

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra botaniky



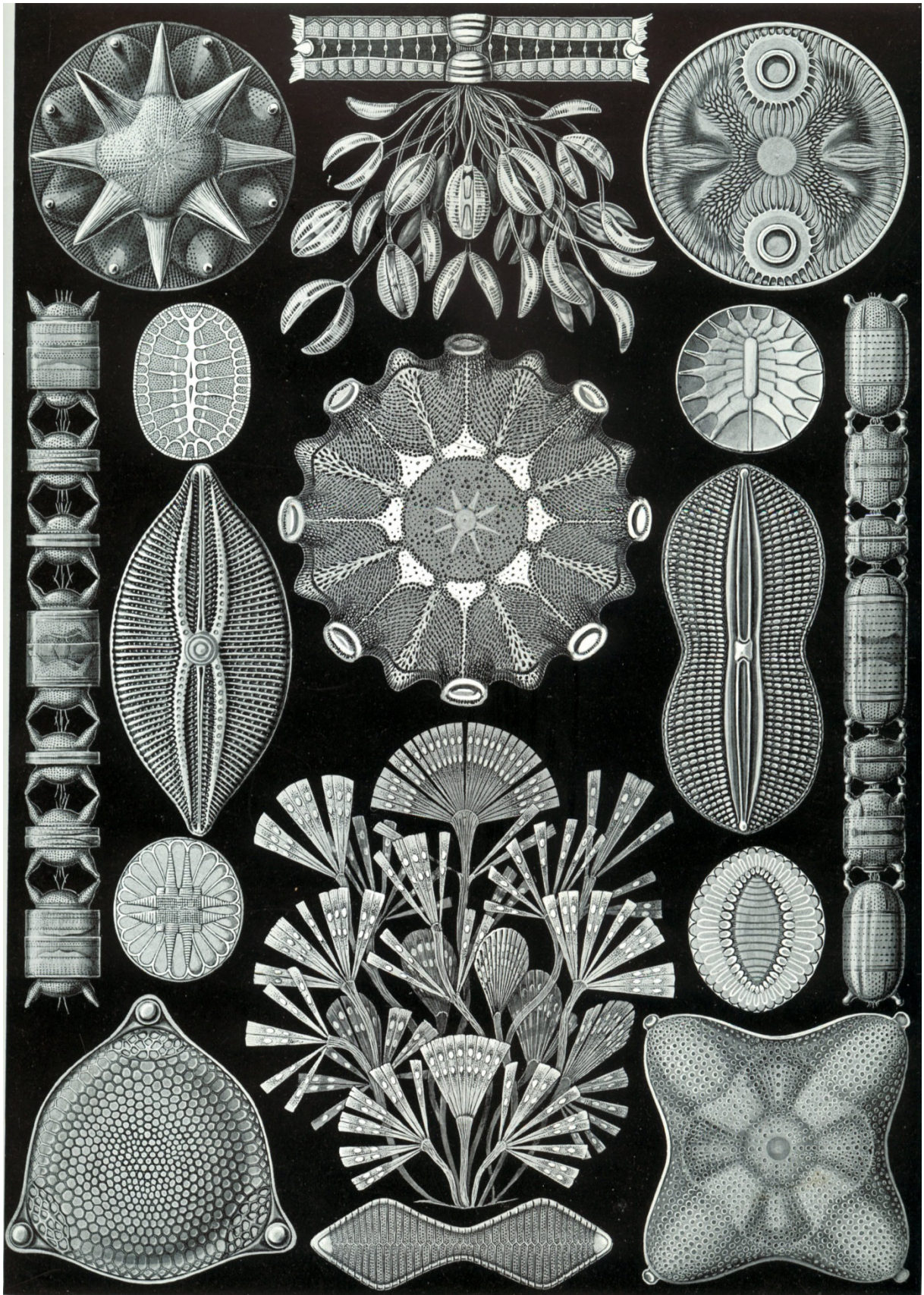
Diplomová práce

# **Tvarová variabilita schránek rozsivek v rámci životního cyklu**

Bc. Kateřina Woodard

2013

Školitelka Mgr. Jana Kulichová Ph.D.



Ernst Haeckel: Diatomea, převzato z [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Haeckel\\_Diatomea.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Haeckel_Diatomea.jpg)

Prohlašuji, že tuto práci jsem vypracovala samostatně, s použitím citované literatury.

V Praze dne

.....

Kateřina Woodard

## *Poděkování*

Své školitelce Janě Kulichové děkuji za to, že mi byla všestrannou a obětavou průvodkyní od mých začátků na algologickém pracovišti a dovedla mě až sem, ke konci magisterského studia. Konzultantu Jiřímu Neustupovi děkuji, že mě zásoboval vědeckými idejemi i ideály, ale také nezbytnou kritikou. Profesorce Aloisii Poulíčkové děkuji za poskytnutí právě se rozmnoživších kultur rozsivek, bez nichž by můj experiment měl nejistou budoucnost. Své rodině - manželovi, rodičům a tchyni - děkuji za trpělivost a pomoc, bez které by tato práce nemohla vzniknout. A svému synovi děkuji, že byl hodný.

## *Abstrakt*

Determinace rozsivkových druhů je založena převážně na morfologii. Určování však komplikuje zmenšování buněk během vegetativní fáze životního cyklu, které je spojeno se změnou tvaru a ztrátou některých důležitých taxonomických znaků. Přestože zmenšování během životního cyklu je obecně známý fenomén, neexistuje na toto téma dostatek studií. V této diplomové práci byly použity čtyři monoklonální populace modelových kmenů penátních rozsivek za účelem studia tvarové dynamiky během životního cyklu. Cílem bylo zjistit podíl alometrie a změny disparity, komplexity a asymetrie buněk během zmenšování. Téměř tři roky probíhala standardizovaná kultivace kmenů a části kultur s různými velikostními stádii byly fixovány do trvalých preparátů. Digitální fotografie buněk sloužily jako výchozí materiál pro analýzy pomocí geometrické morfometriky. Bylo zjištěno, že na tvarové variabilitě mají vysoký podíl signifikantní alometrické změny. Disparita buněk během životního cyklu stoupá a komplexita buněk naopak klesá. Tvarová variabilita je z více než osmdesáti procent tvořena symetrickou složkou. Fenotypová plasticita u monoklonálních populací je zajímavým zjištěním z evolučního hlediska. Pravděpodobně indikuje *constraints*, které způsobuje rigidní křemičitá buněčná stěna, protože zmenšující se buňky se musí vyrovnávat se změnou poměru povrchu a objemu a možnými nepřesnostmi při syntéze buněčné stěny, které se díky způsobu morfogeneze přenáší při vegetativním množení z generace na generaci.

Klíčová slova: rozsivky, životní cyklus, geometrická morfometrika, alometrie, disparita, asymetrie, komplexita

## *Abstract*

The determination of diatom species is mostly based on morphology of a silicified cell wall. It is complicated by the fact of cell diminution during the vegetative phase of the life cycle, which is connected with shape changes and loss of some taxonomically important characters. Even though the diminution during the life cycle is generally known phenomenon, there is a lack of studies on this theme. In this master's thesis, four monoclonal populations of model pennate diatom strains were used in order to study shape dynamics during the life cycle. The strains were cultivated for almost three years and parts of the cultures with a different size stages were fixed in permanent preparations. The digital photographs of the cells were used as a material for the geometric morphometrics analyses. The study revealed high contribution of significant allometric changes to an overall shape variability. During the vegetative phase of the life cycle, disparity of the cells increases and complexity of the cells decreases. The contribution of symmetric variability to an overall shape variability is more than eighty percent. Phenotypic plasticity in a monoclonal population is an interesting finding from an evolutionary point of view. It may indicate *constraints* caused by the silica cell wall. During the size diminution the cells have to deal with changes of surface and volume ratio. Also because of the way of morphogenesis, possible errors in synthesis are probably accumulating through the vegetative generations.

Key words: diatoms, life cycle, geometric morphometrics, allometry, disparity, asymmetry, complexity

## Obsah

1	Úvod.....	8
1.1	Rozsivky (Bacillariophyceae).....	8
1.2	Morfologie a životní cyklus.....	8
1.3	Druhový koncept .....	10
1.4	Ontogeneze, prostředí a fenotypová plasticita.....	11
1.5	Shrnutí úvodní části a cíle práce.....	13
2	Metody .....	14
2.1	Kultivace.....	14
2.2	Příprava a trvalých preparátů a zpracování digitálních fotografií .....	15
2.3	Geometrická morfometrika.....	17
2.3.1	Landmarky .....	18
2.3.2	Symetrizace.....	19
2.3.3	Superimpozice a analýza relativních warpů .....	20
2.4	Alometrie .....	21
2.5	Disparita.....	21
2.6	Komplexita .....	22
2.7	Asymetrie.....	22
3	Výsledky .....	24
3.1	Celková tvarová variabilita.....	24
3.2	Rekonstrukce tvaru pomocí transformačních mřížek.....	27
3.3	Alometrie .....	27
3.4	Disparita.....	29
3.5	Komplexita .....	29
3.6	Asymetrie.....	31
3.7	Shrnutí výsledků .....	36
4	Diskuze .....	38
4.1	Zmenšování a tvar buněk.....	38
4.2	Tvarová dynamika v laboratorních podmínkách .....	41
4.3	Fenotypová plasticita.....	41
5	Závěr .....	43
6	Literatura.....	44

# 1 Úvod

## 1.1 Rozsivky (Bacillariophyceae)

Rozsivky jsou eukaryotní jednobuněčné řasy s pevnou křemičitou buněčnou stěnou. Ve vegetativní fázi životního cyklu jsou unikátně diploidní. Jejich bičíkatá stádia, která pozorujeme jen u evolučně starších linií, mají znaky typické pro skupinu Heterokontophyta (Simpson & Roger, 2004). Jsou abundantní ve fytoplanktonu a fytoentosu mořských, sladkovodních a mokřadních biotopů. Ve sladkovodních tocích tvoří až 90% fytoenostu (Round et al., 1990; Van Den Hoek, 1995). Vyskytují se ale i v aeroterestrickém a půdním prostředí (Sims et al., 2006). Fosilní rozsivky se poprvé objevují v mezozoiku, ve svrchní křídě jsou v naprosté většině mořské centrické a penátní rozsivky zaznamenáváme v terciéru (Round et al., 1990). Miliony let stará rozsivková paleoflóra nám umožňuje studium klimatických, geomorfologických a biologických změn (Round et al., 1990). Kromě paleolimnologických rekonstrukcí jsou rozsivky dobře využitelné pro ekologický biomonitoring (Stoermer & Smol, 1999).

## 1.2 Morfologie a životní cyklus

Rozsivková křemičitá schránka frustula 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, které je tvořeno páskovitými elementy, z nichž část je asociována s epithékou a část s hypotékou, takže jej také dělíme na hypocingulum a epicingulum (Round et al., 1990; Schmid, 1994), (Obr. 1.1). Jediný způsob, jak buňka může v pevné schránce zvětšovat svůj objem, je přirůstání pásků hypocingula. Při buněčném dělení se formují nové hypothéky, zatímco dvě sourozenecké buňky jsou stále uzavřeny v mateřské buněčné stěně (Schmid, 1994). Výsledkem je, že schránky rozsivek se během vegetativní fáze životního cyklu postupem času zmenšují. Někteří autoři (Chepurnov, 2004) pro tento jev používají výraz MacDonalдово-Pfizerovo pravidlo, podle MacDonalda (1869) a Pfizera (1869), kteří tento fenomén objevili téměř současně. V určitém momentě buňky dosáhnou nejmenší možné velikosti (u většiny druhů přibližně 40 – 30% z původní velikosti), což Geitler (1932) nazývá *první kardinální bod*. Pokud je vnější prostředí příznivé, spustí se v populaci synchronizovaně pohlavní proces. Po splynutí gamet se vytvoří auxospora, která je i u penátních rozsivek nejdříve kulovitá stejně

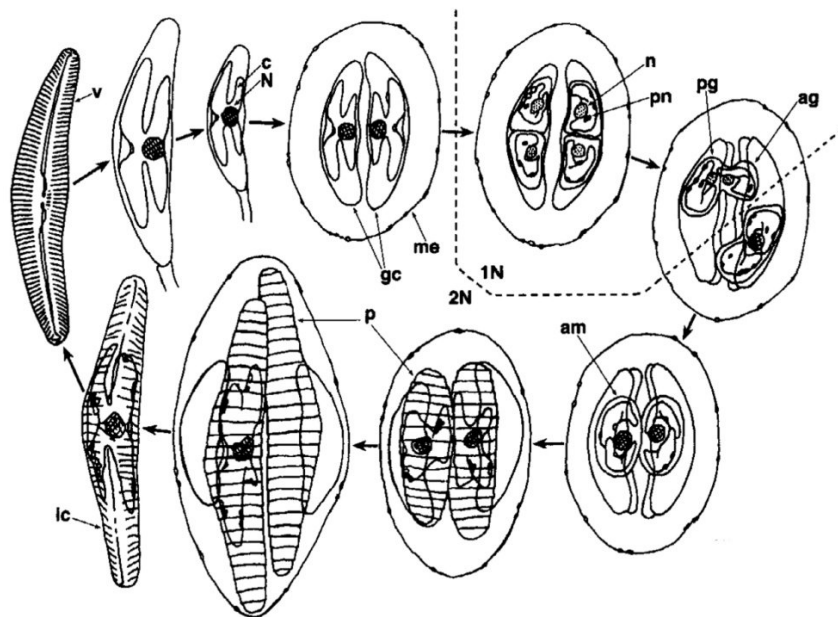


jako u centrických, ale získá bipolární tvar díky křemičitým páskům perizonia (Obr. 1.2). Z auxospory vzniká iniciální buňka, která má již opět obnovenou původní velikost, ale její morfologie je od normálních vegetativních buněk poněkud odlišná. Po dělení iniciální buňky již vznikají schránky s typickou morfologií (Van Den Hoek, 1995; Elund & Stoermer, 1997), (Obr. 1.2).

Sexuální rozmnožování nemusí být jediný způsob, jak mohou buňky obnovit svou původní velikost. Známa je také partenogeneze nebo vegetativní zvětšení (Round et al., 1990; Elund & Stoermer, 1997).



**Obr 1.1** Jednotlivé části frustuly: E – epivalva, EC – epicingulum, HC – hypocingulum, H – hypoalva (převzato z Round et al., 1990)



**Obr 1.2** Životní cyklus penátní rozsivky *Cymbella cistula*, am – membrána auxospory, p – perizonium, ic – iniciální buňka (převzato z Elund & Stoermer, 1997).

### 1.3 Druhový koncept

Odhady druhové diverzity rozsivek se v současné době pohybují kolem milionu druhů (Mann, 1999), což se vyrovná například i početnosti členovců, kteří byli považováni za bezkonkurenčně nejdiferzifikovanější skupinu organismů. Starší odhady však vůbec nebyly tak ambiciózní. Původní druhový koncept byl založený na morfologicky definovaných druzích s kosmopolitním rozšířením. Nyní se však zdá, že tato představa byla zdrojem značného podhodnocení druhové diverzity rozsivek (Mann, 1999; 2004).

Pro hodnocení druhové bohatosti bylo zásadní postulování definice biologického druhu (Mayr, 1942), ze které vyplývá, že jedinci stejného druhu se mohou křížit a jsou reprodukčně izolovaní od jedinců jiných druhů. Řada taxonomických studií, založená na pozorování reprodukční izolace a provádění křížících pokusů, napomáhá odhalování kryptické diverzity rozsivek, a hovoří tak pro značně užší druhový koncept (Rhode et al, 2001; Mann, 2004; Amato, 2007). Ovšem ani schopnost křížení není dostačujícím znakem pro stanovení hranic druhů. Teorie biologického druhu je těžko aplikovatelná na alopatriké a alochronické populace, tedy takové, které se vyvíjejí na jiných místech a v jiném čase (Mann, 2010). Je možné, že i druhy sexuálně kompatibilní mohou být prostorově a časově izolovány (Behnke, 2004).

Také molekulární data ukazují, že druhová diverzita je mnohem větší, než je možné rozpoznat s využitím tradičních morfologických znaků (Edgar & Theriot, 2004; Vanormelingen, 2007; Beszteri, 2007). Problematické však je, že molekulární markery nemusejí reflektovat ekofyziologickou diferenciaci kmenů (Lowe et al., 2005). Značné komplikace s definicí rozsivkových druhů nastávají proto, že se molekulární, reprodukční a morfologické vlastnosti nevyvíjejí synchronně a výsledky různě zaměřených taxonomických studií se pak mohou lišit. Zajímavé řešení přináší Queiroz (2005); podle něj jsou druhy samostatně se vyvíjející metapopulace, které nemusejí být feneticky odlišitelné, monofyletické, reprodukčně izolované nebo ekologicky odlišné, jen společně evoluující (Queiroz, 2005). Metapopulační koncept zároveň tyto charakteristiky nevylučuje a počítá s tím, že monofylie molekulárních markerů, reprodukční izolace, ekofyziologická diferenciacie se u různých linií vytváří v různou dobu a v různém pořadí a že daná linie pravděpodobně tyto vlastnosti během doby získá (Queiroz, 2005).

V současné době se zdá, že morfologie má své limity a zjevně neexistuje unikátní kombinace znaků, které by napomáhaly diagnostikování jednotlivých druhů (Trobajo, 2009). Křížení a molekulární data ukazují rozdíly mezi populacemi, které je takřka nemožné

morfoložicky odlišit. Nicméně většinou i dnes první kroky při výzkumu vedou k mikroskopu a studiu morfoložie. V tomto případě je podle Manna (2010) nutné porozumění ontogenezi, životnímu cyklu a fenotypové plasticitě, která je s vývojem rozsivek těsně spojená a v minulosti způsobovala v taxonomii značné množství chyb. Ve většině případů je míra fenotypové plasticity neznámá, měla by se testovat v experimentálních podmínkách (Mann, 1999). Na tomto poli se také uplatňuje geometrická morfometrika, pomocí které je možné uchopit tvar jako celek a nikoli pouze jako soubor měření a počtu či přítomnosti určitých znaků. Údaje o délce a šířce se velmi často překrývají i v rámci jednoho organismu během životního cyklu a geometrická morfometrika se ukazuje jako dobrá metoda pro morfoložické odlišení různých taxonů, ale i ontogenetických stádií (Pappas et al., 2001; Pappas & Stoermer, 2003; Veselá, 2009). V následující kapitole bude podrobněji probrána právě fenotypová plasticita, a to jak ve vztahu k ontogenezi, tak ve vztahu k abiotickým podmínkám prostředí.

#### **1.4 Ontogeneze, prostředí a fenotypová plasticita**

Z teoretického hlediska se fenotypová plasticita nejčastěji popisuje jako vlastnost daného genotypu produkovat různé fenotypy jako odpověď na podmínky prostředí. Nemusí to být však prostředí vnější, na nějž se typicky zaměřují studie fenotypové plasticity, ale také vnitřní, tedy vnitrobuněčné a mezibuněčné interakce (Pigliucci, 2001). V této kapitole se budu zabývat vztahem tvarové variability a vnějšího abiotického i vnitřního buněčného prostředí.

Představa, že schránky rozsivek se věrně kopírují z generace na generaci, se spíše traduje a není příliš podložena vědeckými daty. Několik současných studií poukazuje na fakt, že polymorfismus u těchto jednobuněčných řas není výjimečným jevem. Podle Kociolka a Stoermera (2010) má tato tvarová variabilita tři zdroje – genetický, ontogenetický a environmentální. Zde se budu zabývat primárně ontogenetickými a environmentálními vlivy. Dá se však říci, že díky morfoložii rozsivkové buněčné stěny jsou tyto dva faktory do značné míry provázané. Změny tvaru v závislosti na prostředí mají totiž také vývojový charakter, protože probíhají pouze během ontogeneze buňky a v momentě, kdy se ukončí tvorba křemičité buněčné stěny, žádné modifikace už probíhat nemohou; změny v morfoložii jsou nevratné.

Při buněčném dělení a následné tvorbě nové poloviny buněčné stěny působí na buňku různé vlivy prostředí – koncentrace látek a osmotické efekty, pH, přítomnost těžkých kovů, trofie (Kociolek & Stoermer, 2010). Mechanismy tvorby valvy<sup>1</sup> jsou vysoce sensitivní k prostředí a to může ovlivňovat morfogenezi. Tato citlivost spolu se specifickým způsobem dělení způsobuje vysokou míru fenotypové plasticity u mnoha druhů (Schmid 1994). Fenotypová plasticita však může být i nenáhodná - Theriot a Stoermer (1984) uvádí rozdíly v morfologii rozsivek rodu *Stephanodiscus* v závislosti na poměru křemíku a fosforu v různých oblastech Velkých jezer v USA. Později Theriot (1988) popisuje tvarové změny jako adaptace s jasnou selektivní výhodou – snižování nároků na křemík pomocí modifikace schránky, změny rychlosti klesání pomocí formování kolonií. Otázku o vztahu ekologických a morfologických vzorců si kladli také Potapova a Hamilton (2007) ve své studii druhového komplexu *Achnantheidium minutissimum*. Podle této studie mají určité morfotypy specifické ekologické nároky. Do jiné kategorie spadají teratologické formy, které vznikají, když jsou rozsivky během reprodukce vystaveny environmentálním stresům. Může se měnit obrys valvy i striace<sup>2</sup>, ale oproti výše popsanému polymorfismu nejsou tyto nahodilé tvarové změny adaptivní nebo neutrální, ale naopak většinou snižují individuální fitness (Falasco, 2009).

Z hlediska této práce jsou však nejzajímavější tvarové změny spojené s životním cyklem. Geitler (1932) a později i další autoři (Theriot & Ladewski, 1986; Schmid, 1994; Elund & Stoermer, 1997) si všimli, že během zmenšování má obrys valvy tendenci se zaoblovat a ztrácet záhyby a poměr délky a šířky se snižuje. Tato alometrická změna proporcí (tedy spojená se změnou velikosti) je provázena také ztrátou některých taxonomicky významných znaků (Schmid, 1994). Morfometrická analýza monoklonálních kultur rodu *Navicula* jasně odlišila postiniciální buňky od sexuálně kompetentních bez ohledu na jejich příslušnost k různým druhům (Veselá et al., 2009). V totožných vzorcích se však vyskytuje i variabilita, která není spojená se změnou velikosti ani faktory prostředí. Je možné, že takováto variabilita je spojená s genetickými rozdíly, ale tato oblast nebyla prozkoumána (Kociolek, 2010).

---

<sup>1</sup> Valva je méně formální termín označující théku, užívá se hlavně v anglicky psané literatuře.

<sup>2</sup> Pojem striace se užívá pro označení vzoru a hustoty strií. Strie jsou zdánlivě linie na thékách tvořené pravidelně řazenými otvory ve schránce.

## 1.5 Shrnutí úvodní části a cíle práce

Rozsivky jsou řasy s unikátní morfologií, která fascinuje vědce v podstatě od doby, kdy byl vynalezen optický mikroskop. Tvar křemičitých schránek, vzor a striace jsou tradičními systematickými znaky, které však mohou být do jisté míry matoucí, protože rozsivkové buněčné stěny vykazují značnou míru polymorfismu. Jak naznačují novodobé taxonomické studie, pro determinaci druhů je morfologie nedostačující. I přesto, že oproti dobám minulým morfologie v současnosti takto ztrácí na významu, při běžném určování je stále první a nejčastější zkoumanou vlastností. Zdá se také, že různé morfotypy korelují s faktory prostředí, což je vlastnost dobře využitelná v ekologii.

Životní cyklus rozsivek je velmi specifický. Narozdíl od většiny organismů se během svého životního cyklu zmenšují, což má řadu fyziologických a morfologických konsekvencí, jako jsou proporcionální tvarové změny (Schmid, 1994). Kromě alometrické složky variability se vyskytuje i nealometrická, tato oblast však zatím nebyla prozkoumána. Několik autorů se věnovalo korelaci tvarových změn a faktorů prostředí, studií zabýjících se kvantifikací tvarové dynamiky ve vztahu k životnímu cyklu je však nedostatek. Podle Manna (1999, 2010) je porozumění ontogenezi, životnímu cyklu, fenotypové plasticitě a polymorfismu nutné při snaze o uchopení rozsivkových druhů. Ve většině případů je podle něj míra fenotypové plasticity neznámá a měla by se testovat v experimentálních podmínkách pro více modelových druhů rozsivek.

Cílem této práce je prozkoumat tvarovou dynamiku schránek rozsivek čtyř monoklonálních kultur během životního cyklu v relativně stálých experimentálních podmínkách, protože jak se zdá, tato oblast je velmi málo probádaná. Předkládaná studie by měla přesahovat taxonomicko-morfologické problémy a od jednotlivostí by měla směřovat k obecnějším závěrům, které by mohly přispět k současné diskusi o vývojové plasticitě protistních organismů a poukázat k možným zdrojům variability.

Konkrétně jsem se zabývala otázkami, jaké procento tvarových změn je spojeno s velikostí; jestli a jak se s větším počtem vegetativních dělení mění disparita, komplexita a asymetrie buněk, zda jsou tyto změny plynulé nebo skokové a jak jsou si treny vzájemně podobné mezi studovanými kmeny. Ke zjištění těchto otázek bylo potřeba kultivovat modelové kmeny rozsivek po takovou dobu, aby bylo možné zachytit celý jejich životní cyklus a jednotlivá velikostní stádia pak zanalyzovat pomocí metod geometrické morfometriky. O metodách této práce bude pohovořeno v následující kapitole.

## 2 Metody

### 2.1 Kultivace

#### *Kmeny*

Pro experiment jsem využila čtyři monoklonální kultury penátních rozsivek *Navicula cryptocephala*, *Sellaphora puppula* a *Luticola dismutica* (dva kmeny tohoto druhu), které jsem získala od prof. A. Poulíčkové z pracoviště Univerzity Palackého v Olomouci. Kmeny *Sellaphora puppula* a *Navicula cryptocephala* mi byly zaslány právě v momentě jejich sexuálního rozmnožování, a tak bylo možné již v začátku experimentu zachytit nejmenší a největší velikostní stádia životního cyklu. Vegetativní fáze může mít trvání v řádu roků až desítek let (Elund & Stoermer, 1997), takže bez zaslání těchto kmenů by byla budoucnost experimentu poměrně nejistá. Nicméně po několika měsících kultivace se začaly sexuálně rozmnožovat i zbylé dva kmeny druhu *Luticola dismutica*. Všechny čtyři kmeny jsou homothalické, takže pohlavní proces mohl proběhnout v monoklonálních kulturách. Přibližně během dvou let došlo u všech kmenů k zopakování sexuálního procesu nebo alespoň zmenšení to takové míry, že bylo možné zdokumentovat všechna velikostní stádia. Pro přehlednost je v tabulce č. 2.1 uvedena časová dokumentace.

	počátek standardizované kultivace	pozorování pohlavního rozmnožování	ukončení standardizované kultivace
<i>Sellaphora puppula</i>	26. 11. 2009	14. 12. 2009	podzim 2011
<i>Navicula cryptocephala</i>	26. 11. 2009	14. 12. 2009	podzim 2011
<i>Luticola dismutica M48</i>	26. 11. 2009	31. 3. 2010	podzim 2011
<i>Luticola dismutica 59</i>	26. 11. 2009	3. 9. 2010	podzim 2011

**Tab. 2.1** Časový harmonogram

#### *Médium*

Pro kultivaci bylo použito WC médium (Andersen, 2005). Příprava média spočívá ve smísení chemických látek uvedených v tabulce č. 2.2, následné doplnění směsi destilovanou vodou na objem jednoho litru a sterilizaci v autoklávu. Po sterilizaci je přidávána směs vitaminů a vodný roztok křemičitanu sodného pomocí stříkačky se sterilizačním filtrem.

množství	chemikálie	zásobní roztok/100 ml H <sub>2</sub> O	pozn.
1 ml	CaCl <sub>2</sub>	3,18 g	
1 ml	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,7 g	
1 ml	NaHCO <sub>3</sub>	1,26 g	
1 ml	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,87 g	
1 ml	NaNO <sub>3</sub>	8,5 g	
1 ml	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	2,84 g	po klávkování
1 ml	stopové prvky		
1 ml	vitamínový roztok		po klávkování
115 mg	HEPES		pufr

**Tab. 2.2** WC médium

### *Standardní podmínky*

Kultury byly pěstovány na Petriho miskách o průměru 7 cm, při teplotě 18°C a dvacetičtyřhodinovém osvětlení zářivkou. Aby se předešlo vyčerpání živin v médiu a tedy případnému strádání buněk, bylo nutné médium vyměňovat každý týden. Kultury rozsivek rostou přilepené ve slizu na dně Petriho misek, takže bylo možné jen médium vylít a rychle přidat nové, aby nedošlo k vyschnutí buněk. Přibližně jednou za měsíc pak bylo nutné kultury přeočkovat na nové misky, aby nedocházelo k přerůstání buněk.

## **2.2 Příprava a trvalých preparátů a zpracování digitálních fotografií**

Přibližně jednou za dva měsíce se odebíraly vzorky buněk ze všech čtyř kultur a vytvářely se trvalé preparáty za účelem dokumentace tvarových změn frustul během vegetativní fáze životního cyklu. Při tvorbě trvalého preparátu je potřeba získat prázdné frustuly vypalováním. Nejdříve byly frustuly čištěny pomocí žhánění 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 byly foceny fotoaparátem Olympus BX51 při zvětšení 1000x. Z každého preparátu se pořídily fotografie přibližně padesáti buněk. V preparátech,

kde byly zachyceny vzorky kultur při sexuálním rozmnožování, a vyskytovaly se tam tedy buňky největší a nejmenší, se pořídilo 50 snímků postiniciálních a 50 presexuálních. Následně se fotografie upravovaly pomocí programu Adobe Photoshop CS3 ver. 10.0. Nejprve bylo potřeba upravit orientaci buněk tak, aby byly všechny ve stejné poloze. Zde je nutné podotknout, že u kultivovaných rozsivek rodu *Luticola* můžeme na rozdíl od dvou dalších studovaných kmenů díky stigmatu na frustule a stočení 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.

Poté se buňky třídily do jednotlivých velikostních skupin. V preparátech se vždy vyskytovaly buňky různých velikostí (nikoli však celé velikostní spektrum), takže nemělo smysl velikostní skupiny dělit podle data preparátu. Bylo tedy nutné u každého kmenu najít největší buňku a od té pak odstupňovat jednotlivé velikostní skupiny – viz tabulku č. 2.3. Pro každou velikostní skupinu se pak vytvořil referenční rámeček a jednotlivé buňky se podle těchto rámečků zařazovaly do skupin. Nejčastější velikost penálních rozsivek při sexuálním rozmnožování se v literatuře uvádí 40% – 30% (Elund & Stoermer, 1997), nicméně velikost, při které se různé druhy rozivek rozmnožují, je druhově specifická, což je pravděpodobně důvod, proč byl u studovaných kmenů získán různý rozsah velikostí. Poulíčková & Mann (2006) ve své studii uvádějí, že buňky různých kmenů *Navicula cryptocephala* měly při sexuálním rozmnožování velikost 24 – 26  $\mu\text{m}$  a iniciální buňky 40 – 48  $\mu\text{m}$ , což v přepočtu odpovídá údajům v tabulce.

<i>Luticola</i> 59	<i>Luticola</i> M48	<i>Navicula</i> a <i>Sellaphora</i>
100% - 90% z největší buňky	100% - 90% z největší buňky	100% - 90% z největší buňky
90% - 80%	90% - 80%	90% - 80%
80% - 70%	80% - 70%	80% - 70%
70% - 60%	70% - 60%	70% - 60%
60% - 50%	60% - 50%	60% - 50%
50% - 40%	50% - 40%	---
---	40% - 30%	---

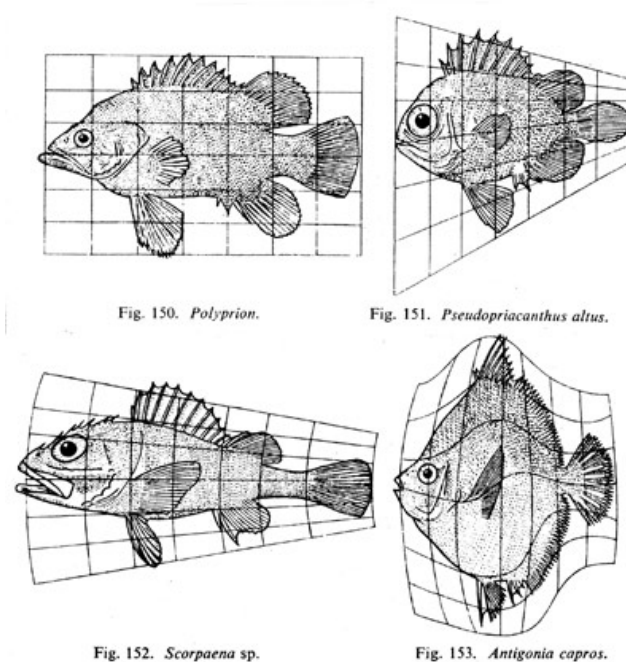
**Tab. 2.3** Velikostní skupiny



## 2.3 Geometrická morfometrika

Morfometrika je metoda studia tvarové variability a její kovariance s dalšími proměnnými. Původně byla tato metoda založena na aplikaci analýz mnohorozměrné statistiky na soubory kvantitativních proměnných, jako je délka, šířka a výška (Adams et al., 2004). Začátkem devadesátých let minulého století proběhla změna ve způsobu, jakým byla data kvantifikována a analyzována. Začal být kladen větší důraz na metody, které umožňovaly podržet informaci o geometrii studovaných morfologických struktur. Tento nový přístup nazvali Rohlf & Marcus (1993) geometrická morfometrika.

Ve statistice se tvar definuje jako veškerá geometrická informace, která zbyde po odflitrování vlivu pozice, rotace a měřítka (Kendall, 1977). Toho se v geometrické morfometrice docílí pomocí landmarků a metody Prokrustovské superimpozice. Landmarky jsou přesně umístěné homologické body na struktuře, které jsou ontogeneticky, funkčně či evolučně signifikantní (Richtsmeier et al., 2002). Homologie landmarků může však být i čistě geometrická a nemusí mít biologickou podstatu (Neustupa, 2005). Pozice landmarků je udávána v  $xy$  souřadnicích a každý objekt v analyzovaném souboru je charakterizován konfigurací landmarků. Pomocí Prokrustovské superimpozice jsou objekty přeloženy přes sebe tak, aby mezi homologickými landmarky byla minimální vzdálenost dle daného optimalizačního kritéria (Rohlf, 1993). Tvarové rozdíly jsou pak reprezentovány reziduály, které je možno znázornit graficky jako vektory. Tyto vektory ukazují, jak se pozice homologických landmarků od sebe liší vzhledem k vypočítanému průměrnému konsenzu (Rohlf, 1993).



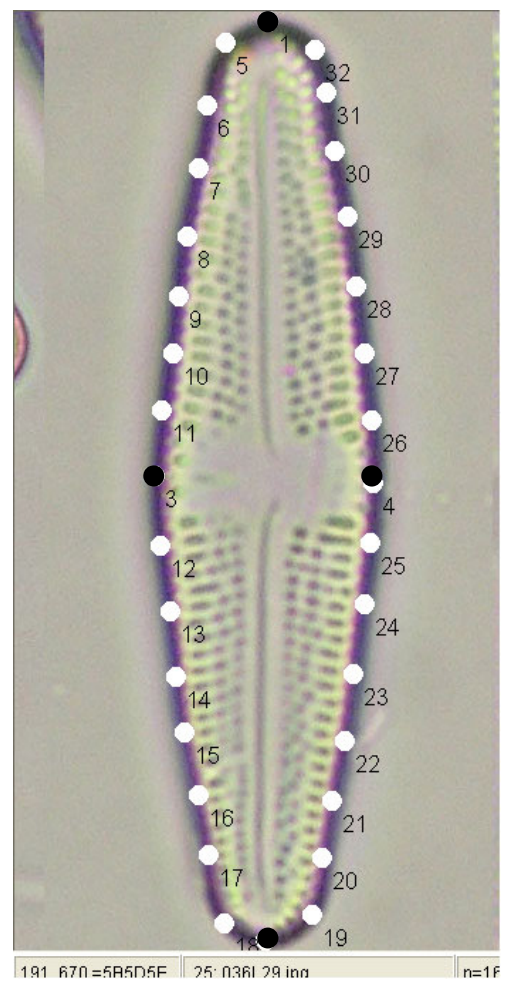
**Obr. 2.1** D'Arcy Thompsonovy transformační mřížky, převzato z [www.dam.brown.edu](http://www.dam.brown.edu)

Tvarové změny lze pak také s využitím reziduálů zobrazit pomocí grafického znázornění podobného transformačním mřížkám vynalezeným Albrechtem Dürerem a znovuobjeveným D'Arcy Thompsonem ve 20. století (Gunz et al., 2005), (Obr. 2.1). Tato metoda se nazývá Thin-plate spline a svým jménem odkazuje na ohýbání a natahování metaforického kovového plátu a deformační energie k tomu potřebné (Bookstein, 1997). Matematicky je to interpolační funkce operující se změnami v oblastech mezi landmarky (Zelditch, 2004).

### 2.3.1 Landmarky

Penátní rozsivky naviculoidního typu jsou příkladem organismů s nedostatkem homologických bodů, které by sloužily k umístění pevných landmarků. Proto jsem využila také tzv. semilandmarky, které mohou volně klouzat po úseku obvodu vyznačeném dvěma sousedními (semi)landmarky (Bookstein, 1997).

Pro analýzy landmarkovou geometrickou morfometriku bylo náhodně vybráno 25 buněk z každé velikostní skupiny od každého kmenu. Analýzy každého kmenu pak probíhaly zvlášť. Pomocí programu TpsUtil 1.45 (Rohlf, 2009) byly digitální fotografie převedeny do formátu TPS. V tomto programu byly také buňky ze všech velikostních skupin náhodně zpřeházeny, protože při ručním značení landmarků v takto objemných souborech by mohlo docházet k ovlivnění dat. V programu TpsDig 1.40 (Rohlf, 2004) byly značeny všechny landmarky a v programu TpsRelw 1.46 (Rohlf, 2008) bylo označeno, které z nich jsou semilandmarky. Na každou buňku byly aplikovány 4 pevné landmarky a jako homologické body pro umístění sloužily průniky apikálních a transapikálních os souměrnosti. Po obvodu pak bylo rozmístěno 28 semilandmarků (Obr. 2.2).



**Obr. 2.2** Pevné landmarky (černé body) a semilandmarky (bílé body)

### 2.3.2 Symetrizace

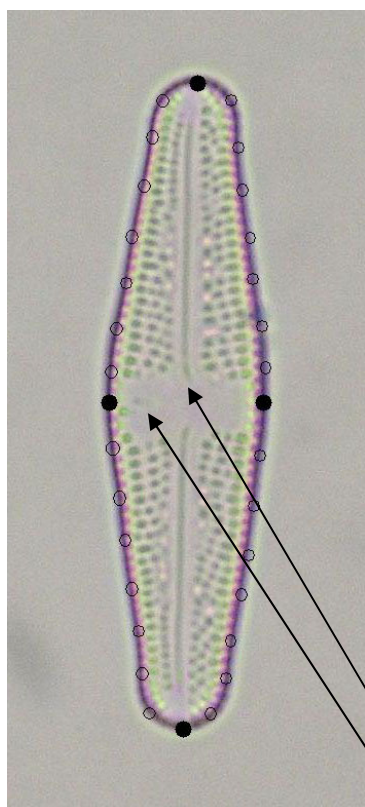
Symetrizace se v současné době provádí ve většině geometricko-morfometrických studií, ve kterých jsou předmětem objekty s bilaterální nebo biradiální symetrií<sup>3</sup> (Neustupa & Šťastný, 2006; Neustupa & Němcová, 2007; Veselá et al., 2009). Je to z toho důvodu, že u objektů s výše popsaným typem symetrie není možné rozpoznat hornodolní, případně ani pravolevou orientaci. Při použití nesymetrizovaných dat by se ve výsledcích mohla projevit asymetrická variabilita způsobená právě orientací buněk. O použití či nepoužití symetrizace stále probíhá diskuze. Argumentem pro nepoužití může být tvrzení, že pravolevá a hornodolní orientace objektů podléhá náhodnému rozložení. Z tohoto důvodu byly provedeny pokusné analýzy i na nesymetrizovaných datech. Výsledky nesymetrizovaných dat se od symetrizovaných lišily v malé míře. Rozdíly jsou patrné hlavně ve vizualizacích pomocí transformačních mřížek, kde byly pozorovány zejména výkyvy v levoprávé asymetrii.

Podle Klingenberga (2002) by měly studie zaměřené na porovnávání tvarové variability mezi jedinci, jejichž cílem není analýza asymetrických komponent, pracovat se symetrickou složkou variability. Proto jsem přistoupila k symetrizaci a ve všech dalších morfometrických a statistických analýzách jsem využívala symetrizovaná data. Výjimkou byla analýza složek symetrické a asymetrické variability, kde bylo cílem porovnat míru jednotlivých složek asymetrie mezi jednotlivými velikostními skupinami. V tomto případě byla využívána nesymetrizovaná data.

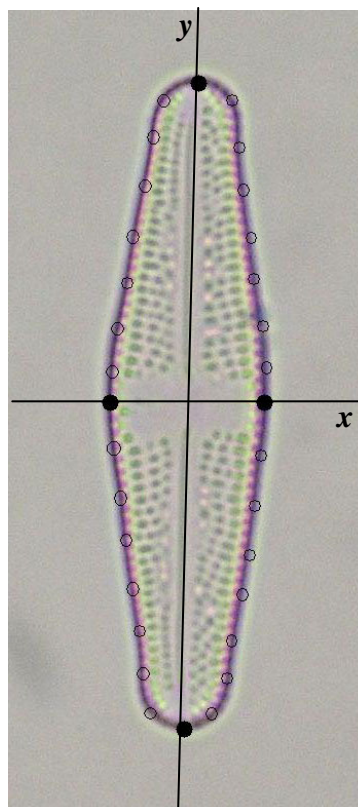
Kmeny použitých druhů *Sellaphora puppula* a *Navicula cryptocephala* jsou symetrické podél osy  $x$  a  $y$ . Další dva použité kmeny druhu *Luticola dismutica* jsou souměrné podél osy  $y$ . I když je tedy u buněk rodu *Luticola* možné rozpoznat hornodolní orientaci díky stigmatu a stočení raphe (Obr. 2.3), byla i u těchto kmenů provedena symetrizace podél obou os za účelem jednotnosti metodiky. Symetrizace podél jedné osy by mohla do výsledků vnášet více variability (Obr. 2.4).

---

<sup>3</sup> Biradiální symetrie je taková, při které má organismus dvě osy symetrie (Savriama & Klingenberg, 2011). Typickým příkladem je právě většina penátých rozsivek nebo některé krásivky (Desmidiáles), jako například rod *Micrasterias*.



**Obr. 2.3**  
stočení raphe  
stigma



**Obr. 2.4** osy  
souměrnosti

Samotná symetrizace probíhala podle Klingenberga (2002) tak, že souřadnice protilehlých landmarků se přeházely podle příslušné osy souměrnosti, vynásobily se -1 a přidaly se pod původní landmarkové souřadnice. Takto se vytvořil dvojnásobný soubor, který se podrobil Prokrustovské superimpozici. Výsledné Prokrustovské souřadnice se zprůměrovaly a takto byl získán soubor s plně symetrickými objekty připravený pro další analýzy. Symetrizace byla provedena v programech Microsoft Excel, Word Pad a Past 2.17 (Hammer, 2001).

### 2.3.3 Superimpozice a analýza relativních warpů

Prokrustovská superimpozice byla provedena v programu Tps Relw 1.46 (Rohlf, 2008) metodou nejmenších čtverců (generalized orthogonal least-squares Procrustes analysis) a spočívá ve třech krocích. Prvním krokem je standardizace velikosti objektů - převedení konfigurací na jednotkovou centroidovou velikost (centroid size, centroidem se rozumí těžiště konfigurací landmarků). Poté translace – centroidy všech objektů jsou přeloženy na centroid

konsenzuální konfigurace. Posledním krokem je rotace – otáčení objektů tak, aby vzdálenost homologických landmarků byla co nejmenší (Dryden & Mardia, 1998).

Analýza relativních warpů je obdobou analýzy hlavních komponent (PCA) pro tvarové proměnné. Relativní warpy reprezentují hlavní směry tvarových změn kolem průměrného tvaru a mohou být vizualizovány pomocí deformačních mřížek (Neustupa, 2005).

Tato analýza byla provedena v programu TpsRelw 1.46. Faktor  $\alpha$  byl přitom nastaven na nulu, jak doporučuje Rohlf (1993). Výstupem je stejně jako u PCA ordinační diagram, jehož první osa ukazuje směr největší variability (Zelditch, 2004). Tvarová variabilita vysvětlená první a druhou osou byla zobrazena technikou Thin-plate spline také v programu TpsRelw 1.46. Vizualizace konsenzuálních tvarů a jejich transformace ve vztahu k nejmenším a největším velikostním skupinám byly provedeny v programu TpsSpline 1.20 (Rohlf, 2004).

## 2.4 Alometrie

Alometrie je změna tvaru spojená se změnou velikosti. Pro zjištění podílu alometrické složky na tvarové variabilitě jednotlivých kmenů byl použit postup podle Debata et al. (2003). V programu R 2.15.2 a TpsRegr 1.37 (Rohlf, 2009) byla provedena mnohorozměrná regrese tvaru (Prokrustovských souřadnic) na velikost (centroid size). Výstupem jsou reziduály, které mohou sloužit k dalším analýzám. Pro tuto studii však postačila informace o procentu tvarových změn nevysvětlených velikostí. V programu TpsRegr byly také provedeny výpočty 1000 permutací pro zjištění signifikance.

## 2.5 Disparita

Disparita je míra morfologické diverzity skupiny, případně taxonu (Foote, 1993). Byla počítána jako Prokrustovská vzdálenost jednotlivých objektů k průměrnému referenčnímu objektu z landmarkových konfigurací (Neustupa & Němcová, 2007). Prokrustovská vzdálenost je míra podobnosti konfigurací landmarků (Zelditch, 2004) a stoupá se stoupající tvarovou odlišností jednotlivých objektů od referenčního objektu (Neustupa & Němcová, 2007). Prokrustovská vzdálenost (D) byla počítána v programu TpsSmall 1.20 (Rohlf, 2003) pro každou velikostní skupinu zvlášť.

Pro výpočet morfologické disparity byl použit Footův index morfologické disparity (Foote, 1993):

$$M = \frac{\sum_{i=1}^N (D_i^2)}{(N-1)}$$

kde  $D_i$  je Prokrustovská vzdálenost a  $N$  je počet objektů. Parciální morfologická disparita, neboli příspěvek každého objektu k celkové morfologické disparitě celého souboru, se počítal podle následujícího vzorce (Foote, 1993; Neustupa & Němcová, 2007):

$$PM = \frac{D_i^2}{N-1}$$

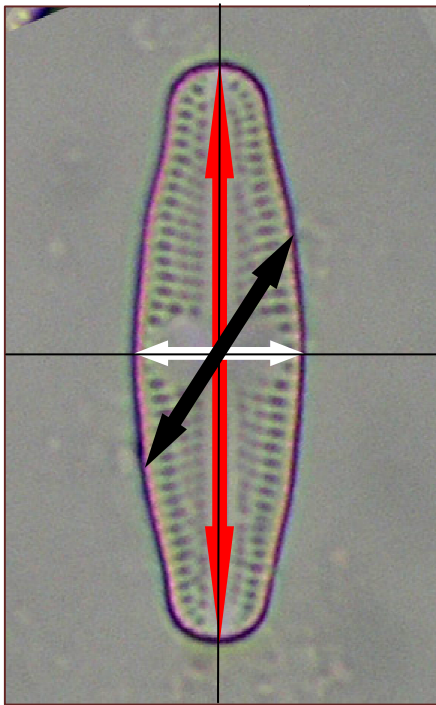
## 2.6 Komplexita

Komplexita je složitost tvaru (v tomto případě 2D obrysu buněk) neboli míra odlišnosti tvaru objektu od tvaru kruhu. Komplexita byla počítána jako Euklidovská vzdálenost sousedních landmarků po obvodu velikostně standardizovaných objektů (Neustupa, 2009). Výpočet byl proveden v programu R 2.15.2.

## 2.7 Asymetrie

V této práci byla použita metoda rozložení symetrické části a asymetrických částí morfologické variability tak, jak ji navrhli Savriama & Klingenberg (2011). Tato metoda je založená na analýze hlavních komponent (PCA) Prokrustovských koordinát a byla použita například při analýze symetrické a asymetrické variability zelené řasy rodu *Micrasterias* (Desmidiales, Viridiplanteae), (Neustupa, 2013).

Cílem bylo zjistit hodnoty symetrické a asymetrických částí morfologické variability jednotlivých velikostních skupin a porovnat je mezi sebou. Buňky studovaných druhů mají dvě osy souměrnosti a tím pádem se dají rozdělit na čtyři symetrické části (viz obr. 2.4). Aby se zjistila hodnota jednotlivých komponent asymetrie, porovnávají se konfigurace landmarků se svými zrcadlovými obrazy ve směru hornodolním, levoprávním a transverzálním (Obr. 2.6). Z konfigurací landmarků a jejich zrcadlových protějšků promítaných ve třech směrech se vytvoří čtyřnásobný soubor, který se podrobí Prokrustovské superimpozici. Následně proběhne analýza hlavních komponent (PCA). Výsledkem analýzy jsou hodnoty relativní a absolutní asymetrie. Hodnoty relativní asymetrie jsou určeny pomocí procentuální variability PCA každého objektu zvlášť, absolutní jako směrodatné odchylky skóre objektů na jednotlivých osách stejných PCA jako je popsáno výše (Neustupa, osobní konzultace). Výpočty byly provedeny v programu R 2.15.2.



**Obr. 2.6** Směry přeházení landmarků:

červená čára – hornodolní směr

bílá čára – levopravý směr

černá čára – transverzální směr

## 3 Výsledky

### 3.1 Celková tvarová variabilita

Na obrázku 3.1 je znázorněn ordinační diagram zobrazující tvarovou variabilitu buněk kmenu *Luticola* 59 podél první (98,7% variability) a druhé osy (0,7% variability). Na první pohled je patrné, že dvě nejmenší velikostní skupiny (60% - 50% z největší buňky a 50% - 40% z nejv. b.) jsou tvarově odlišné od předchozích velikostních skupin. Tuto tvarovou odlišnost reprezentuje hlavně první osa. Tvarové změny podél obou os jsou znázorněny pomocí transformačních mřížek. Podél první osy se tvar buněk mění od protáhlých úzkých se zakulacenou centrální částí k zakulaceným širokým se zúženou centrální částí. Podél druhé osy můžeme zaznamenat u prvních dvou velikostních skupin tendenci k zakulacení apikální části a zaoblení centrální části, oproti tomu další velikostní skupiny tyto vlastnosti nevykazují a mají více okrouhlý tvar. U kmenu *Luticola* M48 (Obr. 3.2) se projevuje velmi podobná tendence. Velikostní skupiny jsou oproti *Luticole* 59 více tvarově odlišné a podél první osy (99% variability) se jasně projevují tvarové změny v průběhu vegetativní fáze životního cyklu. Stejně jako u *Luticoly* 59 jsou poslední dvě velikostní skupiny od ostatních markantně odlišné, a to i přes to, že sexuálně kompetentní buňky těchto dvou kmenů měly odlišnou velikost. Shodný je i trend podél druhé osy (0,6% variability) prvních dvou velikostních skupin k zaoblování apikálních a centrálních částí.

U kmenu *Navicula* nejsou tvarové změny v průběhu zmenšování tak patrné, nicméně skupina nejmenších, sexuálně kompetentních buněk je zřetelně odlišná. Tvarové změny znázorněné první osou (96,9% variability) jsou podobné jako u předchozích kmenů, nejmarkantnější je tendence k zaoblování a rozšiřování buněk. Variabilita spojená s druhou osou (1,5% variability) se projevuje rozšiřováním apikálních částí a zužováním centrální části, tyto tvarové rozdíly však jdou napříč velikostními skupinami.

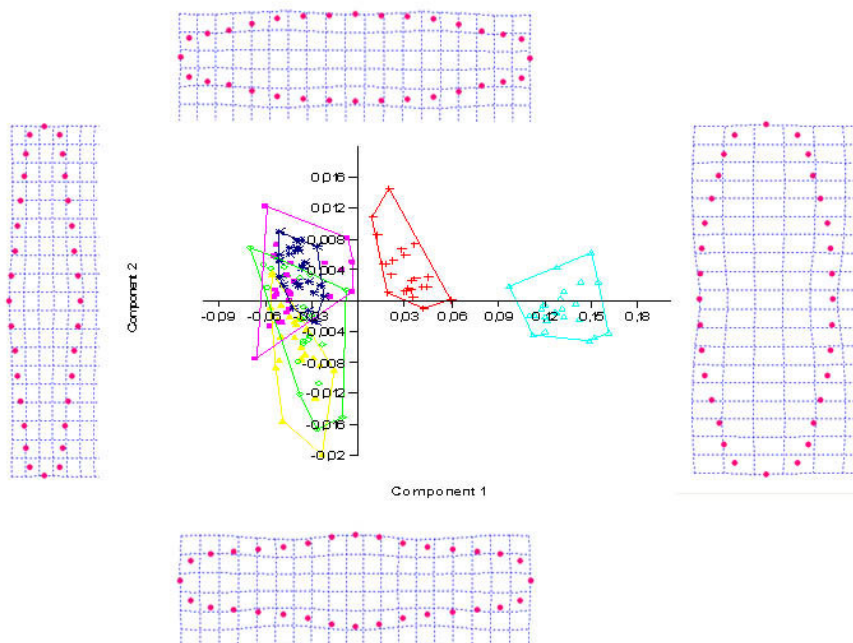
U kmenu *Sellaphora* je na první pohled vidět tvarová odlišnost mezi velikostními skupinami podél první osy (99,3% variability). Podobně jako u předchozích kmenů mají buňky tendenci se rozšiřovat a zaoblovat. Podél druhé osy (0,4% variability) můžeme zaregistrovat na jedné straně buňky s tendencí k zaobleným apikálním částem a poněkud zúženou centrální částí a oproti tomu buňky celkově se zaoblující se ztrátou záhybů. Tato část variability však stejně jako u kmenu *Navicula* neodpovídá rozložení velikostních skupin a projevuje se nezávisle na nich.



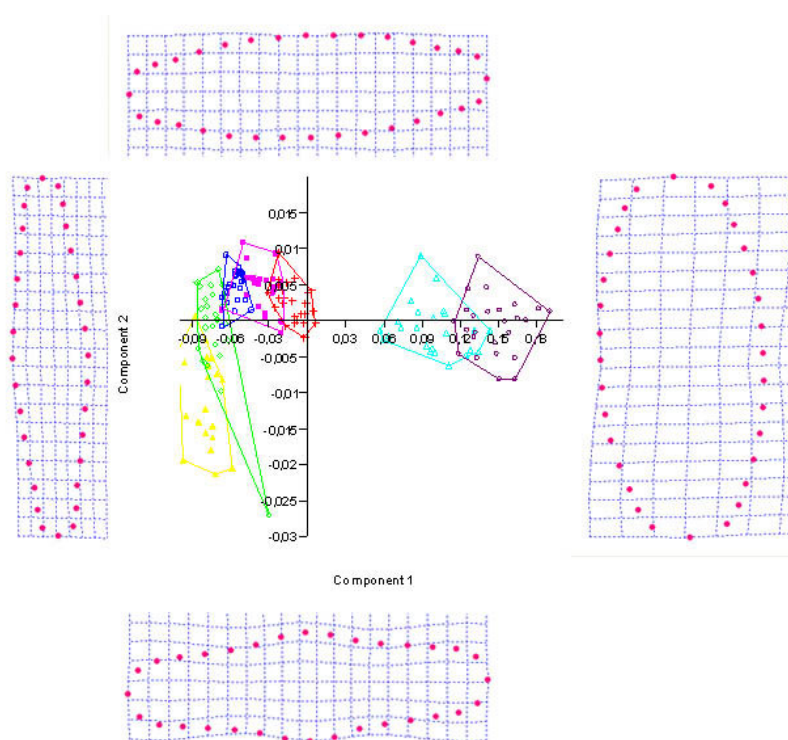
### Obr 3.1 – 3.4 Analýza relativních warpů

Velikostní skupiny: ★ 100% - 90% z největší buňky; ★ 90% - 80%; ★ 80% - 70%; ★ 70% - 60%; ★ 60% - 50%; ★ 50% - 40%, ★ 40% - 30%. Tvarové změny podél 1. a 2. osy jsou znázorněny pomocí deformačních mřížek.

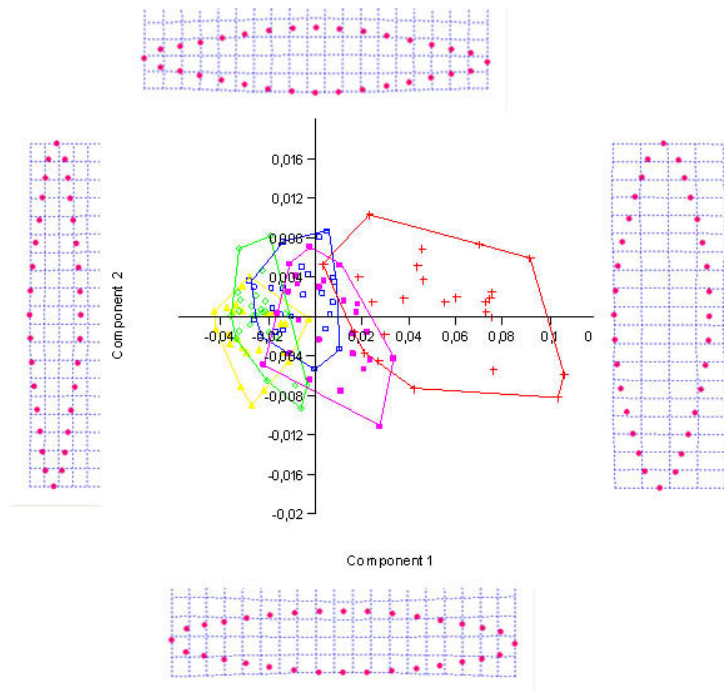
↓Obr 3.1 *Luticola* 59



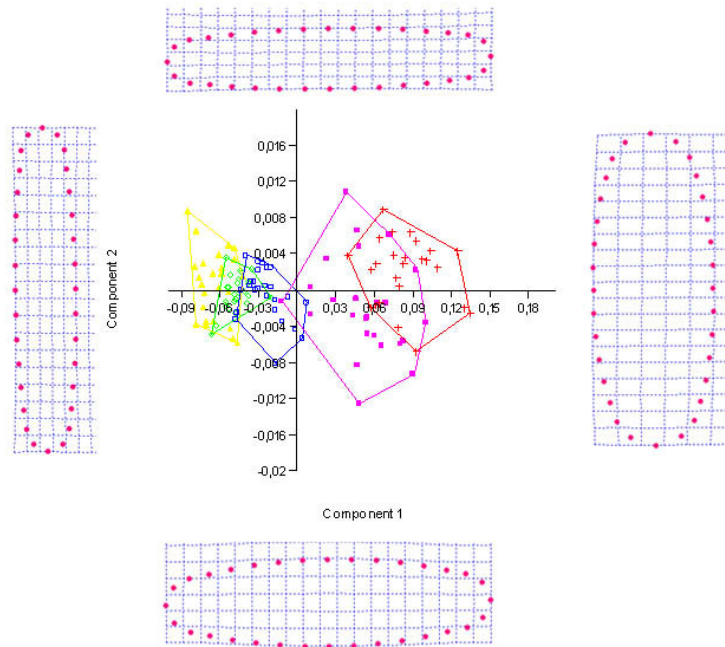
↓Obr 3.2 *Luticola* M48



↓Obr. 3.3 *Navicula*



↓Obr. 3.4 *Sellaphora*



### 3.2 Rekonstrukce tvaru pomocí transformačních mřížek

Pomocí metody Thin-plate spline byly zobrazeny tvarové odchylky od konsenzuální průměrné konfigurace. Na obrázku 3.5 vidíme v první řadě tvarové odlišnosti od průměrného tvaru vzhledem k největší velikostní skupině, v druhé řadě jsou znázorněny deformace mřížky ve vztahu průměrného tvaru a nejmenší velikostní skupiny. U všech čtyř kmenů je na první pohled patrné, že buňky největší velikostní skupiny jsou protáhlé a zúžené, oproti tomu buňky nejmenší velikostní skupiny jsou zaoblené a široké. U obou kmenů *Luticola* je navíc vidět změna proporcí apikálních a centrální části. U největších buněk je centrální část zakulacená, pak se směrem k apikální části markantně zužuje a samotné apikální části jsou opět zaoblené a vytváří jakési hlavičky. Nejmenší buňky tyto znaky úplně ztrácejí a centrální část dokonce není nejširším místem buňky. Naopak se buňky rozšířily v prostoru mezi centrální částí a apikálními částmi. Samotné apikální části pak oproti největším buňkám ztratily na objemu. Tento trend, avšak v méně patrné formě můžeme pozorovat i u zbylých dvou kmenů *Navicula* a *Sellaphora*. Apikální části mají u největších buněk tendenci vytvářet „hlavičky“ a nejmenší buňky tyto charakteristiky ztrácejí.

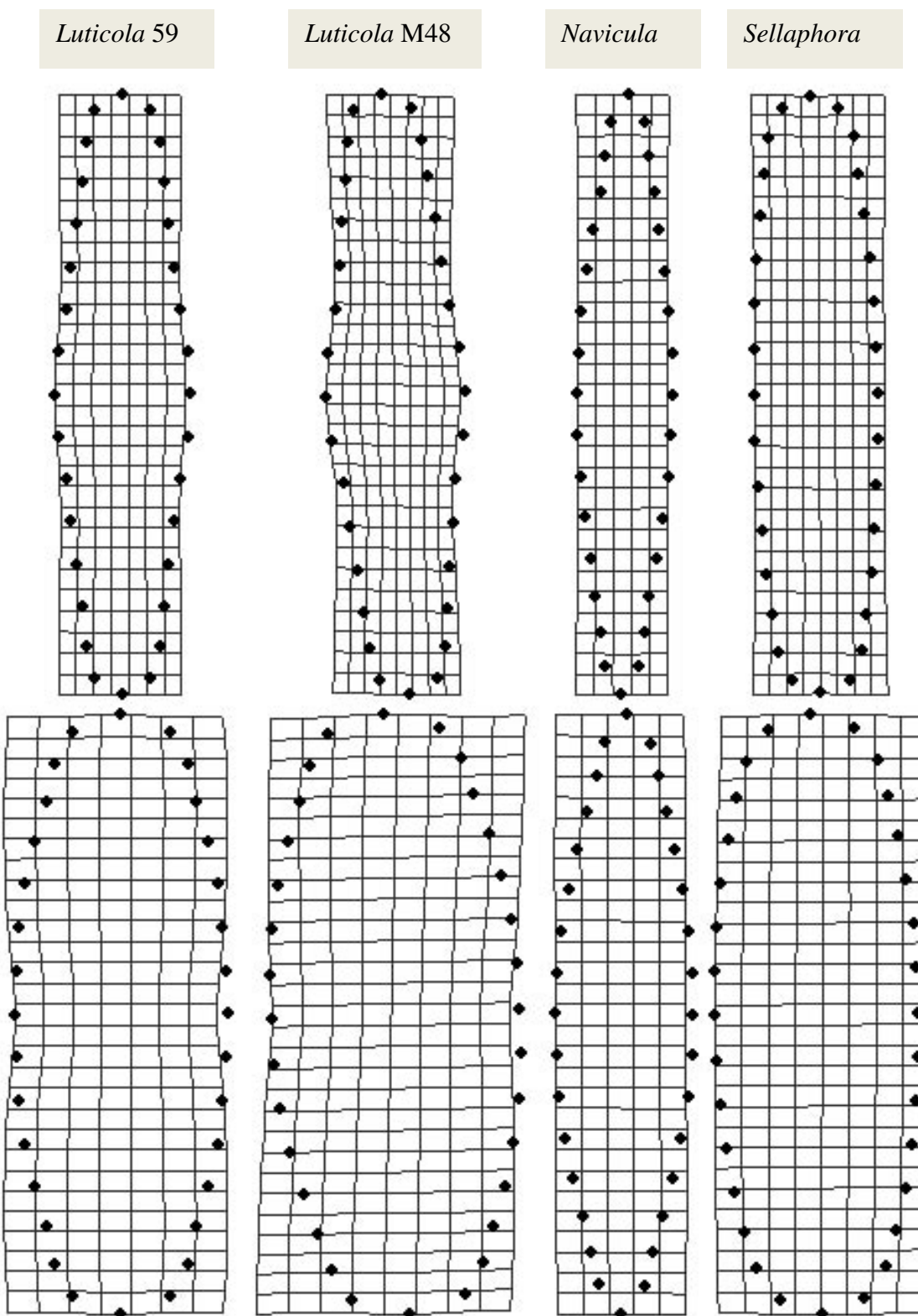
### 3.3 Alometrie

V tabulce 3.1 jsou uvedena procenta tvarových změn vysvětlená změnou velikosti. Permutační testy vyšly u všech kmenů signifikantně.

	procento tvarových změn vysvětlené změnou velikosti	p - hodnota
<i>Luticola</i> 59	62,8%	0,001
<i>Luticola</i> M48	77,9%	0,001
<i>Navicula</i>	33,9%	0,001
<i>Sellaphora</i>	80,0%	0,001

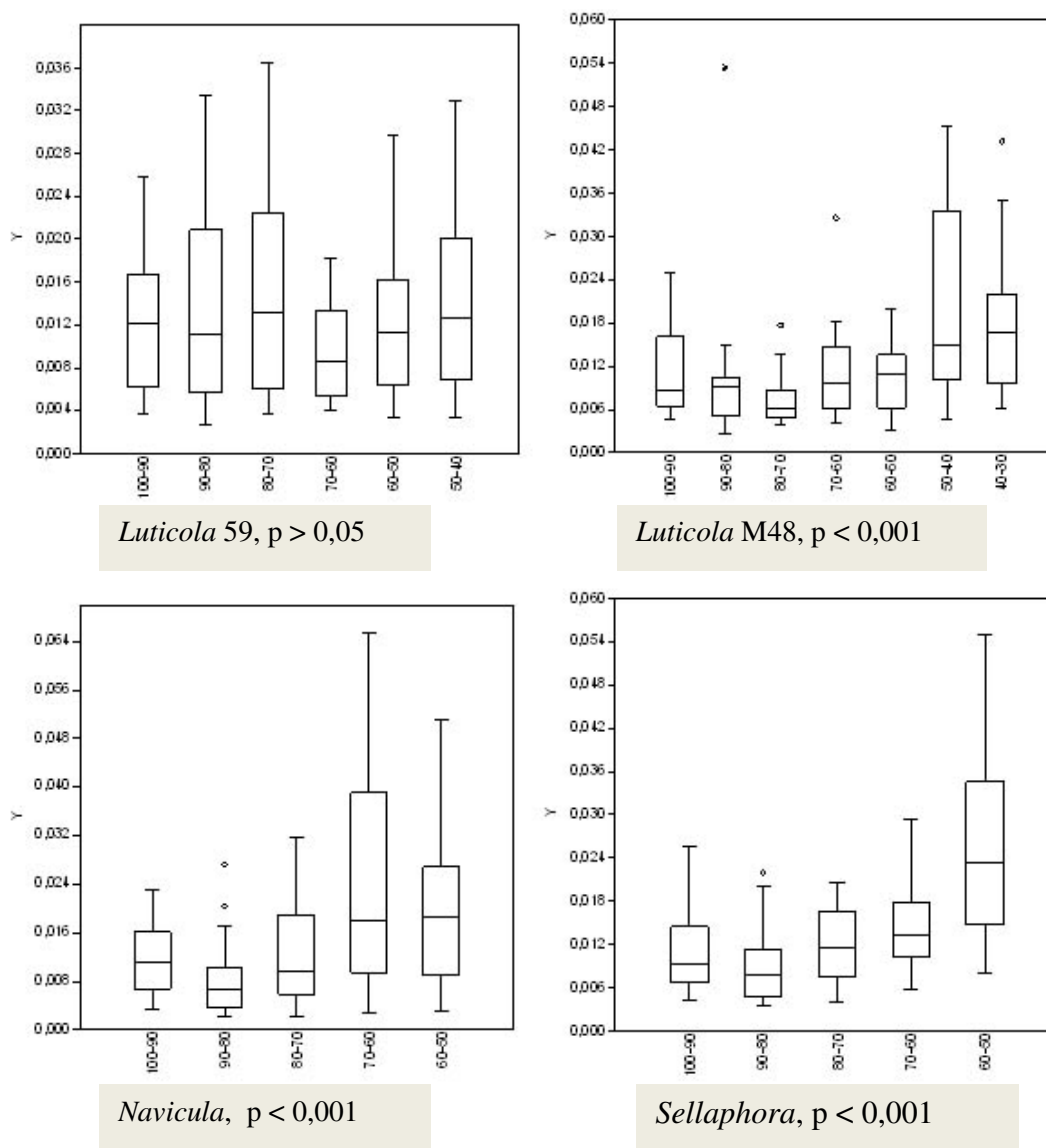
**Tab. 3.1** Procento tvarových změn souvisejících s alometrií.

**Obr 3.5** Thin-plate spline – změny tvaru znázorněné pomocí deformace mřížky ve vztahu konsenzuální konfigurace landamarků vůči největší a nejmenší velikostní skupině



### 3.4 Disparita

Míra disparity a rozdíly mezi velikostními skupinami u jednotlivých kmenů jsou uvedeny v obrázku 3.6. U všech kmenů kromě *Luticola 59* vyšly testy signifikantně (použit byl test Kuskall-Wallis). Všechny ostatní kmeny vykazují podobný trend, kdy u prvních dvou nebo tří velikostních skupin disparita postupně klesá a pak dochází ke zvratu a opětovnému nárůstu disparity, nejvyšší disparitu pak má nejčastěji skupina nejmenších buněk.

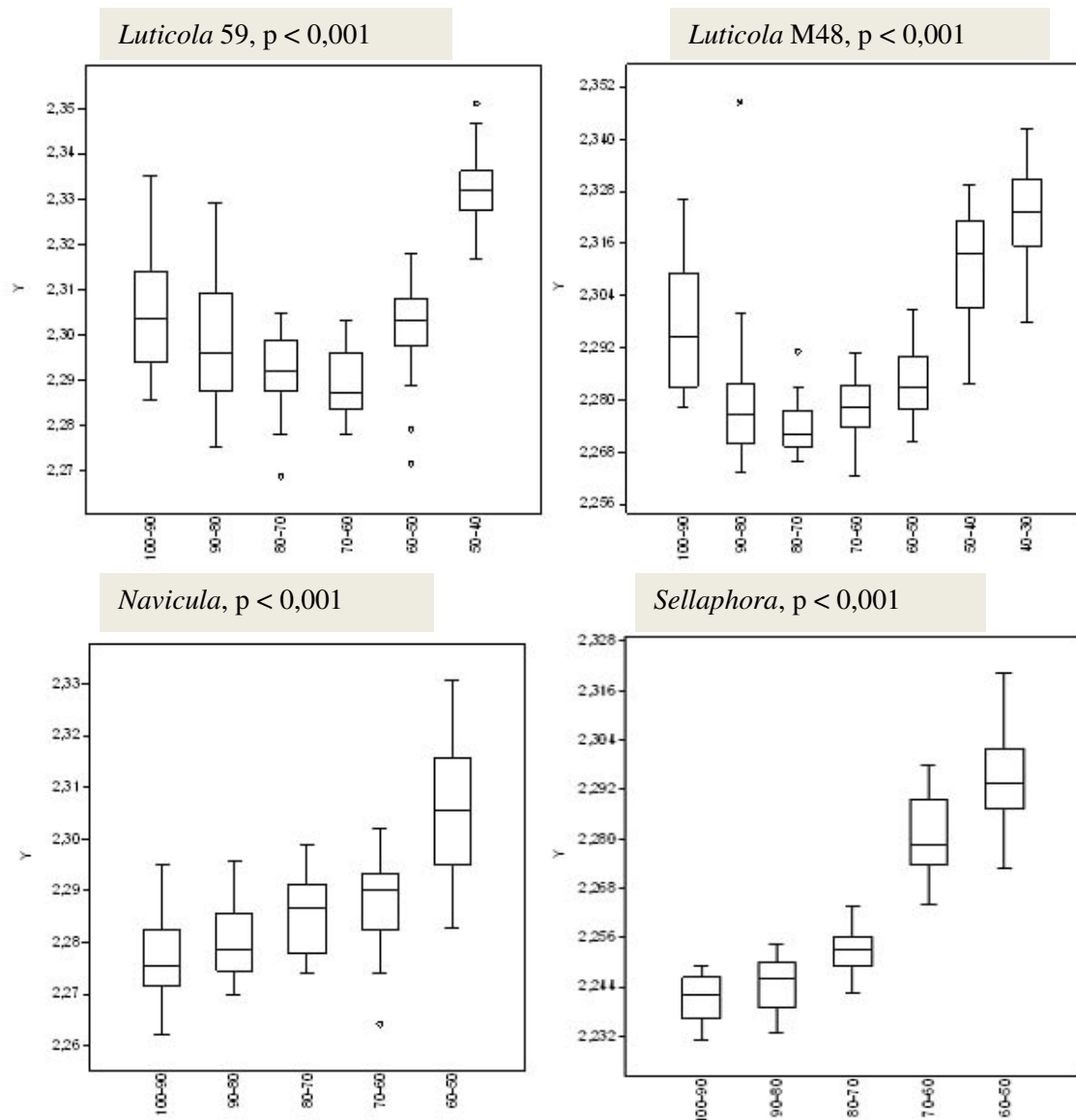


**Obr 3.6** Disparita – míra tvarové variability velikostních skupin jednotlivých kmenů.

### 3.5 Komplexita

Komplexita buněk je vyjádřena globularitou, neboli mírou, do jaké se obrys buněk přibližuje tvaru kruhu. Znamená to, že čím větší globularita, tím menší komplexita. Průběh

změn globularity u jednotlivých kmenů můžeme vidět na obrázku 3.7. Oba kmeny stejného druhu *Luticola* 59 a *Luticola* M48 vykazují stejný trend postupného snižování globularity a u čtvrté nebo páté velikostní skupiny opětovný nárůst. Největší globularitu, a tedy nejmenší komplexitu mají nejmenší buňky. Změny globularity se podobají u kmenů *Navicula* a *Sellaphora*, z grafu je patrný gradualistický nárůst globularity, tedy postupné snižování komplexity buněk. Z obrázků 3.6 a 3.7 je patrný postupný nárůst disparity a zároveň snižování komplexity. Možné interpretace těchto jevů budou popsány v kapitole Diskuse.



**Obr. 3.7** Globularita

### 3.6 Asymetrie

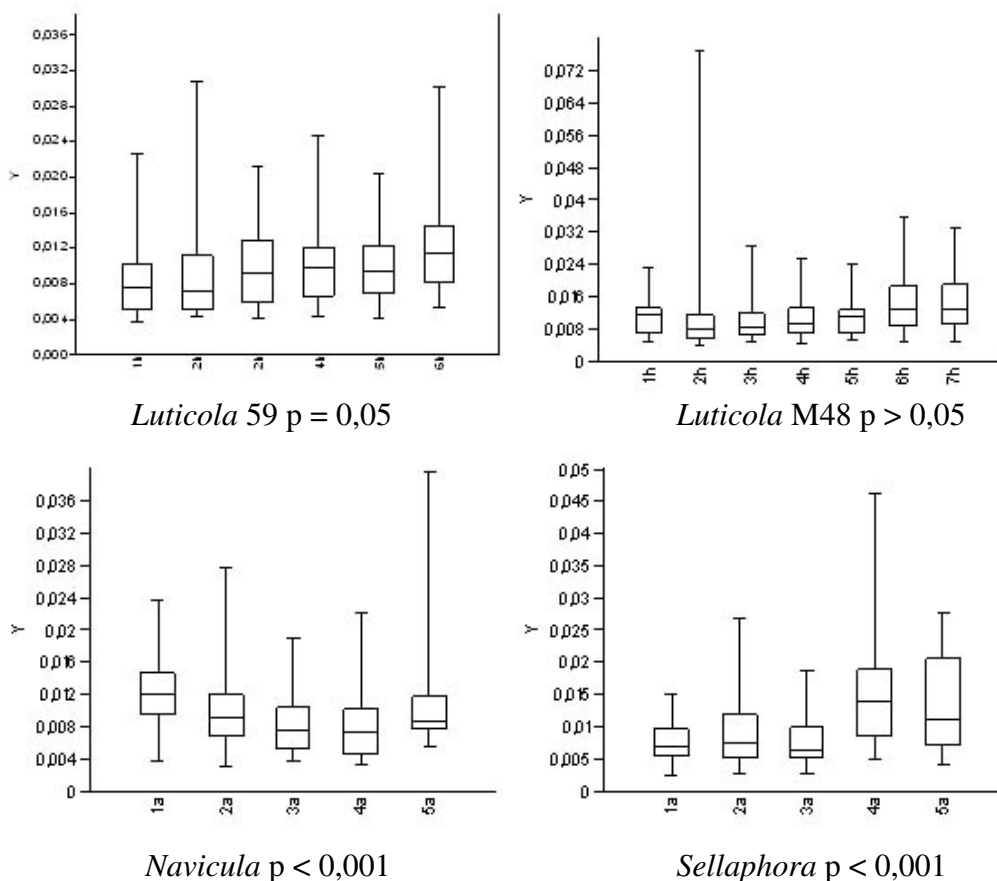
V tabulce 3.2 jsou uvedeny relativní procentuální poměry totální symetrie a segmentů asymetrie.

	totální relativní symetrie %	hornodolní relativní asymetrie %	levoprává relativní asymetrie %	Transverzální relativní asymetrie %
<i>Luticola</i> 59	81,92423	3,507725	8,572247	5,995797
<i>Luticola</i> M48	94,44009	2,363331	1,473282	1,723299
<i>Navicula</i>	84,48314	6,851522	4,059117	4,606221
<i>Sellaphora</i>	93,681	3,326625	1,213632	1,778335

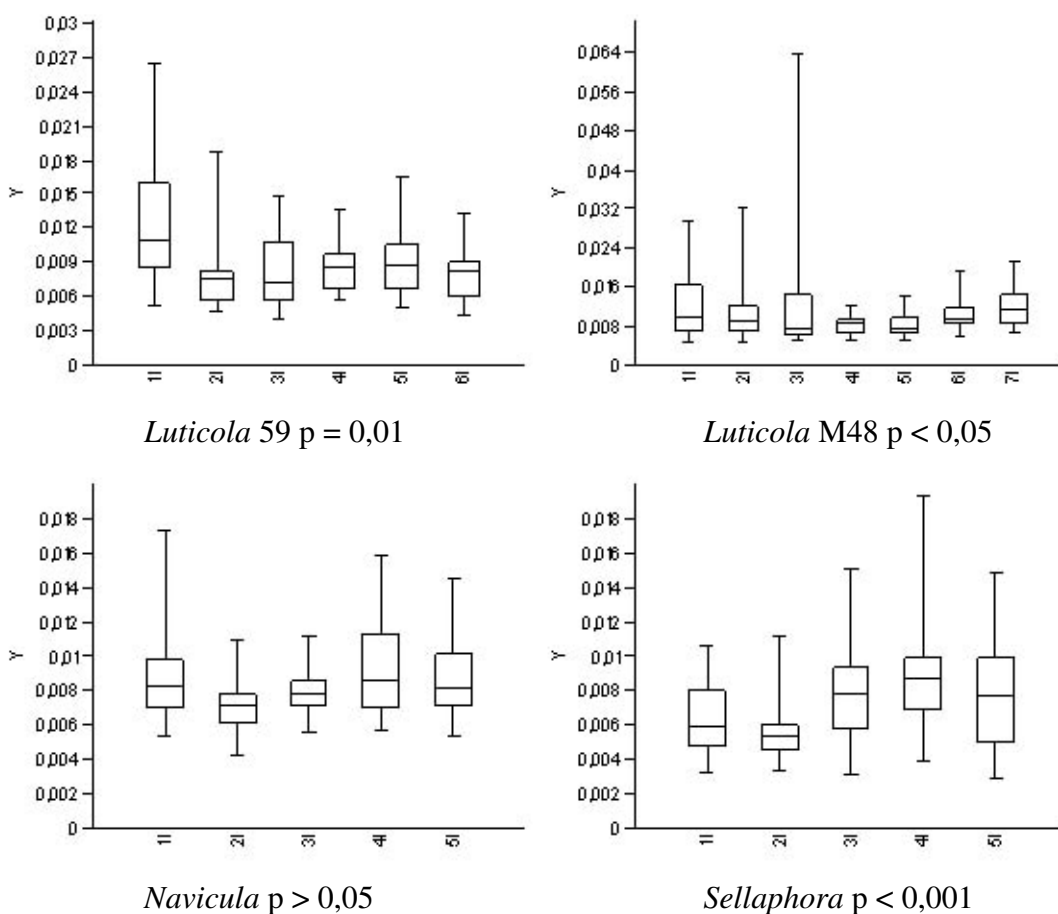
**Tab. 3.2** Hodnoty relativní symetrie a segmentů asymetrie

Na obrázcích 3.8 – 3.11 jsou zobrazeny krabicové diagramy vytvořené z hodnot segmentů absolutní asymetrie.

**Obr. 3.8** Asymetrie hornodolní



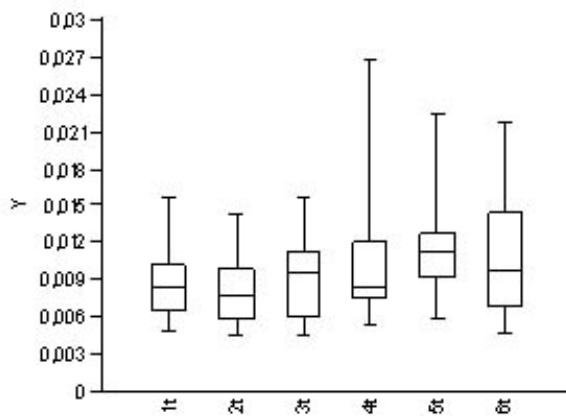
**Obr. 3.9** Asymetrie levopravá



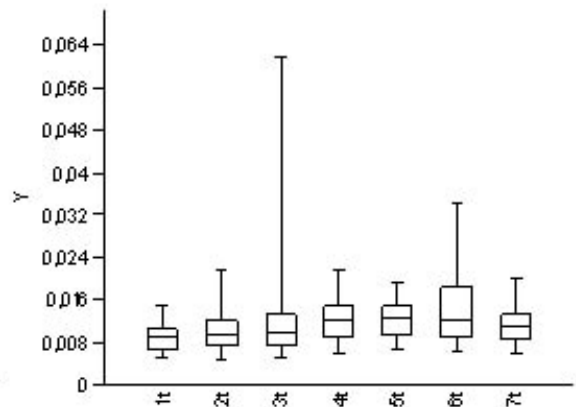
Z tabulky relativních hodnot (3.2) je patrný vysoký podíl celkové symetrie. Poměry segmentů asymetrie jsou s výjimkou kmenu *Luticola 59* podobné, největší podíl má segment hornodolní asymetrie a zbylé dva segmenty levopravé a transverzální asymetrie mají uvnitř každého kmenu podobné hodnoty. U *Luticola 59* dosahuje nevyšších hodnot levopravá asymetrie. Tento kmen má také nejnižší podíl celkové symetrie.



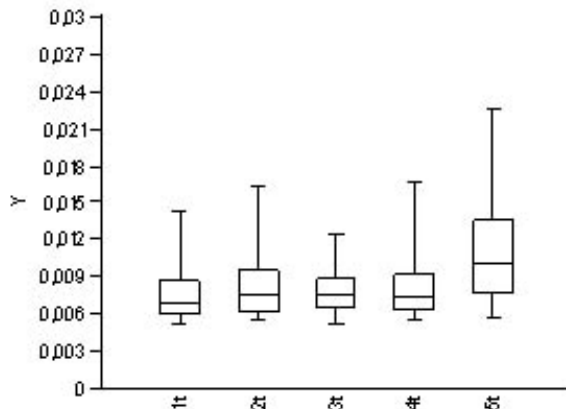
Obr. 3.10 Asymetrie transversální



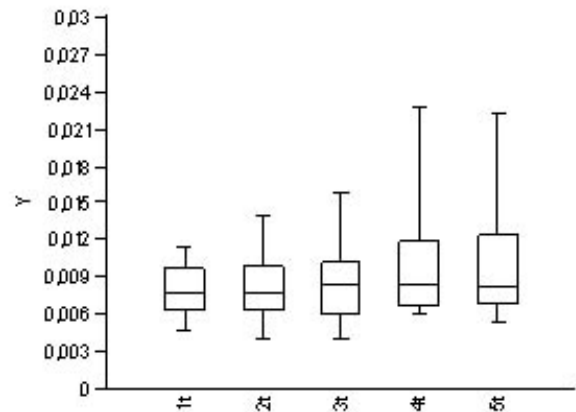
*Luticola* 59  $p < 0,05$



*Luticola* M48  $p < 0,05$

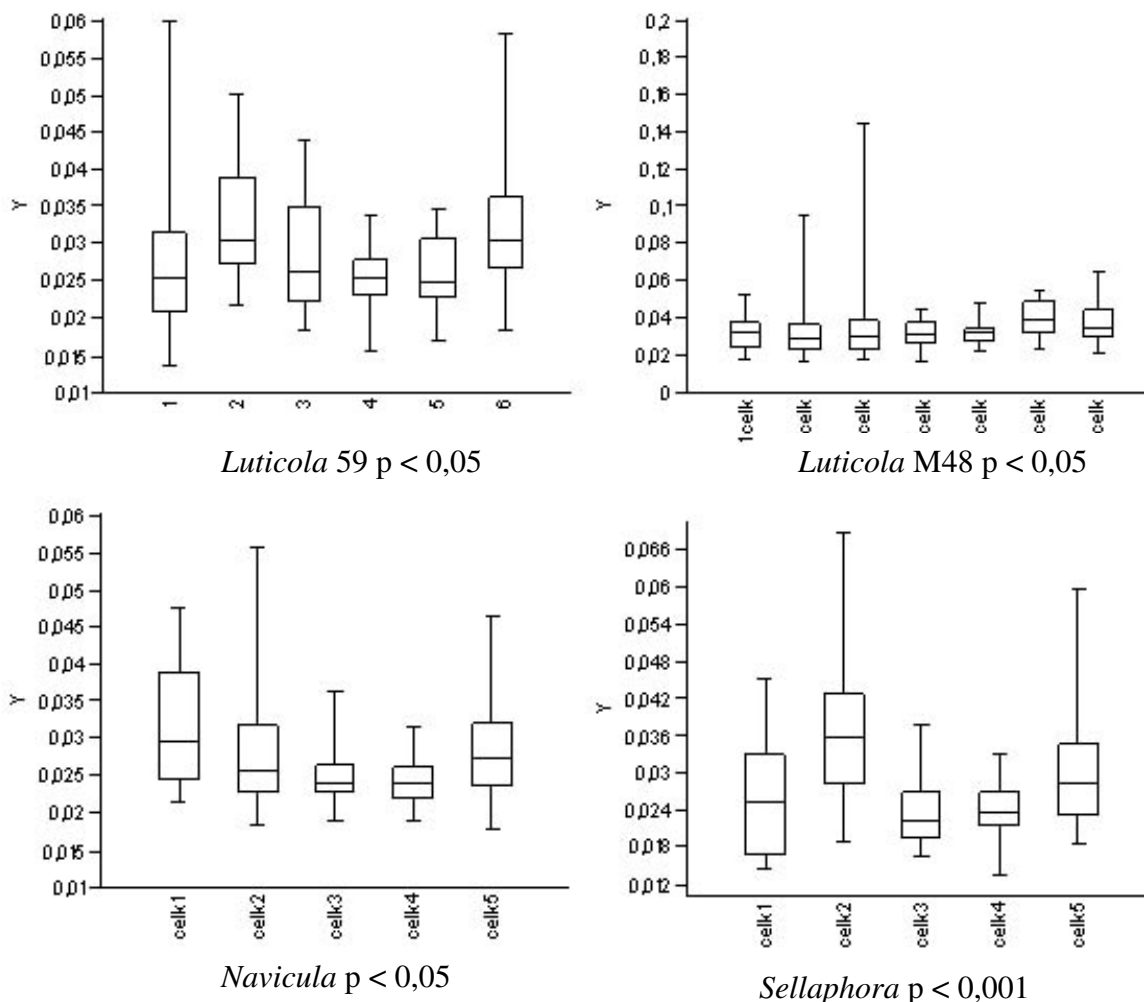


*Navicula*  $p < 0,05$



*Sellaphora*  $p > 0,05$

Obr. 3.11 Asymetrie celková



### 3.7 Shrnutí výsledků

Bylo zjištěno, že tvar schránek rozsivek čtyř modelových klonálních populací se během vegetativní fáze životního cyklu prokazatelně mění. První osa analýzy relativních warpů vysvětluje ve všech případech více než 95% tvarové variability. Podél této osy probíhají tvarové změny, které odlišují jednotlivé velikostní skupiny. U všech kmenů můžeme zaznamenat výraznou odlehlost dvou nebo jedné nejmenší velikostní skupiny. Procento variability vysvětlené druhou osou je poměrně malé (od 1,5 do 0,4 %), nicméně pro kmeny rodu *Luticola* jsou tvarové změny související s touto osou charakteristické.

Tvar buněk se obecně mění od protáhlého k okrouhlému a obrys buněk postupně ztrácí některé charakteristiky, jako je například tendence k tvorbě zaoblených, mírně rozšřených

apikálních částí, pro které se v laboratorním žargonu používá výraz hlavičky. U kmenů rodu *Luticola* kromě výrazného zaoblování dochází k proměňování tvaru, které by se dalo roztřídit do tří fází. První fáze jsou buňky postiniciální se zaoblenými apikálními částmi a ztlustlou okrouhlou centrální částí. Druhou, prostřední fází reprezentují buňky kopinaté tvořící mírný náznak hlaviček. Ve třetí, nejmenší fázi jsou buňky okrouhlé bez výraznějších charakteristik. Takovýto průběh tvarových změn byl zdokumentován také v práci Poulíčkové (2008), nebyl však dosud formalizován pomocí metod geometrické morfometrie.

Tvarové změny jsou z velké části alometrického charakteru, což znamená, že souvisí se změnou velikosti. Kromě *Naviculy* tvoří alometrická složka u všech zkoumaných kmenů hodně přes 50% tvarové variability, u *Sellaphory* je to celých 80%. U kmenu *Navicula* jsou tvarové změny tvořeny ze 33% alometrickou složkou, ale i to je poměrně vysoké číslo.

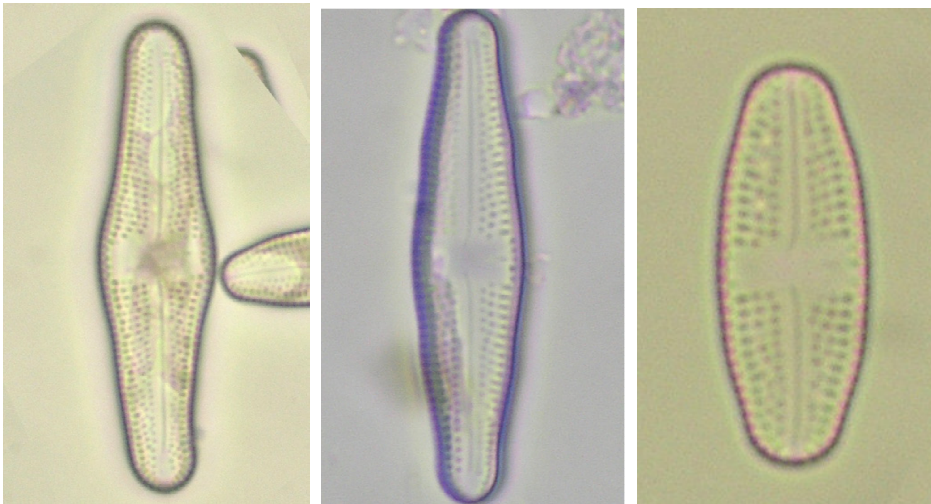
Se zmenšováním buněk stoupá disparita, ovšem nejmenší disparitu nemá skupina největších buněk, ale až druhá nebo třetí velikostní skupina. Opačný trend má komplexita obrysu buněk, která během vegetativní fáze životního cyklu klesá. Možná vysvětlení a srovnání těchto výsledků budou předmětem kapitoly Diskuze.

## 4 Diskuze

### 4.1 Zmenšování a tvar buněk

Bylo pozorováno, že během vegetativní fáze životního cyklu buňky studovaných kmenů postupně získávají okrouhlý tvar a ztrácejí charakteristické znaky obrysu. Toto pravidlo formuloval poprvé Geitler (1932) a později byl tento jev pozorován v několika studiích. Zmiňuje se o něm například Rhode et al. (2001) ve studii tvarové variability populací rodu *Meridion*. Autoři pozorovali, že buňky různých populací se s postupným zmenšováním stávají podobnější. Tendenci k získávání okrouhlého tvaru a ztrátu znaků na obrysu s postupným zmenšováním označují jako tzv. Geitlerův fenomén. Ve studii Veselá et al. (2009) bylo shodně s předchozími poznatky pozorováno, že buňky sexuálně kompetentní jsou oproti iniciálnímu zakulacené a mají menší poměr šířky a délky. V morfometrické analýze také vyšlo, že iniciální a sexuálně kompetentní buňky různých druhů jsou si podobnější než buňky stejných druhů z různých stádií životního cyklu. Podle Schmid (1994) je zmenšování provázeno alometrickou změnou proporcí a ztrátou některých taxonomicky významných znaků. V této diplomové práci byl zjištěn velmi vysoký podíl alometrie na tvarových změnách a zároveň klesání komplexity buněk během vegetativní fáze životního cyklu. Je nutné vzít v úvahu, že při zmenšování se mění poměr povrchu a objemu buněk, což je důležitý faktor z hlediska fyziologie a celkového fungování organismu. Možným vysvětlením tzv. Geitlerova fenoménu je, že se u buněk takto částečně vyrovnává poměr povrchu a objemu.

Za povšimnutí stojí zvláštní tvar iniciálních a postiniciálních buněk kmenů druhu *Luticola dismutica*, který je charakteristický jen pro počáteční fázi životního cyklu. Rozšíření centrální části mají pouze buňky na začátku vegetativní fáze životního cyklu, pak tuto charakteristiku ztrácejí a v kultuře se objevují protáhlé buňky s typickou morfologií. Ztlustlou centrální část má i perizonium tohoto druhu (Pouličková, 2008). Je zajímavé, že stejný tvar perizonia mají i rozsivky *Navicula cryptocephala* (Pouličková & Mann, 2006), ale charakteristické zaoblení centrální části kopírují pouze iniciální buňky druhu *Luticola dismutica* (Pouličková, 2008). Toto zaoblení střední části a celková zakulacenost největších buněk oproti běžným vegetativním buňkám může také vysvětlovat, proč globularita u kmenů rodu *Luticola* nejdříve klesá a přibližně v polovině vegetativní fáze začíná stoupat. U dvou ostatních kmenů rodu *Navicula* a *Sellaphora* tomu tak není a globularita stoupá postupně. Na obrázku 4.1 jsou pro ilustraci znázorněny typické tvarové fáze druhu *Luticola dismutica*.

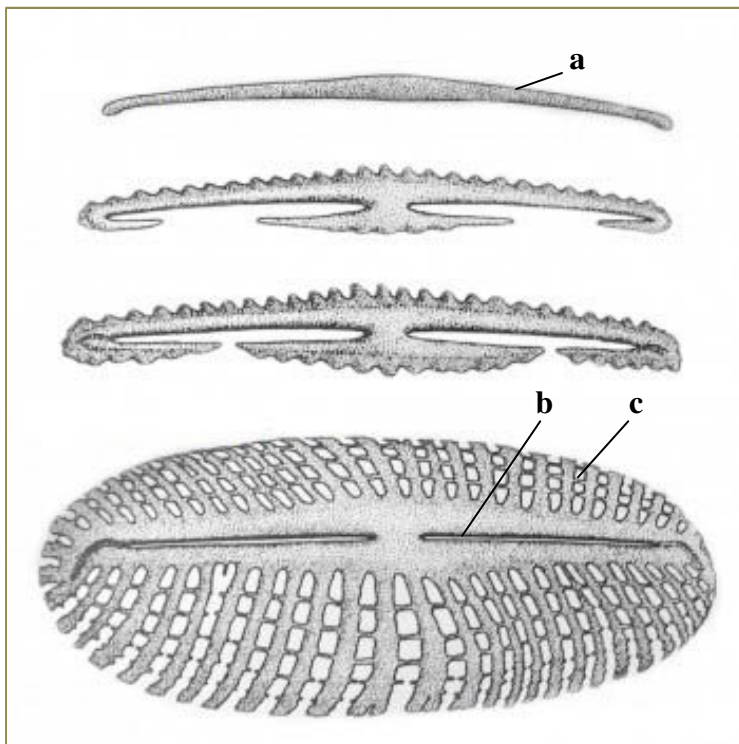


**Obr. 4.1** Tvarové rozdíly buněk rodu *Luticola*. Zleva: buňky největší, buňky prostřední, buňky nejmenší velikosti.

Během zmenšování narůstá morfológická diverzita neboli disparita buněk. Tento poznatek poněkud koreluje s výsledky starší studie Theriota a Ladewského (1986), kde vyšlo, že tvarová variabilita stoupá se snižující se délkou buněk. Autoři mají pro tento jev tři vysvětlení, která se navzájem nemusí vylučovat. První je, že ve zkoumaných vzorcích se objevilo více genetických entit, druhým důvodem může být, že kontrola morfogeneze je preciznější při větších velikostech, třetí vysvětlení je, že tvarovou variabilitu způsobují podmínky prostředí. Pro tuto studii je použitelné jen zdůvodnění druhé, protože pro pokus byly použity klonální kultury pěstované ve standardizovaných laboratorních podmínkách. Jak je vidět, tvarová variabilita i přesto viditelně stoupá během zmenšování. Je nutné vzít v úvahu, že při buněčném dělení slouží starší polovina buněčné stěny jako forma při vytváření nové poloviny. To může způsobovat, že drobné odchylky v morfologii se pak kumulují po mnoho generací vegetativních dělení (Schmid, 1994). Fakt, že buňka se musí vyrovnávat se změnami vnitřního prostředí a orgány jsou nuceny fungovat v čím dále menším prostoru, může organismu způsobovat stres, který se může projevat vyšší disparitou kmenu. Tato domněnka však zatím nebyla nijak formálně ověřena. Za povšimnutí také stojí, že nejmenší disparitu nemají velikostní skupiny největších buněk, ale až většinou druhé největší. Elund & Stoermer (1997) uvádějí, že iniciální buňky mají oproti běžným vegetativním buňkám pozměněnou morfologii, jsou například více zakulacené, mají nefunkční raphe, nebo nepravidelnosti v ultrastruktuře. Do největších velikostních skupin nebyly záměrně zařazovány iniciální buňky, ale pokud se v největších velikostních skupinách objevily, mohly být příčinou vyšší disparity celých skupin. Je možné, že přeměna morfologie iniciální a

postiniciální buňky v typickou morfologii vegetativních buněk se neděje při jednom buněčném dělení, ale přes několik vegetativních generací, což může způsobovat vyšší disparitu skupin největších buněk. Tato domněnka však zatím nebyla ověřena.

Asymetrie má také tendenci se během vegetativní fáze životního cyklu zvyšovat. Pokud by platila hypotéza, že zmenšování znamená pro buňky určitou míru stresu, moho by to zvyšující se asymetrii zdůvodňovat. I když největší podíl na variabilitě má symetrická složka, asymetrické segmenty také nemohou být opomenuty. Určitá míra asymetrie může být zapříčiněna způsobem morfogeneze. U penátních rozsivek se při tvorbě théky nejdříve tvoří sternum, raphe a pak se kolem dotváří systém strií (Obr. 4.2). Na sekundárně vytvořené straně théky (na obrázku spodní strana théky) mohou vznikat tzv. Voightovy diskontinuity, čili nepravidelnosti vzniklé při spojení proti sobě pěstující částí théky. Tento nesymetrický růst může pravděpodobně způsobovat nepatrnou asymetrii buněk, kterou vyzdvihla analýza.



**Obr. 4.2** Morfogeneze théky u penátních rozsivek, a - sternum, b - raphe, c - strie, převzato z Round et al. (1990)

## 4.2 Tvarová dynamika v laboratorních podmínkách

Podle Geitlera (1932) mají rozsivky během svého životního cyklu dva tzv. kardinální body. Prvním kardinálním bodem je dosažení minimální velikosti, která indukuje (spolu s podmínkami prostředí) sexuální rozmnožování. Druhým kardinálním bodem je získání maximální velikosti po sexuální reprodukci. Stává se, že některé buňky mohou takzvaně zmeškat první kardinální bod, neuskuteční pohlavní proces a množí se vegetativně dál, dokud zmenšování schránky dovolí fungování buněk. V přírodních populacích jsou tyto buňky eliminovány, ale v kulturách mohou přežívat poměrně dlouhou dobu. V kultuře také mohou s větší pravděpodobností přežívat buňky deformované či jinak znevýhodněné. Při provádění experimentů s laboratorně kultivovanými kmeny je tedy nutné vzít v úvahu, že tyto organismy jsou v poměrně atypickém stavu (Elund & Stoermer, 1997).

Co se týče této studie, můžeme si povšimnout, že nejmenší velikostní skupiny jsou značně odlehle od ostatních. Je možné, že do nejmenších velikostních skupin byly zařazeny i buňky, které neuskutečnily sexuální reprodukci a dělily se poté dál. Podle Elunda & Stoermera (1997) jsou takovéto buňky dost často teratologické, což by vysvětlovalo vysokou disparitu a tvarovou odlehlost nejmenších velikostních skupin. Tomuto faktu napovídá i pozorování, které ve své studii o životním cyklu druhu *Luticola dismutica* zdokumentovala Pouličková (2008). Naměřené velikosti sexuálně kompetentních buněk zde odpovídaly spíše 50 – 40% velikosti z největší buňky.

## 4.3 Fenotypová plasticita

Fenotypová plasticita je ve zjednodušené definici vlastnost daného genotypu produkovat různé fenotypy jako odpověď na podmínky prostředí (Pigliucci, 2001). Neodarwinistická představa oproti tomu předpokládá, že faktory prostředí jsou jen nevýznamné šumy a genetický program je to podstatné díky čemuž můžeme porozumět vývoji. Tento pohled značně zpomalil studium fenotypové plasticity, ale v evoluční biologii už ztrácí dominantní postavení (Pigliucci, 2001). Současné studie týkající se řas se zabývají například fenotypovou plasticitou vztaženou například k pH (Neustupa & Hodač) nebo k teplotě (Neustupa et al., 2008; Pichrtová & Němcová, 2011). Vztahem morfortypů rozsivek k ekologickým podmínkám se zabývali Potapova & Hamilton (2007). Všechny tyto studie se zabývají tvarovou variabilitou spojenou s vnějšími podmínkami prostředí. Pigliucci (2001) však uvádí ještě tzv. internalistickou perspektivu - „vývoj je více determinován prostředím

než geny, ale je to prostředí vnitřní, tedy vnitrobuněčné a mezibuněčné interakce, ne externí biotické a abiotické podmínky, na které se typicky zaměřují studie fenotypové plasticity“. Zdá se, že takovýto původ má právě tvarová variabilita zde studovaných kmenů. Nelze ji totiž zdůvodnit genetickou heterogenitou a pravděpodobně ani působením různých měnících se faktorů prostředí. U rozsivek je to právě vnitřní prostředí samotné, nebo lépe řečeno buněčná stěna, která způsobuje *constraints*, se kterými se buňky musí vyrovnávat a reagovat na ně. Podle Schmid (1994) se poměr objemu jádra, cytoplazmy a vakuoly během zmenšování mění, což může vést k fyziologické a následně i morfologické heterogenitě kmenu.



## 5 Závěr

Přestože fenomén zmenšování během životního cyklu je u rozsivek všeobecně znám, v dosavadní literatuře chybí jeho experimentální zdokumentování. Tato práce formalizuje tvarové změny během životního cyklu pomocí nástrojů geometrické morfometriky vůbec poprvé. Zmapování tvarové dynamiky křemičitých schránek rozsivek je potřeba nejen pro účely korektní determinace druhů na základě morfologie a možného následného využití těchto poznatků v biomonitoringu, ale i pro rozšíření obecných poznatků o vztahu ontogeneze, evoluce a fenotypové plasticity.

Podle výsledků této studie dochází během vegetativní fáze životního cyklu u buněk klonálních populací k zvyšování disparity a zároveň snižování komplexity. Tvarové změny mají převážně alometrický charakter a tvarová variabilita je u všech kmenů tvořena více než z osmdesáti procent symetrickou složkou.

Je pravděpodobné, že rigidní křemičitá buněčná stěna rozsivek těmto organismům způsobuje *constraints*, které do značné míry determinují jejich způsob života. Snižováním komplexity se vyrovnává poměr povrchu a objemu buněk, což je pro ně výhodné z fyziologického hlediska. Zvyšování disparity je pravděpodobně způsobeno epigenetickým přenášením nepřesností, které se díky způsobu morfogeneze dědí při vegetativním množení z generace na generaci. Zdá se, že sexuální rozmnožování je nutností, jež rozsivky vysvobozuje z této pasti, kterou se jim staly jejich vlastní buněčné stěny.

## 6 Literatura

**Adams DC, Rohlf FJ, Slice DE (2004).** Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology* 71: 5-16.

**Amato A, Kooistra WHCF, Ghyron JHL, Mann DG, Pröschold T, Montresor M (2007).** Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. *Protist* 158: 193-207.

**Andersen, RA (Ed.) (2005).** Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press 578 pp.

**Behnke A, Friedl T, Chepurinov VA, Mann DG (2004).** Reproductive compatibility and rDNA sequence analyses in the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta). *Journal of Phycology* 40: 193-208.

**Beszteri B, Uwe J, Medlin LK (2007).** An assessment of cryptic genetic diversity within the *Cyclotella meneghiniana* species complex (Bacillariophyta) based on nuclear and plastid genes, and amplified fragment length polymorphisms. *European Journal of Phycology* 42: 47-60.

**Bookstein FL (1997).** Landmark methods for forms without landmarks: morphometrics of group differences in outline shape. *Medical Image Analysis* 1:225-243.

**Debat V, Bégin M, Legout H, David JR. (2003).** Allometric and nonallometric components of *Drosophila* wing shape respond differently to developmental temperature. *Evolution* 57: 2773-2784.

**De Queiroz K (2005).** Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America* 102: 6600-6607.

**Dryden IL, Mardia KV (1998).** Statistical analysis of shape. John Wiley & Sons, New York 347 pp.

**Edgar SM, Theriot EC (2004).** Phylogeny of *Aulacoseira* (Bacillariophyta) based on molecules and morphology. *Journal of Phycology* 40: 772-788.

**Elund MB, Stoermer EF (1997).** Ecological, evolutionary, and systematic significance of diatom life history. *J. Phycol.* 33: 897-918.

**Falasco E, Bona F, Badino G, Hoffmann L, Ector L (2009).** Diatom teratological forms and environmental alterations: a review. *Hydrobiologia* 623: 1-35.

**Foote M (1993).** Contributions of individual taxa to overall morphological disparity. *Paleobiology* 19: 403-419.

**Geitler L (1932).** Der Formwechsel der pennaten Diatomeen (Kieselalgen). *Arch. Protist.* 78: 1-226

**Gunz P, Mitteroecker P, Bookstein FL (2005).** Semilandmarks in three dimensions. *Modern morphometrics in physical anthropology*, Springer US 73-98.

**Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2001).** PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 4: 1-9.

**Chepurnov VA, Mann DG, Sabbe K, Vyverman W (2004).** Experimental studies on sexual reproduction in diatoms. *International review of cytology* 237: 91-154.

**Kendall DG (1977).** The diffusion of shape. *Advances in applied probability* 9: 428-430.

**Klingenberg CP, Barluenga M, Meyer A (2002).** Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* 56: 1909-1920.

**Kociolek JP, Stoermer EF (2010).** Variation and polymorphism in diatoms: the triple helix of development, genetics and environment. A review of the literature. *Vie et milieu* 60: 75-87.

**Lowe CD, Kemp SJ, Montagnes DJS (2005).** An interdisciplinary approach to assess the functional diversity of free-living microscopic eukaryotes. *Aquatic microbial ecology* 41: 67-77.

**MacDonald JD (1869).** On the structure of diatomaceous frustule, and its genetic cycle. *Annals and Magazine of Natural History*, series 4, 3: 1-8.

**Mann DG (1999).** The species concept in diatoms. *Phycologia* 38: 437-495.

**Mann DG et al. (2004).** The *Sellaphora puppula* species complex (Bacillariophyceae): morphometric analysis, ultrastructure and mating data provide evidence for five new species. *Phycologia* 43: 459-482.

**Mann DG (2010).** Discovering diatom species: is a long history of disagreements about species level taxonomy now at an end? *Plant ecology and evolution* 143: 251-254.

**Mayr E (1942).** *Systematics and the Origin of Species*. Columbia university press, New York.

**Neustupa J (2005).** Phenotypic plasticity of microalgal cultures in culture collections: a geometric morphometric approach. *Oceanol. Hydrobiol. Stud.* 34: 97-107.

**Neustupa J, Hodač L (2005).** Changes in shape of the coenobial cells of an experimental strain of *Pediastrum duplex* var. *duplex* (Chlorophyta) reared at different pHs. *Preslia* 77: 439-452.

**Neustupa J, Šťastný J (2006).** The geometric morphometric study of Central European species of the genus *Micrasterias* (Zygnematophyceae, Viridiplantae). *Preslia* 78: 253-263.

**Neustupa J, Němcová Y (2007).** A geometric morphometric study of the variation in scales of *Mallomonas striata* (Synurophyceae, Heterokontophyta). *Phycologia* 46: 123-130.

**Neustupa J, Černá K, Šťastný J (2009).** Diversity and morphological disparity of desmid assemblages in Central European peatlands. *Hydrobiologia* 630: 243-256.

**Neustupa J (2013).** Patterns of symmetric and asymmetric morphological variation in unicellular green microalgae of the genus *Micrasterias* (Desmidiales, Viridiplantae). *Fottea* 13: 53-63.

**Pappas JL, Fowler GW, Stoermer EF (2001).** Calculating shape descriptors from Fourier analysis: shape analysis of *Asterionella* (Heterokontophyta, Bacillariophyceae). *Phycologia* 40: 440-456.

**Pappas JL, Stoermer EF (2003).** Legendre shape descriptors and shape group determination of specimens in the *Cymbella cistula* species complex. *Phycologia* 42: 90-97.

- Pfitzer E (1869).** Über den Bau und die Zellteilung der Diatomeen. *Botanische Zeitung* 27: 774-776.
- Pichrtová M, Němcová Y (2011).** Effect of temperature on size and shape of silica scales in *Synura petersenii* and *Malomonas tonsurata* (Stramenopiles). *Hydrobiologia* 673: 1-11.
- Pigliucci M (2001).** Phenotypic plasticity: beyond nature and nurture. Johns Hopkins University Press.
- Potapova M, Hamilton PB (2007).** Morphological and ecological variation within the *Achnantheidium minutissimum* (Bacillariophyceae) species complex1. *Journal of Phycology* 43: 561-575.
- Pouličková A, Mann DG (2006).** Sexual reproduction in *Navicula cryptocephala* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 42: 872-886.
- Pouličková A, Hašler P (2007).** Aerophytic diatoms from caves in central Moravia (Czech Republic). *Preslia* 79: 185-204.
- Pouličková A (2008).** Morphology, cytology and sexual reproduction in the aerophytic cave diatom *Luticola dismutica* (Bacillariophyceae). *Preslia* 80: 87-99.
- R Developmental Core Team (2012).** *R: A Language and Environment for Statistical Computing*.
- Rhode KM, Pappas JL, Stoermer EF (2001).** Quantitative analysis of shape variation in type and modern populations of *Meridion* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 37: 175-183.
- Rohlf JF, Marcus LF (1993).** A revolution morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution* 8: 129-132.
- Rohlf FJ (2003).** *TpsSmall Version 1.20*. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY.
- Rohlf FJ (2004).** *TpsDig Version 1.40*. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, NY.
- Rohlf FJ (2004).** *TpsSpline Version 1.20*. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY.

**Rohlf FJ (2008).** *TpsRelw Version 1.46*. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY.

**Rohlf JF (2009).** *TpsUtil Version 1.45*. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, NY.

**Rohlf FJ (2009).** *TpsRegr Version 1.37*. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY.

**Richtsmeier JT, Burke DV, Lele SR (2002).** The promise of geometric morphometrics. *American journal of physical anthropology* 119: 63-91.

**Round FE, Crawford RM, Mann DG (1990).** *The Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge University Press, Cambridge UK 131 pp.

**Savriama Y, Klingenberg CP (2011).** Beyond bilateral symmetry: geometric morphometric methods for any type of symmetry. *BMC evolutionary biology*, 11: 280.

**Schmid AMM (1994).** Aspects of morphogenesis and function of diatom cell walls with implications for taxonomy. *Protoplasma* 181: 43-60.

**Simpson A & Roger AJ (2004).** The real kingdoms of eukaryotes. *Curr. Biol.* 14: 693-6.

**Sims PA, Mann DG, Medlin LK (2006).** Evolution of the diatoms: insights from fossil, biological and molecular data. *Phycologia* 45: 361-402.

**Stoermer EF, Smol JP (1999).** *The Diatoms: applications for the environmental and earth sciences*. Cambridge University Press, Cambridge UK 455 pp.

**Theriot E, Håkansson H, Stoermer EF (1988).** Morphometric analysis of *Stephanodiscus alpinus* (Bacillariophyceae) and its morphology as an indicator of lake trophic status. *Phycologia* 27: 485-493.

**Theriot E, Ladewski TB (1986).** Morphometric analysis of shape of specimens from the neotype of *Tabellaria flocculosa* (Bacillariophyceae). *American journal of botany* 73: 224-229.

**Theriot E, Stoermer EF (1984).** Principal component analysis of character variation in *Stephanodiscus niagarae* Ehrenb.: morphological variation related to lake trophic status. 7th Diatom Symposium, Koenigstein 97 – 111.

**Trobajo R, Clavero E, Chepurnov VA, Sabbe K, Mann DG, Ishihara S, Cox EJ (2009).** Morphological, genetic and mating diversity within the widespread bioindicator *Nitzschia palea* (Bacillariophyceae). *Phycologia* 48: 443-459.

**Van Den Hoek C, Mann DG, Jahns HM, (1995).** *Algae: An introduction to phycology.* Cambridge University Press, Cambridge UK 627 pp.

**Vanormelingen P, Chepurnov VA, Mann DG, Sabbe K, Vyverman W (2008).** Genetic Divergence and Reproductive Barriers among Morphologically Heterogeneous Sympatric Clones of *Eunotia bilunaris* Sensu Lato (Bacillariophyta). *Protist* 159: 73-90.

**Veselá J, Neustupa J, Pichrtová M, Pouličková A (2009).** Morphometric study of *Navicula* morphospecies (Bacillariophyta) with respect to diatom life cycle. *Fottea* 9: 307-316.

**Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD, Fink WL (2004).** *Geometric morphometrics for biologists.* Elsevier academic press, New York 443 pp.