

Přírodovědecká fakulta University Karlovy v Praze

Katedra botaniky

obor: systematika a ekologie bezcévných rostlin

Bakalářská seminární práce

**Morfologie a fenotypická plasticita druhu
Pediastrum duplex (Chlorophyceae)**

Ladislav Hodač

školitel:

RNDr. Jiří Neustupa, Ph.D.

2005

OBSAH

<i>Předmluva</i>	2
<i>Úvodem</i>	3
1. Teoretická část.....	4
1.1. Morfologie rodu <i>Pediastrum</i>	4
1.1.1. Morfologická variabilita a životní cyklus zástupců rodu <i>Pediastrum</i>	4
1.1.2. Ekologické nároky a rozšíření zástupců rodu <i>Pediastrum</i>	9
1.1.3. Morfologická charakteristika, ekologie a rozšíření <i>Pediastrum duplex</i>	10
1.2. Analýsa tvaru.....	12
1.2.1. Geometrická morfometrika – úvod	12
1.2.3.1. Landmarky a tvar	13
1.2.3.2. Symetrie a symetrisace.....	16
1.2.3.3. Superposice	17
1.2.3.4. Thin-plate spline.....	18
1.2.3.5. Analýsa relativních warpů.....	20
1.2.3.6. Testy párových porovnání	21
2. Praktická část.....	22
2.1. Geometricko-morfometrická studie <i>Pediastrum duplex</i>	22
2.1.1. Úvod	22
2.1.2. Metodika práce	23
2.1.2.1. Digitální mikrofotografie a vymezení význačných bodů	23
2.1.2.2. Symetrisace	23
2.1.2.3. Superposice	23
2.1.3. Výsledky.....	24
2.1.3.1. Thin-plate spline – visualisace	24
2.1.3.2. Skupinová srovnání a shluková analýsa.....	25
2.1.3.3. Analýsa relativních warpů a mnohorozměrná regrese	27
2.1.4. Závěr.....	29
2.2. Diversita fytoplanktonu sledovaných lokalit.....	30
2.2.1. Lokality	30
2.2.2. Metodika odběru, zpracování a uchování vzorků	31
2.2.3. Výsledky.....	32
2.2.3. Závěr.....	35
2.3. Kultivace vybraných zástupců rodu <i>Pediastrum</i>	35
2.3.1. Metodika.....	35
2.3.1. Výsledky.....	36
2.3.2. Závěr.....	37
3. Seznam použité literatury	38

Předmluva

Předloženou seminární práci jsem rozčlenil do dvou samostatných celků. V první, teoretické části, se zabývám (1) úvodem do morfologie zelených kokálních řas rodu *Pediastrum* (Chlorophyceae, Sphaeropleales, Hydrodictyaceae) se zvláštním zaměřením na fenotypickou plasticitu druhu *Pediastrum duplex* a (2) problematikou landmarkových metod geometrické morfometriky, jako potenciálního nástroje studia dynamiky tvaroprostoru modelových mikroorganismů - v tomto bodě spočívá těžiště celé seminární práce.

Druhá, praktická, část je věnována (1) vlastní aplikaci zvolených metod geometrické morfometriky při studiu meziskupinové tvarové variability přírodních subpopulací *Pediastrum duplex*, (2) diversitě fytoplanktonu zdrojových lokalit a (3) problematice izolace a kultivace vybraných zástupců rodu *Pediastrum*.

V průběhu vypracování praktické části jsem obdržel dovednosti nezbytné pro zdárný průběh tematicky navazující diplomové práce, ve které se zaměřím na rozšíření a prohloubení našich znalostí o morfologické mezipopulační vnitrodruhové variabilitě druhu *Pediastrum duplex*. Nabyté zkušenosti s izolací a kultivací těchto řas jsou vstupním předpokladem pro budoucí experimenty s monoklonálními kulturami, jež, jak doufám, povedou k alespoň částečnému odhalení šíře fenotypické plasticity v přírodě častých druhů. Pro hodnocení výsledků tvarových analys přírodních populací *Pediastrum duplex* bude též zdrojem přídatné informace znalost druhového složení planktonních společenstev, která se opět zakládá na výsledcích této seminární práce.

Na tomto místě považuji za nezbytné vyjádřit upřímné poděkování svému školiteli Jiřímu Neustupovi, neboť právě jemu vděčím za nepostradatelný úvod do problematiky předložené práce, jakož i spolehlivé vedení během vypracování, kdy zásluhou jeho bezmezné trpělivosti a vstřícnosti bylo závčas podchyceno mnoho zásadních chyb a omylů. Velmi rád bych také poděkoval všem kolegům z algologické laboratoře, Pavlovi Škaloudovi, Magdě Řezáčové, Sylvii Novákové, Janě Veselé, Lucii Ošlejškové a Janovi Šťastnému za nedocenitelnou ochotu nezištně kdykoli pomoci dobrou radou i skutkem.

Úvodem

Nesmírná tvarová diversita planktonních mikroorganismů je fenoménem vědě známým již od času sestrojení prvního světelného mikroskopu roku 1635 a týká se živých forem napříč všemi skupinami recentních i vymřelých eukaryot. K tvarově zdaleka nejrozmanitějším počítáme společenstva fotoautotrofních planktonních mikroorganismů, tzv. fytoplankton, jehož nesčetní zástupci se stali předmětem četných floristických i taxonomických studií, nicméně úhrnem nesrovnatelně menší kvantum prací bylo věnováno zodpovězení otázky konkrétnějšího vymezení plasticity tvarů mikrobiálního světa, neboť, jak se mnohokrát ukázalo, hranice morfology definovaných znaků nejsou v četných případech ani zdaleka ostré a jejich stanovení mnohdy bylo a dodnes je zatíženo individuální subjektivitou. Úvodním slovem v předmluvě ke skriptům jistého kursu biostatistiky jejich autor poznamenává, že (dnešní) biologie je již vědou kvantitativní (LEPŠ 1996). Lze tedy pomocí vhodně zvolených statistických technik objektivně postihnout šíři fenotypické plasticity a zejména pak směry tvarové varibility vybraného modelového mikroorganismu, kokální zelené řasy? Je celkový rozsah vnitrodruhové morfologické plasticity popsateľný na základě studia jediné subpopulace tohoto druhu, a jaké je třeba předpokládat lokální morfologické odchylky v rámci užší, či širší geografické oblasti?

Kromě jiného i pro zodpovězení výše uvedených otázek se v moderní biologii zavádí geometrická morfometrika, jejíž značná vypovídací hodnota je zcela odvislá od příslušného aparátu technik mnohorozměrné statistiky, zvláště ve spojení s vysoce ilustrativními metodami grafického zobrazení výstupů statistických modelů.

Prvotním cílem této seminární práce je zodpovězení otázky, zda lze prostřednictvím zvolených geometricko-morfometrických technik postihnout biologicky relevantní infraspecifickou morfologickou variabilitu planktonní řasy *Pediastrum duplex*, čili míru lokálně specifické fenotypické plasticity v podobě odchylek od pomyslné „průměrné“ formy. Potenciálně zajímavým výstupem zamýšlené navazující diplomové práce by mohlo být závěrečné zjištění, liší-li jednotlivé subpopulace získané z lokalit odlišných v celé řadě rozmanitých faktorů abiotických (pH, konduktivita, teplota) i biotických (složení společenstev fytoplanktonu s důrazem na hlavní dominanty). Atraktivní je také případná možnost testování

statistické průkaznosti odlišností populací organismu téhož systematického zařazení v závislosti na konkrétní geografické poloze a typu zdrojové lokality.

Jako modelový mikroorganismus jsem si pro předloženou studii zvolil zelenou kokální řasu *Pediastrum duplex*, dnes jednoho z nejhojnějších zástupců svého rodu (i celé čeledi *Hydrodictyaceae*) s takřka kosmopolitním areálem rozšíření a širokou ekologickou valencí. Jedná se o obecně abundantní součást společenstev fytoplanktonu většiny eutrofních sladkovodních nádrží, rybníků a jezer. Zároveň (a toto byl základní moment při uvážení jejich vhodnosti) jde o mikroorganismy vyhraněných rodových a druhových morfologických charakteristik.

1. Teoretická část

1.1. Morfologie rodu *Pediastrum*

1.1.1. Morfologická variabilita a životní cyklus zástupců rodu *Pediastrum*

„*Alga planta, radiata, sine thallo proprio, e cellulis (sporangiiis) compressis, massa sporacea viridis coloris farctis in, radios annuli dispositis, formata.*“ (MEYEN 1829, „Beobachtungen über einige niedere Algenformen“)

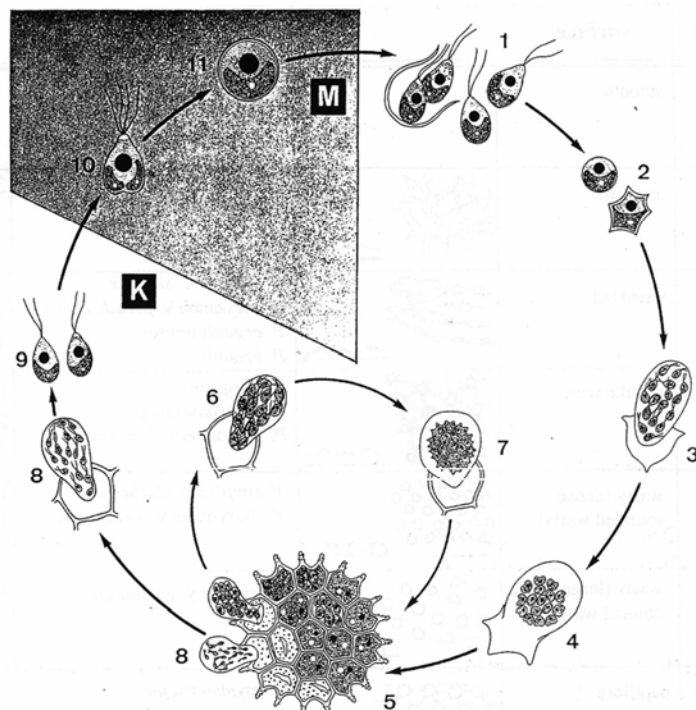
Rod *Pediastrum* MEYEN (1829) je v porovnání s mnohými ostatními planktonními coenobiálními řasami vymezen souborem poměrně spolehlivě definovaných morfologických znaků. Celkový habitus coenobia většiny zástupců rodu lze popsat jako více méně kruhový až eliptický planární útvar, sestavený z jednotlivých aplanetických buněk vzájemně pevně propojených na stycích hran buněčných stěn, popřípadě jejich výběžků. Nezřídka se v rámci rodu vyskytují odchylky od planarity, kdy jsou jednotlivé (zejména marginální) buňky v různých úhlech z roviny coenobia do jisté míry pravidelně vychýleny (*Pediastrum kawraiskyi*), anebo má přímo celá plocha coenobia tendenci vyklenout se do podoby zvonovitého habitu (*Pediastrum marvillense*). Parametry buněk užívané pro interspecifickou determinaci předložené např. SULKEM (1969) jsou odlišné v případě buněk situovaných na coenobiu vně (marginální, tj. okrajové buňky) a uvnitř (vnitřní buňky). Na buňkách

marginálních sledujeme tvar jak samotného těla buňky, tak také jejich vně (popř. dovnitř) směřujících výběžků (processi), které mohou být jednoduché a na buňkách jednotlivě (*Pediastrum simplex*), jednoduché a na buňkách vždy po dvojicích (*Pediastrum duplex*, *P. boryanum*), anebo též na buňkách po dvojicích avšak terminálně rozvětvené, pak ovšem ne více než do druhého řádu (*Pediastrum biradiatum*) – přičemž výběžky 2. řádu mohou být rovnocenné či nerovnocenné. Vnější výběžky sestávají ve většině případů z tzv. laloku (v angl. lit. *lobes*) a násadce hyalinního koncového výběžku zpravidla bez buněčného obsahu, u kterých sledujeme nejen šířku, ale zároveň i míru jejich podélného protažení (KOMÁREK & JANKOVSKÁ 2001). Dalším význačným taxonomickým znakem druhů s párovými vnějšími výběžky je tvar a velikost úhlu tzv. výřezu, který tyto struktury svírají. Výrazně se také liší utváření basální (tj. do centra coenobia směřující) části marginálních buněk, která v některých případech nese výkrojek (*Pediastrum duplex*), jinde je bez zřetelného výkrojeku (*Pediastrum boryanum* var. *brevicorne*), anebo může být směrem dovnitř coenobia vydutá (*Pediastrum boryanum* var. *forcipatum*). Vnitřní buňky jsou v porovnání s marginálními méně tvarově rozmanité, což je přirozeně dáno omezením jejich morfogeneze prostorovou indisposicí spočívající ve způsobu uspořádání buněk uvnitř coenobia. Od morfologie obou typů buněk se dále odvíjí skutečnost, je-li coenobium perforované, či nikoli; a pak-li že ano, všímáme si (ne)pravidelností v rozmístění perforací a samozřejmě jejich tvaru a především velikosti.

Mnohé z uvedených znaků se postupem času ukázaly jako nedostatečné pro spolehlivou druhovou determinaci s ohledem na jejich značnou plasticitu, soudě na základě existence mnohých přechodných forem, které nezdávka nalézáme ve vzorcích přírodních populací GLENK (1994). Modernější taxonomická praxe pracuje také s těmi morfologickými znaky, které odhalila až skenovací elektronová mikroskopie. S její pomocí lze studovat rozmanitou strukturu povrchové skulptury vnitřní vrstvy buněčné stěny, význačné charakteristickými kombinacemi vzorů sestávajících z granulí, bradavek a rýžek různého tvaru a velikosti. Taxonomická hodnota posledně zmíněného znaku však nebyla a není vždy zohledňována a někteří autoři její validitu pro determinaci např. na úrovni poddruhů zamítají. Z autorů zabývajících se v minulosti popisy zástupců rodu *Pediastrum* ještě před zavedením technik elektronové mikroskopie BRAUN (1855) a RACIBORSKI (1890) již při deskripci skulpturu buněčné stěny uvažují, naproti tomu CHODAT (1902) a NITARDY (1914) její taxonomickou hodnotu nepřipouštějí. BIGEARD (1933) je názoru, že konkrétní podoba skulptury buněčné stěny u *Pediastrum* je bezprostředně odvislá od působení faktorů vnějšího prostředí a věkové struktury populace. NIELSEN (2002) studuje variabilitu tzv. density

granulace v rámci druhu *Pediastrum boryanum*. Densita granulace udává jednotlivých povrchových útvarů buněčné stěny na úsečce délky 10 μm . Cílem studie bylo posoudit, zda je uvedený znak komplementární k ostatním morfologickým znakům při determinaci jednotlivých variet daného druhu. Výsledkem bylo uvedeno zjištění, že hustotu granulace nelze samostatně (tj. bez současné aplikace klasických morfologických znaků uvedených výše) spolehlivě použít. Autor zmíněné práce považuje za pravděpodobnou příčinu vysoké pozorované infraspecifické variability *Pediastrum boryanum* (1) odlišnosti v kultivačních podmínkách studovaných variet a (2) původ jednotlivých klonů (ve smyslu odlišnosti zdrojového genotypu).

Výsledný tvar každé buňky v coenobiu je ve výsledku mechanicky determinován průběhem procesu agregace zoospor v ranné fázi ontogenese coenobia W.F. MILLINGTON & S.R. GAWLIK (1975). Související děje asexuální a sexuální reprodukce u *Pediastrum* je možno s ohledem na současný stav poznání těchto procesů uvádí např. KOMÁREK & JANKOVSKÁ (2001). Cyklus vegetativního rozmnožování počíná uvnitř mnohojaderné (coenocytické) mateřské buňky diferenciací cytoplasmatického obsahu v určitý počet dvoubičíkatých morfologicky nerozlišených zoospor (jednojaderné, nahé, jen s cytoplasmatickou membránou na povrchu). Takto se nově vytvořivší shluk zoospor opouští prostor mateřské buňky uzavřen v hyalinním váčku z materiálu vnitřní vrstvy mateřské buněčné stěny rupturou ve vnější sporopoleninové vrstvě. Motilní zoospory se ve váčku nepohybují navzájem nezávisle, neboť jsou propojeny prostřednictvím bičíků (MILLINGTON & GAWLIK 1975), což značně omezuje možnost jejich případného neuspořádaného pohybu. V průběhu asi 10 min. od oddělení váčku se zoosporami od mateřské buňky postupně rychlost pohybu zoospor klesá a jednotlivé planetické buňky vykazují tendenci těsného shloučení za tvorby rozšířených postranních kontaktních plošek. Výsledný tvar coenobia je tedy již od počátku svého vývoje zásadně ovlivněn orientací a vzájemným prostorovým uspořádáním konstituujících složek – jednotlivých buněk. Váček z mateřské stěny, tedy jeho struktura a habitus, pravděpodobně tvar coenobia neovlivní, neboť je shlukem agregovaných zoospor záhy opuštěn. Konečný tvar externích i interních buněk coenobia, a dále i rozmanité povrchové struktury, jsou realizací uspořádání cytoskeletálního systému mikrotubulů a asociovaného transportu stavebních komponent. Nitrobuněčná mikrotubulární síť hraje také roli i při ustanovení orientace zoospory v rámci coenobia (MILLINGTON & GAWLIK 1970, MARCHANT 1974). Experimentální studie morfogenese *Pediastrum simplex* (MILLINGTON & GAWLIK 1975) přinesla zjištění, že při narušení vzájemných spojení mezi sousedícími



Obr.1.1. Životní cyklus (generativní fáze) *Pediastrum* (na příkladu *P. boryanum*): 1 – klíčení zygoty a uvolnění meiospor, 2- změna aplanetické meiospory v polyedrickou buňku, 3- uvolnění váčku se zoosporami rupturou ve stěně polyedrické buňky, 4 – formování nového coenobia ze shluku zoospor, 5 – vegetativní buňky maturovaného coenobia dávají (nepohlavní cestou) vznik dceřiným coenobiím (6-7), 8 a 9 – uvolnění isogametů z mateřské

buňky, následná tvorba planozygoty a hypnozygoty, ve které dochází k diferenciaci četných motilních meiospor. (převzato z KOMÁREK & JANKOVSKÁ 2001)

zoosporami před tvorbou coenobia, ztrácí tyto prostorovou orientaci a charakteristické výběžky (processi), vytvářející se za standardních podmínek pouze na jednom pólu maturované vegetativní buňky, se netypicky objevují ve stejném počtu na obou pólech. Tvorbou nového coenobia ze shluku zoospor se cyklus nepohlavního rozmnožování uzavírá. Cytoplasmatický obsah každé z vegetativních buněk se za příznivých podmínek může diferencovat opět v zoospory a být tak zdrojem dalších coenobií. Zatímco asexuální proces je jevem pozorovaným relativně často, sexuální reprodukce je popisována spíše zřídka. Pohlavní proces u *Pediastrum* je charakteru homothallické isogamie (KOMÁREK & JANKOVSKÁ 2001). Z mateřské buňky se uvolňují dvoubičíkaté zoidy, poněkud menší než zoospory a bez jakéhokoli obalného váčku. Isogamety z téže mateřské buňky jsou schopny vzájemné kopulace za tvorby tlustostěnné hypnozygoty, v níž se tvoří pohyblivé haploidní meiospory. Meiospory se mění na nepohyblivé haploidní polyedrické buňky, ze kterých se, podobně jako je tomu v průběhu nepohlavního cyklu, uvolňují analogické váčky se zoosporami.

Navzdory složitosti procesů odehrávajících se v průběhu utváření konečného tvaru, je řada morfologických znaků dosti stálých, příkladem lze uvést kupř. druhově charakteristický počet výběžků marginálních buněk, do jisté míry omezený interval hodnot, kterých může nabývat počet buněk v coenobiu aj. SULEK (1969) vyhodnocuje morfologickou variabilitu a význam dalších znaků pro taxonomii. Nezřídka lze pozorovat na koncích výběžků marginálních buněk kulovité, či hyalinní štětinovité útvary (borsten- und kugelförmige Gebilde), jejichž přítomnost je naprosto nepravidelná, kdy se zřejmě jedná o reakci na některý z faktorů vnějšího prostředí. Sám jsem ojediněle druhý uvedený typ těchto útvarů pozoroval na *Pediastrum duplex* var. *duplex* při analýze přírodního vzorku z eutrofní rybníční nádrže při obci Hamr na Jezeře v Severních Čechách (Liberecký kraj) a podruhé v monoklonální kultuře téhož druhu a variety. Vzhledem k dosud neznámé podmíněnosti výskytu těchto struktur v rámci subpopulace jedinců téhož druhu, nelze jim přisoudit taxonomickou hodnotu. Jiným druhově typickým znakem je úhel, jež svírají dvojice výběžků marginálních buněk, který je dle Sulka velmi proměnlivý a v extrémních případech závislý zejména na narušení některého z procesů při ontogenesi těla marginální buňky i samotných výběžků, za současného působení vnějších faktorů. Nelze vyloučit ani vliv celkového počtu buněk v coenobiu a jejich vzájemného prostorového uspořádání. SULEK (1969) shrnuje z taxonomického hlediska nejvýznačnější znaky do dvou základních skupin; (1) tvar vnitřních a okrajových buněk a dále rozvětvení a orientace výběžků marginálních buněk vůči rovině coenobia a počet a tvar postranních výběžků buněk vnitřních, (2) přítomnost a charakter skulptury buněčné stěny.

Variabilita morfologických znaků je pro zástupce rodu *Pediastrum* příznačná. V literatuře existují dokonce příklady situací, kdy nebylo na základě v běžné praxi používaných znaků možné jednoznačně determinovat jisté taxony ani na druhové úrovni. Samozřejmě i zde se nabízí otázka oprávněnosti všech současně uznávaných druhových kategorií v rámci rodu. Do jaké míry se fenotypický projev *Pediastrum duplex* odráží na podmínkách vnějšího prostředí není dosud známo, neboť studie fenotypické plasticity, tak jak je realizoval např. TRAINOR (1968) na *Scenedesmus* dosud chybí. Na morfologicky příbuzných druzích rodu *Pediastrum* však mezidruhová variabilita a předchodná stadia již studovány byly. Např. GLENK (1994) pojednává o nálezů přechodných forem mezi druhy *Pediastrum tetras* a *Pediastrum biradiatum* var. *longecornutum* (které ovšem KOMÁREK & JANKOVSKÁ (2001) pojednává jako samostatný druh *Pediastrum longecornutum*) v některých franckých vodních nádržích. Popisované přechody označuje GLENK (1994) termínem mezidruhová morfa (interspezifische Morpha). Nemá k dispozici skenovací elektronový

mikroskop, který by umožnil pozorovat povrchovou skulpturu a proto nemůže své přechodné formy do žádného z nejbližších podobných druhů zařadit v hodnotě poddruhu. Dle jeho názoru není možné ani říci, jedná-li se o některé z onthogenetických stadií uvažovaných druhů, o mutanty, variety, poddruhy, či snad dokonce o odlišné druhy. I další mezidruhově–srovnávací studie, kterou uskutečnil CHANG (1981) na kulturách *Pediastrum boryanum* a *Pediastrum duplex*, ověřuje nutnost uvážení značné plasticity znaků používaných v taxonomii.

1.1.2. Ekologické nároky a rozšíření zástupců rodu *Pediastrum*

Charakteristickým ekosystémem, kde je možné se zástupci rodu *Pediastrum* nejčastěji setkat, jsou sladkovodní nádrže různého stupně trofie. Roli hraje též zeměpisná šířka, neboť některé druhy vzhledem ke svému geografickému rozšíření vykazují zřetelně omezené biogeografické areály (*Pediastrum kawraiskyi*, *P. privum*). Druhy jsou úhrnem součástí společenstev fytoplanktonu tůní, řek, jezer a rybníků a spíše jen zřídka je nalzáme i v metafytonu (*P. duplex*, *P. boryanum*, *P. simplex* apod.). Výjimku tvoří ekologicky ostře vyhraněné druhy vázané na jiný typ stanoviště (*P. braunii* v mechu vlhkého prostředí kapavých skal). Zatímco v globálním měřítku je geografické rozšíření druhů dáno zejména zeměpisnou šířkou, v regionálním měřítku se uplatňuje spíše vliv lokality konkrétního typu. Kosmopolitní areál je charakteristický pro druhy *P. boryanum*, *P. duplex*, *P. tetras* a *P. biradiatum*, ovšem jen s omezenou platností v případě některých variet. Nikoli nevýznamné procento druhů má striktně boreo–alpínský areál rozšíření s výskytem reliktního charakteru v mírném pásu (*P. braunii*, *P. kawraiskyi*). Uvedené druhy obývají zejména chladná čistá jezera severského (skandinávského) typu a jsou dosti citlivé na sílící anthropogenní disturbanci. (KOMÁREK & JANKOVSKÁ 2001) se domnívají, že rod jako celek je v současné době zřetelně na ústupu. Soudí tak na základě zjištění, že právě ty druhy, které dnes nacházíme relativně vzácně a v rámci dosti geograficky omezeného území, nacházejí se hojně v sedimentech chronologicky spadajících do období posledního zalednění (Würm), kde tvoří takřka dominanty. Takovým nápadně reliktním areálem je význačný například druh *P. argentinense*, vázaný výhradně na neotropickou oblast Jižní Ameriky (TELL, 2004b). Rod *Pediastrum* zahrnuje také pozoruhodnou skupinu druhů endemických, či nalezených toliko jednou (za pořízení věrohodného záznamu). Příkladem lze uvést *P. marvilliense*, endemitní druh Kerguelenského souostroví v Indickém oceánu, *P. boryanum* var. *campanulatum*

zvonovitého habitu coenobia, či *P. tricuspdatum*, nalezené ve střední Africe, které je v rámci rodu zcela výjimečné typem marginálních buněk s třemi externími výběžky. Studujeme-li podrobněji areály jednotlivých variet jinak obecně kosmopolitně rošířených druhů, zjišťujeme, že tyto lze rozdělit na spíše teplomilnější na jedné straně, preferující tropické oblasti a variety osídlující stenothermní vodní nádrže temperátní zony na straně druhé.

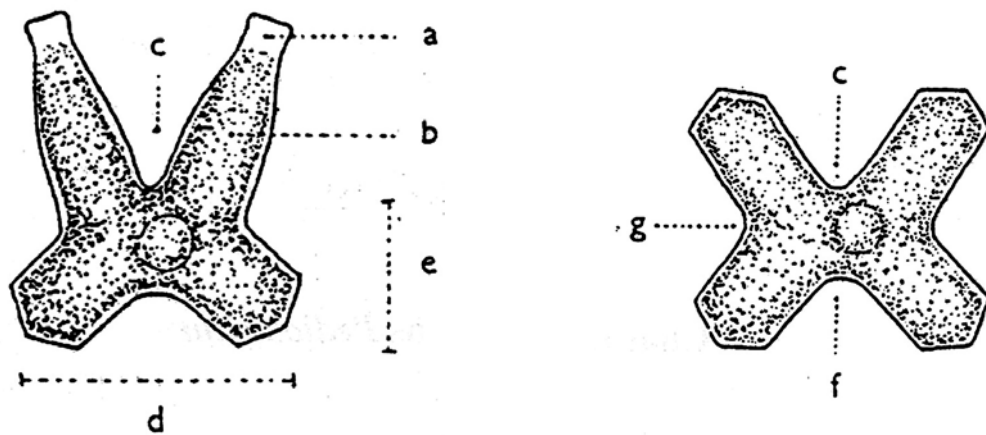
Dalším aspektem studia zástupců rodu *Pediastrum* jsou atraktivní paleoekologické aplikace (KOMÁREK & JANKOVSKÁ 2001), neboť coenobia s rigidní sporopoleninovou vrstvou buněčných stěn jsou dobře zachována ve fosilním a subfosilním sedimentárním záznamu, a proto je nezdívka nacházíme v palynologických vzorcích. Nejstarší dosud objevené a spolehlivě doložené nálezy pocházejí již z ranné křídly (TELL 2004a). Korektní determinace *Pediastrum* naléza cenné uplatnění v usuzování na někdejší klimatické poměry a konkrétní typy stanovišť, což hraje význačnou roli v současném výzkumu proměnlivosti životního prostředí a dosavadního vývoje zemských ekosystémů. Je ovšem třeba poznamenat, že díky snadnému šíření těchto „palynomorf“ nacházíme zjevně allochtonní společenstva druhů *Pediastrum* také v sedimentech kontinentálního šelfu, popř. i za jeho hranicemi, kam byla vyplavena vodními toky. Dosavadní palynologický záznam se ovšem spokojil s determinací na úrovni tolika rodu, ačkoli je dnes již zřejmé, že srovnání jednotlivých fosilních druhů s jejich recentními protějšky může být vzhledem k naší současné dobré znalosti ekologických nároků těchto druhů zdrojem zásadních informací o podobě tehdejšího prostředí. Příkladem lze uvést dvojici druhů (*Pediastrum kawraiskyi*, *P. mustersii*, TELL 2004a) charakteristických pro stenothermní prostředí chladných jezer mírného, až chladného mírného pásu, jehož nálezy pocházejí, jejichž fosilní nálezy jsou známy z období na přelomu terciéru a kvartéru, kdy, s přihlédnutím k dnešnímu stavu, byly tyto taxony daleko častější.

1.1.3. Morfologická charakteristika, ekologie a rozšíření *Pediastrum duplex*

Pediastrum duplex MEYEN Nova Acta Phys. Med. Acad. Caes. Leop. – Carol. XIV; 772, 1829, Fig. 9

„*Cellulae duobus cum radiis*“ (MEYEN 1829). Coenobia tohoto druhu jsou vždy pravidelně perforována, kruhového, zřídka eliptického obrysu. Buňky jsou uspořádány většinou (symetricky) koncentricky, méně často též spirálně anebo bez zřejmé pravidelnosti. Počet buněk se pohybuje v rozmezí 8 – 64 (128). Buňky se vyznačují

výraznými výřezy tvaru „V“, který ohraničují v případě marginálních buněk dva konické nevětvené laloky delší než tělo buňky, situované v rovině coenobia a ukončené krátkými cylindrickými (hyalinními) výběžky. Na konci výběžků pozorujeme občas ve svazcích odstávající jemné, ve světelném mikroskopu stěží patrné, avšak relativně dlouhé štětinovité paprsky, útvary pravděpodobně bílkovinné povahy, se zřejmě pozitivním vlivem na zvýšení hodnoty tvarového odporu (PADISÁK ET AL. 2004). Buněčná stěna je na povrchu hladká, případně jemně až výrazně síťovitě skulpturovaná. Horní hranici velikosti coenobia udávají KOMÁREK & JANKOVSKÁ (2001) hodnotou 212 μm . Rozměry marginálních buněk se pohybují v rozmezí 6-28 μm , u vnitřních 4-30 μm . Veškeré morfologické znaky jsou považovány za variabilní. Na základě prostého srovnání obrazové dokumentace nálezů *Pediastrum duplex* v publikacích starších SULEK (1969) a recentních KOMÁREK & JANKOVSKÁ (2001), TELL (2004b), lze shrnout, že nejmarkantnější rozdíly mezi subpopulacemi (i v jejich rámci) spočívají v odlišných poměrech velikosti externích výběžků (včetně laloků) marginálních buněk vůči rozměrům buněčného těla. Vedle toho je dosti proměnlivý také úhel jejich vnější výběžky svírají; ten může být jak výrazně ostrý, tak i větší než 100° , ovšemže s kontinuem přechodných forem.



Obr.1.2. Morfologie marginálních (vlevo) a vnitřních (vpravo) buněk coenobií *Pediastrum duplex*. a: hyalinní výběžek, b: externí lalok, c: externí zářez, d: šířka buňky, e: délka buňky, f: interní zářez, g: boční zářez. (převzato z KOMÁREK & JANKOVSKÁ 2001)

Zatímco novější publikace (KOMÁREK & JANKOVSKÁ 2001) uvádějí členění druhu na čtyři variety (*P. duplex* var. *duplex*, *P. duplex* var. *gracillimum*, *P. duplex* var. *asperum*), popř. tři (SULEK 1969), názory starších autorů se v tomto bodě značně rozcházejí. Například práce

NITARDYHO (1914) uvádí i taxony v pozdějších pracích (KOMÁREK & JANKOVSKÁ 2001) se neobjevující (*P. duplex* var. *rotundatum*). S ohledem na poslední jmenovanou publikaci, lze shrnout diferenční znaky variet na kvantitativní (počet buněk v coenobiu, a jejich rozměry) a kvalitativní (tvar buněk a jejich laloků a výběžků a skulptura buněčné stěny).

Z hlediska ekologických nároků jedná se o druh striktně planktonní, nalézáný příležitostně též v metafytonu eutrofních vodních nádrží temperátní zóny. V publikaci SLÁDEČEK V. & SLÁDEČKOVÁ A. (1996) *P. duplex* přísluší saprobní index roven 1,8 (eutrofní nádrže) a zároveň středně vysoká (=3) bioindikační hodnota, odrážející výskyt druhu nejen ve vodním prostředí β -mesosaprobního trofického stupně (kde je nejčastější), ale méně také v oligotrofních vodách a s minimální četností v nádržích α -mesosaprobních.

Pediastrum duplex (zastoupený varietami *duplex* a *gracillimum*) je jedním z nejčastějších druhů rodu s areálem v mírném pásu až po subpolární oblasti (existuje ovšem i zmínka o nálezu var. *gracillimum* na Filipínách). V tropech je pravděpodobně hojnější varieta *rugulosum*, z Kuby pochází SULKŮV (1996) nález variety *subgranulatum*. Geografické rozšíření variety *asperum* je prakticky neznámé.

Pokud se týče fosilního a subfosilního záznamu, *P. duplex* je vedle *P. boryanum* nejčastějším druhem v pylových diagramech (KOMÁREK & JANKOVSKÁ 2001). Četné nálezy v subfosilních sedimentech jsou datované z období na počátku holocenu. Komárek v téže publikaci ovšem uvádí, že větší množství taxonů identifikovaných jako "*Pediastrum sp.*" a pokládáných za *P. duplex*, bylo determinováno pravděpodobně mylně. Z korektně určených a spolehlivě dokumentovaných variet druhu je v palynologických vzorcích nejčastější var. *rugulosum* známá již z pozdního období posledního glaciálu a samozřejmě holocenu.

1.2. Analýsa tvaru

1.2.1. Geometrická morfometrika – úvod

Geometrická morfometrika (dále jen GM) je celým rozsáhlým souborem metodických postupů, pomocí nichž se snažíme popsat jednu ze základních charakteristik biologických objektů, jejich tvar. GM ve své podstatě reflektuje ideové schema klasické organismální morfologie, které tvar (formu) organismu uvažuje jako základní podstatnou vlastnost, na základě níž lze biologické objekty vzájemně porovnávat, případně seskupovat do hierarchicky

uspořádaných systémů. Lze tudíž GM v zásadě nahlížet jako jistý protipól metodám čistě genetickým a molekulárně biologickým, již nahlízejí životní projevy organismů prismatickým biochemických analys.

Současný trend rostoucí preference GM přístupů v organismální biologii a biogeografii je snad mj. i odrazem poznání, že složitost dějů spojených s genovou expresí a její regulací je příliš vysoká, než aby za dostupného interpretačního potenciálu mohla být zdrojem poznání o tak komplexní problematice, jako je ontogenese tvaru, jeho dynamika a tedy celková fenotypická plasticita organismu. Značná vypovídací hodnota je geometricko-morfometrickým technikám propůjčena především díky celému aparátu sofistikovaných metod mnohorozměrné statistiky ve spojení s umožněním přímé ilustrativní visualisace výsledků matematického modelování a statistických konstrukcí. Opíráme se zde o myšlenku, že s tvarem organismu, ať již jej postihneme v podobě konfigurace význačných bodů, nebo některou z obrysových metod, je možno operovat jako s jednotlivou mnohorozměrnou proměnnou, funkčním celkem. Dynamika projevů ve variabilitě partikulárních komponent takto postiženého tvaru se pochopitelně odráží na výslednici celkového tvarového trendu, vnějšího morfologického fenotypu.

Velmi atraktivní aplikace v současnosti nalézá GM v oblasti výzkumu fylogenetických vztahů organismů, kupř. umožněním rekonstrukce podoby společných předků na základě analýsy tvarů a jejich změn v průběhu evoluce tak, jak se projevila na tvarech popsaných u navzájem příbuzných recentních descendentů. Toho využívá i moderní paleontologie při hodnocení taxonomické příslušnosti fosilních nálezů.

1.2.3. Geometricko-morfometrická studie *Pediastrum duplex*

1.2.3.1. Landmarky a tvar

Definici tvaru, kterou podal roku 1977 KENDALL, uvádí ve své učebnici GM pro biology ZELDITCH et al. (2004) zhruba v této podobě: „*Tvarem rozumíme veškerou geometrickou informaci o objektu která pozůstává po odstranění vlivu jeho polohy, užitého měřítka a konkrétní míry rotace v prostoru kolem některé z os jím procházejících*“.

Vzhledem k charakteru obrysu studovaných objektů, zvolil jsem techniku analýsy tvaru prostřednictvím tzv. význačných bodů, landmarků. Tento přístup se odvíjí od

skutečnosti, že tvar marginálních buněk coenobií *Pediastrum duplex* je příliš komplikovaný, než aby bylo vhodné pokusit se o vystižení a popis jeho obrysu např. metodou Fourierovy eliptické analýsy, nebo Eigenshape analýsy. Jedna z více předností landmarkových metod vyplývá již z definice těchto tvarových charakteristik, která uvádí, že landmarky jsou takové body na dvou-, či třírozměrné projekci objektu, které jsou umístěny homologicky na (bez výjimky) všech objektech v rámci populace, druhu, či rodu atd. podle preferovaného měřítka rozlišení na jehož úrovni porovnání provádíme. Vymezení landmarků zřejmě naprosto nutně nesouvisí s definicí homologie biologické, ačkoli v četných případech intuitivně landmarky vymezujeme právě v těch bodech, které jsou homologické nejen geometricky, ale též biologicky. Ve smyslu Booksteinem navržené typologie (BOOKSTEIN 1991) užil jsem v této studii landmarky dvou typů, konkrétně tzv. typu III a IV, přičemž landmarky třetího typu vymezují extremity a jsou tedy v rámci subpopulace umístěny vždy homologicky, zatímco druhý typ s tímto nekoresponduje, naopak, nejenže jeho lokalizace není přesně definována, navíc se může jistým (níže popsaným) způsobem při provádění některých konkrétních superposičních technik pohybovat. Pro posledně zmíněný typ (IV) užívá současná GM terminologie označení semilandmark, čili bod umístěný v arbitrárně daném místě na obrysu. Celým souborem semilandmarků jsme schopni přibližně postihnout kontury na obrysech objektů již mají podoby rozmanitých křivek. Zmíněné možnosti pohybu semilandmarků využívá níže rozvedená superposiční technika (tzv. prokrustovská superimposice), v jejímž průběhu je těmto význačným bodům „povoleno klouzat“ podél přímky paralelní se spojnicí dvou bezprostředně po obou stranách s „klouzajícím“ sousedícím význačným bodů, ať již landmarků, či semilandmarků. Problematiku nejasností kolem užití semilandmarků spojených s dosud ne zcela vyřešenou otázkou se jich užitím spojené ztráty stupňů volnosti diskutuje ZELDITCH et al. (2004).

Jako nezbytnou součást úvodu do problematiky zachycení tvaru prostřednictvím konfigurace landmarků je třeba uvést základní vstupní předpoklad o chování takto postiženého tvaru objektu, či struktury ve formě funkčního celku, či operační jednotky. Toto je zcela zásadní rozdíl v přístupu jakým se moderní geometrická morfometrika odlišuje od oné tzv. tradiční, kde jednotlivá morfometrická měření vystupují jako samostatné tvarové proměnné a v návaznosti na tuto skutečnost se pochopitelně postupy interpretace výstupů mnohorozměrných statistických analýs následně liší. Současná, tzv. moderní, tedy geometrická, morfometrika v duchu KENDALLOVY (1977) definice tvaru nepojednává landmarky jako samostatné tvarové proměnné, jejichž chování by bylo možno studovat v rámci objektu odděleně. Naproti tomu jsou jejich projevy (v podobě změn polohy)

navzájem závislé a jakákoli posiční změna každého z nich je bezprostředně asociována s pohybem všech ostatních v závislosti na intenzitě deformujícího faktoru a výchozí konfiguraci landmarků, integrálních součástí celistvosti tvaru.

Dříve, než přistoupím k vlastnímu popisu zachycení tvaru *Pediastrum duplex*, je vhodné stručně naznačit dimensionalitu výchozího pomyslného prostoru v němž jsou všechny výběrové konfigurace landmarků lokalizovány. Tato je dána skalárním součinem počtu všech užitých význačných bodů a počtem jejich kartesiánských souřadnic korespondujících s počtem rozměrů, v nichž byly landmarky zachyceny (tedy nečastěji 2, v případě komplexnějších studií 3). Vzhledem k výrazně planárnímu habitu marginálních buněk coenobií *Pediastrum duplex*, byly tyto pojednány jako přibližně dvourozměrné útvary a jisté (zjevně) reálně existující odchylky od perfektní planarity nebyly dále brány v potaz.. Vedle otázky vhodnosti aproximace buněk do podoby rovinných objektů, bylo dále nutné řešit problematiku práce se symetrickými strukturami, kde je zcela nezbytné vliv případné (flukтуаční) asymetrie na dynamiku tvaru vhodným způsobem odstranit. Jelikož studované buňky vykazují výraznou bilaterální symetrii podle vertikální (anatomické) mediální osy, považoval jsem za vhodné, věnovat symetrisaci a užitě symetrisační technice následující stručnou kapitolku.

Celkový počet na vnějším obrysu buněk vymezených bodů jsem stanovil na 28. Z toho 11 připadá na landmarky typu III a zbývajícím jsou typu IV (semilandmarky). Landmarky s pořadovým označením 1 a 2 defnují oba rohové konce hyalinního zakončení výběžků (procesi) „levé“ poloviny symetrické buňky, analogií jsou landmarky 10 a 11 na „pravé“ půli (pravolevá orientace je nutně opatřena uvozovkami, neboť prakticky nelze rozhodnout, která je planární coenobium na mikrofotografii vzhledem k pozorovateli orientováno, tj. zda plochou „ventrální“, anebo „dorsální“, pak-li že ovšem uvedená polarita vůbec existuje). Pořadová čísla 22, 23 a 24 značí landmarky na „pravé“ půli buňky a vymezují charakteristicky triangulární strukturu spodní hrany basálního výběžku těla buňky, který se svým „levým“ protějškem ohraničuje význačný konkávní oblouk situovaný v přímé opozici k výřezu (incision) vymezeném vnějšími výběžky. Opět zrcadlovou analogií poslední trojice landmarků jsou body s čísly 16, 17 a 18. Posledním landmarkem (6) je bod umístěný na dně vnějšího zářezu. I ostatní struktury podél obrysu buňky sice obsahují do značné míry homologické body, avšak, jelikož zde homologičnost neplatí v rámci všech objektů v populaci bezesbýtku a užitě GM programy nedokonale balancovaná pozorování nepodporují, byla tedy hodnota všech zbývajících bodů „snížena“ na hodnotu semilandmarků. Semilandmarky s čísly 3, 4, a 5 vystihují křivku mezi landmarkem 2 a 6 „vlevo“, 7, 8 a 9 jsou jejich zrcadlovým

obrazem. Podobně 25, 26, 27 a 28 postihují obrysovou křivku mezi landmarky 24 a 1, kdy 12, 13, 14 a 15 jsou „pravou“ analogií. Konečně, na basi buňky je jediná nepárová struktura kterou je již zmíněný oblouk mezi vnitřními výběžky. Podél tohoto jsem situoval semilandmarky 19, 20 a 21.

1.2.3.2. Symetrie a symetrisace

Jak již bylo uvedeno, marginální buňky *Pediastrum duplex* jsou objekty výrazně bilaterálně symetrické. Tato symetrie je typu tzv. objektové symetrie (KLINGENBERG et al 2002), čili takový případ, kdy (zde) jediná osa symetrie prochází mediálně, obě zrcadlově symetrické půle na sebe bezprostředně nasedají a styčné body leží na ose. Z celkového počtu 28 vymezených význačných bodů dva leží na ose symetrie a postrádají tudíž odpovídající zrcadlové protějšky. Protože mediální osa objektu je do značné míry polohově invariantní, není zřejmě možná změna polohy na ní umístěných bodů ve více než jednom směru, totiž podél této osy. Celá řada publikovaných geometricko-morfometrických studií, zabývajících se symetrickými tvary však význam osy symetrie obdobně symetrických objektů ignoruje, operující s konfiguracemi landmarků pouze z jedné ze zrcadlově symetrických polovin. Tento přístup se ukázal být nevhodným s ohledem na výsledek experimentu, kdy byly srovnány produkty superimposice celistvých objektů symetrisovaných a těchže objektů, definovaných než poloviční konfigurací landmarků (Neustupa, ústní sdělení). Je zřejmé, že analýzy takto odlišně získaných datových jsou zdrojem zcela nepodobných výsledků, kdy odlišnost spočívá zejména v různé lokalizaci oblastí na obrysu tvaru, kde pozorujeme nejvyšší variabilitu v odchylkách souřadnic landmarků od homologického bodu konsenzuální konfigurace. Zatímco nejvariabilnější oblastí v rámci souboru celistvých objektů byly konce hyalinních výběžků, nejvyšší variabilita u polovičních objektů byla zaznamenána v místě landmarku č.6, ležícího přímo na ose symetrie (!), v přírodě zjevně reálně neexistující jev.

Zásadním cílem symetrisace je odstranění vlivu tzv. fluktuční asymetrie, projevující se v podobě drobných odchylek od perfektní symetrie, rovnoměrně rozložených na obou symetrických polovinách, jejichž součet je (v rámci např. populace jednoho druhu) roven nule. Tvzení o povaze asymetrie buněk *Pediastrum duplex* je založeno spíše na intuitivním předpokladu (a samozřejmě též na pozorování přírodního materiálu), neboť dosud nebyla provedena příslušná studie, jejíž výsledek by přinesl důkaz o asymetričnosti jiných typů, tj. např. tzv. usměrněné asymetrie, či antiasymetrie. Výchozí předpoklad o neusměrněnosti

asymetrie, tedy o rovnoměrném rozptylu odchylek od symetrie kolem nulové hodnoty, je základem přístupu, kdy se lze domnívat, že tyto odchylky nejsou pro zamýšlené studium rozdílů mezi jednotlivými subpopulacemi cenné a je tedy žádoucí vliv tohoto faktoru separovat.

Podstatou symetrisace v návrhu KLINGENBERGA et al (2002) je dosažení dokonale podle mediální osy bilaterálně symetrického tvaru prostřednictvím zrcadlového překlopení obou mírně asymetrických půlí na své zrcadlové protějšky a výpočet konfigurace průměrného tvaru z těchto dvou objektů. Výsledná konfigurace je prostá vlivu byť jen nepatrné flukтуаční asymetrie. V praxi se dosud nejjednodušším jeví způsob provedení symetrisace pomocí programů Microsoft Excel, Past a tpsRelw. Sekvence kroků jaké nutno podstoupit, zahrnuje zrcadlové převrácení odpovídajících si souřadnic landmarků následované jejich přeznačením pořadovým číslem záměnného protějšku. Podrobíme-li dvojitý datový soubor (kam jsme společně vložili konfigurace landmarků objektů původních s jejich zrcadlovými obrazy) prokrustovské superimposici, je posléze možné takto standardisované konfigurace zpřůměrovat a obdržet objekty perfektně symetrické, připravené takto pro účely vlastních GM analys.

1.2.3.3. Superposice

Je-li naším záměrem studovat tvar a dynamiky tvarových změn, nezbytná reflexe jeho kendallovské definice vede na prvním místě k odstínění vlivu těch faktorů, jejichž variabilita nenesou relevantní informaci. Prvou netvarovou proměnnou je lokalizace objektů v dvou-, či třírozměrném prostoru, k jejímž změnám dochází vlivem translace, dále se jedná o nestejnou rotaci objektů kolem dané osy a nakonec je třeba zmínit také rozdíly ve velikostech objektů. Vliv uvedených faktorů umožňuje vhodně zvolená superposiční technika odseparovat a jejím výstupem jsou tudíž konfigurace landmarků nesoucí informaci než o tvaru a jeho proměnlivosti.

S ohledem na tvar studovaných objektů jsem z dostupných superposičních technik zvolil tzv. prokrustovskou superimposici (Procrustes superimposition, generalised orthogonal least squares Procrustes analysis, GLS). K volbě uvedené metody jsem přistoupil po uvážení předpokladu nepravděpodobnosti existence Pinocchio-efektu, který postihuje struktury s nejméně jedním značně odlehlym význačným bodem umístěným např. na vrcholu velmi

(vůči zbytku tvaru) prominující extremity (řešením problematiky superposice struktur tohoto typu se zabývá metoda tzv. resistantního přizpůsobení (generalized resistant fit, GRF).

Před detailnějším rozvedením vlastního metodického postupu, charakteristického pro prokrustovskou superimposici, je vhodné napřed uvést dva základní termíny označující veličiny s nimiž se dále operuje. Jedná se o hodnotu velikosti těžiště konfigurace landmarků (centroid size, dále jen CS) a tzv. prokrustovskou vzdálenost (Procrustes distance, D). Prvá zmíněná proměnná je charakteristikou velikosti objektu a je proto nezbytné ji standardisovat; obvykle se tak činí položením $CS = 1$ pro všechny objekty výběrového souboru. CS je déno hodnotou druhé odmocniny ze součtu čtverců euklidovských vzdáleností jednotlivých landmarků od těžiště (centroidu) objektu. Standardisací CS je dosaženo odfiltrování případných tvarových změn odvislých od velikosti. Prokrustovská vzdálenost je míra vzájemné podobnosti konfigurací landmarků v Kendallově nelineárním tvaroprostoru (Kendall's shape-space); počítáme ji jako součet čtverců rozdílů mezi všemi landmarky obou porovnávaných konfigurací a je dvojího typu, tzv. full-Procrustes distance a partial-Procrustes distance (ZELDITCH et al. 2004).

Jak již bylo zmíněno, faktor variability v rozměrech jednotlivých buněk lze odstranit korekcí CS na jednotkovou velikost. Dále, vliv nestejně lokalisace v prostoru odstraníme translací všech objektů do polohy takové, kdy se těžiště kryjí s počátkem souřadné soustavy. Poslední netvarovou proměnnou je rotace; tu je možné ošetřit již před provedením superposice, např. úpravou orientace snímků objektů v grafických programech.

Konečným produktem prokrustovské superimposice jsou tzv. prokrustovské residuály, souřadnice význačných bodů superponovaných konfigurací, o (přibližně) jednotkové centroidové velikosti. Odchyly těchto konfigurací od konsensu je možno znázornit např. prostřednictvím vektorů.

1.2.3.4. Thin-plate spline

Thin plate-spline (dále jen TPS) je účinným nástrojem geometrické morfometriky uplatňujícím se zejména ve dvou směrech, tj. (1) generování mnohorozměrných tvarových proměnných a (2) visualisace deformací souřadnicové sítě ilustrující přechod jednoho tvaru v druhý. TPS je interpolační funkce umožňující vyhodnotit vzájemnou vzdálenost konfigurací landmarků v bezrozměrných jednotkách minimalisované míry virtuální deformační energie (bending energy), potřebné k lokálně specifickému zprohýbání metaforického, nekonečně

rozlehlého a nekonečně tenkého kovového plátu (BOOKSTEIN 1991). Věc si lze představit zjednodušeně zhruba takto: Mám-li dvojici tvarů (konfigurací landmarků) a zajímá mě jaká je pomyslná míra deformační energie, již nutno vynaložit pro převedení jednoho v druhý, je třeba uvážit skutečnost, že tato je závislá jednak na tom, zda jsou změny v konkrétních oblastech povrchu tvaru lokalisované, a dále pak také na pozici jednotlivých landmarků, na jejich vzájemných vzdálenostech. Vezmu si tedy pro demonstraci dva papíry na každém z nichž je zachycena jedna z konfigurací standardisované velikosti, orientuji je paralelně ve shodné rotaci a homologické body spojuji pomyslnými úsečkami různých délek s ohledem na míru vzájemného posunutí odpovídajících si bodů v dvourozměrném prostoru. Představím-li si na místě úseček jakési špendlíky odpovídající délky, ve svislé poloze jimi připíchnu jednu z konfigurací v místech landmarků. Snažím-li se posléze transformovat planární konfiguraci landmarků do konfigurace landmarků na opačných, nestejně vzdálených koncích špendlíků, podobně jako bych ekvivalentním způsobem ohýbal kovový plát, je snahou po celém povrchu tvaru rozprostřenou deformační energii minimalisovat. Deformační energie přirozeně není ve všech oblastech tvaru stejná, tak jako byly zapotřebí různě dlouhé usečky k pospojování více a méně vzájemně posunutých homologických landmarků. Využit je zde i další poznatek z mechaniky kovových materiálů, totiž že energie potřebná k vertikálnímu posunu landmarku osamoceného je nižší, než k posunu téhož, pokud je situován v blízkosti dalších landmarků (ZELDITCH et al. 2004).

Máme-li celý soubor objektů daných čistě tvarovými proměnnými je vhodné zvolit jednu vztažnou (referenční) konfiguraci landmarků, míry jejíž deformace ve směrech ostatních objektů budou vhodnou mírou jejich relativní podobnosti. Lze např. porovnávat odlišnosti deformačních mřížek, které jsme obdrželi při transformaci referenční konfigurace do podoby skupinových konsensuálních konfigurací, již mohou representovat „průměrné buňky“ jednotlivých studovaných lokalit.

Zjednodušeně, úkolem TPS je rozložení matice deformační energie (vypočtem závislé pouze na referenční konfiguraci) na soubor tvarových proměnných, parciálních warpů, které lze následně podrobit běžným analysám pomocí klasických technik mnohorozměrné statistiky (kupř. PCA, CVA, nebo shluková analyza). Vlastní vektory matice (bending energy matrix) nazýváme hlavní deformace (hlavní warpy, principal warps), které jsou vyjádřením všech existujících možností deformace vztažného referenčního objektu (nejčastěji konsensuální, „průměrné“ konfigurace), a vystihují tedy mnohorozměrný prostor všech těchto deformací. Dalším krokem je výpočet vektorů, již se vztahují ke skutečným směrům deformace referenčního tvaru v reálné tvary z nichž sestává náš výběr. Každému z objektů je tedy vlastní

soubor hodnot (partial warp scores), jichž nabývá projekcí svých prokrustovských residuálů na vektory hlavních deformací, kdy odpovídající částkové deformace jsou uspořádány v pořadí od nejnižší hodnoty deformační energie, v přímé závislosti na míře lokalisovanosti tvarových změn. V pořadí prvé částkové deformace tudíž popisují tvarové změny odehrávající se spíše ve větším měřítku, neboť s rostoucí hodnotou deformační energie stoupá míra lokalisovanosti těchto změn.

Výsledná matice skóru (weight matrix) je posléze vstupním datovým souborem např. pro analýsu reaktivních warpů, anebo mnohorozměrnou regresi takto postiženého tvaru na nezávislou proměnnou typu velikosti buněk, nebo coenobia apod..

1.2.3.5. Analýsa relativních warpů

Podstatou tzv. relativních warpů jsou vlastní vektory matice koeficientů korelací mezi všemi parciálními warpy včetně afinní složky (BOOKSTEIN 1990). Před vlastní extrakcí vektorů je nezbytné stanovit hodnotu jistého faktoru α , na základě něhož jsou odlišným způsobem váženy různé parciální warpy (při $\alpha > 0$ je vyšší váha přisouzena deformacím projevujícím se ve větším měřítku, přesně naopak je tomu v případě, kdy $\alpha < 0$). Volíme-li $\alpha = 0$, je analýsa relativních warpů ekvivalentní analýze hlavních komponent (principal components analysis, PCA), kdy vstupním datovým souborem je matice skóru jednotlivých objektů na parciálních warpech (včetně uniformního komponentu, který v případě této studie záměrně nebyl separován a analysován zvlášť). Je tedy účelem RWA usnadnění orientace v rozsáhlém datovém souboru o mnoha objektech a proměnných tím způsobem, kdy nejvýznačnější směry variability původního mnohorozměrného znakového prostoru bylo možno postihnout několika málo vzájemně nekorelovanými hlavními osami. Relativní polohy objektů v ordinačním prostoru definovaném relativními warpy vzhledem k rozmístění v původním prostoru znakovém ovšem setrvávají neměnné, neboť rotuje samotná ortogonální souřadná soustava, orientující se právě dle příslušných směrů jimiž probíhají gradienty hodnot nejvariabilnějších znaků. RWA je nedocenitelnou pomůckou pro studium allometrických změn (např. v ontogenezi), čili takových změn, které různé části tvaru během růstu postihují nestejně.

1.2.3.6. Testy párových porovnání

Jedním z nejzávažnějších výstupů této seminární práce by měly být výsledky párových porovnání lokalit, sledovaných ve dvou ročních obdobích, representovaných subpopulacemi *Pediastrum duplex* o (předpokládané) nestejně míře fenotypické plasticity. Je tedy položena otázka, zda se dvě, při běžném pozorování ve světelném mikroskopu, prakticky morfologicky neodlišitelné skupiny statisticky významně odlišují. Každá ze subpopulací je representována souborem tvarových proměnných, např. skórů na parciálních warpech, udávajících které ze všech existujících směrů možných deformací referenční konfigurace jsou „okupovány“ reálnými objekty. Párová srovnání lze teoreticky provést ze použití jak parametrických, tak i neparametrických metod, ovšem protože pravděpodobně nelze přepokládat mnohorozměrnou normalitu rozdělení dat, byly upřednostněny metody neparametrické, v tomto případě tedy mnohorozměrné permutační testy.

Model univariátního permutačního testu pro testování signifikantnosti původu dvou výběrů z odlišných základních souborů je zhruba tento: z dvou reálně existujících výběrů spočtu střední hodnoty a následně absolutní hodnotu jejich rozdílu. Poté oba výběry smíchám a zcela náhodně z tohoto smíšeného souboru učiním nové dva (nezávislé) výběry, z nichž opět spočtu hodnotu rozdílu středních hodnot. Permutace opakuji mnohokrát (minimálně 500-krát). Nakonec vyhodnotím, v kolika ze všech případů střední hodnota (testová statistika) byla rovna, nebo větší než moje kritická hodnota (reálný pozorovaný rozdíl středních hodnot) na předem zvolené hladině významnosti (kupř. 0,05). Zjistím-li, že méně než pět procent hodnot rozdílů mezi náhodně nagenеровanými výběry překročí kritickou hodnotu, pak zamítám nulovou hypotézu o původu mnou sebraných výběrů ze základního souboru s tímž průměrem.

2. Praktická část

2.1. Geometricko-morfometrická studie *Pediastrum duplex*

2.1.1. Úvod

Cílem této kapitoly praktické části mé seminární práce bylo odhalit tvarovou variabilitu *Pediastrum duplex* na základě morfometrické studie čtyř přírodních subpopulací tohoto druhu. Subpopulace pocházejí z fytoplanktonu dvou izolovaných eutrofních vodních nádrží ve Středních Čechách (Štičí a Hluboký rybník), z kterých jsem planktonní vzorky odebral celkem dvakrát, poprvé v srpnu 2004 a podruhé koncem října 2004. Odběr živého materiálu jsem provedl hydrobiologickou planktonní sítí (velikost ok 40 µm) a orientačně změřil pH, konduktivitu, teplotu vody a ovzduší, popř. světelnost. Jako reprezentativní subpopulační výběr bylo z nativních preparátů připravených ze vzorků vyfotografováno 50 coenobií, s tím, že do morfometrické studie bude vložena informace o každém coenobiu ve formě průměrné konfigurace z dvojice vždy přímo protilehlých náhodně vybraných marginálních buněk. Konsenzuální konfigurace spočtená ze všech průměrných buněk coenobií jedné subpopulace bude takto zastupovat lokálně charakteristický tvar.

Většina použitých geometricko-morfometrických analys a visualizačních technik je součástí programové řady TPS J. Rohlf a z Michiganské university, vyvinutého speciálně pro landmarkové metody a programu Past Øyvinda Hammera, jako freeware dostupné na <http://life.bio.sunysb.edu/morph/> a <http://folk.uio.no/ohammer/past/doc1.html>, internetových stránkách zaměřených na poskytování informací, software a kontaktů týkajících se geometrické morfometriky. Výchozí data, digitální mikrofotografie buněk *Pediastrum duplex* jsem zhotovil pomocí fotografického zařízení Camedia 5 (na světelném mikroskopu Olympus BX 51) ovládaném programem Quick Photo. Snímky byly posléze zpracovány v programu Adobe Photoshop 9.0 (vystříhání a rotace buněk). Běžné utilizační operace s maticemi hodnot morfometrických proměnných a obdobnými datovými soubory jsem provedl pomocí programů MS Excel, MS Word Pad a Past.

2.1.2. Metodika práce

2.1.2.1. Digitální mikrofotografie a vymezení význačných bodů

Snímky coenobií *Pediastrum duplex* jsem zhotovil z čerstvých nativních preparátů (bezprostředně po jejich sběru v terénu) při 400 násobného zvětšení. Fotografie byly pro zpracování v grafickém editoru převedeny do JPEG formátu, který je zároveň kompatibilní s morfometrickým digitalizačním programem tpsDig.

Na digitálních mikrofotografiích jsem vyznačil polohy zvolených landmarků pomocí programu tpsDig 1, převádějící tvarovou informaci ze snímků do podoby souboru konfigurací dvourozměrných kartesiánských souřadnic ve formátu TPS (převoditelného programem tpsUtil na formát NTS, popř. MATLAB).

2.1.2.2. Symetrisace

Prvým ze symetrisačních kroků, tzv. reflexe zrcadlově symetrických souřadnic landmarků, byl proveden v programu Past. Přeznačení (relabelling) je nejsnazší uskutečnit v MS Excel vynásobením x-ových souřadnic hodnotou -1. Celý datový soubor, kam jsem pod sebe společně umístil konfigurace landmarků původních objektů a jejich zrcadlově převáčených protějšků bylo následně nutno podrobit superimposici (viz dále), kterou umožnil program tpsRelw. Spočtené prokrustovské residuály byly zprůměrovány v MS Excel; výsledkem jsem obdržel dokonale bilaterálně symetrické konfigurace landmarků, viz **Tab. 3**, obr. c.

2.1.2.3. Superposice

Užitou superposiční proceduru, mj. součástí výpočtu konsenzuální konfigurace, thin-plate spline, i analýsy relativních warpů, provádí většina programů řady TPS, např. tpsRelw ROHLF (2003b), zobecněnou metodou nejmenších čtverců (tzv. generalized orthogonal least-squares Procrustes analysis). Výsledné prokrustovské residuály, dvourozměrné souřadnice landmarků superponovaných objektů o (přibližně) jednotkové centroidové velikosti, program

ukládá ve formátu NTS. Grafické znázornění úspěšné superposice zobrazuje **Tab. 3**, obr. e a f, ve formě bodových shluků (e), resp. vektorů s počátkem v příslušném bodě konsenzuální konfigurace ve směrech homologických souřadnic superponovaných objektů.

2.1.3. Výsledky

2.1.3.1. Thin-plate spline – visualisace

Rekonstrukci objektů zachycených deformovanými konfiguracemi landmarků, které odpovídají extrémním hodnotám skóru na jednotlivých relativních warpech umožnil program tpsSuper ROHLF (2004). Užitím funkce „Estimated image“ program na základě zadaného souboru vložených digitálních snímků reálných objektů sestrojí podobu cílového objektu representovaného zvolenou konfigurací landmarků predikovanou statistickým modelem. Rekonstruoval jsem takto všechny extrémní polohy na prvních třech relativních warpech a dále konsenzuální konfiguraci. Všechny tyto objekty zobrazuje jako deformace souřadnicové sítě již program tpsRelw ROHLF (2003b), který byl za tímto účelem rovněž využit.

Program tpsSplin ROHLF (2003d) je určen k zobrazení transformace deformační mřížky při převedení jednoho tvaru v druhý. V případě, že tato transformace není zdrojem deformace dostatečně markantní, je nicméně pro visualisaci existujícího deformačního trendu vhodné použít vyšší tzv. deformační faktor (scale factor), amplifikující právě trend v jehož směru se tvarová transformace odehrává. Porovnávanými objekty byly konfigurace konsensů všech čtyř subpopulací *Pediastrum duplex*, v jejichž směru byla transformována konfigurace představující společný konsensus. Výsledné podoby deformační mřížky ilustruje **Tab. 8**.

	E	d	rad
HL	0.03506	0.05198	0.05199
HP	0.00554	0.03108	0.03108
SL	0.01423	0.03672	0.03672
SP	0.00599	0.01793	0.01793

Tabulka 1.1.: Thin-plate spline. HL-konsenzuální konfigurace (KK) pro Hluboký rybník (letní odběr), HP-KK Hlub. r. (podzimní odběr), SL (SP)-KK Štičí rybník (letní a pozimní odběr). E-deformační energie (bending energy) potřebná k transformaci společné referenční konfigurace do podoby konsenzuálních konfigurací jednotlivých skupin. d-prokrustovská

vzdálenost skupinových konsensů od reference v Kendallově tvaroprostoru. Rad - velikost úhlu (v radiánech), jež svírá reference s příslušným objektem na povrchu Kend. tvaroprostoru.

2.1.3.2. Skupinová srovnání a shluková analýsa

Užitím interpolační funkce thin-plate spline jsem obdržel soubor tvarových proměnných, skóre objektů na parciálních warpech, které byly následně podrobeny mnohorozměrným permutačním testům za účelem párových porovnání subpopulací *Pediastrum duplex* z různých lokalit sledovaných v průběhu dvou ročních období. Vybraná data byla dále podrobena shlukové analýze v programu HierClus PODANI (2000) pro zjištění celkové (ne)podobnosti čtyř studovaných subpopulací.

Rozklad matice deformačních energií jsem provedl v programu tpsRelw ROHLF (2003b), kdy vstupním datovým souborem byly symetrisované konfigurace landmarků. Program spočítá souřadnice konsensuální konfigurace a provede prokrustovskou superimposici všech objektů na referenční objekt. V dalším kroku provede rozklad matice deformační energie. (ZELDITCH et al. 2004) následkem níž je již k dispozici soubor skóre jednotlivých objektů na parciálních warpech (weight matrix, W). Na zvolených podsouborech jsem provedl párová srovnání za pomoci mnohorozměrných permutačních testů. Pro výpočet testové statistiky mnohorozměrných permutačních testů, Wilksovo lambda (Wilk's λ) jsem zvolil program tpsRegr ROHLF (2003c), kdy vstupním datovým souborem byly konfigurace landmarků objektů dvou porovnávaných skupin v podobě závislé proměnné, která byla podrobena mnohorozměrné regresi na nezávislou jednorozměrnou tzv. falešnou proměnnou (dummy variable), již bylo nutné vytvořit pouze za účelem vymezení jednotlivých skupin pro potřeby programu. Testová statistika Wilksovo lambda je mnohorozměrným ekvivalentem jednorozměrného *F*-testu s nímž pracuje klasická analýza variance jednoduchého třídění, kterým je testována (ne)rovnost průměrů dvou souborů na základě poměru variability meziskupinové a residuální. Signifikantnost lineárního modelu mnohorozměrné regrese testuje program tpsRegr ROHLF (2003c) užitím statistiky zobecněného Goodallového *F*, které je analogické klasickému *F* testu v univariátní analýze variance v tom smyslu, že porovnává varianci postiženou regresním modelem (odchylky predikovaných hodnot od průměru) s variancí residuální (odchylky reálných hodnot proměnné od modelu). Spočtená testová statistika je porovnána s kritickou hodnotou q_m při $(n-1-q)_m$ stupních volnosti s *F*-

rozdělením, kde q je rovno počtu nezávislých proměnných (prediktorů) a m je dimensionalita kendallovského tvaroprostoru ($2p-4$ bez vyloučení uniformního komponentu, při p význačných bodech).

Wilksovo lambda je opět mnohorozměrnou obdobou jednorozměrného F-testu v analýze variance, ovšem s tím rozdílem, že jeho hodnota udává podíl variability lineárním modelem nevysvětlené. Pro usnadnění výpočtu příslušné p-hodnoty je možné hodnotu Wilksova lambda transformovat do podoby statistiky s rozdělením blízkým F -rozdělení.

Porovnávanými skupinami byly odběry (1) z různých lokalit v rámci téhož ročního období, (2) z téže lokality v různých ročních obdobích a (3) pro doplnění z různých lokalit v různých ročních obdobích. Shlukovou analýzu jsem provedl v programu HierClus (PODANI 2000) užitím metody průměrné vzdálenosti (UPGMA, Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Účelem shlukové analýzy (cluster analysis) je hledání hierarchicky uspořádaných skupin (shluků) operačních jednotek (objektů, buněk) popsanych celým souborem proměnných (MARHOLD & SUDA 2002).

V této práci byla shluková analýza použita s cílem pouze orientačně ověřit, zda jsou si na základě porovnávaných morfometrických proměnných relativně „bližší“ výběrové subpopulace které byly pořízeny z téže lokality, byť v odlišných ročních obdobích. Jako vstupní datový soubor pro řešení problematiky tohoto typu jsem zvolil pouze čtyřřádkovou matici hodnot skóru na parciálních warpech (weight matrix, včetně uniformního komponentu) (JENSEN et al. (2002), QUERINO et al. (2002)) spočtenou prostřednictvím projekce konsenzuálních konfigurací charakteristických pro jednotlivé lokality na vektory (hlavní warpy), již jsem obdržel rozkladem matice deformační energie (bending energy) založené na společné referenci. Výstup shlukové analýzy je společně s odpovídajícím způsobem deformovanými mřížkami znázorněn na **Tab. 8**.

Mnohorozměrné permutační testy poukázaly na signifikantní rozdíly mezi subpopulacemi *Pediastrum duplex*. v případě všech kombinací faktorů, tj. lokality a ročního období. Hodnoty testových statistik (Wilk's λ) a dosažených hladin pravděpodobností uvádí Tabulka 1.2.

Ačkoli zřejmě není vypovídací hodnota provedené shlukové analýzy s ohledem na jednoduchost experimentálního designu příliš vysoká, jistou orientační informaci o celkové podobnosti subpopulací z téže lokality její výsledek přináší. Výsledný shluk, poukazující na nejvyšší podobnost konsenzuálních konfigurací (průměrných objektů) pocházejících z téže lokality, sdružuje objekty, vystižené nápadně podobným způsobem deformovanými mřížkami, jejichž blízkost (v Kendallově tvaroprostoru vyjádřená prokrustovskou

vzdáleností) je nejvyšší. Naopak, jak je patrné z **Tab. 8.**, nejuvzdálenější objekt (původem z jiné lokality) sleduje docela odlišný tvarový trend než všechny ostatní a je tudíž situován mimo hlavní shluk.

	λ / p	Goodall's F / p
H(l) : H(p)	0.360 / 0,001	37.795 / 0,001
S(l) : S(p)	0.490 / 0,001	3.626 / 0,027
H(l) : S(l)	0.213 / 0,001	54.369 / 0,001
H(p) : S(p)	0.371 / 0,001	9.779 / 0,002

Tabulka 1.2.: Výsledky mnohorozměrných permutačních testů. U všech hodnot testových statistik je zaznamenána příslušná p -hodnota.

2.1.3.3. Analýza relativních warpů a mnohorozměrná regrese

Pro posouzení nejvýraznějších trendů tvarové dynamiky marginálních buněk coenobií *Pediastrum duplex* jsem analysoval prvé tři relativní warpy, které dohromady postihly více 89% variability v datech. Při studiu tvarů odpovídajících extrémním hodnotám skóru na těchto warpech, bylo možno velmi dobře rozlišit deformace výrazně se týkající jistých skupin význačných bodů. Gradient hodnot na prvním relativním warpu ve směru od $-\infty$ do $+\infty$ výrazně koresponduje s rozevíráním úhlu svíraného externími výběžky, tedy rozšiřováním vnějšího zářezu. Zároveň s rozšířením zářezu a oddálením hyalinních výběžků se mírně rozšiřuje též tělo buňky; toto je ovšem spíše jev doprovodný, následek prvně popsaného, nikoli svébytným fenomenem. Tvar base buňky není deformací téměř ovlivněn. Druhý relativní warp dle definice postihuje gradient tvarů podél nenajvariabilnějšího znaku nepopsaného warpem prvním. Tímto znakem je radikální komprese resp. extenze celého buněčného těla včetně vnějších výběžků; buňky nejrobustnější jsou při dobře patrném zachování znaků charakteristických pro druh *Pediastrum duplex* podobny habitem druhu *P. boryanum* (v oblasti kladných hodnot 2. RW). V opačném případě, buňky nejgracilnější se tvarem výrazně blíží varietě *gracillimum* druhu *P. duplex*, jejíž coenobia vskutku dosahují ze všech dosud popsaných variet nejmenších rozměrů (KOMÁREK & JANKOVSKÁ 2001). Podobně jako v případě prvního relativního warpu i zde setrvává širší vnitřního zářezu (konkávního

oblouku) na basi buňky konstantní, ačkoli jeho vyklenutí pochopitelně následuje kompresi buněčného těla charakteristickou pro druhý relativní warp. Třetí relativní warp tedy postihuje nejvýznačnější tvarový trend opomenutý warpem prvním a druhým, kterým je právě šíře oblouku na basi buňky, tj změna tvaru a velikosti vnitřního zářezu.

Z vizuálního vyhodnocení grafického výstupu programu tpsRegr ROHLF (2003c) (Tab. 7, obr. a) zobrazujícího směry deformace souřadnicové sítě v závislosti na změně velikosti (allometrii) jasně vyplynulo, že s touto proměnnou je těsně spjata tvarová proměnlivost zachycená druhým relativním warpem. Jinak řečeno, výrazná (de)komprese buněčného těla *Pediastrum duplex* je lineárně závislá na faktoru velikosti. Konkrétně: relativně větší buňky jsou zároveň robustnější a naopak. Pro otestování signifikance závislosti neparametrickou cestou program nabízí mnohorozměrné permutační testy; zde hodnoty testových statistik (λ)=0,432 (p =0,001) a Goodalovo $F=33,075$ (p =0,001); allometrie je tudíž signifikantní.

Odhalování dalších potenciálních vektorů, signifikantně korelujících se změnami tvaru, jsem dosud omezil pouze na provedení regrese tvaru na počet buněk ve zdrojovém coenobiu a na jeho celkovou velikost. Významná závislost byla prokázána pouze v případě velikosti coenobií ($\lambda= 0,549$, $p=0,001$, Goodalovo $F=14,660$, $p = 0,001$); není příliš překvapivé, že také tato proměnná se odráží na tvarových změnách korespondujících s druhým relativním warpem. Mnohorozměrná regrese tvaru na počet buněk v coenobiu poukázala na neexistenci průkazné lineární závislosti. Zdroje variability na druhém a třetím warpu setrvávají prozatím neznámy.

relativní warp	eigenvalue	vysvětlená variabilita (%)	kumulativní v.v. (%)	landmarky (pořad. č.)
1	0,8446	51,16	51,16	1.-5., 7-15
2	0,62729	28,22	79,38	14.-13, 19.-21
3	0,34976	8,77	88,16	16.-19.

Tabulka 1.3.: Analýza relativních warpů. Tabulka zachycuje podíly variability vysvětlené jednotlivými relativními warpy. V posledním sloupci jsou zaznamenány skupiny landmarků vymezující nejvariabilnější oblasti korespondující s příslušným relativním warpem.

2.1.4. Závěr

Cílem této seminární práce bylo ověřit, zda je morfologická variabilita studovaných subpopulací *Pediastrum duplex* takového charakteru, aby ji bylo možné postihnout zvolenými technikami geometrické morfometriky, zahrnující jednak grafické znázornění biologicky interpretovatelných výstupů statistických modelů, jednak možnost provádět meziskupinová srovnání tvarově variabilního modelového organismu. Výsledky práce naznačují, že zmíněný přístup opodstatnění skutečně nalézá. Užitá technika zachycení tvaru a popisu jeho změn prostřednictvím konfigurační význačných bodů, jeví se být užitečným nástrojem pro vnitrodruhová srovnání na subpopulační úrovni. Soudím tak mj. na základě výsledků analýsy relativních warpů, která, jak se zdá, vykazuje značný interpretační potenciál při odhalování zásadních směrů infraspecifické tvarové variability. Toto tvrzení je podpořeno zjištěním, že pouhými třemi hlavními komponentami (relativní warpy), je možné postihnout více než 88% z celkové tvarové proměnlivosti marginálních buněk coenobií *Pediastrum duplex*. Další příznivou skutečností je biologická interpretovatelnost alespoň některých z těchto abstraktních proměnných, byť význam ostatních setrvává dosud nevyjasněn. Jedinou osou jejíž význam se objasnit podařilo, je druhý relativní warp, resp. allometrická změna tvaru, která velmi dobře koresponduje s realitou pozorování přírodních vzorků, kdy fenotypická plasticita v utváření těla a externích výběžků marginálních buněk *Pediastrum duplex* odpovídají skutečným rozdílům mezi relativně menšími a většími varietami druhu (resp. var. *gracillimum* vers. např. var. *duplex*). Jiný, fenotypicky též značně plastický znak, zmíněný již v kapitole o morfologii *Pediastrum duplex*, totiž vzájemná poloha externích výběžků a velikost úhlu jimi svíraného, přísluší variabilitě popsané prvním relativním warpem (51% celkové variability), u něhož se předpokládá, že se týká tvarové proměnlivosti ve větším měřítku (ZELDITCH et al. 2004).

Na základě výsledků mnohorozměrných permutačních testů pro párová porovnání jednotlivých subpopulací *P. duplex* z odlišných lokalit a ročních období bylo možné zamítnout nulovou hypotézu o neexistenci statisticky významných rozdílů mezi těmito výběry, definovanými právě prostřednictvím charakteristik tvaru (ve všech kombinacích porovnávaných skupin byly rozdíly vysoce signifikantní).

Pro zjištění celkové tvarové podobnosti populačních vzorků z jednotlivých lokalit jsem provedl shlukovou analýzu, která do jisté míry také podpořila výše uvedené výsledky.

2.2. Diversita fytoplanktonu sledovaných lokalit

Za účelem seznámení se s biotickým prostředím studovaného modelového organismu, věnoval jsem alespoň minoritní část své seminární práce determinaci ostatních planktonních řas se zvláštním zřetelem na hlavní dominanty. Jen zcela okrajově a spíše orientačně jsem se pokusil též o determinaci některých nejčastěji se vyskytujících zooplanktonů a protozoí. Je ovšem na místě předem uznat, že informační hodnota této složky mé seminární práce je, s ohledem na výrazné upřednostnění morfometrické části, zcela minimální (navíc s ohledem na počet odběrů), byť jsem při jejím vypracování obdržel jisté praktické dovednosti, již budou pravděpodobně nedocenitelné pro zdárný průběh zamýšlené navazující diplomové práce.

2.2.1. Lokality

Štičí a Hluboký (Dubnický) rybník

Obě studované lokality se nalézají ve Středních Čechách v jihovýchodní části mladoboleslavského okresu. Jedná se o hospodářsky pravděpodobně intenzivně nevyužívané eutrofní vodní nádrže spadající pod povodí odlišných toků, navzájem vzdálené cca 3 km vzdušnou čarou. Prvá (Štičí rybník) leží v katastrálním území obce Jabkenice v prostoru Přírodního parku Jabkenická obora jako součást celé rybníční kaskády v převážně zalesněném území ohrazeném plotem obory. Ve zmíněné kaskádě propojené Jabkenickým potokem leží sledovaná lokalita mezi nepatrně výše situovaným Mlýnským rybníkem (leží mimo oboru, je v letních měsících využíván jako přírodní koupaliště a zaznamenal jsem zde výskyt vodního květu tvořeného druhem *Planktothrix agardhii*) a rybníkem Vidlákem nalézajícím se již v prostoru obory kam je v období od podzimu do jara vstup omezen. Pokud se týká okolní vegetace, jedná vesměs o chudá lesní společenstva. Původním typem lesa jsou zde jen místy zachované borové doubravy, dnes většinou přeměněné na kulturní bory s menšími plochami zde nepůvodního smrku. V okolních údolních zářezích a nivách jsou však porosty pestřejší, neboť se zde zachovaly fragmenty habrových doubrav, respektive podmáčených olšin a vlhkých nivních luk. Podkladem oblasti jsou svrchnoturonské slíny, které vystupují na povrch jen v údolních zářezích a pak v níže položené bezlesé oblasti. Podloží celého lesního celku tvoří staropleistocenní říční štěrky Jizery. Zmíněná soustava lesních rybníků má spolu s dalšími v této oblasti význam refugia řady mizejících taxonů vodních rostlin i živočichů.

Druhou lokalitou je Hluboký (též Dubnický) rybník na potoce Boží voda v katastrálním území obce Chudíř. I tato nádrž je součástí (menší) kaskády rybníků, kdy výše položeným je Nový rybník a níže následuje velice mělký Vrbičkový rybník. Narozdíl od první lokality, tato neleží přímo obklopena lesním porostem; zčásti je na jedné straně odděluje úzký travnatý pás od obhospodařovaných polností, přičemž ostatní břehy porostem *Phragmites australis* přecházejí v pobřežní porost s olší, topolem a břízou. Rybník je z obecně floristického hlediska pozoruhodný např. výskytem *Utricularia australis*.

Na sledovaných lokalitách jsem měřil teplotu vody při hladině nádrže, teplotu vzduchu, pH, konduktivitu a světelnost. Zaznamenané hodnoty měření uvádí Tabulka 2.1.

2.2.2. Metodika odběru, zpracování a uchování vzorků

Zvolené lokality jsem během vegetační sezóny 2004 navštívil ze účelem odebrání planktonních vzorků celkem šestkrát, v této seminární práci ovšem uvádím výsledky floristického pozorování pouze z těch odběrů, z nichž byly pořízeny výběrové populace *Pediastrum duplex* pro geometricko-morfometrické analýzy, čili z 31. srpna a 21. října 2004, pro porovnání rozdílů ve fenotypickém projevu subpopulací letních a podzimních. Vzorky jsem odebral hydrobiologickou planktonní sítí (o průměru ok 40 μm) pokud možno z celého profilu vodního sloupce, vždy od břehu, v místě rybníčních stavidel. Ve všech případech jsem jednu část vzorku nafiloval Lugolovým roztokem a druhou ponechal v živém stavu pro bezprostřední biologické zpracování v laboratoři. Determinace většiny planktonních mikroorganismů, včetně záznamu jejich semikvantitativních četností, byla provedena pozorováním nativních preparátů během nejvýše pěti dnů ode dne jejich oběru v terénu. Aktuálně nezpracovávané živé vzorky byly uchovávány v lednici s prosklenými dvířky za konstantní teploty 15,5 °C. Preparáty z živých vzorků jsem pro pozorování ve světelném mikroskopu CX 31 upravoval centrifugací při 3200 ot/min (5 minut).

Ke každému z determinovaných taxonů jsem si poznamenal jeho relativní četnost ve vzorku. Za tímto účelem byla sestavena vlastní škála semikvantitativní četnosti, již jsem konzultoval s příslušnou literaturou (HINDÁK 1978, WOŁOWSKI 1998):

šestistupňová škála semikvantitativní četnosti

- 4 – druh se vyskytuje masově; je patrný při pohledu na sklíčko v kterémkoli místě
- 3 - velmi často; ne masově
- 2 – dosti často; poměrně snadno naležitelné

1 – ojediněle až dosti zřídka; ne zcela vzácně (>3 (vč.) buněk v celém vzorku)

O - vzácně; 1-2 buňky à vzorek

N - druh ve vzorku nepřítomen

2.2.3. Výsledky

datum	lokality	pH	konduktivita ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	světelnost (cm)	t_v ($^{\circ}\text{C}$)	t_o ($^{\circ}\text{C}$)
31.VIII.04	Štičí rybník	7,3	423,0	-	18,8	19,0
	Hluboký rybník	7,9	495,0	-	20,5	19,5
22.X.04	Štičí rybník	7,3	380,0	45,0	13,0	22,0
	Hluboký rybník	7,8	470,0	85,0	13,0	21,0

Tabulka 2.1. Zaznamenané hodnoty fyzikálně-chemických parametrů sledovaných nádrží.

Taxon	Hluboký rybník		Štičí rybník	
	léto	podzim	léto	podzim
<i>Actinastrum hantzschii</i>	0	1	0	1
<i>Achnanthes affinis</i>	1	1	0	0
<i>Achnanthes sp.1</i>	1	0	1	1
<i>Amphora ovalis</i>	1	0	0	0
<i>Anabaena cf. circinalis</i>	1	0	1	0
<i>Anabaena flos-aquae</i>	0	0	1	0
<i>Anabaena planctonica</i>	0	1	0	0
<i>Ankistrodesmus bibratianus</i>	1	0	0	0
<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	1	1	0	1
<i>Ankistrodesmus gracilis</i>	0	1	1	0
<i>Asplanchna sp.1</i>	1	1	1	1
<i>Asterionella formosa</i>	2	2	3	0
<i>Aulacoseira granulata</i>	2	2	1	2
<i>Bosmina longirostris</i>	3	2	3	2
<i>Botryococcus braunii</i>	1	1	2	1
<i>Brachionus sp.1</i>	2	0	1	1
<i>Caloneis cf. amphibaena</i>	1	0	0	0
<i>Caloneis silicula</i>	1	1	0	0
<i>Centrtractus belenophorus</i>	0	1	1	0
<i>Ceratium hirundinella</i>	0	1	0	1
<i>Closterium acerosum</i>	1	0	0	0
<i>Closterium limneticum</i>	0	1	0	1
<i>Cocconeis pediculus</i>	1	0	0	1
<i>Codonella craterum</i>	1	2	2	3
<i>Coelastrum asteroideum</i>	1	1	0	0
<i>Coelastrum microporum</i>	0	1	1	0

Taxon	Hluboký rybník		Štičí rybník	
	léto	podzim	léto	podzim
<i>Colatium cyclopicola</i>	2	1	0	1
<i>Coleps hirtus</i>	0	1	0	0
<i>Cosmarium laeve</i>	1	0	1	0
<i>Crucigenia fenestrata</i>	2	1	0	1
<i>Crucigenia tetrapedia</i>	0	0	1	1
<i>Crucigeniella neglecta</i>	1	0	1	1
<i>Crucigeniella rectangularis</i>	1	1	1	0
<i>Cyclops sp.1</i>	0	1	0	2
<i>Cyclotella comta</i>	1	0	0	1
<i>Cyclotella sp.1</i>	1	1	0	0
<i>Cymatopleura solea</i>	1	1	0	1
<i>Cymbella prostrata</i>	0	1	0	0
<i>Cymbella silesiaca</i>	1	1	0	1
<i>Daphnia sp.1</i>	0	1	3	1
<i>Diatoma elongata</i>	0	1	1	1
<i>Dictyosphaerium pulchellum</i>	1	1	1	1
<i>Dictyosphaerium tetrachotomum</i>	1	1	0	1
<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i>	0	0	0	0
<i>Dinobryon sertularia</i>	0	0	0	0
<i>Euglena acus</i>	1	1	0	1
<i>Euglena ehrenbergii</i>	1	0	0	1
<i>Euglena hemichromata</i>	1	2	0	2
<i>Euglena oxyuris</i>	0	1	0	1
<i>Euglena spirogyra</i>	1	0	0	0
<i>Euglena tripteris</i>	1	0	0	0
<i>Fragilaria crotonensis</i>	0	2	1	2
<i>Fragilaria ulna</i>	2	1	0	0
<i>Fragilaria capucina</i>	1	0	0	0
<i>Frustulia rhomboides</i>	0	1	0	0
<i>Frustulia cf. vulgaris</i>	2	1	0	1
<i>Gloeoitila pelagica</i>	1	1	1	0
<i>Golenkinia radiata</i>	0	1	0	1
<i>Gomphonema acuminatum</i>	1	0	0	1
<i>Goniochloris fallax</i>	0	1	1	1
<i>Goniochloris mutica</i>	1	0	1	0
<i>Goniochloris spinosa</i>	1	0	1	0
<i>Gyrosigma acuminatum</i>	2	0	0	0
<i>Keratella cochlearis</i>	0	2	2	3
<i>Keratella quadrata</i>	1	2	0	2
<i>Kirchneriella lunaris</i>	2	1	1	2
<i>Kirchneriella obesa</i>	0	2	0	0
<i>Koliella longiseta</i>	1	1	0	1
<i>Lagerheimia ciliata</i>	0	1	0	0
<i>Lagerheimia genevensis</i>	1	0	1	1
<i>Lagerheimia subsalsa</i>	0	1	1	1
<i>Lagerheimia wratislaviensis</i>	1	0	1	1
<i>Lepocinclis texta</i>	1	1	1	1
<i>Mallomonas cf. caudata</i>	0	1	0	0
<i>Melosira varians</i>	0	1	0	1
<i>Merismopedia elegans</i>	0	0	0	1
<i>Micractinium bohemiense</i>	1	0	1	0
<i>Micractinium pusillum</i>	0	0	0	1

Taxon	Hluboký rybník		Štičí rybník	
	léto	podzim	léto	podzim
<i>Microcystis aeruginosa</i>	1	0	0	0
<i>Microcystis wesenbergii</i>	0	0	0	0
<i>Monoraphidium contortum</i>	2	1	1	1
<i>Monoraphidium griffithii</i>	0	1	0	0
<i>Navicula cf. cryptocephala</i>	1	1	0	1
<i>Navicula lanceolata</i>	1	0	1	0
<i>Navicula cf. oblonga</i>	1	1	1	0
<i>Nephrochlamys subsolitaria</i>	0	0	0	1
<i>Nitzschia acicularis</i>	1	1	0	0
<i>Nitzschia recta</i>	2	1	0	1
<i>Nitzschia sigmaidea</i>	0	1	0	1
<i>Oocystis lacustris</i>	2	1	0	0
<i>Oscillatoria cf. limosa</i>	0	1	0	1
<i>Pandorina morum</i>	0	0	0	1
<i>Pediastrum biradiatum</i>	0	2	0	2
<i>Pediastrum boryanum</i>	1	2	2	2
<i>Pediastrum duplex</i>	0	2	2	2
<i>Pediastrum simplex</i>	0	2	2	1
<i>Pediastrum tetras</i>	1	0	0	0
<i>Peridinium sp.</i>	0	0	0	1
<i>Phacotus lenticularis</i>	1	0	0	0
<i>Phacus acuminatus</i>	0	1	0	1
<i>Phacus cf. pyrum</i>	1	0	1	0
<i>Phacus helicoides</i>	0	1	1	0
<i>Phacus lovgicauda</i>	2	2	2	1
<i>Phacus orbicularis</i>	0	0	0	1
<i>Phacus pleuronectes</i>	2	1	0	0
<i>Phacus tortus</i>	0	2	1	2
<i>Philodina sp.1</i>	1	0	0	0
<i>Pinnularia maior</i>	0	1	0	1
<i>Pinnularia sp.1</i>	2	1	1	1
<i>Pinnularia viridis</i>	1	1	0	1
<i>Planktonema lauterbornii</i>	1	2	2	2
<i>Planktothrix agardhii</i>	0	1	4	1
<i>Polyarthra sp.1</i>	0	2	2	2
<i>Polyedropsis spinosa</i>	1	1	0	1
<i>Pseudanabaena constricta</i>	1	1	0	0
<i>Pseudostaurastrum enorme</i>	0	1	0	1
<i>Pseudostaurastrum hastatum</i>	1	0	0	0
<i>Rhopalodia gibba</i>	0	0	0	1
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	0	1	0	0
<i>Scenedesmus acutus</i>	0	0	0	1
<i>Scenedesmus cf. ovalternus</i>	0	1	0	1
<i>Scenedesmus obliquus</i>	1	1	0	1
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	2	1	1	0
<i>Scenedesmus alternans</i>	0	1	1	1
<i>Snowella lacustris</i>	1	1	0	0
<i>Staurastrum chaetoceras</i>	0	1	1	1
<i>Stauroneis anceps</i>	1	0	1	1
<i>Stauroneis phoenicenteron</i>	2	0	0	1
<i>Stephanodiscus hantzschii</i>	1	1	0	0
<i>Stephanodiscus sp.1</i>	0	1	0	1

Taxon	Hluboký rybník		Štičí rybník	
	léto	podzim	léto	podzim
<i>Surirella ovata</i>	2	0	0	0
<i>Surirella robusta</i>	1	0	0	0
<i>Synedra acus</i>	1	1	0	2
<i>Synura cf. petersenii</i>	1	1	0	0
<i>Synura uvella</i>	0	0	0	1
<i>Tetraëdron caudatum</i>	1	0	1	1
<i>Tetraëdron incus</i>	1	0	0	1
<i>Tetraëdron minimum</i>	0	0	0	0
<i>Trachelomonas hispida</i>	0	1	0	1
<i>Trachelomonas volvocina</i>	0	1	1	1
<i>Woronichinia cf. fusca</i>	1	1	0	1

Tabulka 2.2. Seznam determinovaných taxonů na studovaných lokalitách.

2.2.3. Závěr

Druhová diversita fytoplanktonu sledovaných lokalit není vzhledem k patrné eutrofisaci těchto nádrží (a značné abundanci zooplanktonu) příliš vysoká. V průběhu práce jsem zaznamenal pouze vcelku časté druhy, o téměř nulové, anebo nízké bioindikační hodnotě. Žádný z determinovaných taxonů nelze označit za vzácný, pouze výjimečně se vyskytly druhy méně časté, např. *Pseudostaurastrum enorme* (Eustigmatophyceae) v Hlubokém rybníce. Masový výskyt jednoho druhu byl zjištěn pouze v jednu, při letním odběru vzorků ze Štičího rybníka s rozvojem “vodního květu” vláknité sinice *Planktothrix agardhii*. Relativně nízké hodnoty semikvantitativních četností zjištěné u řady jinak obecně hojných a rozšířených druhů, jsou pravděpodobně odrazem skutečnosti dominance zooplanktonu, charakteristické pro všechny odběry (vyjma onoho s “vodním květem”).

2.3. Kultivace vybraných zástupců rodu *Pediastrum*

2.3.1. Metodika

Za účelem plánovaného budoucího studia přímého vlivu experimentálně nastavených abiotických faktorů na odpovědi organismu v podobě konkrétních tvarových změn, učinil

jsem pokus o kultivaci některých zástupců rodu *Pediastrum*, jmenovitě *P. duplex* var. *duplex*, *P. duplex* var. *gracillimum*, *P. angulosum* var. *angulosum* a *P. boyanum* var. *caribeanum*, mj. i s cílem popsat stabilitu, popř. šíři variability morfologických znaků některých častějších ddruhů (*P. boryanum*, *P. duplex*). Prvé tři uvedené taxony pocházejí z vlastních přírodních vzorků (původem vesměs z eutrofních vodních nádrží rybníčního typu), přičemž posledně jmenovanou varietu *P. boryanum* vázanou zejména (avšak ne zcela) na tropické oblasti, laskavě poskytl můj školitel, dr. Neustupa, po návratu z malajské expedice, v rámci níž exotický taxon nasbíral v jezírku čínské zahrady v Singapuru. Vzhledem k předpokládaným ekologickým a stanovištním nárokům všech užitých experimentálních organismů, zvolil jsem kultivační techniku prostřednictvím tekutého, mírně modifikovaného Boldova základního media (viz KALINA, 1994) (z 0,05% objemu půdní dekokt, s přidavkem vitamínu B₁₂ a vitaminového roztoku M3900) ve skleněných (20 a 30 ml) zkumavkách s hliníkovými nezávitovými víky. Zmíněný typ kultivační nádoby lze s úspěchem nahradit 200 ml Erlenmeyerovými baňkami, zvláště v případě požadavku na rychlejší průběh kultivace (Neustupa, ústní sdělení).

Isolaci *Pediastrum* jsem uskutečnil pomocí mikropipety (sterilované horkým vzduchem při teplotě 160 °C po dobu cca 45 min.) o kruhovém průřezu ústí cca 200 µm, čili právě tak širokým, aby jím bylo možno pipetovat i coenobia největších očekávaných velikostí a zároveň, pokud možno, aby nedocházelo k nevídanému nasátí okolních kontaminujících objektů. Jelikož coenobia *Pediastrum* jsou dostatečně veliká, lze izolaci provést i při menších zvětšeních běžných světelných mikroskopů (100x). Z nativního preparátu mikropipetou vyjmuté coenobium jsem postupně přenášel do kapek destilované vody (vysterilované v autoklávu), s cílem dosáhnout maximálního zředění suspence nezbytně s ním nasáté.

Vlastní kultivace v BBM modifikovaném výše uvedeným způsobem proběhla za přímého permanentního osvětlení zářivkovou trubicí typu Philips TLD 18W/33 ve vzdálenosti cca 20 cm od zdroje, při průměrné laboratorní teplotě 25°C.

Prvé makroskopicky patrné náznaky viditelného nárůstu biomasy v kultivačních nádobách jsem zaznamenal po uplynutí nejméně 5 týdnů ode dne izolace.

Popsaným postupem jsem obdržel čisté kultury všech výše uvedených variet jmenovaných druhů rodu *Pediastrum*.

2.3.1. Výsledky

Výsledky kultivace shrnuje následující tabulka:

taxon	datum isolace	zdrojová lokalita	kultivace	kultivační nádoba
<i>P. duplex</i>	26.XII	Lázně Kunderatice (LB)	-	m
<i>P. duplex</i>	23.XII	Chrastenský rybník (LB)	+	v
<i>P. duplex</i>	23.XII	Chrastenský rybník	+	v
<i>P. duplex</i>	20.XII	PP Skalský rybník (JČ)	-	z
<i>P. duplex</i>	20.XII	PP Skalský rybník	-	z
<i>P. duplex</i>	20.XII	PP Skalský rybník	+	m
<i>P. duplex</i>	23.XII	Hamr na Jezeře (LB)	+	m
<i>P. duplex</i>	23.XII	Hamr na Jezeře	+	m
<i>P. duplex</i>	26.XII	Lázně Kunderatice	+	v
<i>P. boryanum</i> var. <i>caribeanum</i>	7.II	Singapur	+	v
<i>P. duplex</i>	7.II	PP Skalský rybník	+	m
<i>P. duplex</i>	7.II	PP Skalský rybník	+	m
<i>P. duplex</i>	7.II	PP Skalský rybník	+	m
<i>P. duplex</i>	7.II	PP Skalský rybník	+	m
<i>P. duplex</i>	7.II	PP Skalský rybník	+	v
<i>P. duplex</i>	13.II	PP Skalský rybník	+	m
<i>P. duplex</i>	26.XII	Lázně Kunderatice	-	v
<i>P. angulosum</i> var. <i>angulosum</i>	7.II	Borkovická blata (JČ)	+	m
<i>P. boryanum</i> var. <i>caribeanum</i>	7.II	Singapur	+	m
<i>P. boryanum</i> var. <i>caribeanum</i>	7.II	Singapur	+	m

Tabulka 3.1. Soupis izolovaných druhů. +/- značí úspěšnou/neúspěšnou kultivaci. m, v, z jsou zkratky odpovídající použitým kultivačním nádobám (menší nezávitová skleněná zkumavka, větší nezávitová skleněná zkumavka, malá závitová zkumavka).

2.3.2. Závěr

Závěrem lze shrnout, že kultivace vybraných druhů rodu *Pediastrum* není vcelku obtížná a pravděpodobně se obejde bez potřeby užití komplikovanější modifikace základního Boldova media. Ve srovnání s Erlenmeyerovými baňkami však dochází ve skleněných zkumavkách k viditelnému nárůstu biomasy až po relativně dlouhé době (2 týdny/5 týdnů), zdá se tedy účelné od kultivace v těchto nádobách ve prospěch prvně jmenovaných upustit. Dalším nevídaným jevem je pozorovaná desintegrace coenobií některých taxonů (např. *P. duplex* var. *gracillimum*) a růst těchto organismů ve formě jednotlivých buněk. Řešením tohoto problému pro budoucí kontinuální kultivaci bude pravděpodobně naředění tekutého BBM na přibližnou koncentraci anorganických iontů lépe odpovídající obsahu těchto látek v přírodním prostředí.

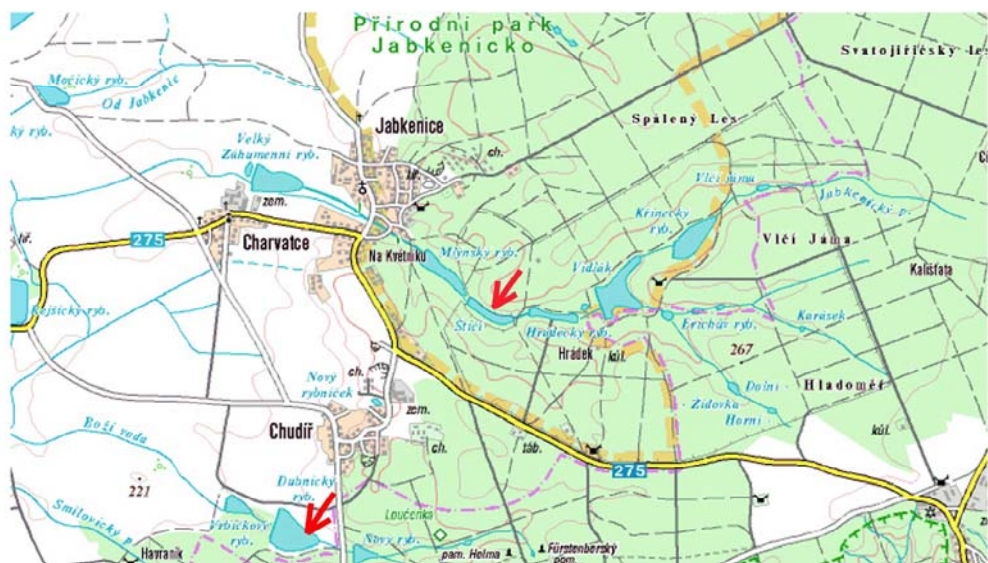
3. Seznam použité literatury

- ADAMS, D. C., ROHLF, F. J., SLICE, D. E.** (2002) Geometric morphometrics: Ten Years of Progress Following the “Revolution”. Review. – 8 pp. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- ASAUL, Z. I.** (1975): Viznačnik evgl'enovich vodorostěj Ukrajskoj RSR. – 406 pp. Redakcija zagaľnoj biologij, Vidavnictvo ”Naukova dumka”. Kijiv
- BOOKSTEIN, F. L.** (1991): Morphometric Tools for Landmark Data. – 435 pp. Cambridge University Press.
- BOOKSTEIN, F. L.** (1990): Combining the Tools of Geometric Morphometrics. – In: MARCUS, L. F., CORTI, M., LOY, A., NAYLOR, G. J. P., SLICE, D. E. (eds.). Advances in Morphometrics. – 22 pp. Plenum Press. New York, London
- BIGEARD, E.** (1933): Les *Pediastrum* d'Europe: Étude biologique et systématique. – In: Trav. Lab. Bot. Univ. Cathol. Angers 5. – 192 pp.
- BRAUN, A.** (1855): Algarum unicellularium genera nova vel minus cognita I. – III. – 111 pp. W. Engelmann. Leipzig
- CHANG, T. P.** (1981): A Comparative study of *Pediastrum boryanum* and *Pediastrum duplex*. Arch Protistenk. 124: 232 – 243.
- CHANG, T. P.** (1981): Zellwandskulpturen von *Pediastrum boryanum* und *Pediastrum duplex*. Nova Hedwigia 34: 191 – 205.
- CHODAT, R.** (1894): Algues des environs Genève. – C. R. Soc. Phys. et Hist. nat. Genève, 3 Per., 32. – p. 623 – 625.
- ETTL, H.** (1978): Xanthophyceae 1. Teil. – In: ETTL, H., GÄRTNER, G., HEYNIG, H., MOLLENHAUER, D. (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa, 3. – 530 pp. G. Fischer Verlag. Jena
- ETTL, H.** (1983): Chlorophyta 1. Teil . – In: ETTL, H., GÄRTNER, G., HEYNIG, H., MOLLENHAUER, D. (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa, 9. – 807 pp. G. Fischer Verlag. Jena
- GERIŠ, R.** (2004): *Pediastrum privum* v České republice. – In: Czech Phycology, 4. – p. 63 – 66. Olomouc.
- GLENK, H. – O.** (1994): Interspezifische Morphen zwischen *Pediastrum tetras* (EHRENBERG) RALFS und *Pediastrum biradiatum* MEYEN, Hydrodictyaceae, Chlorococcales. – In: Lauterbornia H.15. – p. 115-123. Dinckescherben
- HAMMER O. & HARPER, D. A. T.** (2004): PAST, Version 1.29. Program for Paleontological Statistics. <http://folk.uio.no/ohammer/past/doc1.html>

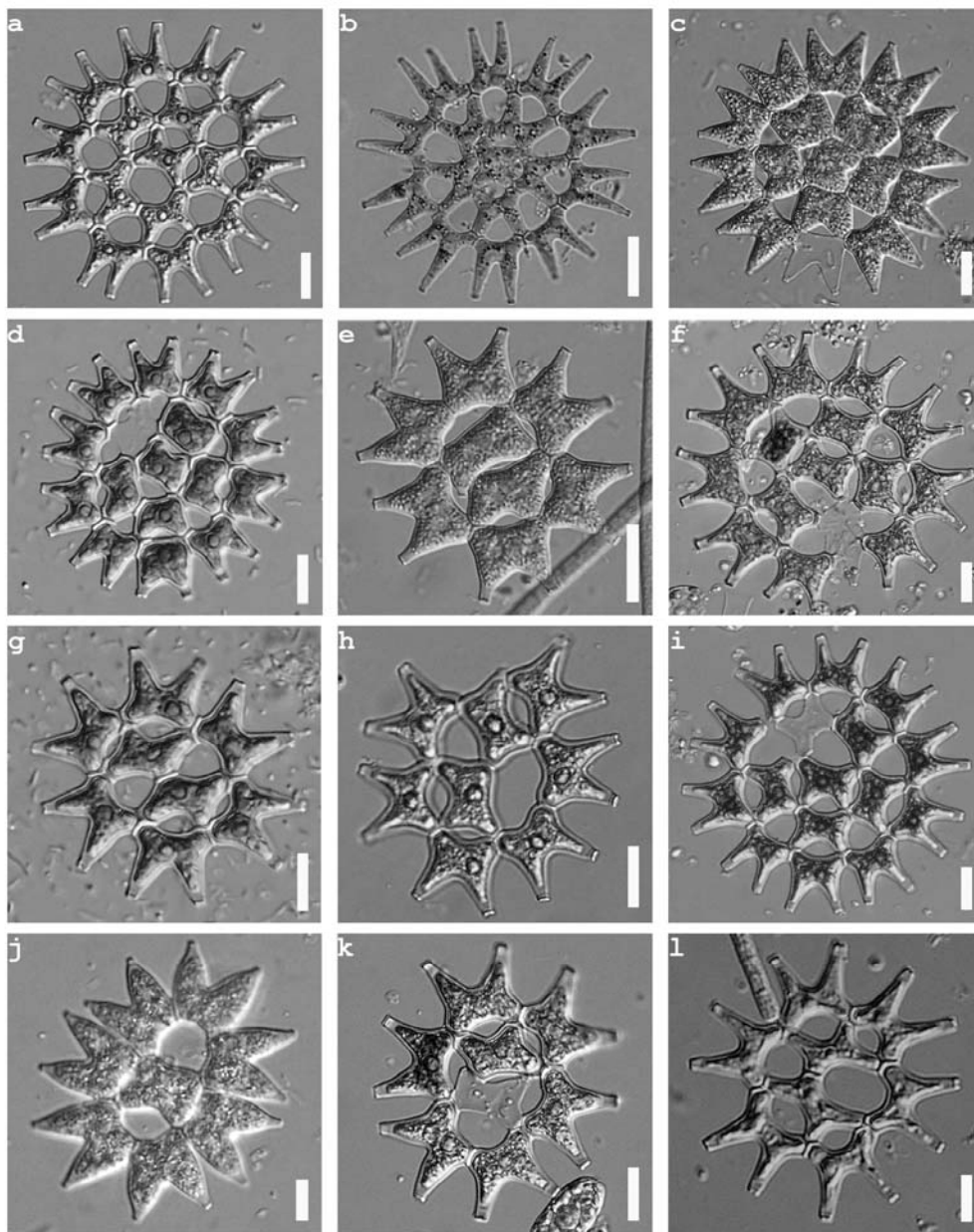
- HAMMER, O.** (2002): Morphometrics – brief notes. – In: Course texts. – 49 pp.
Paläontologisches Institut und Museum. Zürich
- HINDÁK, F.** (ed.) (1978): Sľadkovodné riasy. – 724 pp. SPN. Bratislava
- JENSEN, R. J., CIOFANI, K. M., MIRAMONTES, L. C.**, (2002): Lines, outlines, and landmarks: morphometric analyses of leaves of *Acer rubrum*, *Acer saccharinum* (Aceraceae) and their hybrid. – In: Taxon 51. – p. 475-492.
- KLINGENBERG, CH. P., BARLUENGA, M., MEYER, A.** (2002): Shape analysis of symmetric structures: Quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution*, 56(10). – p. 1909-1920.
- KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K.** (1999): Cynoprocaryota. – In: Ettl, H.; Gärtner, G.; Heynig, H.; Mollenhauer, D. (eds.). Süßwasserflora von Mitteleuropa, 1. Teil, Chroococcales. – 548 pp. Gustav Fischer Verlag. Jena
- KOMÁREK, J. & FOTT, B.** (1983): Chlorococcales. – In: Huber-Pestalozzi, G. (ed.). Das Phytoplankton des Süßwassers, Band 7.–1043 pp. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. Stuttgart
- KOMÁREK, J. & JANKOVSKÁ, V.** (2001): Review of the Green algal Genus *Pediastrum*; Implication for Pollen-analytical Research. – In: Bibliotheca Phycologica, Band 108. – 127 pp. J. Cramer. Berlin, Stuttgart.
- KRAMMER, K. & LANGE-BERTALOT, H.** (1986), 1988, 1991a, 1991b): Bacillariophyceae, 1. – 4. Teil. – In: Ettl, H., Gärtner, G., Heynig, H., Mollenhauer, D. (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa, 2. G. Fischer Verlag. Jena
- KRAMMER, K.** (2000): The genus *Pinnularia*. – In: Lange-Bertalot, H. (ed.). Diatoms of Europe, Volume 1. – 703 pp. A.R.G. Gantner Verlag K.G.. Ruggell
- KALINA, T.** (1994): Sinice a řasy. – In: Kříska, B., Prášil, K. (eds.): Sběr, preparace a konzervace rostlinného materiálu. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta. pp. 5-45.
- KENDALL, D. G.** (1977): The diffusion of shape. – In: Advances in Applied Probability. 9. p - 428-430.
- LANGE-BERTALOT, H.** (2001): *Navicula* sensu stricto. – In: Lange-Bertalot, H. Diatoms of Europe, Volume 2. – 526 pp. A.R.G. Gantner Verlag K.G.. Ruggell
- LEPŠ, J.** (1996): Biostatistika. Jihočeská univerzita. České Budějovice
- MARHOLD, K & SUDA, J.** (2002): Statistické zpracování mnohorozměrných dat v taxonomii: (fenetické metody). – 159 pp. Karolinum. Praha
- MEYEN, F. I. F.** (1829): Beobachtungen über einige niedere Algenformen. – In: Nova Acta

- Leop. Carol., Norimbergae, 14(2). – p. 768-778.
- NIELSEN, H.** (2000): Geometric analysis of cell wall sculpture in seven infraspecific taxa of *Pediastrum boryanum* (Sphaeropleales, Chlorophyta) and its taxonomic implications. *Phycologia*, 39 (1). – p. 36 – 49.
- NITARDY, E.** (1914): Zur Synonymie von *Pediastrum*. - Sonderabdruck aus den „Beiheften zum Botan. Centrallblatt“, Bd. XXXII. Abt. II. Heft 1. – 194 pp. Verlag C. Heinrich. Dresden
- PADISÁK, J., SORÓCZKI-PINTÉR, É., REZNER, Z.** (2003): Sinking properties of some phytoplankton shapes and the relation of form resistance to morphological diversity of plankton – an experimental study. – In: *Hydrobiologia*, Vol. 500 Issue 1-3.–p.243–258.
- PODANI, J.** (2000): HierClus. – In: Syn-Tax. Multivariate data analysis in *SYM*biology and *TAX*onomy, Hierarchical Clustering. Dept. Plant Taxonomy and Ecology, ELTE. Budapest
- QUERINO, R. B., REGINA, C. B., DE MORAES, ZUCCHI, R. A.** (2002): Relative warps analysis to study morphological variations in the genital capsule of *Trichogramma pretiosum* RILEY (Hymenoptera: Trichogrammatidae). – In: *Neotropical Entomolgy* 31 (2). – p. 217 – 224.
- RACIBORSKI, M.** (1890): Przegląd gatunków rodzaju *Pediastrum*. – In: Rozpr. Spraw. Posiedz. Wydz. mat. – przyr. Acad. Umiej., Kraków, 20. p. 84-120.
- RAMANATHAN, K. R.** (1964): Ulotrichales.- In: RANDHAWA, M. S. (ch. ed.). *Monographs on Algae*. – 188 pp. Indian Council of Agricultural Research. New Delhi.
- ROHLF, J. F.** (2003a): tpsUtil, Version 1.26, Utility program.
 - (2005): tpsDig, Version 2.04, Digitalization of landmarks.
 - (2003b): tpsRelw, Version 1.35, Relative warps analysis.
 - (2003c): tpsRegr, Version 1.28. Multivariate Regression.
 - (2003d): tpsSpln, Version 1.18. Thin-plate spline.
 - (2004): tpsSuper, Version 1.13
- Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook.
 New York. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- SIEMIŃSKA, J.** (1964): Bacillariophyceae (Okrzemki). – In: KAROL STARMACH (red.). *Flora Ślaskowodna Polski*, tom 6. – 609 pp. Państwowe Wydawnictwo Naukowe. Warszawa.
- SLÁDEČEK V. & SLÁDEČKOVÁ A.** (1996): Destruenti a producenti. – In: *Atlas vodních organismů se zřetelem na vodárenství, povrchové vody a čistírny odpadních vod*, 1.díl. – 350 pp. ČVTVHS. Praha

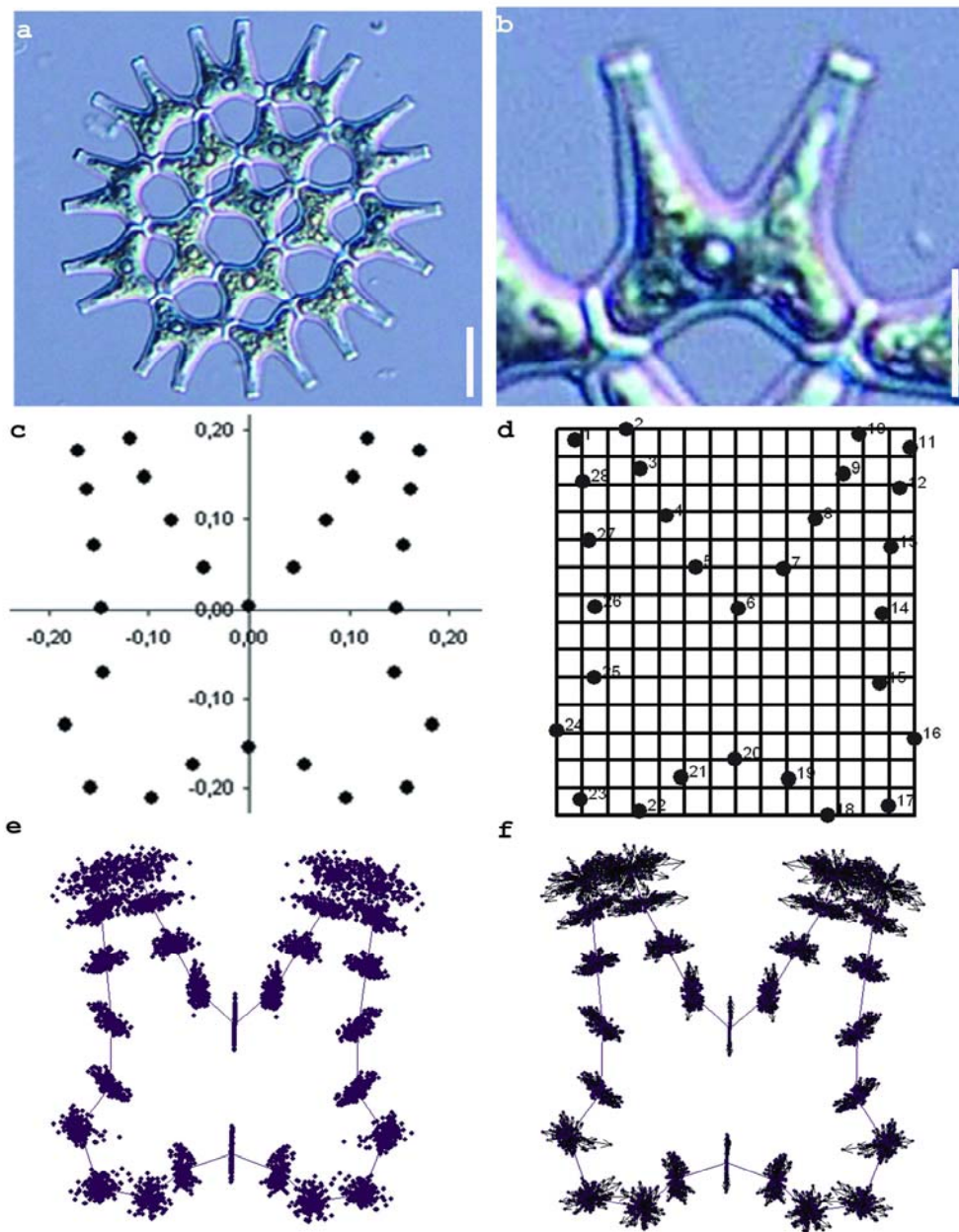
- SLÁDEČEK V. & SLÁDEČKOVÁ A.** (1996): Konzumenti. – In: Atlas vodních organismů se zřetelem na vodárenství, povrchové vody a čistírny odpadních vod, 2.díl. – 358 pp. ČVTVHS. Praha
- STARMACH, K.** (1972): Chlorophyta 3. – Zielenice nitkovate. – In: Flora słdkowodna Polski, Tom 10. – 749 pp. Państwowe wydawnictwo naukowe. Warszawa – Kraków
- STARMACH, K.** (1983): Euglenophyta. – In: Flora słdkowodna Polski, tom 3. – 590 pp. Państwowe wydawnictwo naukowe. Kraków
- STARMACH, K.** (1985): Chrysophyceae und Haptophyceae. – In: Ettl, H., Gärtner, G., Heynig, H., Mollenhauer, D. (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa, 1. – 515 pp. G. Fischer Verlag. Jena
- STARMACH, K.** (red.) (1966): Cyanophyta – Sinice, Glaucophyta – Galukofity. – In: Flora słdkowodna Polski, Tom 2. – 806 pp. Państwowe wydawnictwo naukowe. Warszawa
- SULEK, J.** (1969): Taxonomische Übersicht der Gattung *Pediastrum* Meyen. – In: Fott, B. (ed.): Studies in Phycology. – Praha: 197 – 261.
- TELL, G.** (2004a): A Miocene algal assemblage dominated by *Pediastrum leonensis* n. sp. (Chlorophyceae) from Patagonia, Argentina: paleoenvironmental implications. – In: Journal of Paleolimnology 32. – pp. 247 – 254.
- TELL, G.** (2004b): Recent and fossil species of the genus *Pediastrum* Meyen (Chlorococcales) from Argentina and their geographical distribution. – In: Algological Studies 112, pp. 49 - 71. Stuttgart.
- TRAINOR, F.R. & ROWLAND, H.** (1968): Control of colony and unicell formation in a synchronized *Scenedesmus*. – In: J. Phycol. 4. – p. 310-7.
- WOŁOWSKI, K.** (1998): Taxonomic and Environmental Studies on Euglenophytes of the Kraków – Częstochowa Uppland. – In: Wolek, J. (ed.). Fragmenta Floristica et Geobotanica, Supplementum 6. – 192 pp. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences. Kraków.
- WU, J. - T.** (1987): Revision of Formosan *Pediastrum*. – Nova Hedwigia 44. – 497 – 509.
- ZELDITCH, M. L., SWIDERSKI, D. L., SHEETS, H. D., FINK, W. L.** (2004): Geometric morphometrics for biologists: A primer. – 443 pp. Elsevier Academic Press.



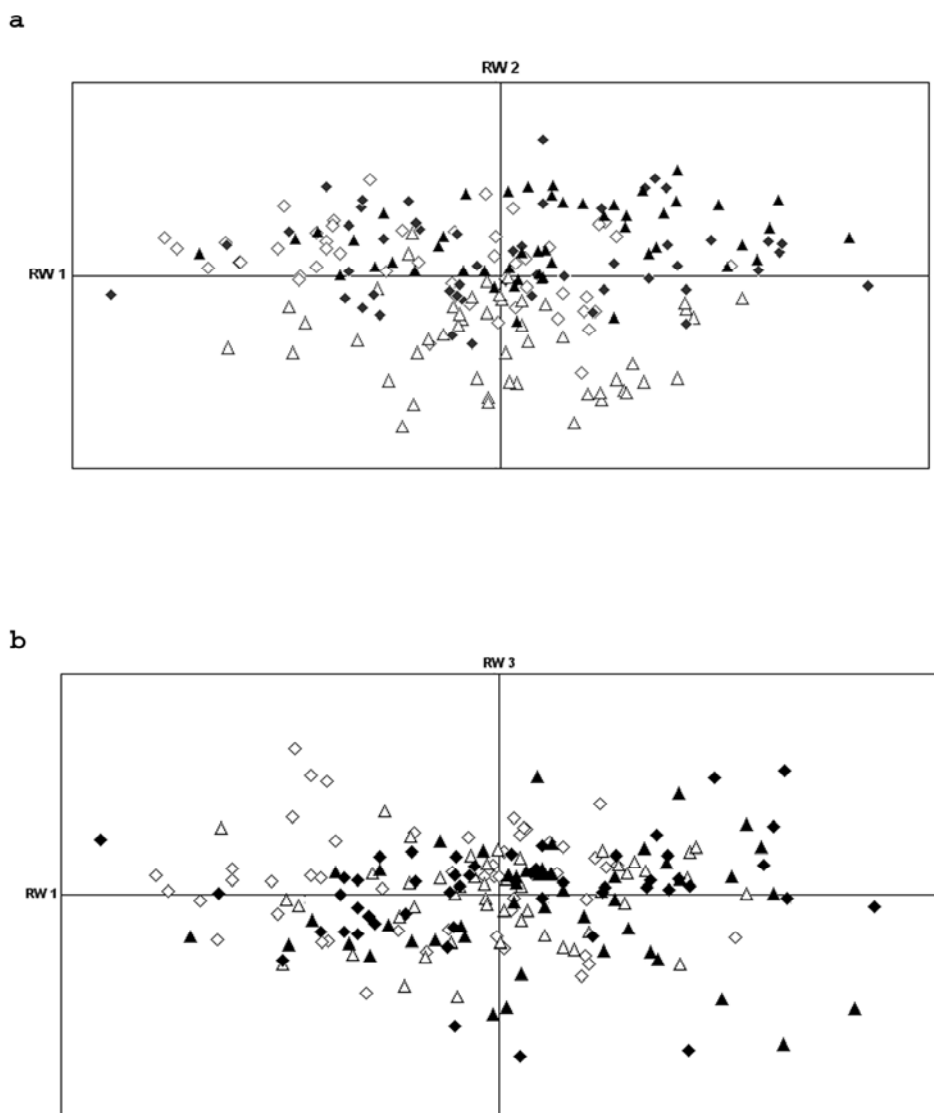
Tab. 1. - a: mapa (1: 50 000) oblasti Přírodního parku Jabkenicko a jeho jihozápadního okraje. Červené šipky označují sledované lokality, Štičí a Hluboký (Dubnický) rybník. – b: satelitní snímek kaskády lesních rybníků v Jabkenické oboře s označeným Štičím rybníkem.



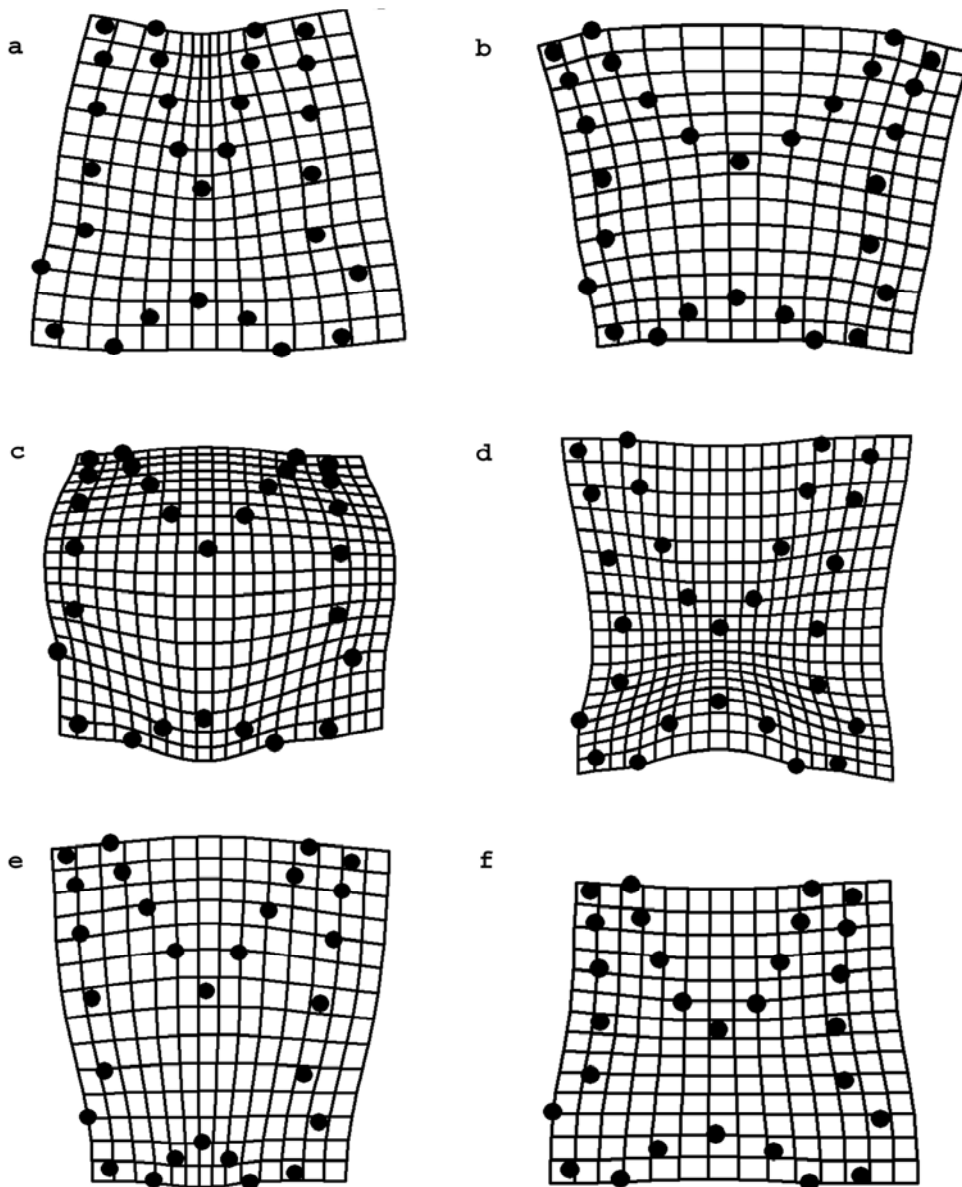
Tab. 2. a-l: mikrofotografie coenobií *Pediastrum duplex* (Hluboký a Štičí rybník) . Úsečka ve všech případech znázorňuje 10 μ m.



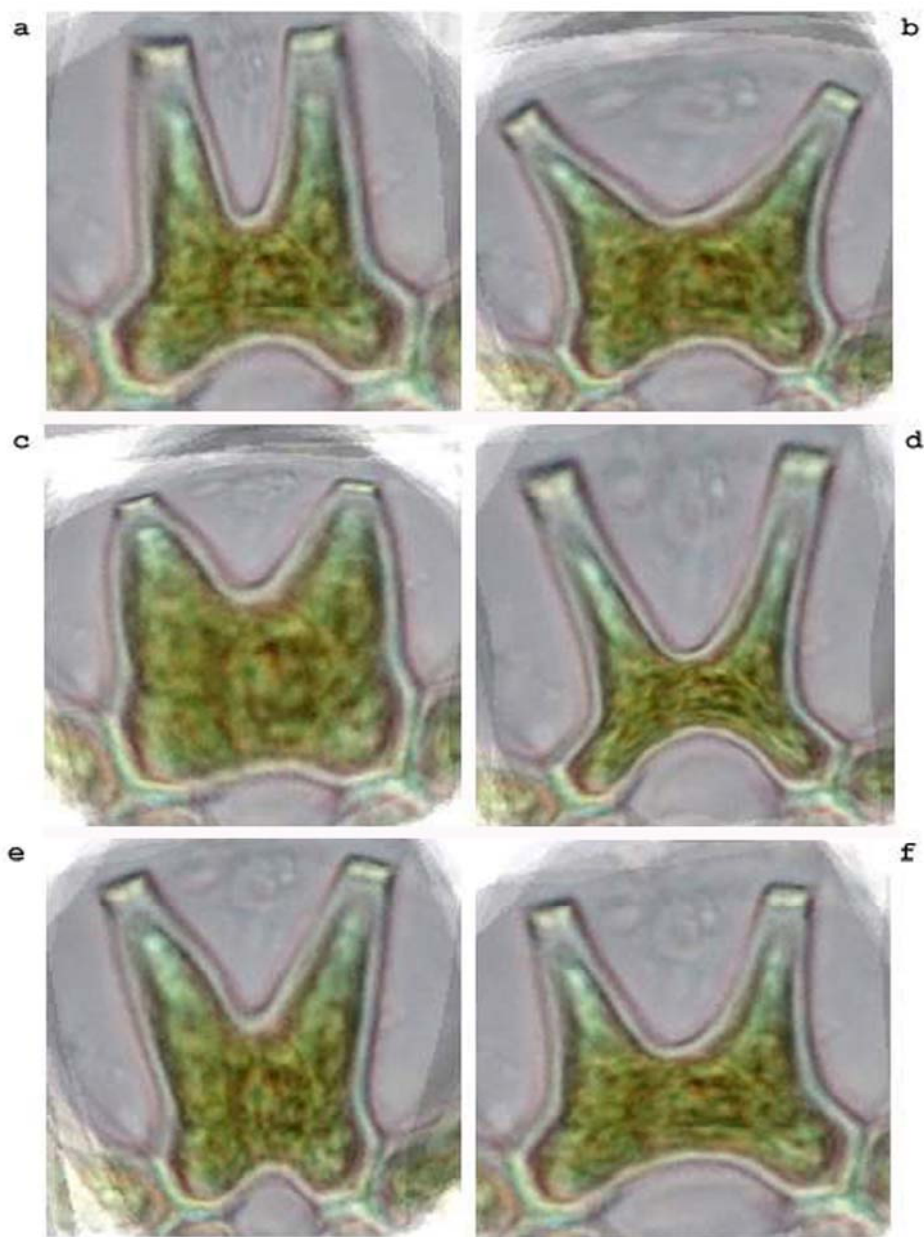
Tab. 3. Digitalisace význačných bodů a superimposice. – a: coenobium *Pedastrum duplex*. – b: marginální buňka coenobia *P. duplex*. – c: zachycení obrysu buňky prostřednictvím konfigurace kartesiánských souřadnic. - d: deformační mřížka. – e-f: znázornění výsledku prokrustovské superimposice objektů v podobě bodů (e) a vektorů (f).



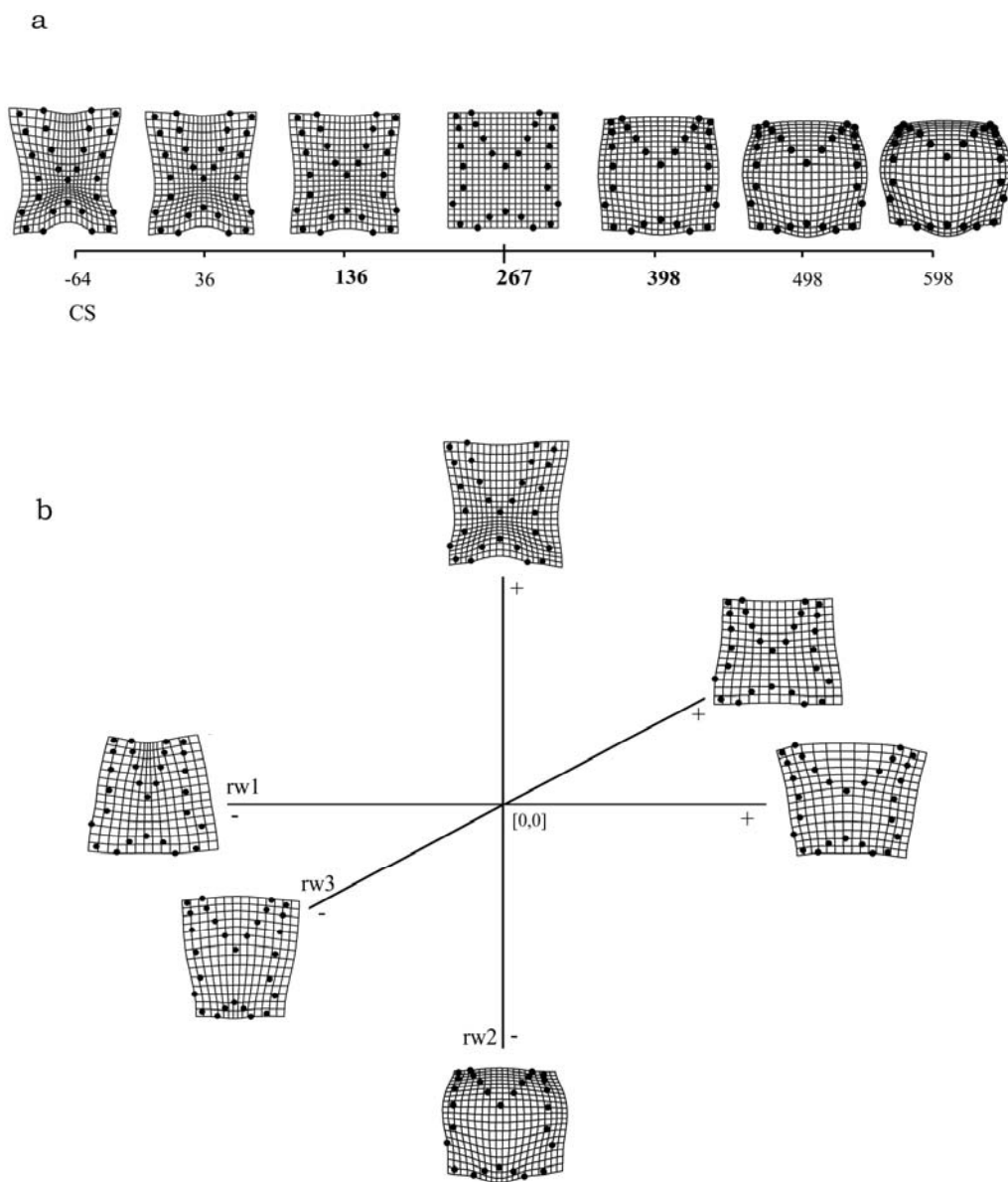
Tab. 4. Analýza relativních warpů. a-b: ordinační diagramy s rozložením objektů ze čtyř skupin. - a: skóry objektů na prvním a druhém relativním warpu. - b: skóry objektů na prvním a třetím relativním warpu. Bílé symboly značí subpopulace z Hlubokého rybníka, černé za Štičího. Kosočtverce znázorňují odběry letní, trojúhelníky zimní.



Tab. 5. Analýza relativních warpů (RWA) a-f: deformační mřížky objektů odpovídajících odhadovaným hodnotám skóre na prvních třech relativních warpech. - a-b: první relativní warp (RW1), oblast záporných (a) a kladných hodnot (b). - c-d: RW2, - (c), + (d). - e-f: RW3, - (e), + (f).



Tab. 6. Analýza relativních warpů (RWA). a-f: rekonstrukce objektů odhadnutých prostřednictvím RWA pomocí programu tpsSuper. Jednotlivé obrázky odpovídají deformačním mřížkám z Tab. 5.



Tab. 7. Mnohorozměrná regrese a Analýza relativních warpů. – a: allometrie, změna tvaru závislá na velikosti. Zvýrazněné hodnoty odpovídají reálnému rozpětí hodnot centroidové velikosti buněk studované populace, ostatní jsou užity pro statistickou konstrukci. – b: znázornění trendů změn tvaru postižených prvými třemi relativními warpy.



Tab. 8. Thin-plate spline a shluková analýsa. Zjištění vzájemné podobnosti konsenzuálních konfigurací užitím shlukovací techniky *UPGMA*. Pod kladogramem jsou deformační mřížky znázorňující transformaci referenčního objektu ve směrech jednotlivých skupinových konsenzů, odpovídajících zdrojovým lokalitám, které jsou vyznačeny na přiložené mapce.