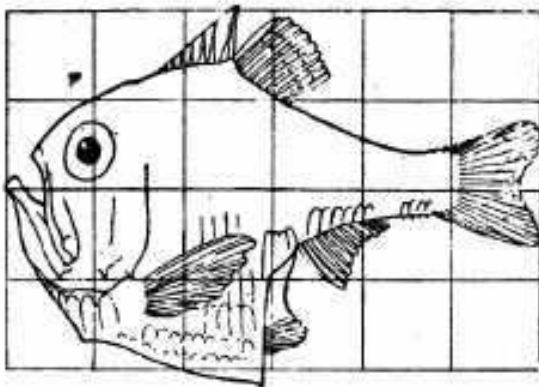


Fig. 517. *Argyropelecus Olfersi*.

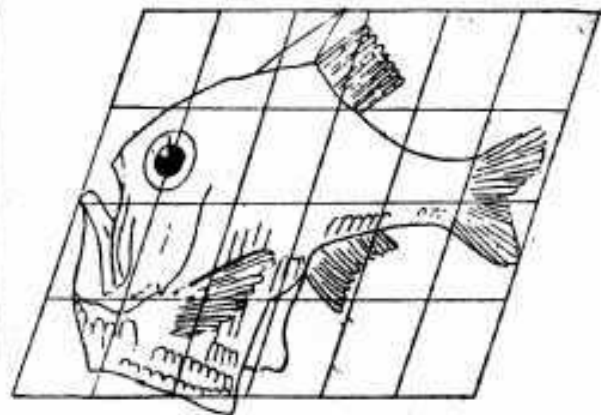


Fig. 518. *Sternoptyx diaphana*.

Obr. 6. Transformační mřížky, které uvádí skotský biolog a matematik ve svém díle On growth and form (1917)

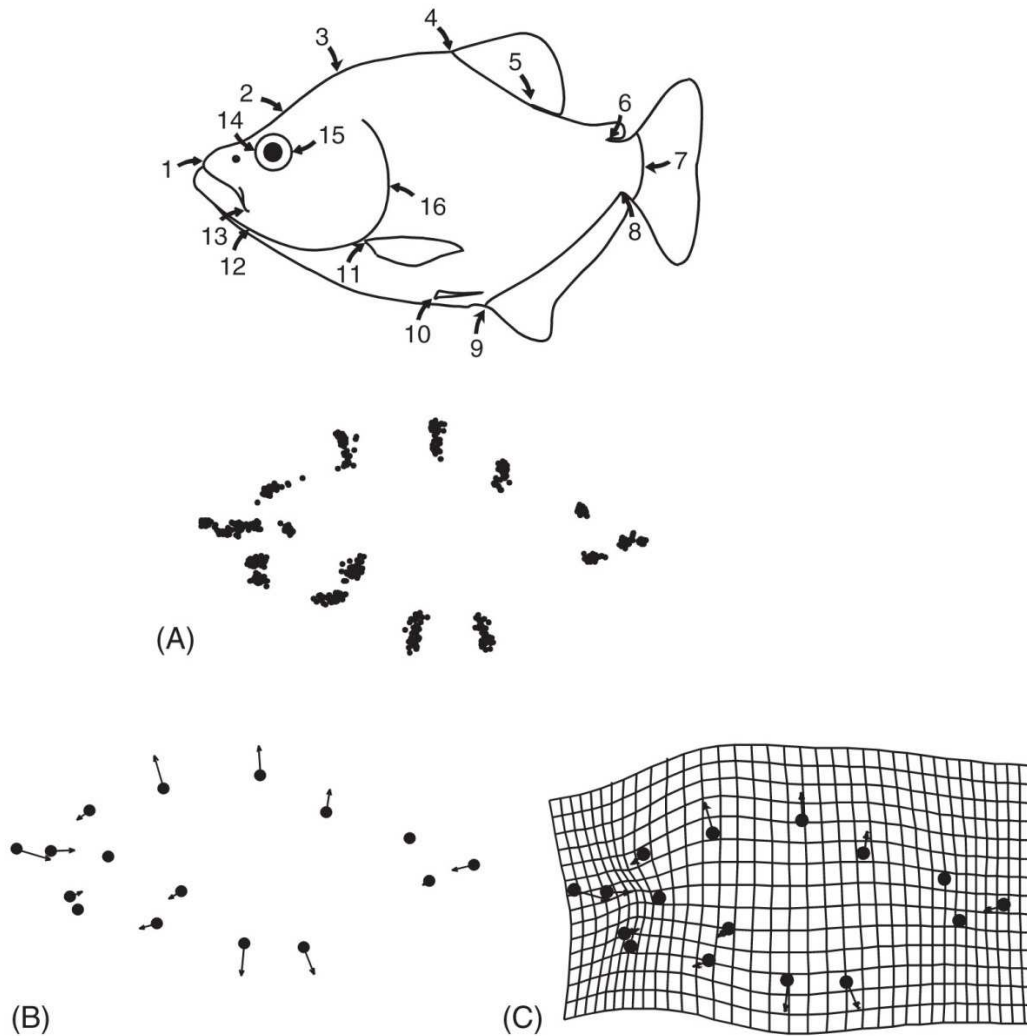
¹ D'Arcy Thompson (1860-1948) byl skotský biolog a matematik, jehož nejznámější dílo je On growth and form (1917), kde se zabývá vlivem fyzikálních zákonů a mechaniky na utváření fenotypu organismů a zmiňuje se mimo jiné o alometrii.

1.3.3.1 Landmarkové metody

Landmarky jsou přesně umístěné homologické body na struktuře, které jsou ontogeneticky, funkčně či evolučně signifikantní. Jsou zachycené jako souřadnice v dvoj- nebo trojdimenzionálním prostoru. Ty, které mají stejné umístění na daných objektech, nazýváme korespondující. Mohou mít fylogenetickou, strukturní nebo biomechanickou podstatu (Richtsmeier et al., 2002).

Hlavní rozdíl mezi tradičními a landmarkovými technikami je ten, že u tradiční morfometriky vybíráme proměnné ještě před začátkem analýzy, kdežto u landmarkových metod nikoli (Zelditch, 2004). Právě naopak, nezaměřujeme se na konkrétní proměnné, ale analýza sama ukáže oblast největší variability (Rohlf & Marcus, 1993). Graficky se dají změny tvaru znázornit buď pomocí vektorů naznačujících směr změn, nebo transformačních mřížek (obr. 7.). Prvním krokem při analýze tvaru landmarkovou metodou je digitalizace homologických bodů, landmarků, jako x a y souřadnic. Každý objekt ze souboru je pak charakterizován konfigurací landmarků. Homologie landmarků může být čistě geometrická, nebo může mít biologickou podstatu (Neustupa, 2005). Landmarkové metody však nemohou být založeny na přímé analýze souřadnic, protože v nich je obsažena informace nejen o variabilitě tvaru, ale i pozice, orientace a měřítko, a tak se nejdříve musí tyto nežádoucí efekty odstranit. Eliminují se pomocí metod superimpozice překrýváním podle stanoveného optimalizačního kritéria (Adams & Rohlf, 2004). Po provedení superimpozice mohou být tvarové odlišnosti mezi objekty popsány pomocí rozdílů mezi souřadnicemi patřičných landmarků. Jiný způsob, jak znázornit tvarovou variabilitu objektů je funkce thin-plate spline, což je matematická realizace D'Arcy Thompsonových transformačních mřížek (Adams & Rohlf, 2004).

Co se týče algologie, landmarkové metody byly použity v taxonomických studiích rozsivek (Beszteri et al., 2005; Fránková et al., 2009), u makroskopických zelených řas (Verbruggen et al., 2005) a v experimentech s fenotypovou plasticitou vztaženou k pH u druhu *Pediastrum duplex* (Neustupa & Hodač, 2005). Ovšem například výzkum penátních rozsivek, ale i řas obecně, dlouhou dobu postrádal vhodnou metodu pro kvantifikaci tvaru, protože tyto organismy mají nedostatek landmarků (Theriot & Ladewski, 1986). Pro popis takovýchto organismů se nejlépe hodí semilandmarky, které na rozdíl od landmarků nemají přesnou lokalizaci, ale naopak kloužou po úseku obrysu, který jsme zvolili (Zelditch et al., 2004). Následující kapitoly obsahují přehled případových studií užívajících metod geometrické morfometriky.



Obr. 7. Metody zobrazení tvarových změn. A – superpozice landmarků, B – vektory, C – transformační mřížky (převzato ze Zelditch, 2004)

1.3.3.2 Geometrická morfometrika a taxonomie

Geometrická morfometrika se často využívá na poli taxonomie, pro příklad můžeme uvést studii Becerra a Valdecassase (2003). Autoři zkoumali, zda konfigurace landmarků může fungovat jako charakteristická vlastnost, něco jako otisk prstu. Dalo by se tím při určování odstranit variaci způsobenou věkem, pohlavím nebo geografickou polohou. Testované vzorky roztočů rodu *Torrenticola* byly porovnávány s již popsány druhy. Výsledky ukazují, že tato strategie do jisté míry funguje, ale nemůže být používána samostatně, nýbrž pouze v kombinaci s jinými metodami. Podle autorů geometrická

morfometrika udává stupeň podobnosti, ale není diagnostická sama o sobě, přináší však nové možnosti, jak studovat morfologickou variabilitu populací.

V taxonomii rozsivek a dalších mikroskopických řas je geometrická morfometrika také hojně využívána. Beszteri et al. (2005) zkoumali taxonomickou identitu dvou příbuzných druhů rodu *Cyclotella*. Autory také zajímalo, jak jsou efektivní různé morfometrické metody v této otázce. Tato studie jako první používá u rozsivek metodu thin-plate spline a analýzu pomocí landmarků. Podle autorů nám morfometrické metody pomáhají rozhodnout, zdali je tvarová variabilita u studovaných skupin spojitá a mohou určit, které vlastnosti jsou vhodné pro odlišování skupin. Jiná studie se zabývá fylogenetikou 67 populací rodu *Aulacoseira* a kombinuje nukleotidové sekvence, kvalitativní a kvantitativní morfometrická data a nový typ charakteristiky, používající spojitě kvantitativní proměnné popisující ontogenetické a alometrické trajektorie během životního cyklu (Edgar & Theriot, 2004). Zmenšování rozsivek během životního cyklu provázejí tvarové změny a kvantitativní posuzování takovéto variability bývá opomíjeno (Edgar & Theriot, 2004). Ze studie vyplývá, že morfometrika nám umožňuje posuzovat variabilitu vlastností a transformace mezi druhy, a tím získávat hypotézy o vztazích mezi populacemi a druhy. V morfometrické studii střeoevropských druhů rodu *Micrasterias* byla použita analýza relativních warpů pro znázornění hlavních trendů v morfologické variabilitě a shlukovací analýza pro odhalení seskupení jednotlivých druhů uvnitř rodu. Výsledky landmarkové analýzy se shodovaly s tradičním určováním druhů (Neustupa & Štátný, 2006).

Při morfometrických studiích zabývajících se taxonomií je vždy otázkou, do jaké míry jsou studované znaky fylogeneticky relevantní. Z tohoto hlediska stojí za zmínku studie zabývajících se zjišťováním fylogenetických signálů v morfometrických datech (Klingenberg & Gidazewski, 2010). Způsob, jakým kombinovat morfometrická data a výsledky fylogenetických analýz je stále předmětem diskuse. Častý rozpor výsledků vzbuzuje otázku, zdali je možné podle morfometrických dat odhadovat charakter fylogeneze. Fylogenetický signál je přítomen, pokud fylogeneticky příbuzné organismy jsou si fenotypově bližší než nepříbuzné. To je možné studovat pomocí zjišťování shody mezi fylogenetickými a fenetickými stromy konstruovanými pomocí morfometriky (Klingenberg & Gidazewski, 2010).

1.3.3.3 Geometrická morfometrika a fenotypová plasticita

Fenotypová plasticita je schopnost organismu měnit fenotyp v závislosti na podmínkách prostředí a je to alternativa ke genetické změně. Různé organismy, nebo i znaky na organismech mohou vykazovat odlišnou míru plasticity. Přes množství studií se genetická a vývojová podstata plasticity jeví nejasná kvůli nedostatku vhodných nástrojů pro zkoumání fenotypových výstupů a vývojových mechanismů (Debat, 2003).

První studii fenotypové plasticity a alometrie zkoumané pomocí metod geometrické morfometrie provedl Debat et al. (2003). Zabývá se fenotypovou plasticitou křídla drosophily v závislosti na teplotě pomocí metod geometrické morfometrie. Podle autorů nám geometrická morfometrika dovoluje separovat tvarové změny spojené se změnou velikosti (alometrická složka) a přitom zachovat informaci o variabilitě tvaru spojené například s měnicími se parametry prostředí (nealometrická složka). To přináší možnost vztáhnout zákonitosti tvarových změn k známým vývojovým procesům zapojeným v morfogenezi (Debat et al., 2003).

Zajímavou studii z oblasti algologie na toto téma prováděli Neustupa a Hodač (2005). Zkoumali fenotypovou plasticitu přírodních populací zelené řasy druhu *Pediastrum duplex* v závislosti na pH. PH vodního prostředí je důležitý faktor ovlivňující morfologii sladkovodních řas a mohl by být užitečný v paleoekologických rekonstrukcích a zkoumání vztahu environmentálních podmínek a tvarové dynamiky. Jiný typ studie se týká fenotypové plasticity řas dlouhodobě pěstovaných v kulturách (Neustupa, 2005).

Za zmínku jistě stojí studie Potapové & Hamiltona (2007), kteří se zabývali morfologickou a ekologickou variabilitou rozsivek druhového komplexu *Achnatidium minutissimum*. Autoři brali v úvahu, že morfologická kritéria nemusí být dostatečná pro rozlišování mezi druhy a pokoušeli se najít vztah mezi morfologickými trendy a podmínkami prostředí. Ve studiích tohoto typu není cílem zjišťovat, zdali je morfologická variabilita podložena geneticky, nebo je způsobena fenotypovou plasticitou, ale spíše odhalit, jestli určité morfotypy odpovídají konkrétním podmínkám prostředí, a případné výsledky použít například v bioindikaci.

1.4 Shrnutí

Nejprobádanější oblastí biologie rozsivek je bezpochyby morfologie jejich křemičité buněčné stěny. Vědci se jí zabývají již více než sto let, v podstatě od doby, kdy byl vynalezen

světelný mikroskop. Díky poměrně úzkým ekologickým nárokům jednotlivých taxonů a zachovatelnosti schránek v sedimentech jsou rozsivky hojně využívány při biomonitoringu a v paleolimnologii. Komplikovaná struktura buněčné stěny nazývaná frustula vyžaduje adekvátní morfogenetický aparát, který je studován od doby, kdy to umožnila elektronová mikroskopie. Řada procesů již byla objasněna, nicméně stále nevíme, jak probíhá přenos morfogenetické informace do struktur tvořících výslednou ornamentaci schránky.

Životní cyklus, charakteristický zmenšováním buněk v populaci během vegetativní fáze, je také detailně studován, ovšem přináší řadu problémů například taxonomům, protože zmenšování buněk působí na jejich tvar, který je při určování zásadní. Přes množství studií zabývajících se životním cyklem je vliv alometrie a obecně tvarová dynamika během vegetativní fáze málo prozkoumána. Potřeba probádat tuto oblast nemá však jen taxonomické důvody, ale i otázky obecnějšího rázu, jako je evolučně-vývojová podstata tohoto procesu. Z tohoto důvodu je tvarová dynamika během životního cyklu tématem experimentální části mé bakalářské i navazující diplomové práce.

Taxonomie rozsivek, i přes morfologickou probádanost schránek, je komplikovanou záležitostí, a to právě proto, že morfologická terminologie je až příliš bohatá a postupem času ztratila na přehlednosti. Taxonomové se proto často uchylují k tradiční morfometrice, která má však řadu nevýhod. Navíc je známo, že morfologicky definované druhy neodpovídají molekulárním datům a křížícím pokusům. Druhový koncept je tedy stále předmětem diskuse. Nyní se zdá, že nejvhodnější je polyfázický neboli holistický přístup, který kombinuje molekulární data, morfologii a křížící experimenty, ale ani ten není konečným řešením, protože data z těchto tří zdrojů jsou často rozporuplná. Jednou z cest, jak se dá uchopit složitá morfologie rozsivek, je geometrická morfometrika, která se dá využít nejen v taxonomických studiích, ale i při zkoumání fenotypové plasticity nebo korelace morfologie s ekologickými nároky. V praktické části své práce jsem metody geometrické morfometricky využila při studiu tvarové dynamiky schránek během životního cyklu.

2 Praktická část

2.1 Úvod

Jak již bylo podrobněji popsáno v teoretické části této práce, rozsivky se během vegetativní fáze svého životního cyklu zmenšují, čímž se liší od většiny organismů, které během života naopak rostou. Tento fenomén je zásadní nejen pro taxonomy, jimž ztěžuje identifikaci druhů (například iniciální buňky jsou často natolik odlišné, že hrozí záměna), (Pappas & Stoermer, 2003), ale navíc vyvolává řadu zajímavých otázek týkajících se fenotypové plasticity i epigenetických změn. Je proto nezbytné prozkoumat tvarovou dynamiku tohoto procesu. Nástroje geometrické morfometriky nám umožňují uchopit tvarové změny během zmenšování daného kmene a zjišťovat, jak jsou tvarově variabilní jednotlivé velikostní skupiny.

Dá se předpokládat, že ve vegetativní fázi životního cyklu mohou přibývat odchylky a nepravidelnosti v morfologii křemičité schránky a kvůli zmenšování se může měnit celkový tvar buňky, při čemž obnovu původního tvaru schránky pak zajišťuje sexuální rozmnožování. Z tohoto důvodu chci ve své budoucí diplomové práci porovnat jednak míru asymetrie buněk v jednotlivých velikostních skupinách, dále se budu ptát, zdali buňky, které se více blíží sexuální fázi, jsou jednodušší, čili jestli mají nižší komplexitu. Zkoumat také budu, zda jednotlivé velikostní skupiny mají odlišnou strukturu plasticity a jestli větší buňky jsou tvarově homogennější.

Praktická část mé bakalářské práce slouží jako úvodní studie k práci diplomové a je pojata jako základní analýza dat. K analýze posloužily tři kmeny různých druhů penátních rozsivek, jejichž kultury nám laskavě zaslala Prof. Aloisie Poulíčková z pracoviště Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Součástí analýzy dat byl výpočet disparity (Neustupa & Němcová, 2007) skupiny nejmenších a největších buněk.

Disparita by se dala definovat jako míra tvarové variability daného objektu nebo souboru objektů (Neustupa & Němcová, 2007). Na rozdíl od diverzity se netýká taxonomické rozrůzněnosti, ale v mnoha typech studií může přinášet doplňující informaci, protože diverzita naopak nezahrnuje míru bohatosti tělních plánů. V době, kdy druhový koncept organismů a vztah mezi genotypem a fenotypem je stále předmětem diskuse, je informace, kterou nám disparita přináší, nanejvýš užitečná. Jako nejvhodnější nástroj ke studiu disparity se jeví geometrická morfometrika. V experimentální části své práce jsem zvolila landmarkovou metodu analyzující obrys schránek rozsivek. Jak již bylo výše zmíněno, lez předpokládat, že

dlouhý cyklus vegetativního dělení může pozměnit morfologii buněčné stěny (Veselá et al., 2009), takže cílem analýzy bylo posoudit, zdali nejmenší buňky, které prošly dlouhým vegetativním cyklem a jsou ve fázi těsně před sexuálním rozmnožováním, mají odlišnou disparitu od buněk vzniklých obnovením při sexuálním procesu z auxospory.

2.2 Metody

Kultivace

Pro účely zkoumání disparity u různých velikostních skupin jsem vybrala tři kmeny penátních rozsivek s bilaterální symetrií a raphe rodu *Luticola*, *Navicula* a *Sellaphora*. Kultivovány byly za stálé teploty (18°C) a neměnného osvětlení na Petriho miskách v tekutém médiu WC (Andersen, 2005). Kvůli zajištění stálého množství živin a konstantního pH je nutné médium vyměňovat jednou týdně, a to tak, že z Petriho misky se jednoduše vylije vyčerpané médium a rychle se doplní nové, přičemž shluky buněk obklopené slizem zůstanou přilepené na dně, takže dochází jen k zanedbatelným ztrátám. Přeočkování malé části kultury do nových Petriho misek probíhá přibližně jednou za měsíc, aby nedocházelo k přerůstání buněk přes sebe, a tím k možnému strádání, které by mohlo zapříčinit nežádoucí změny ve tvaru schránek

Tvorba trvalých preparátů a obrazové dokumentace

Přibližně jednou za dva měsíce se vytvoří trvalý preparát z každé kultury, abychom tak získali sérii velikostních skupin od každého kmenu. Cílem této studie je porovnat disparitu největších a nejmenších buněk, takže bylo žádoucí zachytit kmeny při sexuálním rozmnožování, abychom tak měli k dispozici jak nejmenší buňky těsně před tvorbou gamet, tak největší, iniciální a postiniciální.

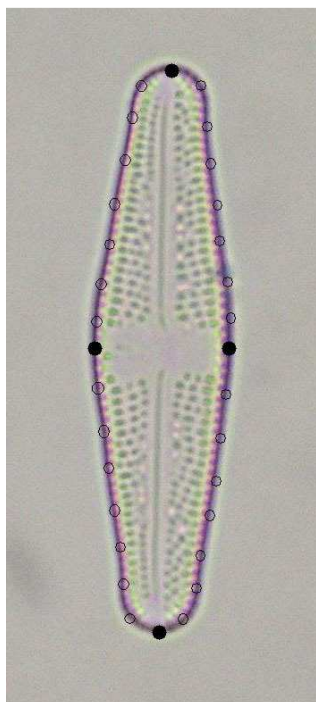
Při tvorbě trvalého preparátu s danou velikostní skupinou je potřeba získat prázdné frustuly vypalováním. Nejdříve byly preparáty žíhány plamenem, ale později se lépe osvědčila chemická oxidační metoda (Poulíčková & Hašler, 2007). Při chemickém vypalování jsou buňky nejdříve ponechány v 30% roztoku peroxidu vodíku a po uplynutí jedné hodiny se přidá malé množství dichromanu draselného. Takto vypálené schránky se pak několikrát po sobě pomocí centrifugy vypláchnou destilovanou vodou a zafixují se do Naphraxu pomocí krycích a podložních sklíček.

Zafixované prázdné schránky jsou foceny fotoaparátem Olympus BX51 při zvětšení 1000x. Orientace schránek na digitálních fotografiích je pak upravena pomocí programu

Adobe Photoshop CS3 ver. 10.0. Zde je potřeba podotknout, že u kultivovaných rozsivek rodu *Luticola* můžeme na rozdíl od dvou dalších studovaných kmenů díky stigmatu na frustule a zatočenému raphe rozlišovat pravou a levou stranu, na což je nutné při úpravě orientace ve Photoshopu pamatovat. Tomuto jevu se budu blíže věnovat ještě v oddílu o symetrizaci, při které hraje důležitou roli.

Landmarky

K analýze bylo použito 35 malých a 35 velkých schránek od každého ze tří kmenů. Po obvodu každé schránky byly aplikovány 4 landmarky a 28 semilandmarků (obr. 8.). Semilandmarky byly zvláště vhodné proto, že se mohou volně posouvat po určitém úseku obrysu a nevyžadují homologní umístění. Pevné landmarky byly vyznačeny na průniku apikální a transapikální osy symetrie s obvodem buňky. K vyznačení landmarků a semilandmarků posloužil program TpsDig (Rohlf, 2004).



Obr. 8. Rozmístění landmarků (plné body) a semilandmarků podél obrysu schránky

Symetrizace

U kultivovaných kmenů rodu *Navicula* a *Sellaphora* není z fotografií možné rozeznat apikální a transapikální orientaci buněk, u rodu *Luticola* je možné díky stigmatu a orientaci raphe zjistit alespoň apikální polohu. Jelikož nebylo možné zajistit stejnou orientaci buněk na fotografiích, bylo nutné provést symetrizaci, aby se odstranil vliv náhodných asymetrických

tvárových změn na výsledky analýzy. U rodu *Navicula* a *Sellaphora* byla tedy provedena symetrizace podél obou os symetrie, kdežto u rodu *Luticola* pouze podél osy y.

Symetrizace byla prováděna podle postupu Klingenberga et al. (2002) v programech Microsoft Excel, WordPad a PAST 1.79.

Analýza dat

K znázornění hlavních morfologických trendů v souboru 35 malých a 35 velkých buněk dohromady byla použita analýza relativních warpů a následná analýza hlavních komponent (PCA). Analýza relativních warpů byla provedena v programu TpsRelw (Rohlf, 2004) s použitím symetrizovaných dat. Následovala PCA relativních warpů (PAST 1.79) a znázornění polohy objektů na prvních dvou PCA osách vysvětlujících největší podíl variability (Sigma Plot 9). Hlavní oblasti variability (odchylka od průměrného tvaru) a celkový tvar v určité oblasti grafu byly znázorněny pomocí deformační mřížky (metodou thin-plate spline).

Pro výpočet morfologické disparity v rámci souboru 35 malých a 35 velkých buněk byl použit vzorec pro výpočet euklidovské vzdálenosti:

$$d(\mathbf{p}, \mathbf{q}) = \sqrt{(p_1 - q_1)^2 + (p_2 - q_2)^2 + \dots + (p_n - q_n)^2} = \sqrt{\sum_{i=1}^n (p_i - q_i)^2},$$

kde hodnoty p odpovídají polohám (semi)landmarků jednotlivých objektů v jednotkové velikosti a q průměrné poloze (semi)landmarků. Grafické znázornění variability disparity prostřednictvím krabicových diagramů bylo provedeno v programu SigmaPlot 9.

Pro určení, zda rozdíl ve vypočtených disparitách je statisticky průkazný, byl využit permutační test srovnávající součty s 10 000 permutacemi (program R 2.9.2 a Microsoft Excel).

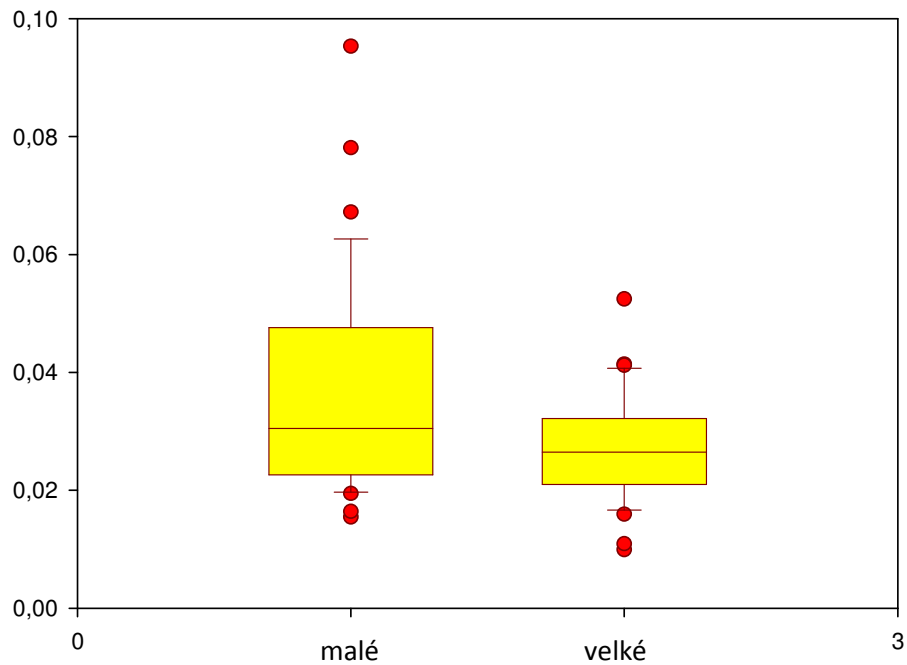
U rodu *Navicula* se zřejmě vyskytla v datech, kterou bohužel nebylo možné identifikovat, takže ve výsledcích uvádím pouze kmeny *Sellaphora* a *Luticola*.

2.3 Výsledky a diskuse

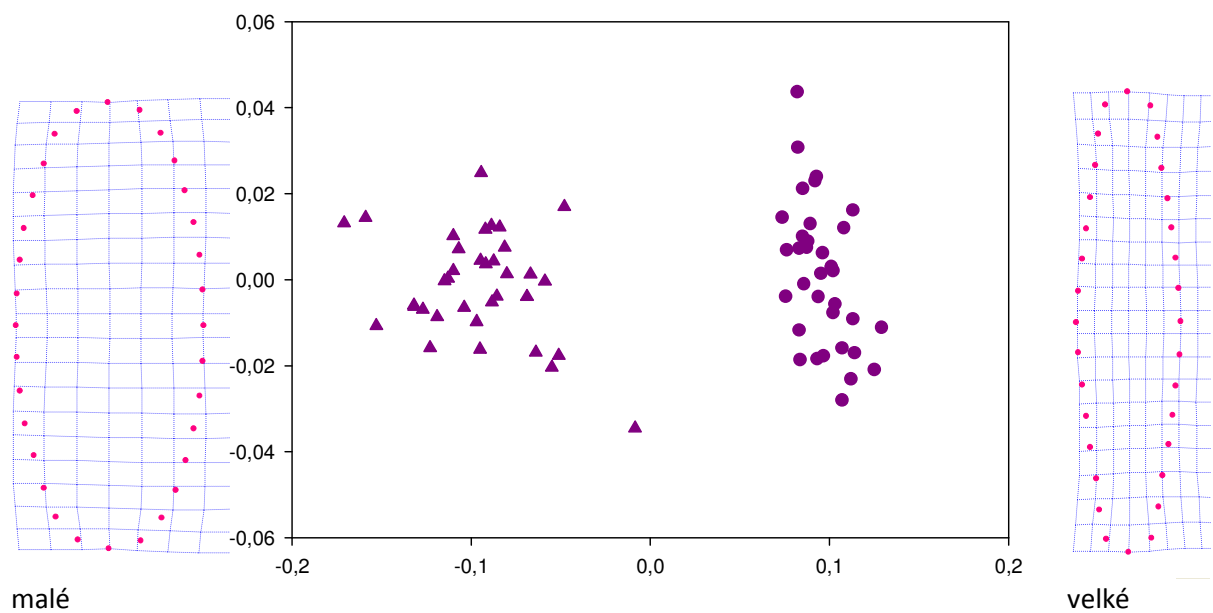
Výsledky PCA jednotlivých kmenů jsou znázorněny v grafech 2. a 4. a tvarové změny ke kterým dochází podél první osy PCA můžeme vidět na obrázcích 9. a 10. Rozdílná míra morfologické disparity je znázorněna v krabicových diagramech 1; 3.

Rod *Luticola*

Graf 1. Morfologická disparita skupiny malých a velkých buněk.



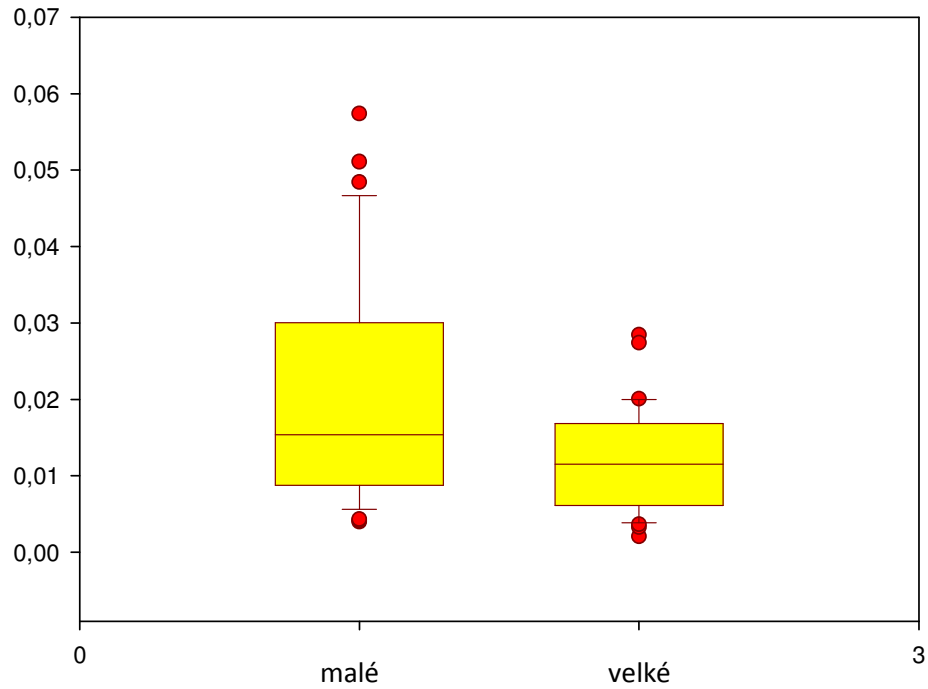
Graf 2. PCA z relativních warpů ukazuje oddělenou skupinu malých (v grafu označených trojúhelníkem) a velkých buněk.



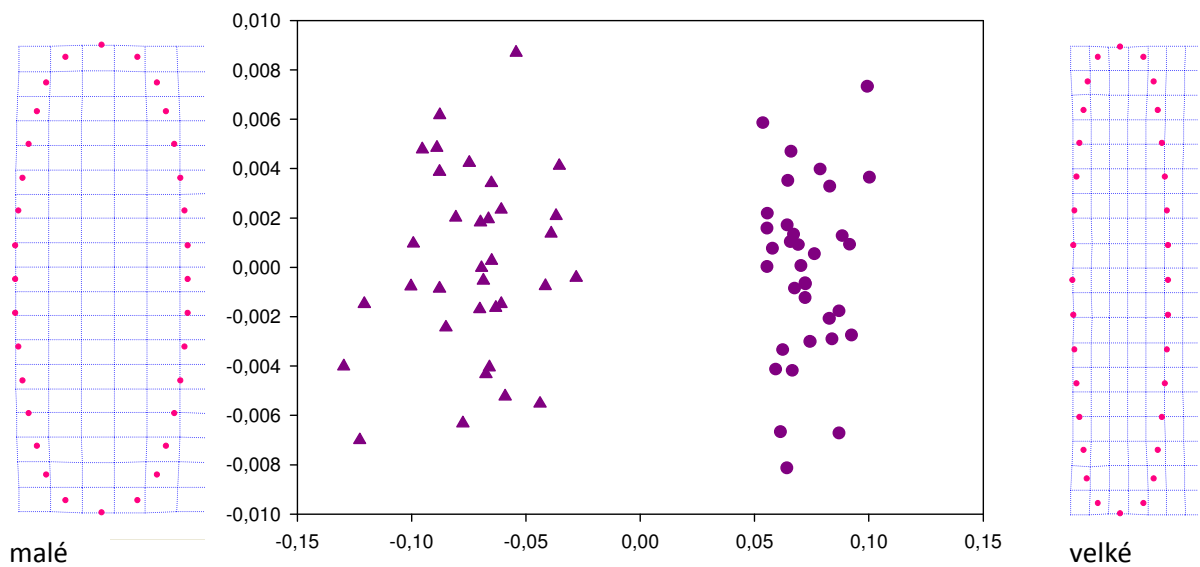
Obr. 9. Pomocí metody thin-plate spline jsou zobrazeny tvarové rozdíly mezi nejmenšími a největšími buňkami.

Rod *Sellaphora*

Graf 3. Odlíšná míra disparity u malých a velkých buněk



Graf 4. PCA relativních warpů



Obr. 10. Tvarové změny zobrazené pomocí metody thin-plate spline

Výsledky ukazují, že malé buňky mají větší morfologickou disparitu než buňky velké ($p < 0.05$), které právě prošly sexuálním rozmnožováním. Větší tvarová variabilita malých buněk může být způsobena dlouhou fází vegetativního množení, protože při opakovaném syntetizování menších částí frustuly může zřejmě docházet k nepřesnostem. Z vizualizace pomocí metody thin-plate spline je patrný určitý směr tvarových změn během zmenšování. Na první pohled je vidět, že dochází k zaoblování a zřejmě k zjednodušování tvaru. Trendy u kmenu *Sellaphora* i *Luticola* jsou podobné.

3 Literatura

ADAMS, D. C.; ROHLF, F. J.; SLICE, D. E. Geometric Morphometrics: Ten Years of Progress Following the 'Revolution'. *Ital. J. Zool.* 2004, 71, s. 5-16.

ANDERSEN, R. A., et al. *Algal culturing techniques*. : Elsevier Academic Press, 2005. 578 s.

BECERRA, J. M.; VALDECASAS, A. G. Landmark superimposition for taxonomic identification. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2003, 81, s. 267-274.

BESZTERI, B.; ÁCS, É.; MEDLIN, L.. Conventional and geometric morphometrics studies of valve ultrastructural variation in two related *Cyclotella* species. *Eur. J. Phycol.* 2005, 40, s. 89-103.

BOOKSTEIN, F. L. Landmark methods for forms without landmarks: morphometrics of group differences in outline shape. *Medical image analysis*. 1996/7, 1, s. 225-243.

COX, E. J. Variation in patterns of valve morphogenesis between representatives of six biraphid diatom genera (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 1999, 35, s. 1297-1312.

DEBAT, V., et al. Allometric and nonallometric components of *Drosophilla* wing shape respond differently to developmental temperature. *Evolution*. 2003, 57, s. 2773-2784.

DZIENGO-CZAJA, M.; KOSS, J.; MATUSZAK, A. Teratological forms of diatoms (Bacillariophyceae) as indicators of water pollution in the western part of Puck Bay (Southern Baltic Sea). *Oceanological and Hydrobiological Studies*. 2008, 37, s. 119-132.

EDGAR, S. M.; THERIOT, E. C. Phylogeny of *Aulacoseira* based on molecules and morphology. *J. Phycol.* 2004, 40, s. 772-788.

ELUND, M. B.; STOERMER, E. F. Ecological, evolutionary, and systematic significance of diatom life histories. *J. Phycol.* 1997, 33, s. 897-918.

FALASCO, E., et al. Diatom teratological forms and ecological alteration: a review. *Hydrobiologia*. 2009, 623, s. 1-35.

FRÁNKOVÁ, M., et al. Geometric morphometrics - a sensitive method to distinguish diatom morphospecies: a case study on the sympatric populations of *Reimeria sinuata* and *Gomphonema tergestinum* (Bacillariophyceae) from the river Bečva, Czech republic. *Nova Hedwigia*. 2009, 88, s. 81-95.

H du Buf and MM Bayer (eds) (2002). *Automatic Diatom Identification*. World Scientific, Series in Machine Perception and Artificial Intelligence, Vol 51. 316 pp.

JONES, H. M., et al. Life history and systematics of *Petronis* with special referenece to british waters. *Eur. J. Phycol.*. 2005, 40, s. 61-87.

KLINGENBERG, Ch. P.; GIDASZEWSKI, N. A. Testing and quantifying phylogenetic signals and homoplasy in morphometric data. *Syst. Biol.*. 2010, 59, s. 245-261.

MANN, D. G. The species concept in diatoms. *Phycologia*. 1999, 38, s. 437-495.

MANN, D. G., et al. The *Sellaphora pupula* species complex: morphometric analysis, ultrastructure and mating data provide evidence of five new species. *Phycologia*. 2004, 43, s. 459-482.

NEUSTUPA, J.. Phenotypic plasticity of microalgal cultures in culture collections: the geometric morphometric approach. *Oceanological and Hydrobiological Studies*. 2005, 3, s. 97-107.

NEUSTUPA, J.; HODAČ, L.. Changes in shape of the cenobial cells of an experimatal strain of *Pediastrum duplex* var. *duplex* (*Chlorophyta*) reared in different pHs. *Preslia*. 2005, 77, s. 439-452.

NEUSTUPA, J.; NEMJOVÁ, K. Quantitative assessment of morphological variation of six *Pseudococcomyxa* strains by geometric morphometrics destriptors. *Fottea*. 2008, 8, s. 111-116.

NEUSTUPA, J.; ŇEMCOVÁ, Y.. A geometric morphometric study of the variatinon of scales *Mallomonas striata* (Synurophyceae, Hetrocontophyta). *Phycologia*. 2007, 46, s. 123-130.

NEUSTUPA, J.; ŠŤASTNÝ, J.; HODAČ, L. Temperatue relatred phenotypic plasticity in the green microalga *Micrasterias rotata*. *Aquat Microb Ecol*. 2008, 51, s. 77-86.

NEUSTUPA, J.; ŠŤASTNÝ, J. The geometric morphometric study of Central European species *Micrasterias* (Zygnematophyceae, Viridiplanteae). *Preslia*. 2006, 78, s. 253-263.

ORSINI, L.; PROCACCINI, G.; SARNO, D.; MONTESOR, M. Mulitple rDNA ITS-types within the diatom *Pseudonitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae) and their relative

abundances across a spring bloom in the Gulf of Naples. *Marine ecology progress series*. 2004, 271, s. 87-98.

PAPPAS, J. L.; FOWLER, G. W.; STOERMER, E. F. Calculating shape descriptors from Fourier analysis: shape analysis of *Asterionella* (Heterokontophyta, Bacillariophyceae). *Phycologia*. 2001, 40, s. 440-456.

PAPPAS, J. L.; STOERMER, E. F. Legendre shape descriptors and shape group determination of specimens in the *Cymbella ciscuta* species complex (Bacillariophyceae). *Phycologia*. 2003, 42, s. 90-97.

POTAPOVA, M.; HAMILTON, P. B. Morphological and ecological variation within the *Achnathidium minutissimum* (Bacillariophyceae) species complex. *J. Phycol.* 2007, 43, s. 561-575.

POULÍČKOVÁ, A.; HAŠLER, P. Aerophytic diatoms from caves in central Moravia (Czech Republic). *Preslia*. 2007, 79, s. 185-204.

POULÍČKOVÁ, A.; MANN, D. G. Sexual reproduction in *Navicula cryptocephala* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 2006, 42, s. 872-886.

RHODE, K. M.; PAPPAS, J. L.; STOERMER, E. F. Quantitative analysis of shape variation in type and modern population in *Meridion* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 2001, 37, s. 175-183.

ROHLF, F. J.; MARCUS, L. F. A revolution in morphometrics. *Tree*. 1993, 8, s. 0.

ROHLF, F. J.. On Applications of geometric morphometrics to studies of ontogeny and phylogeny. *Syst. Biol.* 1998, 47, s. 147-158.

RICHTSMEIER, J. T.; DELEON, V. B.; LELE, S. R. The Promise of Geometric Morphometrics. *Yearbook of physical anthropology*. 2002, 45, s. 63-91.

ROUND, F. E.; CRAWFORD, R. M.; MANN, D. G. *The Diatoms : Biology and Morphology of the genera*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1990. 131 s.

SCHMID, A. M. M. Aspects of morphogenesis and function of diatom cell walls with implications for taxonomy. *Protoplasma*. 1994, 181, s. 43-60.

- SHEATH, R. G. Applications of image analysis and multivariate morphometrics for algal systematics. *J. Phycol.* 1989, 25, s. 3-5.
- STOERMER, E. F.; SMOL, J. P. *The Diatoms: applications for the environmental and earth sciences*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1999. 455 s.
- THERIOT, E.; LADEWSKI, T. B. Morphometric analysis of shape of specimens from the neotype of *Tabellaria flocculosa* (Bacillariophyceae). *Amer. J. Bot.* 1986, 73, s. 224-229.
- TRAPANI, J.. Geometric morphometric analysis of body-form variability in *Cichlasoma mickleyi* the Cuatro Cienegeas cichlid. *Environmental biology of fishes*. 2003, 68, s. 357-369.
- VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. *Algae : An introduction to phycology*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1995. 627 s.
- VANORMELINGEN, P., et al. Genetic divergence and reproductive barriers among morphologically heterogeneous sympatric clones of *Eunotia bilunaris* sensu lato (Bacillariophyceae). *Protist*. 2007, 0, s. 0.
- VANORMELINGEN, P., et al. Congruence of morphological, reproductive and ITS rDNA sequence data in some Australasian *Eunotia bilunaris* (Bacillariophyta). *Eur. J. Phycol.* 2007, 42, s. 61-79.
- VESELÁ, J.; NEUSTUPA, J.; PICHRTOVÁ, M.; POULÍČKOVÁ, A. Morphometric study of *Navicula* morphospecies (Bacillariophyta) with respect to diatom life cycle. *Fottea*. 2009, 9, s. 307-316.
- WERNER, D. *The Biology of Diatoms*. Berkeley and Los Angeles: University of California press, 1976. 498 s.
- ZELDITCH, M., et al. *Geometric Morphometrics for Biologists*. Michigan: Elsevier Academic Press, 2004. 433 s.