

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra botaniky



Bakalářská práce

**Vliv faktorů prostředí na morfologickou
variabilitu křemičitých struktur
chrysomonád (Synurophyceae)**

Martina Pichrtová

2007

Školitelka: RNDr. Yvonne Němcová, PhD.

Abstrakt

Předkládaná bakalářská práce shrnuje současné znalosti o vlivu faktorů prostředí na morfologickou variabilitu křemičitých struktur chrysomonád a hodnotí přínos geometrické morfometrie pro analýzu tvaru. Experimentální část práce je věnována výzkumu křemičitých chrysomonád v NP České Švýcarsko a charakterizaci tvarové dynamiky křemičitých šupin u vybraných zástupců rodu *Mallomonas* pomocí metod geometrické morfometrie.

Buňky chrysomonád jsou pokryty křemičitými šupinami a ostny. Taxonomie této skupiny je založena výhradně na morfologii křemičitých struktur studovaných v elektronovém mikroskopu. První část je věnována literární rešerši. Shrnuty byly dosavadní poznatky o vlivu pH, teploty a obsahu živin na výskyt, růst a především morfologickou variabilitu křemičitých struktur chrysomonád. Popis a studium tohoto jevu mohou být využitelné v taxonomii a bioindikaci. Rozebrány jsou různé metody hodnocení tvaru šupin chrysomonád, se zvláštním zřetelem na landmarkové metody geometrické morfometrie, vhodného nástroje na studium tvaru a jeho proměn. Druhá část je věnována výsledkům vlastní experimentální práce, jejíž cíle byly následující: seznámit se s přírodními lokalitami, kde je možné chrysomonády nalézt, determinovat je s pomocí transmisního elektronového mikroskopu a ustanovit jejich kultury. V rámci výzkumu v NP České Švýcarsko bylo nalezeno celkem 14 druhů křemičitých chrysomonád, poprvé byla v ČR nalezena varieta *Mallomonas striata* var. *serrata*. Podařilo se izolovat klonální populace *Synura petersenii* a *Synura echinulata*. Možnosti landmarkové geometrické morfometrie jsou prezentovány na příkladu studie morfologické variability šupin *M. striata*, *M. kalinae*, *M. calceolus* a *M. flora*. Analýza relativních warpů umožnila popsat hlavní trendy morfologické variability a použité metody mnohorozměrné statistiky úspěšně odlišily šupiny jednotlivých druhů. Diskutovány jsou další možnosti využití těchto metod pro studium taxonomie a ekologie chrysomonád.

Klíčová slova: geometrická morfometrie, chrysomonády s křemičitými šupinami, *Mallomonas*, *Synura*, morfologie šupin, pH, teplota, živiny, NP České Švýcarsko

Abstract

The impact of environmental factors on morphological variation of silica structures in chrysophytes (Synurophyceae)

Proposed Bc. Thesis reviews temporal knowledge on the effect of environmental factors on the silica structures morphological variation in synurophytes, methods of geometric morphometrics as a valuable tool in shape analyses are presented. Finally, silica-scaled chrysophytes from the Bohemian Switzerland National Park are listed and shape variation of silica scales with application of the geometric morphometrics methods in selected *Mallomonas* species is characterized.

The synurophyte cells are covered with armour of imbricated silica scales. Taxonomy within this group is almost exclusively based on morphology of silica structures studied by transmission or scanning electron microscope. The effect of environmental factors (e.g. pH, temperature, nutrient content) on occurrence, growth and scale morphology in natural and experimental populations was discussed in several papers. Observed morphological variability of scales has important consequences for taxonomy and use of chrysophytes as valuable bioindicators. Several approaches to evaluation of the scale shape were described and the landmark based methods of geometric morphometrics appeared to be the most suitable. The second part concerned experimental work. A total of 14 species of silica-scaled chrysophytes were revealed during the investigation of the Bohemian Switzerland National Park. *Mallomonas striata* var. *serrata* has not been published from the territory of the Czech Republic yet. Clonal cultures of *Synura petersenii* and *Synura echinulata* were established. Landmark methods of geometric morphometrics were used to evaluate scale shape variation in *M. calceolus*, *M. kalinae*, *M. flora* and *M. striata*. Relative warps analysis described the main patterns of variation and methods of multivariate statistics successfully distinguished particular species. Potential of geometric morphometrics methods in the investigation of chrysophyte taxonomy and ecology is discussed.

Keywords: geometric morphometrics, silica-scaled chrysophytes, *Mallomonas*, *Synura*, scale morphology, pH, temperature, nutrients, Bohemian Switzerland National Park

Poděkování

Děkuji především své školitelce RNDr. Yvonne Němcové, PhD. za vedení celé práce, za ochotu kdykoliv pomoci a za trpělivost odpovídat na mé nesčetné otázky.

Dále děkuji RNDr. Jiřímu Neustupovi, PhD. za zasvěcení do metod geometrické morfometriky a v neposlední řadě za jeho nakažlivé nadšení pro věc.

Mé poděkování patří také všem kolegům a kamarádům z algologické laboratoře za nejrůznější rady a pomoc a za vytvoření příjemného a přátelského pracovního prostředí.

Za všestrannou pomoc a podporu děkuji RNDr. Janě Pichrtové, CSc.

Práce byla financována z prostředků grantu GA UK (B BIO 137/2006) a z výzkumného záměru MŠMT č. 0021620828.

Obsah

1.	Úvod	2
2.	Teoretická část	3
2.1	Chrysomonády s křemičitými šupinami	3
2.1.1	Taxonomické zařazení a obecná charakteristika	3
2.1.2	Křemičité struktury	3
2.1.3	Ekologie	6
2.1.4	Biogeografie	7
2.1.5	Význam	8
2.2	Morfologická variabilita šupin	8
2.2.1	Různé úrovně variability	8
2.2.2	Vliv různých parametrů prostředí	9
2.3	Význam studia tvarové variability pro taxonomii	14
2.4	Metody studia morfologické variability	16
2.4.1	Kvalitativní hodnocení	16
2.4.2	Tradiční morfometrika	17
2.4.3	Geometrická morfometrika	18
2.5	Shrnutí	21
3.	Experimentální část	23
3.1	Izolace a kultivace chrysomonád	23
3.1.1	Úvod	23
3.1.2	Vybrané lokality	23
3.1.3	Odběry vzorků	24
3.1.4	Izolace buněk do klonálních kultur	24
3.1.5	Příprava preparátů pro transmisní elektronovou mikroskopii	26
3.1.6	Nalezené druhy chrysomonád	26
3.1.7	Doprovodné druhy fytoplanktonu	31
3.1.8	Závěr	31
3.2	Aplikace metod geometrické morfometriky na identifikaci taxonů chrysomonád s křemičitými šupinami	33
3.2.1	Úvod	33
3.2.2	Metodika	33
3.2.3	Výsledky	36
3.2.4	Diskuse	42
3.2.5	Závěr	44
4.	Použitá literatura	46

1. Úvod

Vynález elektronového mikroskopu přinesl nový pohled do světa přírody. Struktury, jejichž přítomnost byla zatím pouze tušena, začaly být snadno pozorovatelné a mnoho nového bylo spatřeno zcela poprvé. Otevřel se tak prostor pro řadu nových výzkumů. S počátky elektronové mikroskopie souvisí mimo jiné právě rozvoj studia křemičitých šupin a ostnů chrysomonád. Jejich existence byla sice známá už z období světelné mikroskopie, nicméně teprve nová metoda umožnila zachytit složitost, jemnost a rozmanitost těchto submikroskopických objektů a porozumět procesu jejich vzniku.

První snímky šupin byly publikovány v roce 1955 (ASMUND 1955, FOTT 1955). Od té doby stále dochází k popisu nových druhů chrysomonád, právě na základě jejich odlišné morfologie. Poté, co byl shromážděn i dostatek ekologických dat, našly praktické využití jako důležité bioindikátory.

Avšak podrobné studium s sebou přineslo objev velice významného jevu – veliké tvarové variability šupin a ostnů. Tato různorodost může znesnadňovat taxonomické zařazení, současně se ale otevírá možnost zkoumání morfologie jako funkce faktorů prostředí. Nabízí se otázka, do jaké míry jsou pozorované rozdíly dané geneticky či zda se jedná spíše o projev fenotypické plasticity.

Je proto důležité variabilitu křemičitých struktur studovat, popsat ji a především zjistit, které faktory a jakým způsobem se na ní podílejí. Její detailní prozkoumání může pomoci nejen rozšířit možnosti využití chrysomonád jako bioindikátorů, ale také přinést významné poznatky pro taxonomii, která je zatím založena výhradně na popisu křemičitých struktur. Pro potvrzení jednotlivých vlivů je kromě shromažďování dat přímo v terénu potřeba provádět i pokusy s kulturami v laboratorních podmínkách, neboť jen tak lze prokázat skutečnou závislost určitého jevu na studovaném parametru prostředí. Kromě toho je třeba zvolit vhodnou metodu, jež by umožnila tvarové změny dobře popsat a analyzovat.

Tato práce slouží jako úvod k budoucí práci diplomové, která bude věnována právě ekofyziologickým experimentům s vlastními kulturami, vyizolovanými z přírodního prostředí. Důraz bude kladen na zjištění morfologické variability šupin v závislosti na různých faktorech. K jejímu vyhodnocení budou sloužit metody geometrické morfometriky. Základním cílem bakalářské práce tedy bylo poznání a zhodnocení dané problematiky a potřebné metodiky.

2. Teoretická část

2.1 Chrysomonády s křemičitými šupinami

2.1.1 Taxonomické zařazení a obecná charakteristika

Označení chrysomonády se vztahuje na jednotlivě žijící či koloniální bičíkovce patřící do dvou tříd oddělení Heterokontophyta – Chrysophyceae a Synurophyceae (ANDERSEN 1987). Zástupci tohoto oddělení mají mnohé znaky společné. Jedná se především o přítomnost dvou bičíků, z nichž jeden je delší, pokrytý dvěma řadami mastigonem, a druhý krátký, hladký, či pokrytý pouze jednoduchým vlášením. Chloroplast má 4 obalné membrány, tylakoidy tvoří skupinky po třech a hlavním zásobním produktem je chrysolaminaran. Složení pigmentů je také charakteristické – chlorofyl a, c, β -karoten, xantofyly a dominantní fukoxanthin, který u zástupců tříd Chrysophyceae a Synurophyceae způsobuje jejich typickou zlatavou barvu. Proto se o nich v česky psané literatuře hovoří jako o zlativkách. (KALINA & VÁŇA 2005)

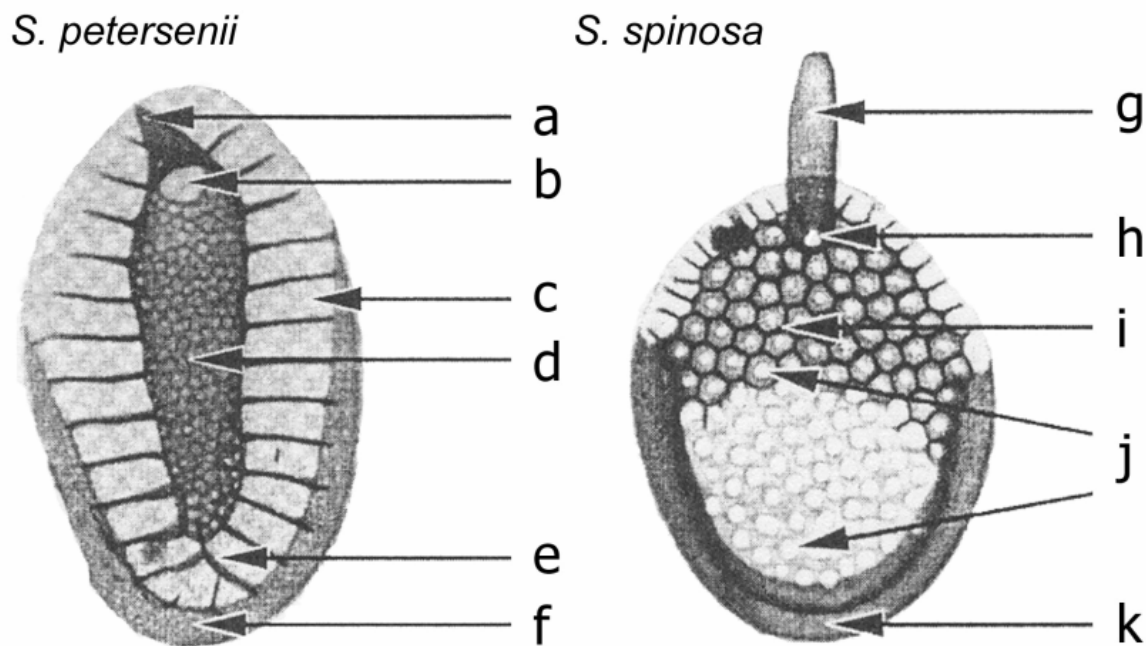
2.1.2 Křemičité struktury

Typickým znakem této skupiny organismů je přítomnost struktur tvořených polymery oxidu křemičitého. Ze stejného materiálu jsou složeny například i schránky rozsivek, další heterokontní skupiny organismů (třída Bacillariophyceae). Zlativky mají schopnost endogenně vytvářet silifikovaná odpočívající stadia – stomatocysty. Navíc, někteří zástupci třídy Chrysophyceae (konkrétně se jedná o čeleď Paraphysomonadaceae) a všichni Synurophyceae mají povrch buňky pokrytý šupinami a ostny. Tyto struktury jsou klíčové pro druhovou determinaci, ke které se vzhledem k jejich malým rozměrům standardně používá elektronový mikroskop. Proto počátek studia šupin (ASMUND 1955, FOTT 1955) souvisí s rozvojem transmisní elektronové mikroskopie v 50. letech 20. století. Výzkum chrysomonád s křemičitými šupinami má velmi dlouhou tradici jak u nás, tak i jinde ve světě. Právě díky přítomnosti šupin a ostnů jsou jednotlivé druhy snáze zaznamenány a určeny a jejich biologii je tedy věnováno mnohem více publikací než ostatním zlativkám. Také tato práce je zaměřena na šupinaté chrysomonády, obzvláště na třídu Synurophyceae.

Do této třídy patří rody *Chrysodidymus*, *Tessellaria*, *Mallomonas* a *Synura*. Šupiny bývají většinou heteropolární, vykazují bilaterální symetrii a na buňce jsou uspořádané ve spirálních řadách (LEADBEATER 1986, 1990). Jsou tvořeny uvnitř buňky za pomoci váčku SDV (silica deposition vesicle) a poté se dostávají na povrch exocytózou. SDV je asociován s membránou chloroplastu (SCHNEP & DEICHGRÄBER 1969).

Morfologie šupin je poměrně složitá a na její popis byla zavedena speciální terminologie (obr. 1 a 2). Každá šupina je tvořena bazální deskou, na jejímž vnějším povrchu se někdy vytváří sekundární vrstva (WEE 1997).

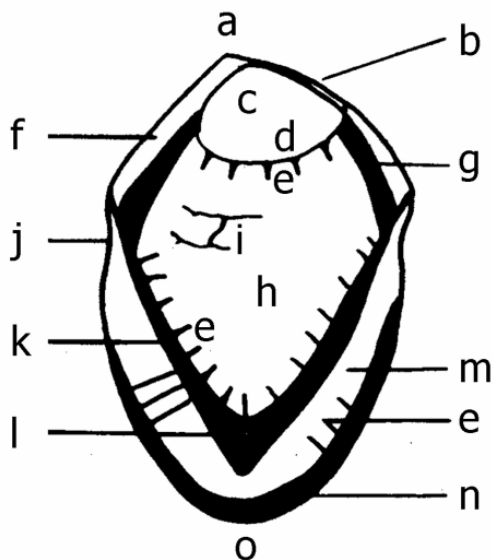
Do rodu *Synura* patří koloniální bičíkovci, jejichž buňky jsou spojeny svými posteriorními konci. Dorzální strana jejich šupiny je ornamentovaná, ventrální hladká. Téměř všechny druhy mají ostének, který u *Synura petersenii* KORSHIKOV vytváří dorzální záhyb – kýl. Ostének se vytváří ve stejném SDV jako šupina. Velmi odlišný typ šupin má *Synura lapponica* SKUJA. Jsou oválné, homopolární, bez osténku, s jednou centrální papilou a na povrchu buňky jsou rozmístěné neorganizovaně (KRISTIANSEN 2005).



Obr. 1. Morfologie šupin zástupců rodu *Synura*: a. špička kýlu, b. otvor v bazální desce, c. bazální deska, d. kýl, e. trámeček, f. přehnutý okraj, g. ostének, h. otvor v bazální desce, i. šestiúhelníková sekundární struktura, j. póry bazální desky, k. přehnutý okraj. Podle WEE (1997). České názvosloví převzato z práce NĚMCOVÁ (2000).

Šupinová vrstva u rodu *Mallomonas*, jednotlivě žijícího bičíkovce, je podobná jako u rodu *Synura*. Šupiny se na buňce vzájemně částečně překrývají, jsou uspořádány podobně jako tašky na střeše a tvoří tak kompletní schránku. (KRISTIANSEN 2002) Jejich průměrný počet je

druhově charakteristický (SIVER 1991). Šupiny jednotlivých druhů se liší tvarem a přítomností řady sekundárních struktur, které se též tvoří pouze na dorzální straně. Typické šupiny druhů ze sekce *Mallomonas* jsou tripartitní – rozdělené do tří částí – kromě dómu mají ještě centrální štít a okraj, které jsou od sebe odděleny V-žebrem. (KRISTIANSEN 2002)

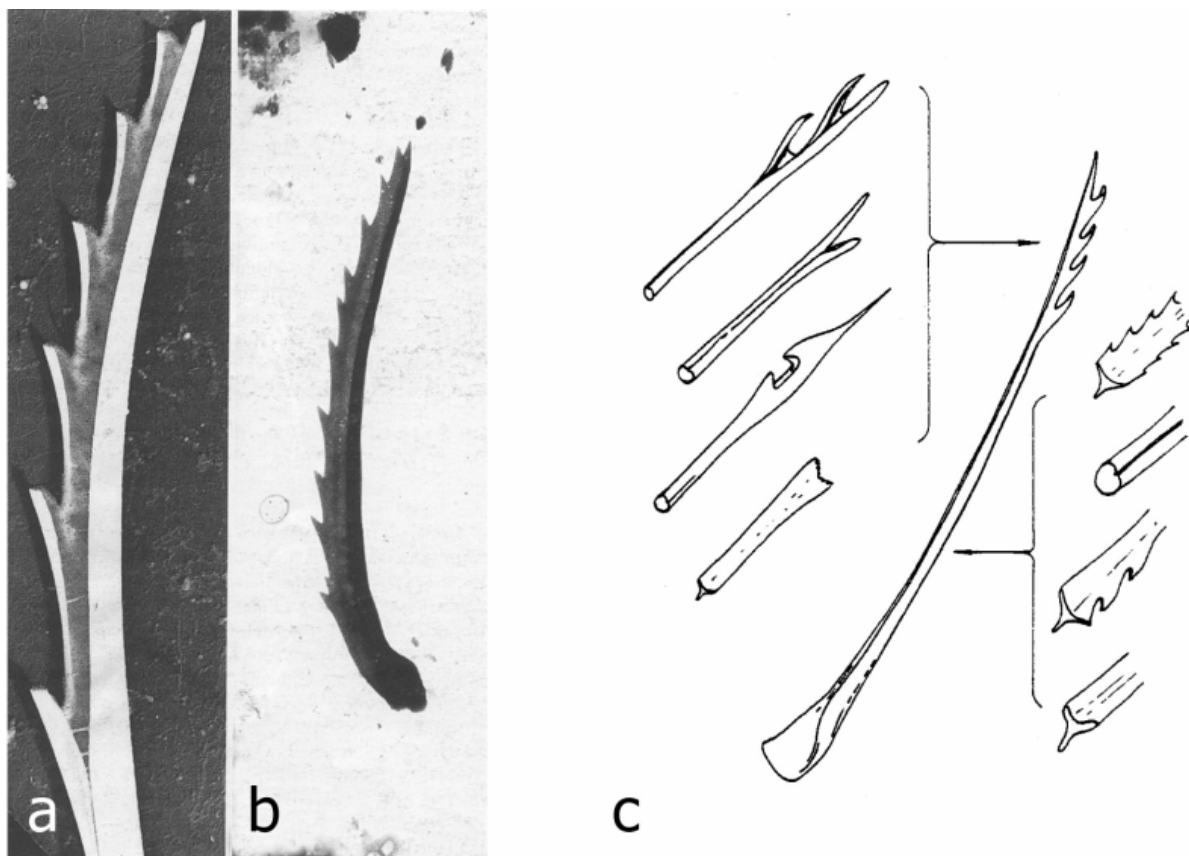


Obr. 2. Morfologie tripartitní šupiny rodu *Mallomonas*: a. distální konec, b. hrana, c. dóm, d. posteriorní hraniční žebro dómu, e. trámce, f. anteriorní okraj, g. anteriorní submarginální žebro, h. štít, i. žebra, j. laterální zakřivení, k. V-žebro, l. kápě, m. posteriorní okraj, n. přehnutý okraj, o. proximální konec. Podle KRISTIANSEN (2002). České názvosloví částečně převzato z práce NĚMCOVÁ (2000).

Kromě šupin nalezneme u *Mallomonas* i další křemičité struktury – ostny. Ty se vytvářejí jako ploché útvary, které jsou později srolovány do trubičky. Navíc, vždy vznikají v jiném SDV než příslušná šupina, k sobě jsou připojeny až v extracelulárním prostředí. Osten bývá svým plochým proximálním koncem připevněn na určité místo na šupině (BEECH et al. 1990). Některé druhy mají na šupině speciální strukturu zvanou dóm, kam osten přesně nasedne a dokonce je poté pasivně pohyblivý.

Rozeznáváme různé typy ostnů. Podle způsobu zoubkování se dělí na kraspedodontní (zoubky byly přítomné už na původním plochém útvaru před jeho svinutím) a notakantické (zoubky jsou vychlípeniny na výsledné trubičce), viz obr. 3 a,b. (ASMUND & KRISTIANSEN 1986). Podle délky distální části rozlišujeme ostny pseudobifurkáttní a špičaté. Některé druhy mají konec ostnu zvláště tvarovaný, například do podoby helmice. (KRISTIANSEN 2005)

Jak již bylo zmíněno, cysty chrysomonád se formují endogenně. Tvorby se opět účastní SDV splývající s váčky Golgiho aparátu. Křemičitá cysta má v sobě pór, který je nakonec uzavřen zátkou. Cysty bývají nejrůznějším způsobem ornamentované nebo mohou tvořit výběžky a ostny. Často je můžeme nalézt v sedimentu, nicméně jen u malé části z nich je známá jejich druhová příslušnost. Také není dostatečně jisté, jaký faktor tvorbu cyst iniciuje ani jak dlouho buňky v tomto odpočívajícím stadiu zůstanou životaschopné. (KRISTIANSEN 2005)



Obr. 3. Příklady různých typů ostnů u rodu *Mallomonas*: a. kraspedodontní ostěn, b. notakantický ostěn (KRISTIANSEN 2002); c. různé morfologie distální a proximální části ostnu (SIVER 1991).

2.1.3 Ekologie

Chrysomonády byly tradičně považovány za organismy chladnějších a oligotrofních vodních nádrží s maximem výskytu na jaře (KRISTIANSEN & TAKAHASHI 1982). Jedná se nicméně o velké zobecnění a nelze je aplikovat na všechny zástupce. Lokality s nejbohatší zlativkovou flórou však bývají neutrální až mírně kyselé, s nízkou konduktivitou, alkalinitou a obsahem živin a mírným množstvím rozpuštěných huminových kyselin (SIVER 1995). SIVER (1995) shrnul poznatky o rozšíření šupinatých chrysomonád v závislosti na různých parametrech prostředí, jako je pH, vodivost, trofie, teplota a sezonalita.

Nejdůležitějším parametrem určujícím distribuci chrysomonád se ukazuje být pH (ROIJACKER & KESSELS 1986, SIVER & HAMER 1989). Jen velmi málo druhů (ROIJACKER & KESSELS 1986 uvádějí pouze *Synura echinulata* KORSHIKOV a *Synura sphagnicola* (KORSHIKOV) KORSHIKOV) je však schopno žít v prostředí s velmi malými hodnotami pH, tzn. pod 5.

Hodnota pH zřejmě nepůsobí na rozšíření chrysomonád přímo, ale přes rozpuštěný anorganický uhlík, který se ve vodě vyskytuje jako CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- a CO_3^{2-} . Zastoupení jednotlivých forem souvisí právě s pH vody. Chrysomonády pravděpodobně nejsou schopné využívat ion HCO_3^- , potřebují především CO_2 , jenž je dostupný při nižších hodnotách pH. Touto vlastností lze vysvětlit i jejich typické jarní maximum a následnou častou absenci v létě. (ROJACKER & KESSEL 1986, ALLEN & SPENCE 1981, SAXBY-ROUEN et al. 1998)

Teplota vody je dalším z významných faktorů ovlivňujících distribuci chrysomonád. Na rozdíl od pH však není klíčová pro globální rozšíření, ale spíše hraje roli v sezónním rozvoji. Neurčuje, zda se organismus bude v daném prostředí vyskytovat, ale v jakém množství (ROJACKERS & KESSELS 1986), a je důležitá v periodické sukcesi druhů (SIVER & HAMER 1992).

ROJACKERS & KESSELS (1986) našli chrysomonády v rozmezí teplot 4-20°C. Často vykazují největší biomasu brzy na jaře po roztátí ledu, kdy jsou teploty hodně nízké. Tento jev lze mimo přímého vlivu teploty vysvětlit i zvýšeným osvětlením, koncentrací živin či malým predačním tlakem (SIVER 1995).

Významný vliv na rozšíření chrysomonád mají i živiny. Co do počtu druhů i do biomasy jsou hojnější v oligotrofních nádržích (SIVER 1995), nicméně je možné je nalézt i ve vodách eutrofních (KRISTIANSEN 1988). SIVER & MARSICANO (1996) uspořádali celou řadu druhů podél gradientu trofie. Kritériem k jejímu posouzení byl tzv. trofický status, jenž v sobě zahrnuje celkový fosfor, celkový dusík, obsah chlorofylu a a hloubku Seccioho desky.

Kromě základních živin, jako je dusík a fosfor, které bývají obvykle limitující, přichází u chrysomonád v úvahu ještě křemík, protože se jedná o základní stavební složku jejich šupin. Jedná se sice o druhý nejhojnější prvek na Zemi, avšak dostupný pro planktonní organismy je pouze rozpuštěný ve formě kyseliny monokřemičité (LEADBEATER & BARKER 1995). Obsah křemíku se v přírodních lokalitách velmi mění v průběhu sezóny a liší se i mezi jednotlivými jezery a nádržemi.

2.1.4 Biogeografie

KRISTIANSEN (2001) zpracoval studii o globálním výskytu rodu *Mallomonas* a rozlišil několik typů distribuce – kromě kosmopolitních či takzvaně široce rozšířených máme druhy vázané na jednotlivé kontinenty či klimatické zóny. Řada druhů vykazuje bipolární rozšíření (tzn. chybí v tropech) a poměrně velké množství druhů se řadí mezi endemity (KRISTIANSEN

& LIND 2005). Proti tomuto tradičnímu pohledu na biogeografii stojí neutrální model ubikvitního rozšíření mikroorganismů (FINLAY & CLARKE 1999, FINLAY 2002, FENCHEL & FINLAY 2004), který předpokládá, že všechny mikroorganismy mají díky jednoduchému šíření kosmopolitní výskyt a druhová bohatost na konkrétní lokalitě pouze odráží jejich globální zastoupení. Výskyt druhů na určitém místě je tedy daný jen ekologickými faktory prostředí, nikoliv historicky podmíněnou biogeografií. Neutrální model také předpokládá velkou lokální diverzitu mikroorganismů, která se zvětšující se plochou narůstá jen málo, což je odlišuje od organismů větších (FINLAY 2002, FENCHEL & FINLAY 2004).

Platností neutrálního modelu u rodu *Mallomonas* se zabývali ŘEZÁČOVÁ & NEUSTUPA (2007), kteří srovnávali druhy nalezené v jedné tůni a v celé soustavě aluviálních tůní s pulikovanými nálezy z celé ČR, Evropy a světa. Nárůst počtu druhů s plochou byl ve srovnání s teorií neutrálního modelu poněkud strmější na úrovni kontinentu a světa. Pro druhy nalezené v aluviálních tůních, u nichž se tradičně uvádí jejich biogeografie jako severní temperátní, byla spočítána pravděpodobnost, se kterou se ve skutečnosti jedná o druhy bipolární, zatím však náhodou zaznamenané jen na polokouli severní. Tato pravděpodobnost byla s výjimkou tří druhů vysoká. Autoři tedy došli k závěru, že neutrální model zřejmě platí pro distribuci většiny druhů rodu *Mallomonas* a v diskusi podrobně rozebrali možné příčiny zjištěných nesrovnalostí. (ŘEZÁČOVÁ & NEUSTUPA 2007)

2.1.5 Význam

Mnohé druhy chrysomonád mají dobře definované a úzké rozpětí optimálních podmínek prostředí, při kterém se v přírodě vyskytují. Tato vlastnost, spolu s jejich poměrně jednoduchou druhovou determinací, je předurčuje k roli vhodných bioindikátorů, a to nejen pro posuzování současného stavu, v biomonitoringu, ale díky dobrému zachování šupin a cyst v sedimentech také v paleolimnologii. (SIVER 1995, SMOL 1995)

2.2 Morfologická variabilita šupin

2.2.1 Různé úrovně variability

Šupiny chrysomonád vykazují variabilitu v podstatě na všech úrovních – v rámci jedné

buňky, v průběhu sezóny i mezi jednotlivými lokalitami (KRISTIANSEN 1979). Různorodost šupin získaných z jediné buňky souvisí s jejich přesnou polohou na jejím povrchu. Typy šupin přítomné na jedné buňce jsou druhově specifické. Například *Synura spinosa* KORSHIKOV má anteriorní tělové šupiny s osténkem, v okolí bičíku bývají tubulární apikální šupiny, v posteriorní části protáhlé šupiny bez osténku a úplně vzadu drobné kaudální šupiny. (KRISTIANSEN 1986a)

U rodu *Mallomonas* obvykle nacházíme 3-4 druhy šupin. Mohou být od sebe jasně oddělené, ale často je mezi nimi spíše plynulý přechod (KRISTIANSEN 2002). Např. druh *Mallomonas crassisquama* (ASMUND) FOTT má v okolí bičíku asymetrické apikální šupiny s dómem, dále téměř symetrické tělové šupiny, které bývají někdy bez dómu, a menší posteriorní šupiny (vždy bez dómu). Pro sekci *Torquatae* jsou charakteristické ještě tzv. límcové šupiny nesoucí ostny (KRISTIANSEN 2005).

Dalším druhem variability, kterou lze pozorovat na šupinách, je variabilita mezipopulační. Přírodními populacemi se zabývali ŘEZÁČOVÁ & ŠKALOUDEK (2005). Pomocí metod obrysové analýzy srovnávali šupiny *Mallomonas caudata* IVANOV ze dvou oblastí (dohromady 4 lokalit). Došli k závěru, že se šupiny skutečně signifikantně liší, a to především svojí šířkou.

NEUSTUPA & NĚMCOVÁ (2007) zkoumali tvarovou variabilitu přírodních populací *Mallomonas striata* ASMUND pomocí landmarkových metod geometrické morfometrie. Použity byly dva soubory dat – nejruznější publikované nálezy z celého světa a šupiny patřící jedné konkrétní populaci. Nejvýznamnější trend morfologické variability šupin byl velmi podobný u obou datových souborů a odpovídal variabilitě způsobené různou polohou šupin na buňce. Míra variability byla větší v celosvětovém měřítku než v rámci populace, z čehož vyplývá, že na ní významný podíl mají různé hodnoty ekologických parametrů, které se v rámci celého světa odlišují více než v podmínkách jednoho rybníka, odkud byla odebrána sledovaná populace. Tento typ variability je rozebrán v rámci následující kapitoly.

2.2.2 Vliv různých parametrů prostředí

Byla publikována řada prací zabývajících se laboratorními pokusy s kulturami chrysomonád. Tímto způsobem bylo možno vysledovat vliv jednotlivých parametrů prostředí na růstovou rychlost a morfologickou variabilitu křemičitých struktur. Experimentálně získané výsledky lze porovnat se studiemi, které shromáždily data o výskytu, četnosti a morfologické variabilitě chrysomonád v přírodních podmínkách.

pH

Laboratorní experimenty potvrzují klíčovou roli pH prostředí pro rozšíření chrysomonád, která byla vypořádována již při studiu přírodních vzorků. *Synura petersenii* má růst ohraničený hodnotami 3,3-3,9 a 8-8,4. pH značně ovlivňuje právě růstovou rychlost, která dosahuje maxima při hodnotách mezi 5,5 a 6,5 (SAXBY-ROUEN et al. 1997). GAVRILOVA et al. (2005) uvádí inhibici růstu u *Synura petersenii* při hodnotách 4.5 a 9.5. Interval ohraničený těmito hodnotami přesně odpovídá podmínkám s největším počtem nalezených druhů (SIVER & HAMMER 1989). LEE & KIM (2007) uvádějí růst kultur druhů *Mallomonas acaroides*, *M. caudata* a *M. areolata* mezi hodnotami pH 4 a 9. Maximální rychlosti bylo u prvních dvou uvedených dosaženo při pH 6, tři odlišné kmeny druhu *Mallomonas caudata* vykazovaly významné rozdíly – největší růst byl pozorován v rozmezí hodnot pH 5-7.

Hodnota pH však nemá vliv pouze na růstovou rychlost, ale i na morfologii šupin. GAVRILOVA (2005) provedla morfometrickou analýzu šupin řasy *Synura petersenii*, která byla kultivována při různých pH. Stres způsobený extrémní kyselostí či zásaditostí média se projevil poškozením šupin, které byly slabě silifikované, nepravidelné, kýl byl zkrácený, zmnožený či jinak deformovaný.

Morfometrická analýza však ukázala, že každý ze dvou studovaných kmenů prochází odlišnými změnami. Nelze tedy zobecnit typ změn, kterými šupina prochází v závislosti na pH, mnohem více závisí právě na příslušnosti ke kmeni. Nicméně přítomnost silně zdeformovaných šupin ve vzorku může být pro posouzení stavu životního prostředí použita.

Teplota

Řada laboratorních experimentů ukázala, že optimální teplota, tedy taková, při které kultury dosahují nejvyšší růstové rychlosti, bývá obvykle vyšší než teplota, při které chrysomonády najdeme běžně v přírodě. *Synura petersenii* má nejvyšší růstovou rychlost při teplotě 20°C, při nižší i vyšší teplotě dochází k poklesu (MARTIN-WAGENMANN & GUTOWSKI 1995, SAXBY-ROUEN et al. 1997). Optimální teplota 20°C platí i pro druh *Mallomonas tonsurata* TEILING (GUTOWSKI 1996). HEALEY (1983) sledoval růst *Synura sphagnicola* při různých teplotních a světelných podmínkách. Pokusy byly prováděny na kultuře získané z hypolimnionu, z hloubky 7.5 metrů, kde tyto organismy tvoří vegetační zákaly v některých kanadských jezerech. Studie si proto především kladla za cíl zjistit, jestli *Synura sphagnicola*

vykazuje nějaké speciální adaptace zvýhodňující ji právě v daném typu prostředí. Jako optimum byla stanovena teplota 10°C při malé ozáření a 17°C při velké. Jedná se sice o hodnotu nižší než u předešlých zmiňovaných druhů, avšak opět vyšší než panovala v místě izolace (7-8°C). K podobnému závěru dospěli i LEE & KIM (2007). Studované druhy mallomonád také v kultuře vykazovaly vyšší teplotní optimum (18-21°C) než by odpovídalo původním lokalitám (11,1-17,8°C). Mezi třemi různými kmeny *Mallomonas caudata* byly, podobně jako v případě pH, pozorovány významné rozdíly.

Teplota je také parametrem s významným vlivem na morfologii křemičitých struktur, jak se ukázalo již při pozorování přírodních vzorků. SIVER & SKOGSTAD (1988) studovali přírodní nálezy druhu *Mallomonas crassisquama*, o kterém bylo známo, že jeho šupiny jsou poměrně variabilní, ať už na úrovni mezipopulační nebo i v rámci jedné buňky (KRISTIANSEN 1979). Morfologických znaků na šupinách byla sledována celá řada, avšak jediným, u kterého byla skutečně prokázána závislost na nějakém parametru prostředí, byl vzhled ostnů. U *Mallomonas crassisquama* je možné nalézt 2 typy ostnů – serátní a helmicovité. Sledovaný znak souvisí s teplotou vody. Ve vodě, která má teplotu do 12°C, mají tyto organismy pouze serátní ostny, nad 15°C helmicovité. Oba dva typy vyskytující se najednou můžeme nalézt v rozmezí teplot 9-20°C. Možným vysvětlením může být přizpůsobení měnící se viskozitě vody, která klesá s rostoucí teplotou. Helmiovité ostny jsou totiž delší než serátní a mohou tak lépe zabránit klesání organismu ve vodním sloupci při nižších hodnotách viskozity. (SIVER & SKOGSTAD 1988)

GUTOWSKI (1996) zkoumala kultury *Mallomonas tonsurata* pěstované v teplotách od 5 do 25°C a kromě růstové rychlosti zaznamenávala morfologické změny na šupinách i ostnech. Získávána byla jak kvantitativní, tak kvalitativní data, sledován byl stupeň silifikace i celkový poměr normálních a deformovaných šupin na buňce. Výsledkem teplotního pokusu bylo zjištění, že šupiny se se vzrůstající teplotou zkracují, zatímco šířka zůstává stejná. Parametry na V-žebříku zůstávají víceméně konstantní. Při teplotě 20°C má také největší počet šupin plně vyvinutou sekundární vrstvu. U šupin bez dómu toto procento přímo koreluje s růstovou rychlostí. Až do teploty 20°C nalezneme na šupinách 2 typy ostnů – kratší na apikálních a delší na tělových. Při 25°C tyto kategorie přestávají být rozlišitelné a ostny mají zhruba střední délku.

Dostupný křemík a jiné živiny

Díky přítomnosti šupin, ostnů a cyst je právě dostupný křemík velmi důležitý v biologii chrysomonád. Jeho významu a vlivu na morfologii bylo proto také věnováno zřetelně více studií než ostatním živinám. Chrysomonády pro stavbu zmiňovaných struktur potřebují získat křemík z okolního prostředí – vody. Nabízí se zde srovnání s rozsivkami, jejichž schránka je též složená z polymerovaného oxidu křemičitého. Jeho množství je u obou skupin organismů dokonce srovnatelné co do plochy povrchu schránky. Pro rozsivky se obsah křemíku ukázal být limitujícím faktorem prostředí, bez něhož se okamžitě zastaví jejich dělení. (cf. SANDGREN et al. 1996)

Význam křemíku pro růst řasy *Synura petersenii* studovali už KLAVENESS & GUILLARD (1975). První přemístění kultur z média s křemíkem do média bez křemíku nepřineslo signifikantní pokles růstové rychlosti, ten se objevil až s dalšími přenosy do čerstvého média bez křemíku. Koncentrace pod 1 μM hodně snížila růstovou rychlost a způsobila morfologické změny – když se pozastaví růst populace, ať už z důvodu vyčerpání křemíku či vysoké populační hustoty – kolonie se rozpadnou a brzy poté se začnou objevovat buňky mrtvé. *Synura petersenii* tedy ke zdárnému růstu vystačí i s malými koncentracemi křemíku. K významné změně růstové rychlosti či dokonce ke ztrátě životaschopnosti vede pouze dlouhodobý nedostatek. Je-li ale v médiu křemík přítomen, může ho *Synura petersenii* dokonce úplně vyčerpat. Je proto velmi úspěšná v kompetici například právě se zmiňovanými rozsivkami.

KLAVENESS & GUILLARD (1975) studovali i vliv GeO_2 , což je látka známá jako specifický inhibitor silikátového metabolismu. Bylo zjištěno, že na růst nepůsobí inhibičně v případě nízkých koncentrací křemíku v médiu, klíčový je tudíž především poměr Si:Ge – germanium je tím méně toxické, čím méně je v médiu křemíku. Toto je další významný rozdíl mezi chrysomonádami a rozsivkami. Autoři navrhuji jako možné vysvětlení případnou schopnost chrysomonád nahradit křemík jiným prvkem s podobnými chemickými vlastnostmi, jako je právě germanium či cín.

Životaschopnost chrysomonád tedy není pevně spojena s přítomností křemíku, jako je tomu u rozsivek. Pokud se buňky dostanou do prostředí bez křemíku, morfologie a organizace šupin se stává nenormální, až nakonec zůstanou jen nahé, ale životaschopné buňky. Po obohacení média dochází k obnovení normální schránky do 48 hodin, první šupiny se však objevují již po 2 hodinách. I buňky bez šupin stále obsahují funkční SDV, které jsou naplněny

pouze tenkým fibrózním materiálem. První šupiny exocytují na různých místech a posléze putují směrem k bičíku. Co tento pohyb zapříčiňuje není známo, možná je účast cytoskeletu, bičíkových kořenů či buněčných organel. (SANDGREN et al. 1996)

HAHN et al. (1996) provedli pokus s klonálními kulturami *Mallomonas tonsurata*, studující jejich růst v médiích, která se lišila obsahem minerálních látek. Pozorovali, že v médiu bohatém na křemík se tvoří delší, avšak zároveň tenčí šupiny. Jedná se také o jedinou ekofyziologickou studii zabývající se také vlivem dusíku a fosforu na morfologii křemičitých struktur. Nejvíce se projeví podmínky se zvýšenou hladinou fosforu, kde šupiny s dómem byly signifikantně delší než v ostatních pokusech. Měly též výraznější štít a relativně menší dóm. Projevilo se také prodloužení apikálních ostnů do jehlovitého tvaru.

SANDGREN & BARLOW (1989) navíc přinesli podrobné shrnutí vlivů různých inhibitorů metabolismu na regeneraci šupinové vrstvy. Látky byly do média přidány spolu s křemíkem a poté byl sledován jejich vliv na dělení buněk, produkci SDV, morfologii šupin a jejich umístění. Autoři zjistili, že kolchicin i nokodazol, známé destabilizátory mikrotubulů, mají vliv na morfologii šupin a jejich organizaci na buněčném povrchu. Kolchicin v menší koncentraci zastavuje dělení, při vyšších koncentracích jsou buňky zakulacené, téměř nebo zcela bez šupin. Při koncentraci nokodazolu větší než 1 μM se sníží počet produkováných šupin, narušen je i jejich tvar, vývoj kýlu a ornamentace a navíc jsou šupiny na povrchu buňky rozložené zcela náhodně. Cytochalazin B neměl žádný průkazný vliv na produkci šupin, pouze při vyšších koncentracích inhibuje buněčné dělení. Protože se jedná o látku způsobující depolymerizaci aktinových mikrofilament, odvozují autoři, že se mikrofilamenta nijak neúčastní formování SDV, přestože se tak doposud předpokládalo. Buňky vystavené účinku tunicamycinu se přestaly dělit, objevovalo se jen velmi malé množství nových šupin, které zato byly naprosto normální. Jed má tedy vliv na vznik nových SDV, nicméně i nahá buňka jich stále malé množství obsahuje. Na druhou stranu kofein při vyšší koncentraci kromě pozastavení dělení ovlivňuje i stávající SDV tak, že produkují abnormální šupiny. Monensin působí podobně jako kofein. Navíc byl zjištěn zajímavý efekt – tato látka nijak neovlivňuje produkci šupin u řasy *Paraphysomonas* sp., což ukazuje na významný rozdíl v mechanismu produkce šupin mezi oběma skupinami chrysomonád – třídami Synurophyceae a Chrysophyceae.

2.3 Význam studia tvarové variability pro taxonomii

Studium vlivů parametrů prostředí na variabilitu šupin může pomoci vyřešení některých taxonomických nejasností, nebo alespoň může ukázat, na které aspekty je vhodné se při posuzování druhové příslušnosti zaměřit. Platí, že čím je znak proměnlivější v závislosti na podmínkách prostředí, tím méně vhodné je jeho použití pro rozlišení jednotlivých taxonů. Na několika následujících příkladech jsou představeny studie morfologické variability, které přinesly důležité poznatky právě pro taxonomii.

Mallomonas striata

NEUSTUPA & NĚMCOVÁ (2007) se ve své geometricko-morfometrické studii kromě celkového zhodnocení morfologické variability šupin *Mallomonas striata* zaměřili i na rozdíl mezi dvěma varietami tohoto druhu – *Mallomonas striata* var. *striata* ASMUND a *Mallomonas striata* var. *serrata* HARRIS & BRADLEY, které jsou definovány pouze podle typu ostnů. Použitá metoda umožnila odlišit variety i na základě tvaru šupin, což rozdělení obou taxonů podporuje.

Mallomonas tonsurata

Mallomonas tonsurata patří do série Tonsuratae (KRISTIANSEN 2002). Šupiny i ostny zástupců této skupiny jsou velmi podobné zástupcům série Alpinae, od nichž je obvykle odlišuje přítomnost sekundární vrstvy, ale často jsou rozdíly poměrně nejasné. HAHN et al. (1996) ve svém experimentu studujícím vliv minerálních látek prokázali přítomnost sekundární vrstvy a okénka vždy u stabilního procenta šupin, žebra se objevovala u šupin s vyšším stupněm silifikace.

Podíl šupin se sekundární vrstvou je ale závislý na teplotě, u těch bez dómu dokonce přímo koreluje s růstovou rychlostí. Největší procento šupin s vyvinutou sekundární vrstvou nalezneme při 20°C. (GUTOWSKI 1996)

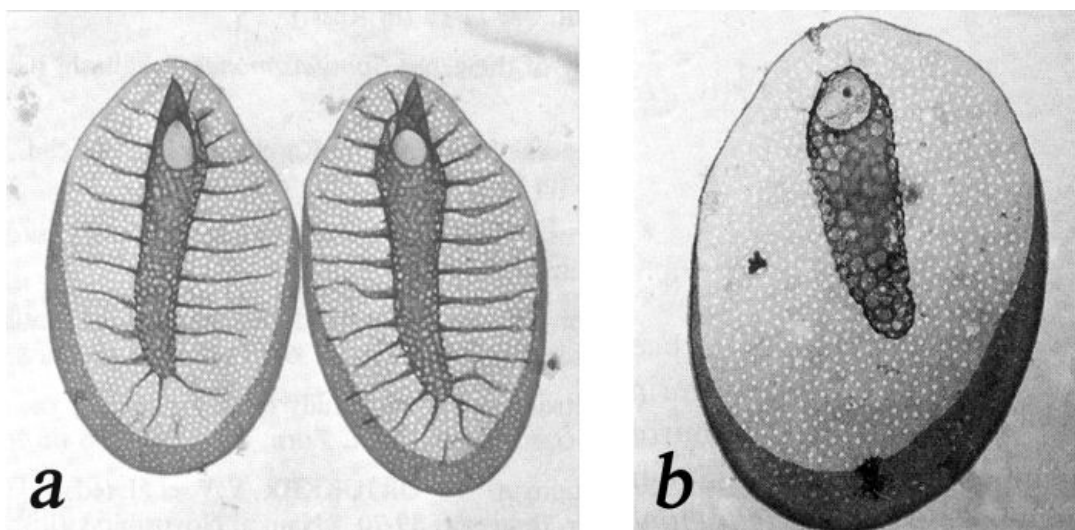
Experimenty ukázaly na morfologickou variabilitu, která znesnadňuje správné zařazení zástupců obou zmiňovaných sekcí. Protože se sekundární vrstva vždy u určitého procenta šupin neobjevuje, není možné určovat do druhu pouze na základě jediné nalezené šupiny.

Ostny jsou zřejmě ke změně podmínek ještě citlivější než šupiny (GUTOWSKI 1996). V médiu bohatém na fosfor byly všechny ostny delší a měly i jehlovité konce, díky nimž

mohou připomínat ostny druhu *Mallomonas areolata* NYGAARD (HAHN et al. 1996)

Synura petersenii* f. *glabra

Synura petersenii zahrnuje celou řadu forem a variet, z nichž některé pravděpodobně nejsou z taxonomického hlediska oprávněné. Pochybnosti vzbuzuje především *Synura petersenii* f. *glabra*. Nejprve byla v roce 1929 popsána jako samostatný druh *Synura glabra* KORSHIKOV, poté převedena na varietu *Synura petersenii* var. *glabra* HUBER-PESTALOZZI v roce 1941. SIVER (1987) navrhl uvádět ji jako formu *Synura petersenii* f. *glabra*. Od f. *petersenii* ji odlišují menší šupiny, méně vyvinutý centrální hřeben a žebra, která nedosahují až k okraji šupiny či úplně chybějí (obr. 4). Celkově se šupiny zdají být méně silifikované. Nicméně v přírodních vzorcích lze nalézt celou škálu přechodných typů (KRISTIANSEN 1979, 1986b, GUTOWSKI 1989), a tudíž se zdá být pravděpodobné, že tyto odlišnosti jsou způsobeny pouze prostředím.



Obr. 4. Šupiny druhu *Synura petersenii* odpovídající různým formám: a. f. *petersenii* (převzato z KRISTIANSEN et al. 1997), b. f. *glabra* (převzato z GUTOWSKI 1989).

WEE et al. (1991) do své práce zaměřené na vliv pH na růstovou rychlost zahrnuli kmeny s oběma typy šupin. Pro každý ze sledovaných kmenů byly zkonstruovány křivky růstové odpovědi na pH. Určité rozdíly mezi zjištěnými hodnotami sice byly, ale nijak neodpovídaly příslušnosti k daným klonům. Na druhou stranu růstová rychlost morfologickým rozdílům odpovídala – byla vyšší u *glabra* než *petersenii* typů. Tyto rozporuplné výsledky spíše podporují teorii, že oba typy patří do jednoho společného, i když velmi variabilního taxonu.

MARTIN-WAGENMANN & GUTOWSKI (1995) studovaly morfologickou variabilitu kmenů v závislosti na teplotě a stáří kultury. Kmeny byly získány ze tří různých přírodních vzorků, a

jejich šupiny se od začátku lišily. Klon I byl klasifikován jako *Synura petersenii* f. *petersenii*, klon II jako *Synura petersenii* f. *glabra* a klon III jako přechodný typ. Na šupinách byly měřeny následující charakteristiky: délka šupiny, šířka, délka středního hřebene, délka okraje, šířka okraje a rozměry póru. Morfologické změny byly hodnoceny jako signifikantní rozdíly středních hodnot naměřených veličin. Na základě těchto dat bylo zjištěno, že šupiny tří kmenů prodělávají rozdílné změny na šířce i délce se stářím kultury. Obecně se dá říci, že f. *petersenii* prodělává menší změny než oba ostatní kmeny. Kmen III se navíc se stářím přibližuje spíše morfologii f. *glabra*. V závislosti na teplotě dochází k méně výrazným změnám a zjištěné rozdíly se opět liší u jednotlivých kmenů. Co se týče počtu žeber, nebyla nalezena korelace s žádným morfologickým kritériem, ani s délkou šupiny, průměrná hodnota však opět byla u každého kmene odlišná. Šupiny všech tří kmenů tak po celou dobu pokusu zůstávaly dobře odlišitelné. Autoři zdůrazňují nutnost dalších studií, které by se zabývaly taxonomií *Synura petersenii*, protože existence forem bývá sice zpochybňována, nicméně tento pokus by ji spíše podporoval. Proto navrhuji provést experimenty zaměřené na vliv dalších faktorů, jako je obsah křemíku a ostatních živin.

Vliv křemíku posléze studovali SANDGREN et al. (1996). Křemíkový stres způsobil, že se v kultuře druhu *Synura petersenii* f. *petersenii* objevily šupiny připomínající f. *glabra*, f. *asmundiae* či f. *kufferathi*. Domnívají se tedy, že se jedná pouze o ekotypové formy, ne o skutečné geneticky definované taxony. Nejspornější je opět existence f. *glabra*, která vykazuje plynulý přechod s f. *petersenii*, a při silném křemíkovém stresu jsou dokonce naprosto nerozlišitelné.

2.4 Metody studia morfologické variability

Řada citovaných prací se nějakým způsobem zabývala právě morfologií šupin a její změnou. Použité metody však byly dost odlišné a daly by se rozdělit do tří skupin:

2.4.1 Kvalitativní hodnocení

Někteří autoři morfologii šupin nekvantifikovali. Posuzovali vlastně jen přítomnost a nepřítomnost určitého znaku (nebo zavedli i několik kategorií). SIVER & SKOGSTAD (1988) na *Mallomonas crassiquama* sledovali retikulaci štítu, která může být různě vyvinutá a někdy tvoří sekundární vrstvu, trámce s jejich případným rozdvojením, příčnými spojkami či sítěním a řadu dalších charakteristik popisujících vzhled okraje, V-žebrá, dómu a ostnů.

SANDGREN & BARLOW (1989) a SANDGREN et al. (1996) posuzovali morfologii celé

šupinové vrstvy, a tudíž zavedli několik kategorií, které ji popisovaly jako celek – od úplně nahých buněk přes různé stupně nekompletní schránky s anomálními šupinami až po zcela normální buňky.

Kvalitativní znaky na šupinách do své studie zahrnuly MARTIN-WAGENMANN & GUTOWSKI (1995), HAHN et al. (1996), GUTOWSKI (1996). Většinou se jednalo o přítomnost a nepřítomnost určitého znaku, zahrnut byl i stupeň silifikace či počet trámců.

2.4.2 Tradiční morfometrika

Tradiční morfometrika se zabývá měřením různých kvantitativních proměnných, obvykle lineárních vzdáleností jako je délka, šířka apod., ale zahrnuty mohou být také poměry, úhly i počty nejrůznějších pozorovaných znaků. Data jsou posléze analyzována pomocí mnohorozměrné statistiky (ADAMS et al. 2004).

Uvedená metoda má však řadu nevýhod. Dominantní složkou vysvětlené variability je vždy velikost objektů, která je netvarovou proměnnou a je tedy třeba její vliv odfiltrovat. (ZELDITCH et al. 2004). Za tímto účelem byly vyvinuty různé korekční metody, ale každá z nich dává trochu jiné výsledky a je obtížné rozhodnout, která je nejvhodnější. (ADAMS et al. 2004) Navíc, mnohé potenciálně významné prvky nebudou námi zvolenými proměnnými vůbec postihnuty a ztrácí se tak podstatné informace o tvaru objektu. Na druhou stranu, různé naměřené vzdálenosti často nejsou navzájem nezávislé a měření se stávají nadbytečnými. Problém nastává i při měření takových vzdáleností jako je např. maximální šířka objektu, neboť zde hrozí, že budou srovnávány biologicky nehomologické oblasti (ZELDITCH et al. 2004).

Tradiční morfometrika byla použita v rámci několika studií variability křemičitých šupin chrysomonád (HAHN et al 1995, WAGENMANN & GUTOWSKI 1995, GUTOWSKI 1996, GAVRILOVA 2005).

SIVER (1991) navrhl zavést proměnnou, která v sobě zahrnuje více naměřených hodnot, tzv. *form factor*. Jde o poměr, který udává celkový obrys šupiny v hodnotách od 0 (úsečka) do 1 (kruh). Jedná se tedy o způsob, jak postihnout tvar struktury i v rámci klasických morfometrických měření. *Form factor* ve své studii použili i HAHN et al. (1996).

$$Form\ factor = (4\pi sA)/P^2$$

sA: obsah šupiny

P: obvod

2.4.3 Geometrická morfometrika

Geometrická morfometrika se zabývá popisem a statistickou analýzou tvaru a jeho proměnlivosti. Tvar je chápán dle definice KENDALLA (1977) jako „veškerá geometrická informace, která zůstane po odfiltrování vlivu pozice, velikosti a rotace objektu“. Princip vizualizace celkové změny tvaru pomocí transformačních mřížek se objevil už v roce 1917 v práci THOMPSONA (THOMPSON 1992), který se tak pokoušel znázornit rozdíly mezi organismy. K velkému rozvoji tohoto oboru však došlo v biologii až v 90. letech 20. století – ROHLF & MARCUS (1993) mluví v této souvislosti přímo o geometricko-morfometrické revoluci.

Geometrická morfometrika v průběhu analýz zachovává kompletní informaci o relativním prostorovém rozložení dat a zabývá se celkovou geometrií morfologických struktur. Protože pracuje s tvarem jako celkem, lze s její pomocí jednotlivé změny vizualizovat rekonstrukcí na původních objektech a biologicky interpretovat. Další analýza dat je prováděna pomocí metod mnohorozměrné statistiky. (ADAMS et al. 2004)

Geometrická morfometrika v sobě zahrnuje nejrozličnější postupy, má široké možnosti využití v různých oblastech biologického výzkumu (např. v paleontologii, antropologii, ekologii, evoluční biologii, taxonomii, vývojové biologii), ale také v geologii, kriminalistice nebo medicíně. Zde jsou představeny základní metody, které byly již použity v rámci hodnocení morfologie křemičitých šupin chrysomád.

Obrysová metody

Jedná se vlastně o analýzu křivek, které popisují tvar objektu. Nejčastěji používanou metodou je eliptická Fourierova analýza, s jejíž pomocí dostaneme soubor harmonických funkcí definujících obrys. Na začátku analýzy je třeba definovat jeden homologický bod a směr pohybu podél objektu. Křivky jsou porovnávány s použitím mnohorozměrných analýz, v nichž proměnné tvoří koeficienty výsledných harmonických funkcí. (ADAMS et al. 2004)

ŘEZÁČOVÁ & ŠKALOUD (2005) použili eliptickou Fourierovu analýzu ve své studii šupin druhu *Mallomonas caudata*.

Landmarkové metody

Landmarky

Základem této metody jsou homologické body – landmarky a jejich souřadnice, kterými jsou vyznačena vzájemně si odpovídající místa na všech zkoumaných objektech. BOOKSTEIN (1991) rozeznává 3 typy landmarků. Landmarky prvního typu jsou definované nejčastěji např. zřetelnou hranicí různých tkání. Typ II zahrnuje lokální extrémy jako například špičku zubu či maximum křivky. Jejich homologie je definovaná pouze geometricky, ne histologicky. Landmarky typu III určují např. nejvzdálenější bod struktury nebo dno prohloubeniny. Nejedná se vlastně o pravé homologické body a při interpretaci na to musí být pamatováno. (ZELDITCH et al. 2004)

Některé body mohou být definovány jako tzv. semilandmarky (BOOKSTEIN 1997) – jejich umístění není pevně dané a jejich poloha je dána dvěma sousedními body, mezi nimiž v průběhu procesu superimpozice „kloužou“ a slouží tak k vyznačení linky okraje a jiných křivek. Semilandmarky nám tedy umožňují získat i při použití landmarkových metod určitou informaci o obrysu (ROHLF 2007).

Superimpozice

Definování landmarků je následováno procesem, při kterém se jednotlivé objekty přes sebe přeloží tak, aby se eliminovala variabilita způsobená pozicí, rotací a velikostí a zůstaly rozdíly pouze ve tvaru. Existuje několik metod, jak tohoto docílit. Nejužívanější je tzv. Prokrustovská superimpozice. Je také nejsprávnější z hlediska konzistence s teorií tvaru, protože minimalizuje Prokrustovskou vzdálenost mezi objekty (vzdálenost objektů v Kendallově tvaroprostoru, v podstatě se jedná o odmocninu ze sumy čtverců vzdáleností mezi homologickými landmarky). Její nevýhodou je, že počet souřadnic je větší než počet dimenzí tvaroprostoru, což komplikuje užití takto získaných dat pro další statistické analýzy. Nicméně existují metody, s jejichž pomocí lze tuto překážku bez problému obejít. K určitému ztížení interpretace výsledků dochází i u bilaterálně symetrických objektů, protože kvůli minimalizaci Prokrustovské vzdálenosti dochází k rotaci tvarů podél osy symetrie. (ZELDITCH et al. 2004) Součástí procesu superimpozice je výpočet průměrného referenčního objektu, od něhož mají všechny ostatní minimální vzdálenost a se kterým se jejich konfigurace porovnávají (ROHLF 2007).

Tvar a deformace

Důležitou součástí analýzy tvaru pomocí landmarkových metod je tzv. metoda ohebných pásků (thin-plate spline), která slouží k vizualizaci tvarových změn. Jedná se o interpolační funkci operující i se změnami, ke kterým dochází v oblastech mezi landmarky. (ZELDITCH et al. 2004) Využívá představu projekce souřadnicové sítě s referenčním objektem na nekonečně velký a tenký kovový pásek, jenž musí být zprohýbán a natahován, aby z něho vznikl tvar cílový. Na deformaci je potřeba energie, tzv. bending energy, jež je větší v případě, že se jedná o změny spíše lokálního charakteru. (MARHOLD & SUDA 2002)

Deformace má dvě složky – uniformní a neuniformní. Uniformní komponent zahrnuje změny, které zachovávají rovnoběžky a probíhají v každém bodu stejně, čili včetně takových, které nemění tvar objektu v Kendallově smyslu. Neuniformní deformace mají lokální charakter, projevují se pouze v určité oblasti. (ZELDITCH et al. 2004)

Z matice deformační energie se spočítají tvarové změny, které jsou vyjádřeny pomocí tzv. hlavních warpů. Projekcí našich objektů na hlavní warpy získáme warpy parciální. Matice skóru na parciálních warpech představuje vstupní data pro výpočet relativních warpů, které shrnují neuniformní složku tvarové variability mezi objekty. Zároveň se projevuje snaha o minimalizaci počtu dimenzí. Analýza relativních warpů je tedy vlastně obdoba PCA (principal components analysis, analýzy hlavních komponent), avšak pouze když faktor alfa nastavíme rovný nule. Při jiných hodnotách tohoto faktoru je umožněno dávat větší váhu deformacím lokálním ($\alpha < 0$) či globálním ($\alpha > 0$). (ROHLF 2007) Výstupem analýzy relativních warpů je stejně jako u PCA ordinační diagram, jehož první osa je vedena ve směru největší variability mezi objekty a každá další osa je nekorelovaná s předchozími.

Získané matice skóru na parciálních či relativních warpech představují soubor proměnných, které lze posléze využít v dalších mnohorozměrných statistických analýzách (např. ve shlukovací analýze nebo diskriminační analýze), neboť na rozdíl od souřadnic získaných při superimpozici jejich počet odpovídá dimenzionalitě prostoru, a tudíž i počtu stupňů volnosti (ZELDITCH et al. 2004).

Landmarkové metody byly použity ve studii variability šupin druhu *Mallomonas striata* (NEUSTUPA & NĚMCOVÁ 2007) a také v experimentální části této bakalářské práce, kde je metodika jednotlivých analýz popsána ještě podrobněji.

2.5 Shrnutí

Ekofyziologické studie ukázaly vliv různých parametrů prostředí na buňky a křemičité šupiny chrysomonád. Experimenty byly prováděny pouze na několika zástupcích, nejčastěji byla použita *Synura petersenii*, která je hojná, jednoduše determinovatelná a má širokou ekologickou valenci. Mnohé výsledky však mají obecnou platnost a získané poznatky lze rozšířit i na ostatní chrysomonády. Rozšíření druhů nejvíce určuje pH, které mimo jiné ovlivňuje dostupné formy anorganického uhlíku (ROIJACKERS & KESSELS 1986, ALLEN & SPENCE 1981, SAXBY-ROUEN et al. 1999). Chrysomonády nejsou schopny využívat ion HCO_3^- alespoň ne v podmínkách s nízkou alkalitou (ROIJACKERS & KESSELS 1986). Naproti tomu teplota určuje pouze rozvoj biomasy. Chrysomonády se v přírodě obvykle vyskytují při teplotách nižších, než jaké je jejich optimum zjištěné v laboratorních podmínkách (GUTOWSKI 1995, SAXBY-ROUEN & LEADBEATER 1997, HEALEY 1983, LEE & KIM 2007). Křemík, hlavní stavební složka schránky, není limitujícím prvkem, chrysomonády mohou přežít i jeho naprostý nedostatek (KLAVENESS & GUILLARD 1975) a po jeho dodání dojde na nahých buňkách ke znovuvytvoření normální šupinové vrstvy (SANDGREN et al. 1996). Toto zjištění mimo jiné poukazuje na nutnost kontrolovat obsah křemíku v kulturách, na kterých sledujeme vlivy jiných parametrů. Rostoucí populace médium neustále ochuzuje a mohlo by dojít k nesprávnému posuzování sledovaných morfologických změn.

Zajímavé jsou též při experimentech pozorované rozdíly mezi různými kmeny téhož druhu, které jsou srovnatelné s rozdíly mezidruhovými (GAVRILOVA 2005, LEE & KIM 2007). Tento jev nejen komplikuje odhalení typické morfologie spojené s určitým parametrem prostředí, čili možné aplikace v biomonitoringu, ale také znesnadňuje vyvozování taxonomických závěrů, jako např. v otázce postavení *Synura petersenii* f. *glabra*. (MARTIN-WAGENMANN & GUTOWSKI 1995)

Přestože se morfologii šupin a její variabilitě již řada publikací věnovala, stále ještě před námi leží řada nezodpovězených otázek, jimiž se lze v budoucnosti zabývat. Především, naprostá většina druhů byla prozatím opomíjena. Další výzkum variability by se měl zaměřit na studium méně hojných druhů. Porovnání výsledků různých pokusů by mohlo vést k nalezení společných nebo naopak rozdílných, druhově specifických ekofyziologických rysů. Metody geometrické morfometrie, která byla doposud využita jen okrajově, otevírají nové možnosti pro studium morfologické variability. Protože postihuje tvar jako celek a umožňuje sledovat trendy morfologických změn, mohla by pomoci určit a odlišit vlivy jednotlivých

faktorů. Vliv pH se zdá být klíčový pro distribuci druhů, bylo by tedy zajímavé zkoumat, jakým způsobem se jeho změna projevuje na variabilitě křemičitých šupin. Teplota, jež těsně souvisí s viskozitou vody, má pravděpodobně na morfologii také velký dopad. Kromě toho, geometrická morfometrika umožňuje odlišit variabilitu danou polohou šupin na buňce od variability dané prostředím. Porovnání výsledků z nezávislých studií více různých druhů by umožnilo odhalit případné společné trendy morfologických změn, platné obecně například pro celý rod. Metody geometrické morfometricky by mohly být též velmi vhodné pro odlišení podobných druhů, úspěšnost takové determinace je pak snadno testovatelná.

3. Experimentální část

3.1 Izolace a kultivace chrysomonád

3.1.1 Úvod

Ekofyziologické experimenty se provádějí v laboratorních podmínkách s použitím monoklonálních kultur, a proto jim musí předcházet úspěšné zvládnutí metodiky izolace a kultivace vybraných organismů. Pro účely izolace řas do kultur je třeba nejprve vybrat vhodnou přírodní lokalitu, kde je možné se s nimi setkat, a to nejlépe po většinu roku a v hojném počtu. Malé vodní nádrže na území NP České Švýcarsko se zdály poskytovat ideální podmínky odpovídající typickým biotopům s bohatou flórou chrysomonád. Zvolené území je charakterizováno nízkou nadmořskou výškou a malým vlivem lidské činnosti na přírodu. Navíc, chrysomonády ani jiné řasy ve vybraných lokalitách ještě nikdo nestudoval, a tak bylo zajímavé zjistit, s jakými organismy se zde lze setkat.

3.1.2 Vybrané lokality

Vzorky byly odebírány celkem ze čtyř lokalit nacházejících se v blízkosti obcí Hřensko a Mezní Louka. Lokality č. 1 a 2 jsou malé rybníčky, č. 3 a 4 spíše tůňky, které ale zcela nevysychají ani v průběhu léta. Mapa a fotografie jsou v příloze na tabuli č. 1, naměřené parametry prostředí charakterizující přírodní podmínky jsou uvedeny v tabulkách 1-3.

Všechny čtyři lokality mají neutrální až mírně kyselé pH. Pouze ve dvou případech byla naměřena hodnota přesahující 7. Konduktivita naměřená v rybníčku č. 2 byla při všech odběrech znatelně vyšší než u ostatních, což je pravděpodobně způsobené větším množstvím rozpuštěných látek, které způsobují nápadný trvalý zákal.

Datum odběru	24.6.05	4.11.05	20.4.06	1.7.06	17.9.06	3.11.06	9.2.07
Lokalita							
1	6,66	6	4,69	7,16	6,01	5,5	4,91
2	6,55	6,05	5,94	6,18	5,68	5,9	5,18
3	7,55	6,2	6,03	6,19	5,74	5,1	5,3
4	4,85	4,9	-	4,93	6,16	5,5	4,2

Tabulka 1. Naměřené pH na sledovaných lokalitách během odběrů v letech 2005-2007.

Datum odběru	24.6.05	4.11.05	20.4.06	1.7.06	17.9.06	3.11.06	9.2.07
Lokalita							
1	19	8	11,7	24,4	17,5	4,7	2
2	23,8	7,2	15,1	24,3	15,8	4,5	2,8
3	25,4	8,6	12,4	24,5	16,2	3,9	1,1
4	21,4	7,9	-	22,4	15,8	5,6	1,9

Tabulka 2. Naměřená teplota na sledovaných lokalitách během odběrů v letech 2005-2007. Hodnoty jsou ve °C.

Datum odběru	24.6.05	4.11.05	20.4.06	1.7.06	17.9.06	3.11.06	9.2.07
Lokalita							
1	58	70	62	66	70	40	80
2	147	135	122	165	169	135	136
3	54	52	13	62	66	34	60
4	67	34	-	33	81	66	75

Tabulka 3. Naměřená konduktivita na sledovaných lokalitách během odběrů v letech 2005-2007. Hodnoty jsou v $\mu\text{S/cm}$.

3.1.3 Odběry vzorků

Vzorky planktonu byly odebírány pomocí planktonní sítě s rozměry ok 20 nebo 40 μm . Dále byla pipetou odebírána i povrchová vrstva sedimentu. Vzorky sedimentů byly fixovány Lugolovým roztokem a uschovány ve tmě pro pozdější přípravu elektronmikroskopických preparátů. Živé vzorky byly prohlédnuty pomocí světelného mikroskopu a v případě nálezů šupinatých chrysomonád následoval pokus o jejich izolaci do kultur. Parametry prostředí byly měřeny pomocí terénního přístroje Combo HI 98129.

Odběry byly prováděny v letech 2005-2007, v různých částech roku, aby se zvýšila pravděpodobnost, že bude postihnuto právě období většího výskytu chrysomonád.

3.1.4 Izolace buněk do klonálních kultur

Z přírodního vzorku je především nutné vyizolovat skutečně jedinou buňku (v případě rodu *Synura* kolonii) daného druhu. K tomuto účelu se používá tenká skleněná mikropipeta s připevněnou gumovou hadičkou. Bičíkovec se opakovaně nasaje a vypustí vždy do čisté kapky kultivačního média, aby se co nejvíce zabránilo kontaminaci kultury nežádoucími

druhy řas. Nakonec se kultury ponechají růst cca 14 dní v serologických destičkách, odkud jsou posléze přemístěny do Erlenmeyerových baněk o objemu 50 ml. Ke kultivaci bylo použito modifikované médium DY IV (ANDERSEN 1997, ŘEZÁČOVÁ 2003). Návod na jeho přípravu je v tabulkách 4, 5 a 6.

Množství	Chemikálie	Zásobní roztok
1,0 ml	MgSO ₄ .7H ₂ O	5,0 g/100 ml dest. H ₂ O
1,0 ml	KCl	0,3 g/100 ml dest. H ₂ O
1,0 ml	NH ₄ Cl	0,268 g/100 ml dest. H ₂ O
1,0 ml	NaNO ₃	2,0 g/100 ml dest. H ₂ O
1,0 ml	β-glycerolfosfát	0,216 g/100 ml dest. H ₂ O
1,0 ml	H ₃ BO ₃	0,08 g/100 ml dest. H ₂ O
1,0 ml	Na ₂ EDTA	0,7g/100 ml dest. H ₂ O
1,0 ml	Na ₂ SiO ₃	0,6 g/100 ml dest. H ₂ O
1,0 ml	FeCl ₃ .6H ₂ O	0,166 g/100 ml dest. H ₂ O
1,0 ml	CaCl ₂	7,5 g/100 ml dest. H ₂ O
243 mg (200 mg)	HEPES (MES)	-
1,0 ml	stopové prvky	viz tabulka 5
1,0 ml	Vitamínový roztok	viz tabulka 6

Tabulka 4. Návod na přípravu kultivačního média DY IV. Uvedené množství se přidá do 950 ml destilované vody a poté se doplní na konečný objem 1,0 l. (ŘEZÁČOVÁ 2003)

Množství	Chemikálie
31,4 mg	MnCl ₂ .4H ₂ O
4,5 mg	MnSO ₄ .H ₂ O
1,46 mg	CoCl ₂ .6H ₂ O
2,35 mg	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O
0,13 mg	NH ₄ VO ₃
0,27 mg	Na ₂ SeO ₃

Tabulka 5. Návod na přípravu zásobního roztoku stopových prvků. Uvedené množství se rozpouští v 10 ml destilované vody. Nakonec se dílčí roztoky smíchají a doplní destilovanou vodou na konečný objem 100 ml. (ŘEZÁČOVÁ 2003)

Množství	Chemikálie	Zásobní roztok
1,0 ml	B ₁₂	0,5 g/l dest. H ₂ O
10,0 mg	Thiamin HCl	-

Tabulka 6. Návod na přípravu vitamínového roztoku. Uvedené množství se přidá do 80 ml destilované vody a poté se doplní na konečný objem 100 ml. (ŘEZÁČOVÁ 2003)

Vitamínový roztok je třeba přidat až po sterilizaci v autoklávu. Nakonec ještě upravíme pH na požadovanou hodnotu pomocí roztoků NaOH či HCl. Do média, které má mít pH mezi 5,5 a 6,5, dáváme pufr MES, při vyšším pH (7,5-8,5) použijeme HEPES.

3.1.5 Příprava preparátů pro transmisní elektronovou mikroskopii

Vzorky fixované Lugolovým roztokem je třeba před přípravou preparátů promýt opakovanou centrifugací s destilovanou vodou. Poté se vzorek nakape na předem připravené měděné síťky pokryté tenkou formvarovou blankou.

K samotnému pozorování preparátů byly použity transmisní elektronové mikroskopy Philips 300 a JEOL 1011.

3.1.6 Nalezené druhy chrysomonád

Chrysophaerella brevispina KORSHIKOV

Obr. 5 a

Taxonomické zařazení: Chrysophyceae

Rozšíření: kosmopolitní (KRISTIANSEN 2001)

Autekologie: pH větší než 5-6, široký rozsah teplot, ale preferuje nižší (pod 11°C) (ROIJACKERS & KESSELS 1986)

Nález: 1 (4.11.2005), 3 (4.11.2005)

Paraphysomonas vestita (A.C. STOKES) DE SAEDLEER

Obr. 5 b

Taxonomické zařazení: Chrysophyceae

Rozšíření: kosmopolitní, velmi častý (FINLAY & CLARKE 1999)

Autekologie: široká ekologická valence pro pH i teplotu (ROIJACKERS & KESSELS 1986)

Nález: 1 (4.11.2005, 3.11.2006)

Mallomonas adamas HARRIS & BRADLEY

Obr. 5 c

Taxonomické zařazení: Synurophyceae

Rozšíření: roztroušeně (KRISTIANSEN 2002)

Autekologie: není známá

Nález: 1 (4.11.2005)

Mallomonas matvienkoe (MATV.) ASMUND & KRISTIANSEN

Obr. 5 d

Taxonomické zařazení: Synurophyceae

Rozšíření: kosmopolitní (KRISTIANSEN 2002)

Autekologie: není známá

Nález: 1 (4.11.2005, 3.11.2006)

Mallomonas papillosa HARRIS & BRADLEY

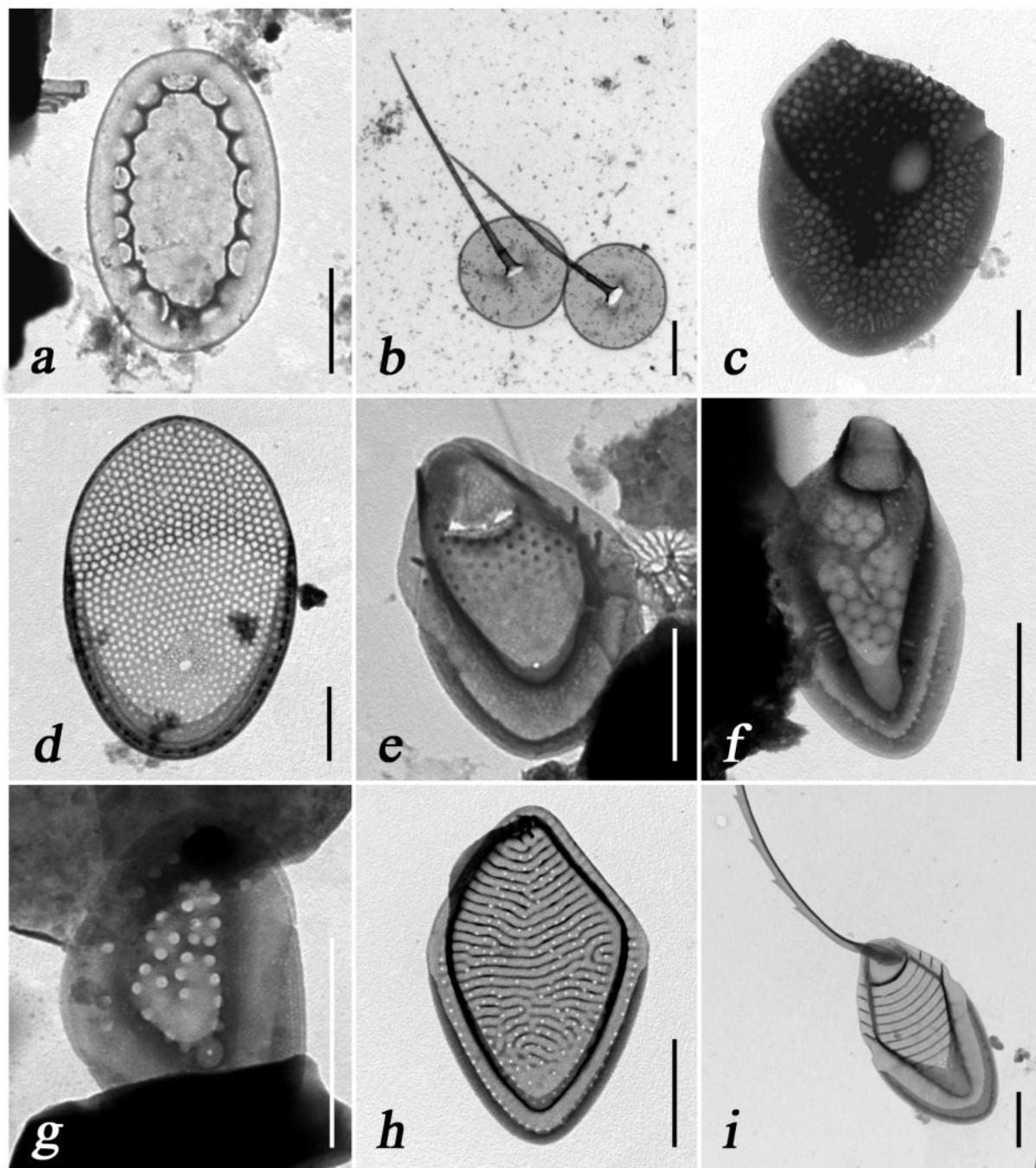
Obr. 5 e

Taxonomické zařazení: Synurophyceae

Rozšíření: kosmopolitní (KRISTIANSEN 2002)

Autekologie: pH indiferentní, preferuje chladnější vodu (ROIJACKERS & KESSELS 1986)

Nález: 1 (4.11.2005)



Obr. 5. Fotografie šupin nalezených druhů chrysomonád: a. *Chrysosphaerella brevispina* - šupina b. *Paraphysomonas vestita* - ostnová šupina, c. *Mallomonas adamas* - tělová šupina, d. *Mallomonas matvienkoae* - tělová šupina, e. *Mallomonas papillosa* - anteriorní šupina, f. *Mallomonas pillula* f. *pillula* - tělová šupina s dómem, g. *Mallomonas pumilio* - zadní šupina, h. *Mallomonas schwemmleri* - tělová šupina, i. *Mallomonas striata* var. *serrata* - šupina se serátním ostnem. Měřítko odpovídá 1 μm .

Mallomonas pillula f. pillula HARRIS

Obr. 5 f

Taxonomické zařazení: Synurophyceae

Rozšíření: severní temperátní (KRISTIANSEN 2002)

Autekologie: není známá

Nález: 4 (4.11.2005)

Mallomonas pumilio HARRIS & BRADLEY emend. ASMUND, CRONBERG & DÜRRSCHMIDT

Obr. 5 g

Taxonomické zařazení: Synurophyceae

Rozšíření: bipolární (KRISTIANSEN 2002)

Autekologie: neutrální pH, nižší teploty (ROIJACKERS & KESSELS 1986)

Nález: 1 (4.11.2005)

Mallomonas schwemmlei GLENK emend. GLENK & FOTT

Obr. 5 h

Taxonomické zařazení: Synurophyceae

Rozšíření: Severní temperátní (KRISTIANSEN 2002), s velkou pravděpodobností bipolární (ŘEZÁČOVÁ & NEUSTUPA 2007)

Autekologie: druh byl nalezen i pod ledem (SIVER 1991)

Nález: 1 (4.11.2005, 20.4.2006)

Mallomonas striata var. serrata HARRIS & BRADLEY

Obr. 5 i

Taxonomické zařazení: Synurophyceae

Rozšíření: kosmopolitní (KRISTIANSEN 2002)

Autekologie: preferuje nižší teploty a neutrální pH (ROIJACKERS & KESSELS 1986)

Nález: 4 (11.4.2005)

Mallomonas tonsurata TELING emend. KRIEGER

Obr. 6 a

Taxonomické zařazení: Synurophyceae

Rozšíření: kosmopolitní (KRISTIANSEN 2002)

Autekologie: hlavně mezotrofní až eutrofní lokality, vyšší pH (nad 6), teplota především pod 11°C (ROIJACKERS & KESSELS 1986, SIVER 1995)

Nález: 1 (3.11.2006)

Synura echinulata KORSHIKOV

Obr. 6 b-e

Taxonomické zařazení: Synurophyceae

Rozšíření: kosmopolitní (KRISTIANSEN & VIGNA 1996)

Autekologie: preferuje nízké pH (pod 6) a chladnější vody (SIVER 1995)

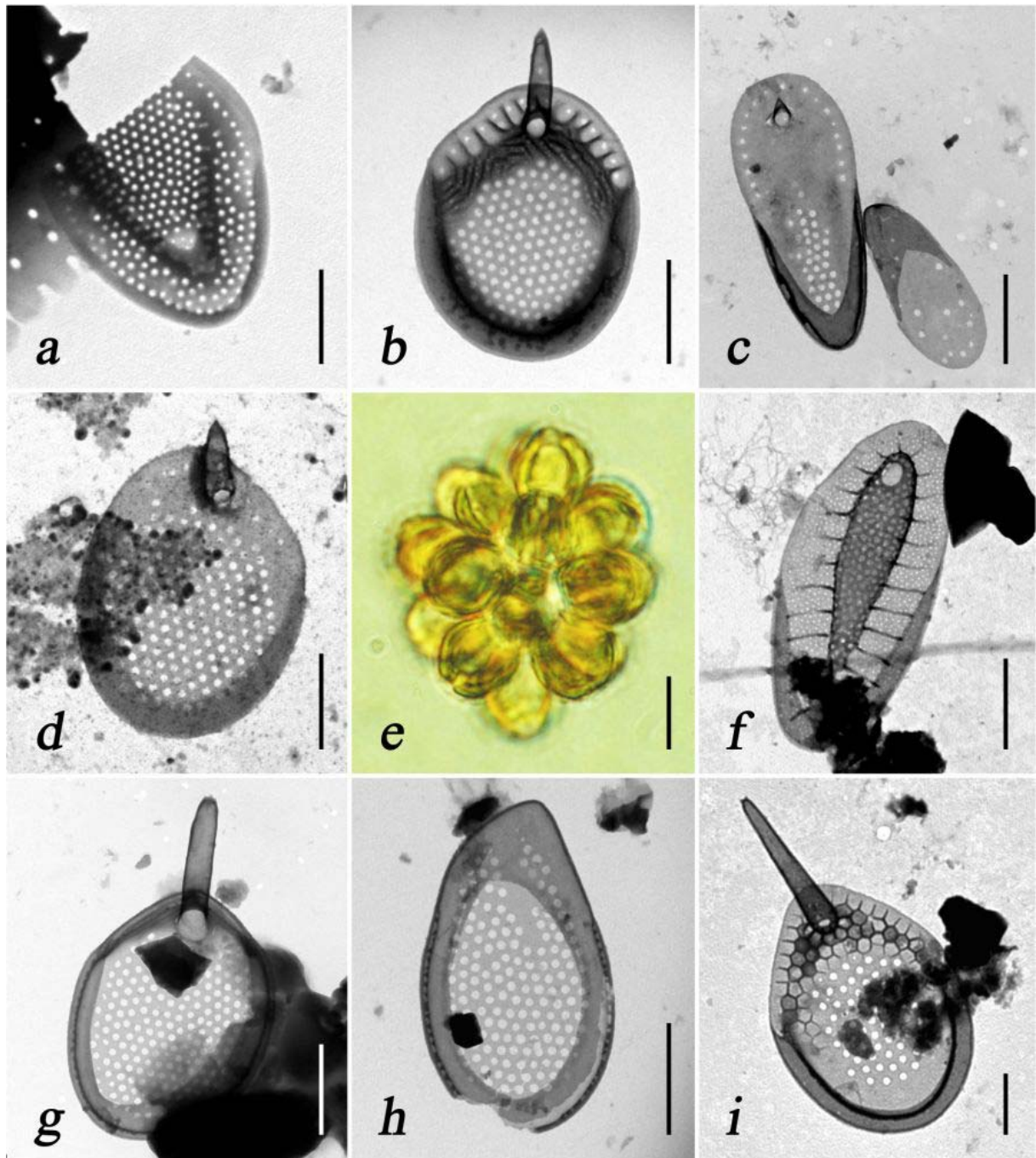
Nález: 1 (4.11.2005, 17.9.2006., 3.11.2006); 2 (20.4.2006); 3 (20.4.2006, 17.9.2006), 4 (4.11.2005, 17.9.2006)

Synura petersenii KORSHIKOV

Obr. 6 f

Taxonomické zařazení: Synurophyceae

Rozšíření: kosmopolitní (KRISTIANSEN & VIGNA 1996)



Obr. 6. Fotografie šupin nalezených druhů chrysomonád: a. *Mallomonas tonsurata* – úlolek tělové šupiny, b.-e. *Synura echinulata* – b. tělová šupina s osténkem, c. posteriorní šupiny, d. málo silifikovaná šupina, e. celá kolonie ve světelném mikroskopu, f. *Synura petersenii* – tělová šupina, g.-h. *Synura sphagnicola* – g. tělová šupina s osténkem, h. posteriorní šupina, i. *Synura spinosa* - tělová šupina s osténkem. Měřítko odpovídá 1 μm , u obr. e 10 μm .

Autekologie: pH indiferentní (SIVER 1989), široké rozmezí teplot, ale preferuje pod 11°C (ROIJACKERS & KESSELS 1986)

Nález: 3 (4.11.2005, 20.4.2006, 17.9.2006), 4 (4.11.2005)

Synura sphagnicola (KORSHIKOV) KORSHIKOV

Obr. 6 g-h

Taxonomické zařazení: Synurophyceae

Rozšíření: široce rozšířená (KRISTIANSEN & VIGNA 1996)

Autekologie: preferuje nízké pH (pod 6) a vyšší teploty (SIVER 1995)

Nález: 3 (17.9.2006), 4 (11.4.2005, 17.9.2006)

Synura spinosa KORSHIKOV

Obr. 6 i

Taxonomické zařazení: Synurophyceae

Rozšíření: kosmopolitní (KRISTIANSEN & VIGNA 1996)

Autekologie: pH indiferentní, hlavně mezi 5,5-6,5, preferuje chladnější vodu (ROIJACKERS & KESSELS 1986, SIVER 1995)

Nález: 1 (4.11.2005)

Na vybraných lokalitách bylo nalezeno celkem 14 druhů křemičitých chrysomonád, z toho 8 zástupců rodu *Mallomonas* a 4 z rodu *Synura*. Druhově nejbohatší je zřetelně lokalita č. 1, rybníček na potoce Suchá Bělá. Nejčastěji byla nacházena *Synura echinulata*, která jako jediná byla zaznamenána ve všech čtyřech tůních. Jedná se o běžný druh, jehož autekologii místní podmínky dobře vyhovují. Známé ekologické nároky ostatních druhů též odpovídají parametrům naměřeným na odběrových místech. Trochu překvapivý je pouze nález *Mallomonas tonsurata*, který je udáván z lokalit s vyšším pH. Na druhou stranu naměřené pH často překročilo hodnotu 6, jež je udávána jako spodní hranice výskytu tohoto druhu. Výskyt alkalifilního druhu v sedimentu kyselé tůně by mohl značit, že zde v minulosti měla voda vyšší pH a teprve později došlo k významné acidifikaci prostředí. Avšak k vyvozování podobných závěrů by byl potřeba podrobnější výzkum a více nálezů.

Řada druhů byla zaznamenána pouze jednou. Z nich je zajímavý především *Mallomonas striata* var. *serrata*, neboť uvedená varieta nebyla na našem území dosud potvrzena. Variety tohoto druhu jsou definovány na základě typu ostnů, a proto ve většině případů, kdy byly pozorovány samotné šupiny, není varieta vůbec uvedena. Z České Republiky byla zatím uvedena pouze *Mallomonas striata* var. *striata* (ŘEZÁČOVÁ et al. 2004).

Méně hojný druh *Mallomonas adamas* byl z nálezu na našem území publikován zatím jen jednou, a to ve stejné oblasti ČR (NOVÁKOVÁ et al. 2004). Nicméně, v poměrně hojném zastoupení byl pozorován již i na rašeliništi Swamp (NĚMCOVÁ, ústní sdělení). NOVÁKOVÁ et al. 2004 studovali chrysomonády rašelinišť na území NP České švýcarsko a CHKO Labské pískovce. Přestože se jednalo o biotopy poměrně odlišné, řada determinovaných druhů byla

v obou studiích společná (*Mallomonas adamas*, *M. papillosa*, *M. pumilio*, *M. schwemmlei*, *M. tonsurata*, *Paraphysomonas vestita*, *Synura echinulata*, *S. petersenii*, *S. sphagnicola*, *S. spinosa*).

Nejhojnějším druhem byla i v tehdejší studii *Synura echinulata*.

3.1.7 Doprovodné druhy fytoplanktonu

V rámci odběrů vzorků byly kromě chrysomonád determinovány i další druhy řas, které se na lokalitách v dané době vyskytovaly. Jejich přehled je uveden v tabulce v příloze a fotografie některých fytoplanktonních druhů na tabuli č. 2 tamtéž.

Mezi nálezy dominují podle očekávání planktonní organismy typické pro mezotrofní či mírně eutrofní lokality. Opakovaně se zde však nacházely i druhy eutrofní (*Monoraphidium contortum*, *Dictyosphaerium tetrachotomum*, *Crucigenia* sp.) nebo naopak některé typické spíše pro trofii nižší (*Pandorina morum*, *Tabellaria fenestrata*, *Staurastrum orbiculare*, *Staurodesmus dejectus*).

Co se týče sezónní dynamiky, projevilo se například typické jarní maximum rozsivek, a to na naprosté dominanci *Stauroneis phoenicenteron* ve vzorku č. 3 z 20.4.2006. Řada druhů byla také nacházena výhradně nebo převážně pouze v teplém období roku – např. *Lepocinclis acus*, *Peridinium cinctum* či *Phacus longicauda*.

Zajímavý je také jeden nález vzácného druhu *Euglena gymnodinioides*.

K determinaci druhů byla použita tato určovací literatura: COESEL (1998), HINDÁK (1978, 2001), KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1999), KOMÁREK & FOTT (1983), LENZENWEGER (1996, 1997, 1999, 2003), POPOVSKÝ & PFIESTER (1990), STARMACH (1985) a WOLOWSKI & HINDÁK (2003).

3.1.8 Závěr

Provedený výzkum ukázal, že vybrané lokality nejsou pro studium a pravidelné odběry chrysomonád příliš vhodné, neboť v planktonu byly zaznamenány velmi řídké a pouze ve dvou případech tvořily mezi fytoplanktonními druhy dominantu. Ani průzkum sedimentů neprokázal významný výskyt těchto organismů. V rámci diplomové práce bude tedy třeba rozšířit odběrová místa i na jiná území, například tůně podél Lužnice, jejichž zlativková flóra

je velmi bohatá (ŘEZÁČOVÁ 2003).

Chrysomonády se podařilo úspěšně izolovat a v současné době je ustanoveno několik monoklonálních kultur druhů *Synura petersenii* a *Synura echinulata*. Zástupce rodu *Mallomonas* je z důvodu jejich menší velikosti obtížné izolovat a získané klony se zatím nepodařilo dlouhodobě kultivovat.

Kultury je nejlépe uchovávat za stálého osvětlení v lednici nastavené na 15°C. Při vyšších teplotách se projeví případná kontaminace bujným rozvojem zelených řas. Při kultivaci byl také pozorován zajímavý jev – přestože se jedná o planktonní bičíkovce, mají chrysomonády tendenci růst u dna a stěny baňky, kde tvoří hnědý zákal.

3.2 Aplikace metod geometrické morfometriky na identifikaci taxonů chrysomonád s křemičitými šupinami

3.2.1 Úvod

Záměrem studie bylo pomocí landmarkových metod geometrické morfometriky popsat a zhodnotit variabilitu šupin čtyř druhů rodu *Mallomonas* a také posoudit, do jaké míry lze tímto způsobem druhy rozlišit. Pro pokus byly vybrány *Mallomonas striata* ASMUND a *Mallomonas flora* HARRIS & BRADLEY ze sekce *Striatae* (KRISTIANSEN 2002) a *Mallomonas calceolus* BRADLEY a *Mallomonas kalinae* ŘEZÁČOVÁ ze sekce *Papillosae* (ASMUND & KRISTIANSEN 1986). Studie si nekladla za cíl nalézt rozlišovací kritérium pro správnou determinaci těchto konkrétních druhů, neboť ty jsou od sebe dobře rozeznatelné na první pohled. Jednalo se spíše o obecné posouzení vhodnosti metod geometrické morfometriky ke studiu tvaru křemičitých šupin. Uvedené metody by pak mohly být aplikovány při studiu skutečně obtížně zařaditelných zástupců. Důležitým cílem tohoto experimentu bylo také seznámení s metodikou, jejíž znalost bude využita v budoucí diplomové práci.

3.2.2 Metodika

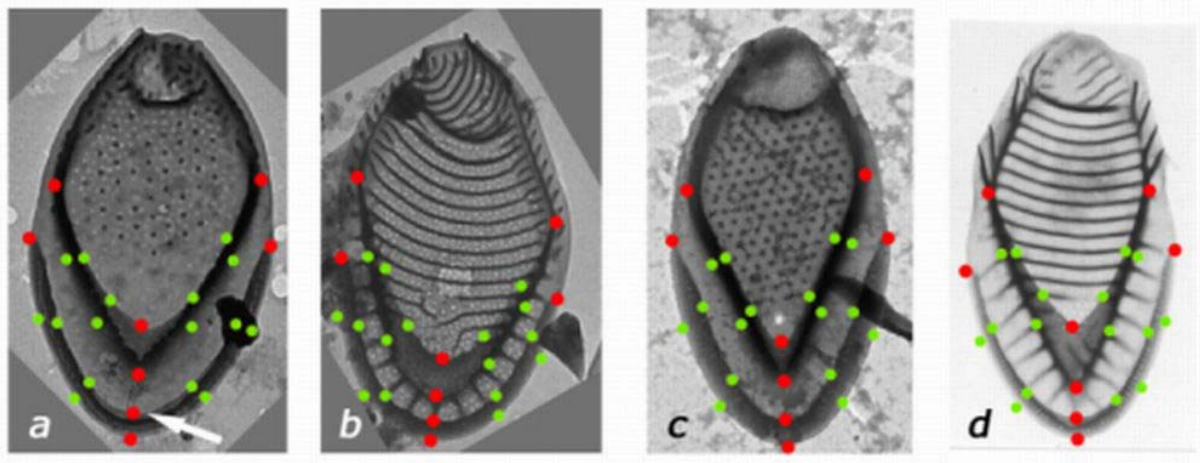
Do studie bylo zahrnuto 30 šupin od každého druhu, dohromady tedy celkem 120 šupin. Jednalo se o fotografie z transmisního elektronového mikroskopu, získané z celé řady publikací, i dosud nepublikované, pocházející z různých lokalit ČR i světa. Pouze v případě druhu *Mallomonas kalinae* pochází všechny šupiny ze stejné kultury, neboť se jedná o teprve nedávno popsany druh (ŘEZÁČOVÁ 2006), jehož fotografie nelze získat z jiných zdrojů. Všechny obrázky byly převedeny do digitální podoby a v programu Adobe Photoshop 6.0 otočeny tak, aby dóm směřoval vzhůru.

Rozmístění landmarků

Šupiny chrysomonád sice nejsou zcela ploché útvary, avšak na jejich analýzu lze použít dvourozměrné landmarkové metody, neboť všechny byly vyfotografovány ze stejného – kolmého pohledu. Případná chyba je zanedbatelná, popisované metody se běžně používají na analýzu objektů, jejichž prostorovost je mnohem zřetelnější – např. lebek (ZELDITCH et al.

2004). V takovém případě je jen třeba dobře uvážit rozmístění landmarků i následnou biologickou interpretaci sledovaných změn.

Vyznačení polohy jednotlivých landmarků bylo provedeno v programu tpsDig (ROHLF 2006a). Na každé šupině bylo vybráno 24 význačných bodů. Z analýzy byla vynechána oblast dómu, neboť existuje hypotéza, že jeho vznik je nezávislý na zbytku šupiny, ke kterému je připojen až dodatečně (HAHN et al. 1996, GUTOWSKI 1996). Protože se šupiny vybraných druhů velmi liší strukturou a ornamentací štítu i okraje, nebylo možné ani na těchto částech šupiny vybrat homologické oblasti, a tudíž byly landmarky umístěny pouze v oblasti přehnutého okraje a V-žebra, což jsou struktury přítomné u všech čtyř druhů. Zároveň se však jedná o struktury, na kterých se variabilita výrazně projevuje (NEUSTUPA & NĚMCOVÁ 2007), a je tedy vhodné rozmístit landmarky právě zde.



Obr. 7. Rozmístění pevných landmarků (červeně) a semilandmarků (zeleně): a. *Mallomonas calceolus*, b. *M. flora*, c. *M. kalinae* a d. *M. striata*. Šipka vyznačuje landmark č. 10, který má největší podíl na celkové variabilitě.

Pevné landmarky byly umístěny na koncích přehnutého okraje a v místech přechodu V-žebra a anteriorního submarginálního žebra. Čtyři další leží na podélné ose buňky, vždy na nejspodnějším bodu křivek vyznačených přehnutým okrajem a V-žebrem. Tvar těchto křivek je posléze vyznačen pomocí celkem 16 semilandmarků. Poloha homologických bodů na šupinách čtyř studovaných druhů je zobrazena na obr. 7.

Symetrizace

Při definování polohy landmarků je důležitá především homologie stejně očíslovaných bodů na různých objektech. To může znamenat v případě šupin veliký problém, neboť některé jsou výrazně asymetrické, zatímco jiné téměř či úplně symetrické, a na fotografiích

z transmisního elektronového mikroskopu nelze přesně určit, která strana je levá a pravá. Jak již bylo zmíněno v teoretické části, Prokrustovská superimpozice může při analýze objektů vykazujících bilaterální symetrii vnášet do výsledku určitou chybu (ZELDITCH et al. 2004). Symetrie u biologických objektů totiž není nikdy zcela dokonalá, objevují se náhodné odchylky – jedná se o jev zvaný flukтуаční asymetrie. V takovém případě se provádí symetrizace, která spočívá v několika krocích. Nejprve se zkopírují souřadnice všech landmarků a v nově vzniklém datovém souboru se x-ové souřadnice vynásobí číslem -1. Poté se přeznačí čísla landmarků tak, jak sobě navzájem odpovídají dvojice dle symetrie podle podélné osy šupiny. Landmarky ležící na této ose nemají zrcadlové protějšky, a tudíž si ponechají číslo původní. Následuje Prokrustova superimpozice původních a nových obrácených a přeznačených objektů. Nakonec se z takto získaných Prokrustovských souřadnic vypočítá pro každou dvojici průměr, který odpovídá již zcela bilaterálně symetrickým šupinám. (KLINGENBERG et al. 2002)

Na provedení symetrizace zatím neexistuje speciální software a jednotlivé kroky je třeba provádět zvlášť, např. s pomocí programů z řady Microsoft Office (Excel, WordPad) a PAST (HAMMER et al. 2001), superimpozice je posléze provedena v programu tpsRelw (ROHLF 2007).

Analýza relativních warpů

Tato analýza byla provedena v programu tpsRelw (ROHLF 2007). Vstupní data tvořily zprůměrované Prokrustovské souřadnice získané již při symetrizaci.

Před samotnou analýzou relativních warpů je ještě důležité zkontrolovat, jestli tvarová variabilita mezi objekty není příliš velká. Hlavní warpy jsou součástí nelineárního Kendallova tvaroprostoru, avšak pro další analýzy dochází k jeho aproximaci lineárním tangenciálním prostorem. Pokud by objekty v tvaroprostoru byly příliš vzdálené od referenčního, byl by tento převod velmi nepřesný. Zmiňovanou kontrolu je možné provést pomocí programu tpsSmall, který vykreslí graf vzdáleností v tangenciálním prostoru proti Prokrustovským vzdálenostem. Tato závislost by měla být lineární (ROHLF 2003).

Metody analýzy dat

K zhodnocení morfologické variability šupin a posouzení možnosti rozlišení jednotlivých

druhů byly použity metody mnohorozměrné statistiky.

Analýza MANOVA (multivariate analysis of variance, mnohorozměrná analýza variance) testuje shodnost průměrů předem zvolených skupin. Jako testová statistika se používá např. Wilksovo lambda (Wilks's λ). Rozlišení skupin lze posléze zobrazit pomocí CVA (canonical variates analysis), ordinační metody, která uspořádá objekty do diagramu, jehož osy vedou ve směru největší meziskupinové variability. V případě, že máme 4 skupiny, získáme 3 smysluplné kanonické osy a matici skóru na nich pro každý objekt.

V soustavě definované kanonickými osami lze též spočítat průměr každé skupiny. Porovnáním Euklidovských vzdáleností těchto hodnot získáme v našem případě údaje o morfologické podobnosti druhů. Analogicky lze získat také Euklidovskou vzdálenost průměrů v soustavě definované PCA osami.

Trendy morfologických změn podél kanonických os, tedy hlavní znaky významné pro odlišení druhů, lze vizualizovat pomocí mnohorozměrné regrese, kde jako závislé proměnné slouží původní Prokrustovské souřadnice a nezávislou proměnnou tvoří skóry na příslušné kanonické ose, podle níž chceme tvarovou variabilitu zobrazit. Pro vizualizaci změn je opět využita metoda ohebných pásků. Tuto analýzu lze provést v programu tpsRegr (ROHLF 2005).

Klasifikační diskriminační analýza umožňuje testovat správnost klasifikace šupin do dané skupiny – druhu, a to vždy v rámci dvojic. Jedná se vlastně o obdobu MANOVA, ale pouze pro 2 skupiny, objekty jsou tedy uspořádány pouze podél jediné kanonické osy.

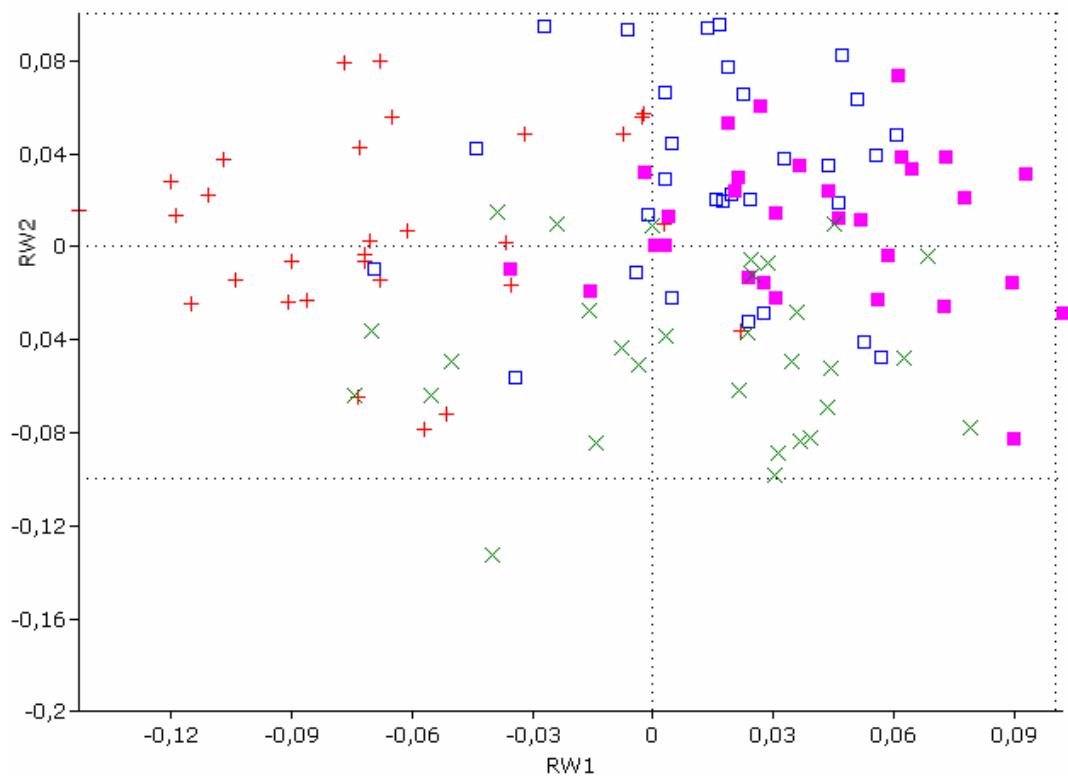
Souhrnné zobrazení morfologických znaků typických pro určitý druh, čili takových, které ho odlišují od všech ostatních, je proveditelné opět pomocí metody ohebných pásků, v programu tpsSplin (ROHLF 2004). V tomto případě jsou vizualizovány trendy změny konsenzuální konfigurace všech šupin při její deformaci na konsenzus dílčí, skupinový.

Trendy variability v rámci jedné skupiny lze zjistit pomocí dílčí analýzy relativních warpů. Pro tuto analýzu musela být použita data pouze z poloviny šupiny (14 landmarků), aby byla splněna podmínka PCA, že počet objektů musí být větší než počet znaků (MARHOLD & SUDA 2002).

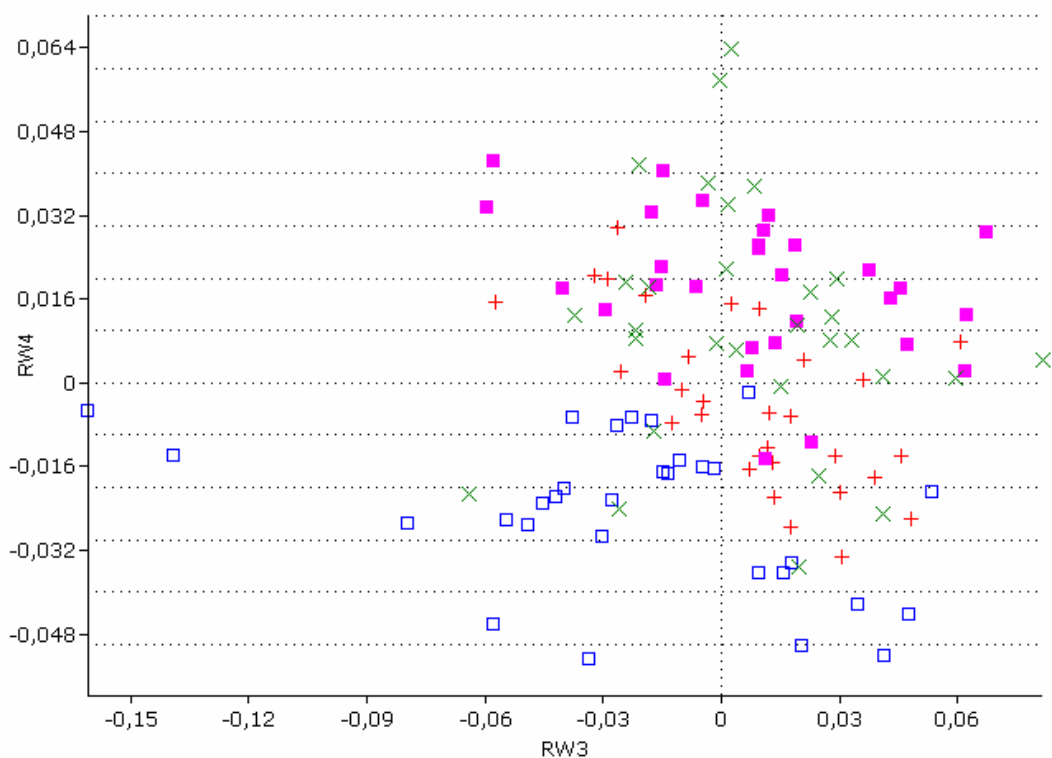
3.2.3 Výsledky

Ordinační diagramy zobrazující výsledek analýzy relativních warpů pro první čtyři relativní warpy jsou na obr. 8 a 9. První osa vysvětluje 36,5 % variability, druhá 27,78 %, třetí 17,08 %, čtvrtá 7,06 %. Prvních deset os v sobě zahrnuje více než 99 % veškeré variability. Největší podíl na variabilitě nese landmark č. 10 (11%), který byl umístěn na podélné ose

šupiny, na vnitřní straně přehnutého okraje (na obr. 7 a je vyznačen šipkou).

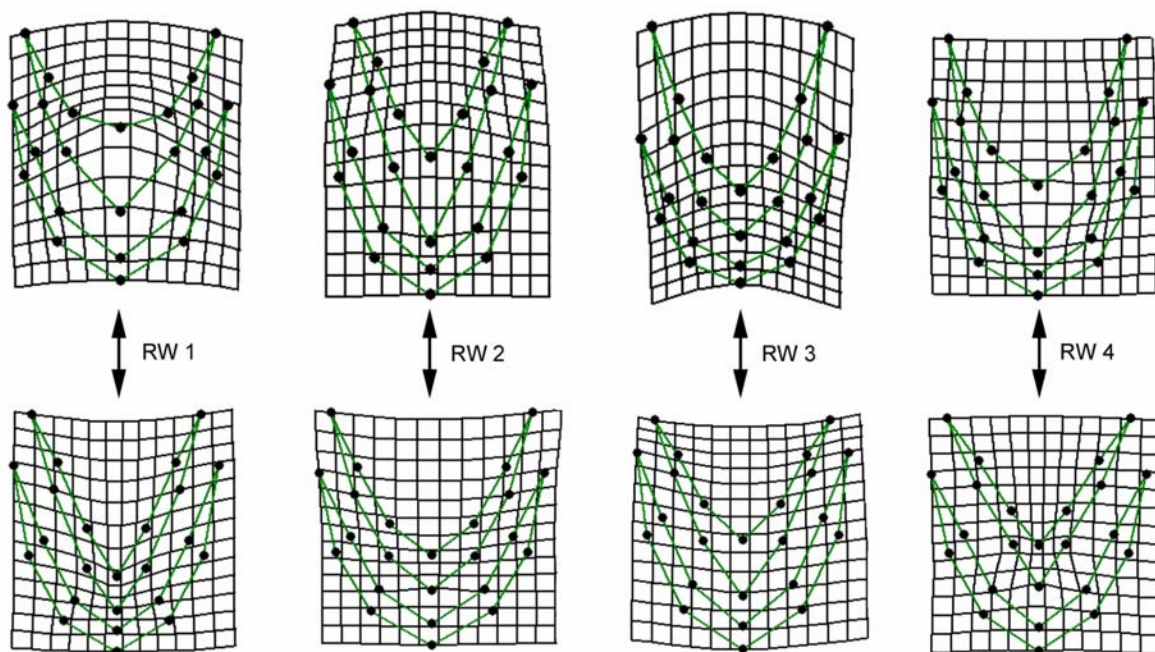


Obr. 8. Analýza relativních warpů – ordinační diagram. Rozmístění objektů podél prvních dvou relativních warpů, které popisují 36,5 % a 27,78 % tvarové variability. Červeně (+) *Mallomonas calceolus*, modře (□) *M. flora*, růžově (■) *M. kalinae* a zeleně (×) *M. striata*.



Obr. 9. Analýza relativních warpů – ordinační diagram. Rozmístění objektů podél prvních třetího a čtvrtého relativního warpů, které popisují 17,08 % a 7,06% tvarové variability. Červeně (+) *Mallomonas calceolus*, modře (□) *M. flora*, růžově (■) *M. kalinae* a zeleně (×) *M. striata*.

Hlavní trendy tvarových změn probíhající v celém datovém souboru lze znázornit metodou ohebných pásků. (obr. 10) Nejvýraznější změny, popisované první osou, se odehrávají v oblasti střední části V-žebra. Tato oblast může být zesílená ve velmi výraznou kápi nebo naopak stejně úzká jako postranní ramena, která svírají ostrý úhel a V-žebro dosahuje až téměř k přehnutému okraji.



Obr. 10. Trendy tvarových změn spojených s prvními čtyřmi relativními warpy zobrazené pomocí deformačních mřížek.

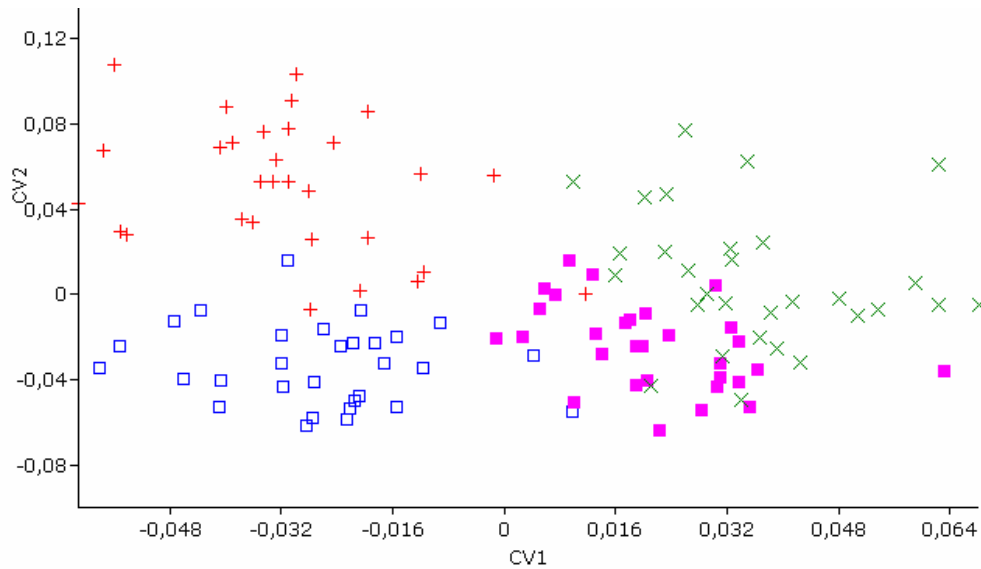
Druhá osa popisuje především šířku a délku celé studované části šupiny – na jedné straně máme šupiny spíše krátké a široké a na druhé dlouhé a úzké. Změna v šířce se projevuje především ve střední části šupiny, změna v délce je patrná především v oblasti hrotu V-žebra.

Poměrně velký příspěvek k variabilitě je vyjádřen i osou třetí. Na ní je především patrný trend prodlužování postranních větví V-žebra směrem k distálnímu konci šupiny.

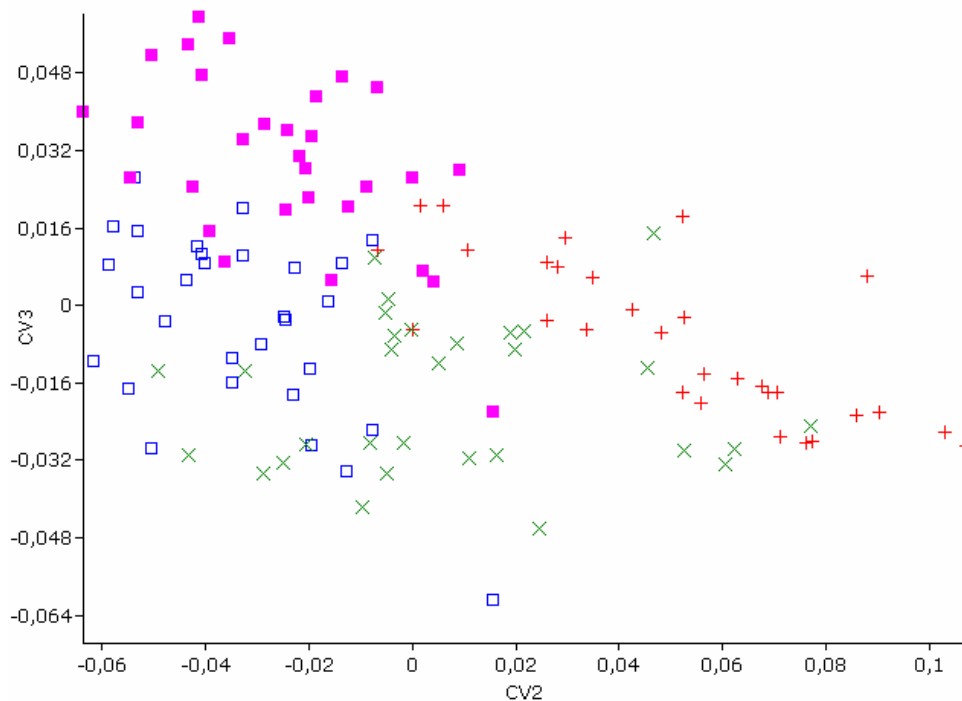
Čtvrtá osa je rovněž významná. Opět sleduje změny ve střední části V-žebra a jeho celkový tvar, který by se dal charakterizovat podobností s písmeny „V“ a „U“. Projevuje se i vzájemná vzdálenost V-žebra a přehnutého okraje.

Jako výchozí data pro MANOVA byly použity skóry na prvních deseti relativních warpech. Výsledek analýzy vyšel vysoce signifikantní (Wilk's $\lambda = 0,02081$, $F = 28,75$, $df1 = 30$, $df2 = 314,7$, $p = 1,146 \text{ E-}72$). Rozložení objektů podél kanonických os je znázorněno na obrázcích 11 a 12. První kanonická osa (CV1) popisuje 61,52 % variability, druhá osa (CV2) 23,18 %. CV1 výrazně odděluje dvojice druhů *M. flora* a *M. calceolus* na jedné straně a *M. kalinae* a *M. striata* na druhé. Druhá osa se nejvíce podílí na odlišení druhu *Mallomonas*

calceolus (a to především od druhů *M. flora* a *M. kalinae*). Významná je v tomto případě i třetí kanonická osa, podle které dochází k poměrně zřetelné separaci šupin druhu *Mallomonas kalinae*.

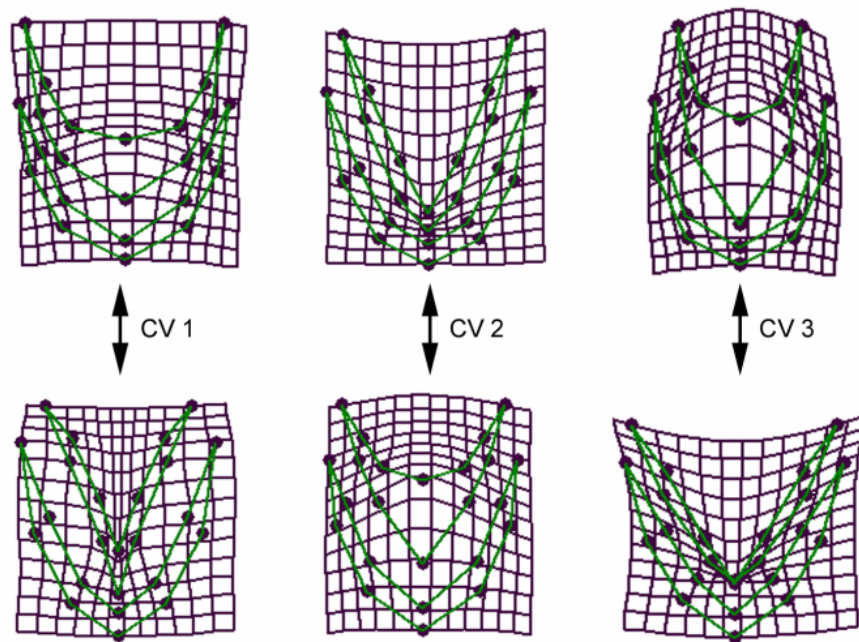


Obr. 11. CVA bodový diagram. Rozložení druhů podél prvních dvou kanonických os. Červeně (+) *Mallomonas calceolus*, modře (□) *M. flora*, růžově (■) *M. kalinae* a zeleně (×) *M. striata*.



Obr. 12. CVA bodový diagram. Rozložení druhů podél druhé a třetí kanonické osy. Červeně (+) *Mallomonas calceolus*, modře (□) *M. flora*, růžově (■) *M. kalinae* a zeleně (×) *M. striata*.

Na obr.13 jsou viditelné trendy morfologických změn spojených s kanonickými osami. Dvojice druhů oddělené podél první osy se liší především tvarem V-žebra. Zatímco pro *M. calceolus* a *M. flora* je typické rozšířené V-žebro ve tvaru písmene U, které svými postranními větvemi dosahuje blízko k okraji šupiny, *M. kalinae* a *M. striata* mají V-žebro skutečně spíše ve tvaru písmene V, s rovnými postranními větvemi svírajícími ostrý úhel, zřetelně zašpičatělé a dosahující téměř k přehnutému okraji svým hrotem.



Obr. 13. Trendy tvarových změn spojené s prvními třemi kanonickými osami. Rozsah změn je dvojnásobně zvýrazněný oproti realitě kvůli větší ilustrativnosti.

Změny podél druhé osy se rovněž týkají především V-žebra. *M. calceolus* a částečně i *M. striata* jsou zde definovány tendencí k zesílení střední části V-žebra až ve velmi výraznou kápi.

Třetí osa odděluje *Mallomonas kalinae* na základě celkově špičatějšího obrysu a hlavně velmi úzkého V-žebra bez přítomnosti kápě.

Vzdálenost průměrů jednotlivých skupin, spočítaná třemi různými způsoby, je v tabulce 7. Nejmenší rozdíl průměrů, a tudíž největší podobnost, vykazují šupiny druhů *Mallomonas flora* a *Mallomonas kalinae*. Naproti tomu nejvzdálenější jsou si *Mallomonas kalinae* a *M. calceolus*.

Výsledky klasifikační diskriminační analýzy pro jednotlivé dvojice jsou v tabulce 8. Odlišení skupin a tedy správné zařazení šupin k jednotlivým druhům vychází vysoce signifikantní. Ve třech případech byla klasifikace všech šupin správná a ve zbylých třech došlo pouze k jedinému špatnému zařazení, což odpovídá úspěšnosti 98,33 %.

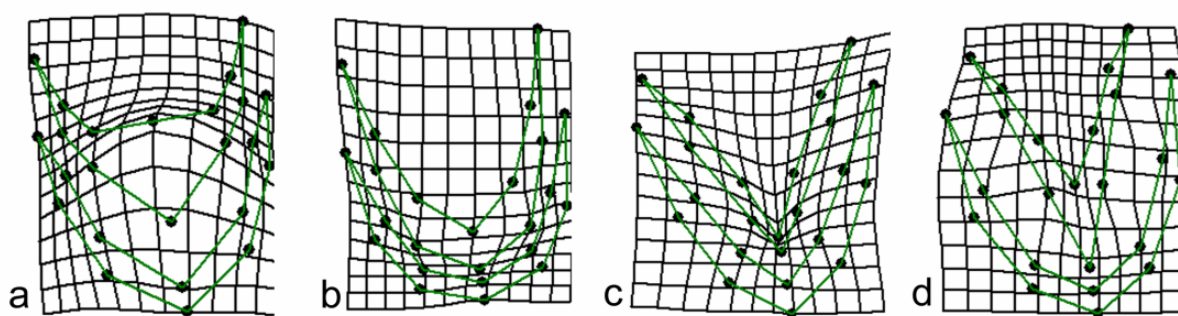
dvojice druhů	PCA	CVA	Prok. vzd.
c-f	0,02972	0,04826	0,09370
c-k	0,03500	0,05680	0,11007
c-s	0,03043	0,04625	0,09665
f-k	0,02016	0,03423	0,06431
f-s	0,02797	0,04369	0,08931
k-s	0,02199	0,03459	0,06938

Tabulka 7. Vzdálenosti jednotlivých skupin. Dvojice druhů: příslušné druhy, o jejichž vzdálenost se jedná (c=*M. calceolus*, f=*M. flora*, k=*M. kalinae*, s=*M. striata*). PCA: Euklidovské vzdálenosti průměrů skupin, průměry ze skóre na prvních deseti PCA osách. CVA: Euklidovské vzdálenosti průměrů skupin, průměry ze skóre na třech kanonických osách. Prok. vzd.: Prokrustovské vzdálenosti konsenzuálních konfigurací jednotlivých skupin.

dvojice druhů	p-hodnota	procento správně klasifikovaných
c-k	2,20E-17	98,33 %
c-f	1,64E-15	98,33 %
c-s	7,45E-18	100 %
k-f	3,69E-20	100 %
k-s	7,77E-14	98,33 %
f-s	1,10E-19	100 %

Tabulka 8. Klasifikační diskriminační analýza. Úspěšnost rozlišení šupin do druhů v rámci jednotlivých dvojic. (c=*M. calceolus*, f=*M. flora*, k=*M. kalinae*, s=*M. striata*)

Tvarové změny charakterizující rozdíly jednotlivých druhů od konsenzuální konfigurace jsou na obr. 14. Typickým trendem morfologické variability, který popisuje průměrnou šupinu druhu *Mallomonas calceolus* ve srovnání se šupinou konsenzuální, je široké rozevření V-žebra do tvaru písmene U. V-žebro má rovněž výraznou kápi. U druhu *Mallomonas flora* je též patrný trend V-žebra ve tvaru písmene U, avšak to na rozdíl od *Mallomonas calceolus* vykazuje tendenci blížit se k přehnutému okraji, a to po celé své délce. Směrem k hrotu sice dochází k zesílení struktury, nicméně typickou kápi nevytváří. U druhu *Mallomonas kalinae* se oproti ostatním sledovaným druhům projevuje výrazněji i obrys spodní části šupiny, který je zašpičatělý. Ramena V-žebra oproti konsenzuální konfiguraci svírají ostrý úhel, avšak je široce otevřené, ve střední části se zužující. Trendy spojené s charakteristikou šupiny druhu *Mallomonas striata* ukazují na V-žebro ve tvaru V, nicméně s menším úhlem mezi rameny a směrem do středu zesílené, na rozdíl od druhu předchozího. V-žebro je také dost oddálené od okraje šupiny.



Obr. 14. Trendy morfologické variability mezi referenční konsenzuální konfigurací a konsenzuálními konfiguracemi jednotlivých druhů: a. *M. calceolus*, b. *M. flora*, c. *M. kalinae*, d. *M. striata*.

Trendy morfologické variability podél prvních tří relativních warpů v jednotlivých skupinách, čili pro každý druh zvlášť jsou na obr. 15. Zobrazené jsou mřížky pro první 3 relativní warpy, které popisují dohromady přes 80 % variability – podrobné údaje lze nalézt v tabulce 9.

	<i>M. calceolus</i>	<i>M. flora</i>	<i>M. kalinae</i>	<i>M. striata</i>
RW1	50,76 %	54,92 %	50,58 %	46,02 %
RW2	28,13 %	24,26 %	23,96 %	20,31 %
RW3	10,26 %	8,38 %	10,59 %	16,23 %
celkem	89,15 %	87,55 %	85,14 %	82,55 %

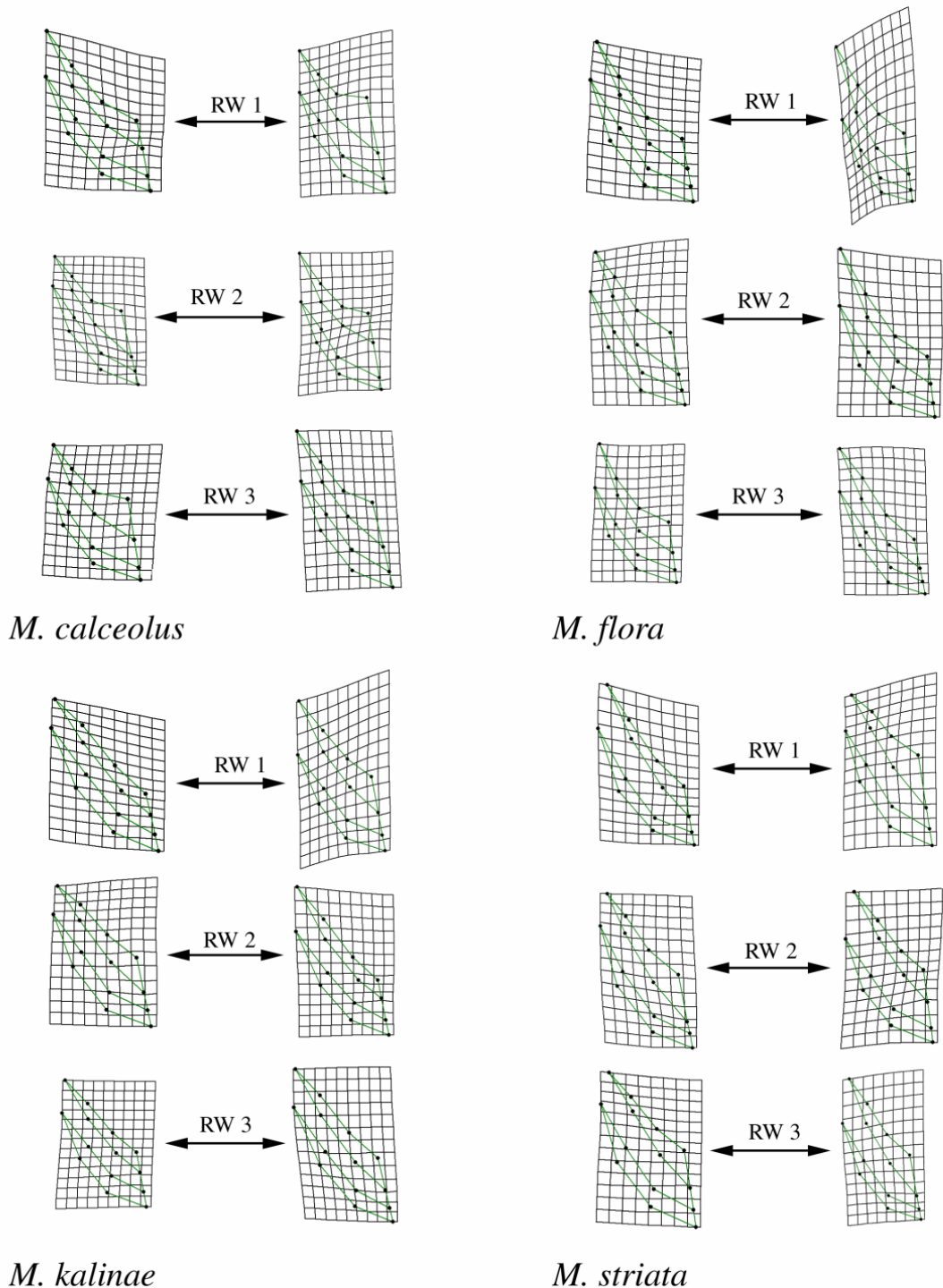
Tabulka 9. Procento vysvětlené variability na prvních třech osách pro čtyři nezávislé RWA.

U všech zkoumaných druhů se na 1. ose objevuje trend prodlužování/zkracování ramen V-žebra i přehnutého okraje, a zároveň platí, že čím kratší, tím je jeho střední část více kápovitě zesílená. S druhou osou je spojena především variabilita ve vzdálenosti hrotu V-žebra od přehnutého okraje, která je patrná také u všech 4 druhů, nejvýrazněji však u *M. calceolus* a *M. striata*.

3.2.4 Diskuse

Z výsledku analýzy relativních warpů vyplývá, že nejvýraznější změny na šupinách se projevují v oblasti V-žebra, ať už se jedná o jeho šířku, délku, rozevřenost, úhel či tvar v oblasti jeho středu – kápě. Na druhou stranu, oblast přehnutého okraje je variabilní poměrně málo. Tyto výsledky je možné srovnat se studií variability šupin *Mallomonas striata* (NEUSTUPA & NĚMCOVÁ 2007). Určité trendy se projeví shodně, a to především ve srovnání

s jejich souborem celosvětových dat. Na první ose byl též patrný přechod od konstantně úzkého V-žebra ke kápovitému. Projevila se však také délka jeho větví a celková délka šupiny, což je variabilita vysvětlovaná v této studii až pomocí osy třetí. Druhá osa sledovala úhel rozevření V-žebra, a to sice v obou případech, avšak nyní se projevil opačný trend závislosti úhlu V-žebra a přítomnosti kápě.



Obr. 15. Trendy morfologické variability spojené s prvními třemi relativními warpy v případě, že je analýza relativních warpů provedena pro každý druh zvlášť. K analýzám byla použita data jen z jedné poloviny šupiny, aby byl počet objektů vyšší než počet znaků.

Nicméně zjištěné rozdíly lze vysvětlit – landmarky ve studii NEUSTUPY & NĚMCOVÉ (2007) byly rozmístěné i na jiných částech šupiny, a tudíž se do celkové variability promítají změny, které nyní nebylo možné posoudit. Ukazuje se tedy, jak velký vliv na výsledky má právě volba homologických bodů. Pokud chceme navzájem srovnávat více nezávislých studií, je důležité vycházet z pokud možno stejné sady landmarků.

Co se týče vzájemné tvarové podobnosti zkoumaných druhů, jsou výsledky poměrně překvapivé. Jako tvarově nejpodobnější vychází druhy *Mallomonas kalinae* a *Mallomonas striata*, které patří každý do jiné sekce rodu. *Mallomonas kalinae* je řazen do sekce Papilosae spolu s druhem *Mallomonas calceolus*, a právě šupiny těchto dvou druhů měly vzdálenost největší. Nicméně sekce rodu *Mallomonas* jsou založené pouze na celkové vnější morfologické podobnosti šupin. Do jaké míry odrážejí skutečnou příbuznost je třeba zhodnotit metodami molekulární fylogenetiky.

Zajímavé je srovnání variability uvnitř skupin – druhů. Zdá se, že existují trendy variability, které jsou pro jednotlivé druhy stejné či velmi podobné. Ve všech čtyřech případech také první tři relativní warpy popisují podobně velikou složku variability. Dokonce i výsledky získané pro druh *Mallomonas kalinae* jsou srovnatelné s ostatními, přestože reprezentují pouze variabilitu v rámci kultury. Jednalo by se o významné zjištění, které by ukazovalo, že určitý pattern plasticity zůstává stejný, přestože morfologie šupin je u různých druhů odlišná. Nicméně nebyla zatím provedena formální analýza, která by patrnou shodu variability testovala.

3.2.5 Závěr

Landmarkové metody se ukázaly být vhodné pro studium morfologické variability křemičitých šupin chrysomonád a jako takové budou tvořit základní metodický přístup budoucí diplomové práce. Umožnily popsat základní trendy, které se ve změně tvaru projevují, a s využitím klasifikační diskriminační analýzy se podařilo rozlišit jednotlivé druhy s velkou úspěšností. Ještě větší přesnosti při klasifikaci by bylo dosaženo v případě většího základního souboru. 30 šupin od každého druhu bylo zvoleno vzhledem k nedostatku publikovaných fotografií, nicméně v diplomové práci, ve které by základ měly tvořit vlastní kultury, bude pro analýzy tvaru používáno šupin více.

Uvedené metody mohou být využity k určování druhů, jejichž šupiny jsou velice podobné, nebo se odlišují na základě znaků, které není možné vždy posoudit pouze při nálezů jedné

šupiny. Bylo by možné odhalit i případné druhy kryptické. Nabízí se i využití v oblasti automatické identifikace. Tento přístup byl již zkoumán v projektu ADIAC, jenž se zabýval možnostmi počítačem řízené determinace rozsivek, včetně automatického pořízení snímku a následné analýzy obrazu. Dosažená úspěšnost byla poměrně vysoká (přes 90 %) a zmíněná metoda bude jistě v budoucnosti ještě dále rozvinuta. (DU BUF & BAYER 2002) Ve zmiňovaných případech je navíc pravděpodobná ještě vyšší úspěšnost rozlišení, neboť u velmi podobných šupin lze najít mnohem více homologických struktur, a tudíž je možné pracovat s větším souborem landmarků, které by popisovaly variabilitu v oblasti celé šupiny a ne pouze na několika omezených oblastech. Naopak studium variability izolované části šupiny a s ním spojená schopnost rozlišení taxonů by mohly pomoci v paleoekologii, protože v sedimentech bývají velmi často nacházeny pouze úlomky šupin.

Kromě zde již uvedených metod skýtá geometrická morfometrika ještě další možnosti. Lze například vytvořit regresní modely, pomocí kterých je možné testovat závislost morfologické variability na nezávislých proměnných – tedy např. na environmentálních faktorech. Umožňuje i modelování tvarů odpovídajících například konkrétním podmínkám prostředí a naopak sestavování modelů pro odhad podmínek historických prostředí.

4. Použitá literatura

- ADAMS, D. C., ROHLF, F. J. & SLICE, D. E. (2004): Geometric Morphometrics: Ten Years of Progress Following the 'Revolution'. – Ital. J. Zool. 71: 5-16.
- ALLEN, E. D. & SPENCE, D. H. N. (1981): The differential ability of aquatic plants to utilize the inorganic carbon supply in fresh waters. – New Phytologist 87 (2): 269-283.
- ANDERSEN, R. A. (1987): Synurophyceae classis nov., a new class of algae. – Am. J. Bot. 74 (3): 337-353.
- ANDERSEN, R. A., MORTON, S. L. & SEXTON, J. P. (1997): Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton 1997. List of strains. – J. Phycol. 33 (6) (suppl.): 1-75.
- ASMUND, B. (1955): Electron microscope observations on *Mallomonas caudata* and some remarks on its occurrence in four Danish ponds. – Bot. Tidsskr. 52: 163-166.
- ASMUND, B. & KRISTIANSEN, J. (1986): The genus *Mallomonas* (Chrysophyceae). A taxonomic survey based on the ultrastructure of silica scales and bristles. – Opera Botanica 85: 1-128.
- BEECH, P. L., WETHERBEE, R. & PICKETT-HEAPS, J. D. (1990): Secretion and deployment of bristles in *Mallomonas splendens* (Synurophyceae). – J. Phycol. 26: 112-22.
- BOOKSTEIN, F. L. (1991): Morphometric tools for landmark data: geometry and biology, 435 pp. Cambridge University Press, Cambridge.
- BOOKSTEIN, F. L. (1997): Landmark methods for forms without landmarks: morphometrics of group differences in outline shape. – Medical Image Analysis 1: 225-243.
- COESEL, P. F. M. (1998): Sieralgen en natuurwaarden, pp. 56. KNNV Uitgeverij, Utrecht.
- DU BUF, H & BAYER, M. M. (2002): Automatic diatom identification, 316 pp. World Scientific Publishing, Singapore.
- FENCHEL, T. & FINLAY, B.J. (2004): The ubiquity of small organisms: patterns of global and local diversity. – Bioscience 54: 777-785.
- FINLAY, B. J. (2002): Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. – Science 296: 1061-1063.
- FINLAY, B. J. & CLARKE, K. J. (1999): Apparent global ubiquity of species in the protist genus *Paraphysomonas*. – Protist 150: 419-430.
- FOTT, B. (1955): Scales of *Mallomonas* observed in electron microscope. – Preslia 27: 280-282.
- GAVRILOVA, O. V., NOGINA, N. V. & VOLOSHKO, L. N. (2005): Scale structure and growth characteristics of *Synura petersenii* (Synurophyceae) under different pH conditions. – Nova Hedwigia Beih. 128: 249-256.
- GUTOWSKI, A. (1989): Seasonal succession of scaled chrysophytes in a small lake in Berlin. – Nova Hedwigia Beih. 95: 159-177.
- GUTOWSKI, A. (1996): Temperature dependent variability of scales and bristles of *Mallomonas tonsurata* TEILING emend. KRIEGER (Synurophyceae). – Nova Hedwigia Beih. 114: 125-146.
- HAHN, A., GUTOWSKI, A. & GEISSLER, U. (1996): Scale and bristle morphology of *Mallomonas tonsurata* (Synurophyceae) in cultures with varied nutrient supply. – Acta Botanica 109: 239-247.

HAMMER, O., HARPER, D. A. T. & RYAN, P. D. (2001): PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. – *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9 pp. (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>)

HEALEY, F. P. (1983): Effects of temperature and light intensity on the growth rate of *Synura sphagnicola*. – *Journal of Plankton Research* 5: 767-774.

HINDÁK, F. (1978): *Sladkovodné riasy*, 724 pp. Slovenské pedagogické nakladateľstvo, Bratislava.

HINDÁK, F. (2001): *Fotografický atlas mikroskopických siníc*, 127 pp. VEDA Publishing house of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava.

KALINA, T. & VÁŇA, J. (2005): *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*, 606 pp. Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, Praha.

KENDALL, D. (1977): The diffusion of shape. – *Advances in Applied Probability* 9: 428-430.

KLAVENESS, D. & GUILLARD, R. R. L. (1975): The requirement for silicon in *Synura petersenii*. – *J. Phycol.* 11: 349-55.

KLINGENBERG, C. P., BARLUENGA, M. & MEYER, A. (2002): Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. – *Evolution* 56 (10): 1909-1920.

KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. (1999): Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. – In: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H. & Mollenhauer, D. (eds.): *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/1, 548 pp. Gustav Fischer Verlag, Jena.

KOMÁREK, J. & FOTT, B. (1983): Chlorophyceae (Grünalgen) Ordnung: Chlorococcales. – In: Huber- Pestalozzi, G. (ed.): *Das Phytoplankton des Süßwassers*, Band XVI, 1044 pp. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung., Stuttgart.

KORSHIKOV, A. A. (1929): Studies on the CHRYSOMONADS 1. – *Arch. Protistenkd.* 67: 253-288.

KRISTIANSEN, J. (1979): Problems in classification and identification of Synuraceae (Chrysophyceae). – *Schweiz. Z. Hydrol.* 40: 310-319.

KRISTIANSEN, J. (1986a): The ultrastructural basis of chrysophyte systematics and phylogeny. – *Crit. Rev. Plant. Sci.* 4: 149-211.

KRISTIANSEN, J. (1986b): Silica-scale bearing Chrysophytes as Environmental Indicators. – *Br. phycol. J.* 21: 425-436.

KRISTIANSEN, J. (1988): Seasonal occurrence of silica-scaled chrysophytes under eutrophic conditions. – *Hydrobiologia* 161: 171-184.

KRISTIANSEN, J. (2001): Biogeography of silica-scaled chrysophytes. – *Nova Hedwigia Beih.* 122: 23-39.

KRISTIANSEN, J. (2002): The genus *Mallomonas* (Synurophyceae)- A taxonomic survey based on the ultrastructure of silica scales and bristles. – *Opera Botanica* 139: 5-128.

KRISTIANSEN, J. (2005): *Golden algae*, 166 pp. Gantner Verlag Kommanditgesellschaft.

KRISTIANSEN, J. & LIND, J. F. (2005): Endemicity in silica-scaled chrysophytes. – *Nova Hedwigia Beih.* 128: 65-83.

KRISTIANSEN, J. & TAKAHASHI, E. (1982): Chrysophyceae: introduction and bibliography. – In: Rosowski, J. & Parker, B. (eds.): *Selected Papers in Phycology*, vol. II. Phycological Society.

KRISTIANSEN, J. & VIGNA, M. S. (1996): Bipolarity in the distribution of silica-scaled chrysophytes. – *Hydrobiologia* 336: 121-126.

KRISTIANSEN, J., DÜVEL, L. & WEGENBERG, S. (1997): Silica-scaled chrysophytes from the Taymir Peninsula, Northern Siberia. – *Nova Hedwigia* 65: 337-351.

LEADBEATER, B. S. C. (1986): Scale case construction in *Synura petersenii* KORSCH. – In: Kristiansen, J. & Andersen, R. A. (eds.): *Chrysophytes. Aspects and Problems*, pp. 121-

132. Cambridge University Press, New York.

LEADBEATER, B. S. C. (1990): Ultrastructure and Assembly of the Scale Case in *Synura* (Synurophyceae ANDERSEN). – Br. phycol. J. 25: 117-132.

LEADBEATER, B. S. C. & BARKER, D. A. N. (1995): Biomineralization and scale production in the Chrysophyta. – In: SANDGREN, C. D., SMOL, J. P. & KRISTIANSEN, J. (eds): Chrysophyte algae, pp. 141-164. Cambridge University Press.

LEE, K. L. & KIM, H. S. (2007): Growth characteristics of three synurophytes (*Mallomonas* species) at different temperatures and pH. – Nova Hedwigia 84: 227-240.

LENZENWEGER, R. (1996): Desmidiaceenflora von Österreich Teil 1., 120 pp. J.Cramer in der Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.

LENZENWEGER, R. (1997): Desmidiaceenflora von Österreich Teil 2., 153 pp. J.Cramer in der Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.

LENZENWEGER, R. (1999): Desmidiaceenflora von Österreich Teil 3., 158 pp. J.Cramer in der Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.

LENZENWEGER, R. (2003): Desmidiaceenflora von Österreich Teil 4., 87 pp. J.Cramer in der Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung., Stuttgart.

MANTON, I. & LEEDALE, G. F. (1961): Observations on the fine structure of *Paraphysomonas vestita*, with special reference to the Golgi apparatus and the origin of scales. – Phycologia 1: 37-57.

MARHOLD, K. & SUDA, J. (2002): Statistické zpracování mnhorozměrných dat v taxonomii (Fenetické metody), 159 pp. Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, Praha.

MARTIN-WAGENMANN, B. & GUTOWSKI, A. (1995): Scale morphology and growth characteristics of clones of *Synura petersenii* (Synurophyceae) at different temperatures. – In: SANDGREN, C. D., SMOL, J. P. & KRISTIANSEN, J. (eds): Chrysophyte algae, pp. 345-360. Cambridge University Press.

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

NĚMCOVÁ, Y. (2000): Ultrastruktura a taxonomie vybraných skupin řas, 136 pp. Disertační práce. – depon. in: Knihovna katedry botaniky PřF UK, Benátská 2, Praha 2.

NOVÁKOVÁ, S., NĚMCOVÁ, Y., NEUSTUPA, J., ŘEZÁČOVÁ, M., ŠEJNOHOVÁ, L. & KALINA, T. (2004): Silica scaled chrysophytes in acid peat bogs of Bohemian Switzerland (Czech Republic) and Saxonian Switzerland (Germany). – Nova Hedwigia 78: 507-515.

POPOVSKÝ, J. & PFIESTER, L. A. (1990): Dinophyceae (Dinoflagellida). – In: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H. & Mollenhauer, D. (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa 6, 272 pp. Gustav Fischer Verlag, Jena.

ROHLF, F. J. (2003): tpsSmall, Version 1.20. – Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook, New York. (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>)

ROHLF, F. J. (2004): tpsSpln, Version 1.20. – Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook, New York. (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>)

ROHLF, F. J. (2005): tpsRegr, Version 1.31. – Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook, New York. (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>)

ROHLF, F. J. (2006a): tpsDig, Version 2.10. – Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook, New York. (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>)

ROHLF, F. J. (2006b): tpsUtil, Version 1.38. – Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook, New York. (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>)

ROHLF, F. J. (2007): tpsRelw, Version 1.45. – Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook, New York. (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>)

ROHLF, F. J., & MARCUS, L. F. (1993): A revolution in morphometrics. – Trends in Ecology and Evolution 8: 129-132.

- ROJACKERS, R. M. & KESSELS, H. (1986): Ecological characteristics of scale-bearing Chrysophyceae from the Netherlands. – Nord. J. Bot. 6: 373-383.
- ŘEZÁČOVÁ, M. (2003): Ekologie a rozšíření chrysomonád s křemičitými šupinami (Chrysophyceae, Synurophyceae), 59 pp. Bakalářská seminární práce.
- ŘEZÁČOVÁ, M. (2006): *Mallomonas kalinae* (Synurophyceae), a new species of alga from northern Bohemia, Czech Republic. – Preslia 78: 353-358.
- ŘEZÁČOVÁ, M. & NEUSTUPA, J. (2007): Distribution of the genus *Mallomonas* (Synurophyceae) – Ubiquitous dispersal in microorganisms evaluated. – Protist 158: 29-37.
- ŘEZÁČOVÁ, M. & ŠKALOUĐ, P. (2005): Silica-scaled chrysophytes of Ireland. With an appendix: Geographic variation of scale shape of *Mallomonas caudata*. – Nova Hedwigia Beih. 128: 101-124.
- ŘEZÁČOVÁ, M.; NEUSTUPA, J. & ŠEJNOHOVÁ, L. (2004): Five species of *Mallomonas* (Synurophyceae) new to the algal flora of the Czech Republic. – Preslia 76: 175-181.
- SANDGREN, C. D. & BARLOW, S. B. (1989): Siliceous scale production in chrysophyte algae: II SEM observations regarding the effects of metabolic inhibitors on scale regeneration in laboratory populations of scale-free *Synura petersenii* cell. – Nova Hedwigia Beih. 95: 27-44.
- SANDGREN, C. D., HALL, S. A. & BARLOW, S. B. (1996): Siliceous scale production in Synurophyte algae. I. Effects of silica-limited growth on cell scale content, scale morphology and the construction of the scale layer of *Synura petersenii* cells. – Journal of Phycology 32: 675-692.
- SAXBY-ROUEN, K. J., LEADBEATER, B. S. C. & REYNOLDS, C. S. (1997): The growth response of *Synura petersenii* (Synurophyceae) to photon flux density, temperature and pH. – Phycologia 36: 233-243.
- SAXBY-ROUEN, K. J., LEADBEATER, B. S. C. & REYNOLDS, C. S. (1998): The relationship between the growth of *Synura petersenii* (Synurophyceae) and components of the dissolved inorganic carbon system. – Phycologia 37: 467-477.
- SCHNEP, E. & DEICHGRÄBER, G. (1969): Über die Feinstruktur von *Synura petersenii* unter besonderer Berücksichtigung der Morphogenese ihrer Kieselschuppen. – Protoplasma 68: 85-106.
- SIVER, P. A. (1987): The distribution and variation of *Synura* species (Chrysophyceae) in Connecticut, USA. – Nord. J. Bot. 7: 107-16.
- SIVER, P. A. (1991): The biology of *Mallomonas*- morphology, taxonomy and ecology, 230 pp. Kluwer Acad. Publ., London.
- SIVER, P. A. (1995): The distribution of chrysophytes along environmental gradients: their use as biological indicators. – In: SANDGREN, C. D., SMOL, J. P. & KRISTIANSEN, J. (eds): Chrysophyte algae, 232-268 pp. Cambridge University Press, Cambridge.
- SIVER, P. A. & HAMER, J. S. (1989): Multivariate statistical analysis of the factors controlling the distribution of scaled chrysophytes. – Limnol. Oceanogr. 34 (2): 368-381.
- SIVER, P. A. & HAMER, J. S. (1992): Seasonal periodicity of Chrysophyceae and Synurophyceae in a small New-England lake – Implications for paleolimnological research. – J. Phycol. (2): 186-198.
- SIVER, P. A. & MARSICANO, L. J. (1996): Inferring lake trophic status using scaled chrysophytes. – Nova Hedwigia Beih. 114: 233-246.
- SIVER, P. A. & SKOGSTAD, A. (1988): Morphological variation and ecology of *Mallomonas crassiquama* (Chrysophyceae). – Nord. J. Bot. 8: 99-107.
- SMOL, J. P. (1995): Application of chrysophytes to problems in paleoecology. – In: SANDGREN, C. D., SMOL, J. P. & KRISTIANSEN, J. (eds): Chrysophyte algae, pp. 303-329. Cambridge University Press, Cambridge.
- STARMACH, K. (1985): Chrysophyceae und Haptophyceae. – In: ETTL, H., GERLOFF, J.,

HEYNIG, H. & MOLLENHAUER, D. (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa 1, 515 pp. Gustav Fischer Verlag, Jena.

THOMPSON, D. W. (1992): On growth and form. The Complete Revised Edition, 1116 pp. Dover Publications, Inc, New York.

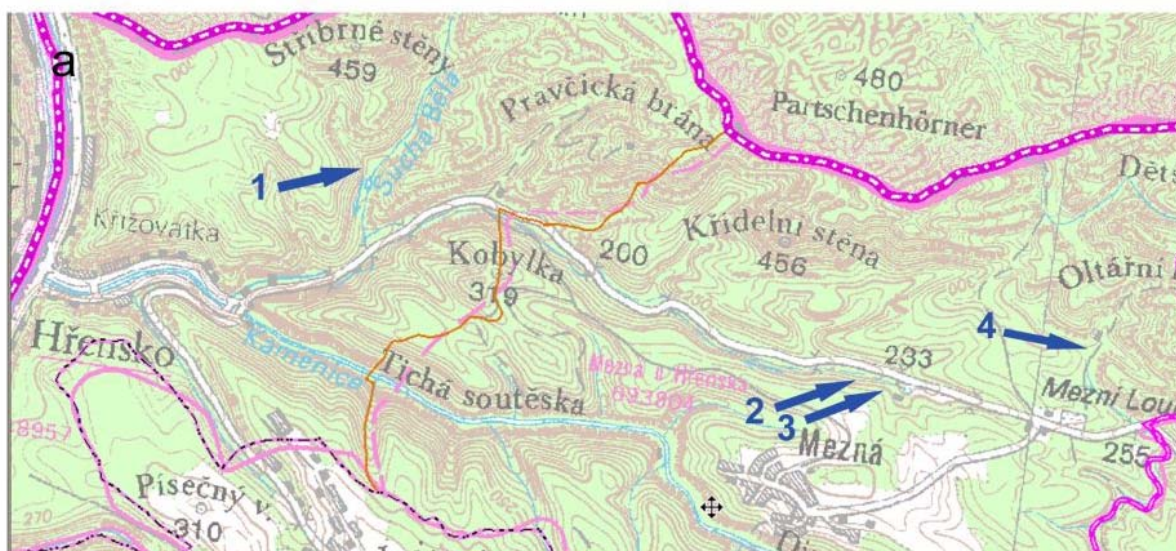
WEE, J. L. (1997): Scale biogenesis in Synurophycean protists: Phylogenetic implications. – Crit. Rev. Plt. Sci. 16: 497-534.

WEE, J. L., MILLIE, D. F. & WALTON, S. P. (1991): A statistical characterization of growth among clones of *Synura petersenii* (Synurophyceae). – J. Phycol. 27: 570-575.

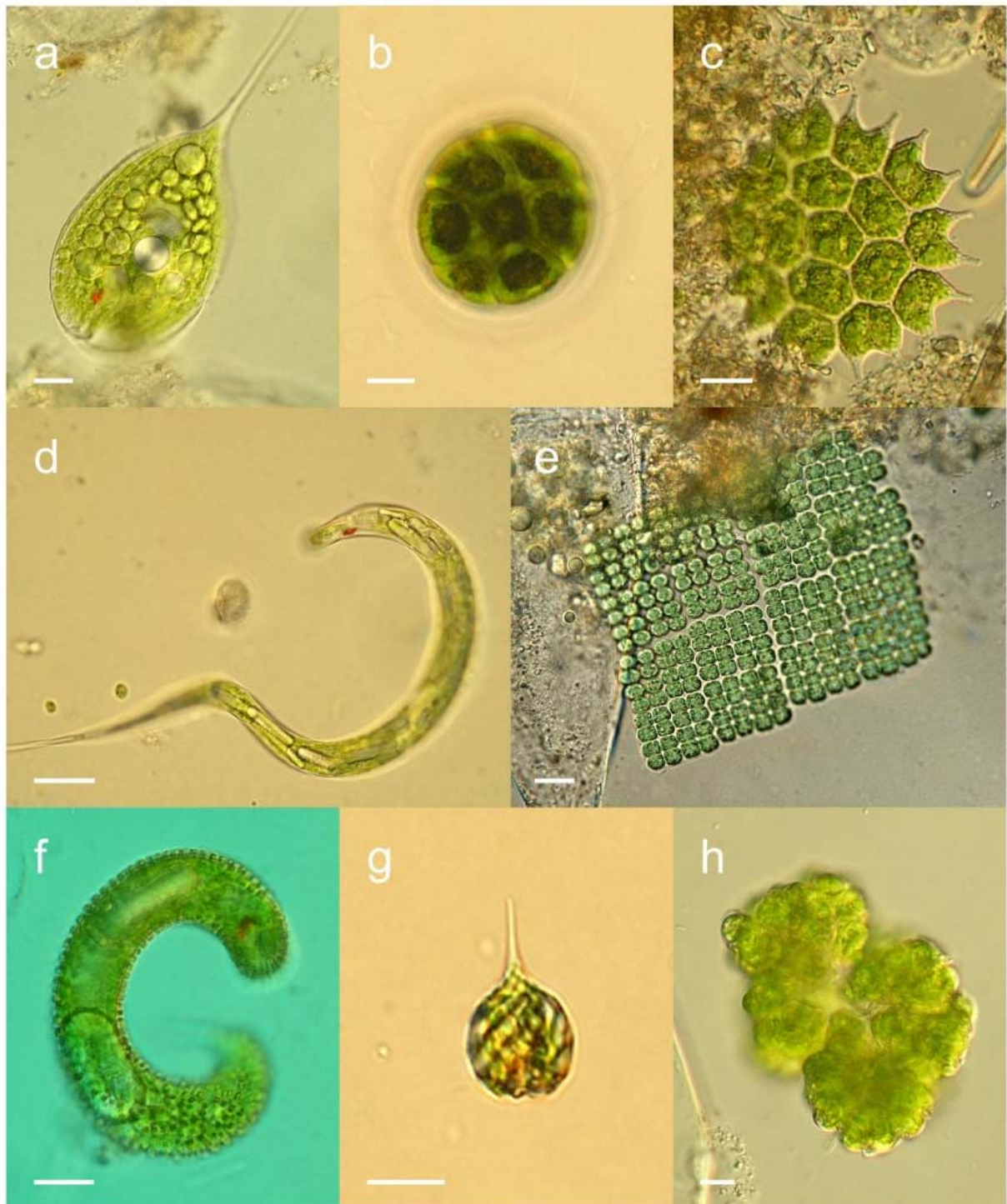
WOLOWSKI, K. & HINDÁK, F. (2003): Atlas of Euglenophytes, 136 pp. VEDA Publishing house of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava.

ZELDITCH, M. L., SWIDERSKI, D. L., SHEETS, H. D. & FINK, W. L. (2004): Geometric morphometrics for biologist: A primer, 443 pp. Elsevier Academic Press, New York.

Příloha



Tabule 1. Místa odběru fytoplanktonu a sedimentu v NP České Švýcarsko: a. mapa lokalit, jednotlivé lokality označeny číslem (popis viz text), b. lokalita č. 1, c. lokalita č. 2, d. lokalita č. 3, e. lokalita č. 4



Tabule 2. Doprovodné druhy fytoplanktonu: a. *Phacus longicauda*, b. *Pandorina morum*, c. *Pediastrum boryanum*, d. *Lepocinclis acus*, e. *Merismopedia glauca*, f. *Euglena spirogyra*, g. *Monomorphina pyrum*, h. *Botryococcus braunii*. Měřítko odpovídá 10 μm .

Tabulka: Fytoplanktonní druhy determinované ze vzorků odebraných v letech 2005 a 2006 na vybraných lokalitách v NP České Švýcarsko. Četnost je uvedena na semikvantitativní stupnici: 1=1 buňka či kolonie na sklíčko, 2=2-10 buněk, 3=více než 10 buněk, dominantní druh ve vzorku.

Datum odběru	24.6.05				4.11.05				20.4.06			1.7.06				17.9.06				3.11.06																	
Lokalita	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4														
Druh																																					
<i>Ankistrodesmus falcatus</i> (CORDA) RALFS																					1																
<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> CORDA					2					2	2					1																					
<i>Ankistrodesmus spiralis</i> (TURN.) LEMM.												2					1	3					3														
<i>Astasia harisii</i> PRINGSHEIM																					2																
<i>Botryococcus brauni</i> KÜTZ.																	1					1															
<i>Bulbochaete</i> sp.				1																		1															
<i>Ceratium hirundinella</i> (O.F.MÜLLER) SCHRANK	3	1																																			
<i>Closterium juncidum</i> RALFS											1																										
<i>Closterium parvulum</i> NÄGELI											2																										
<i>Coelastrum</i> sp.																	1																				
<i>Cosmarium botrytis</i> RALFS									1	1																											
<i>Cosmarium cf. ochthodes</i> NORDST.									1																												
<i>Cosmarium laeve</i> RABENH.											2																										
<i>Crucigenia fenestrata</i> (SCHMIDLE) SCHMIDLE																	2					3	1														
<i>Crucigenia tetrapedia</i> (KIRCHN.) W. & G.S. WEST											2					2	2																				
<i>Cryptomonas</i> sp.					2	1	1	1	1	1	3	1					1																				
<i>Desmodesmus communis</i> (E.HEGEWALD) E.HEGEWALD	2	2			2					1	1	3	2	2	3	2	2	1	1	2	2																
<i>Dictyosphaerium tetrachotomum</i> PRINTZ					1					1	1					3	3	2					2	3													
<i>Dinobryon sertularia</i> EHRENB.					2	1					2					1					1																
<i>Euastrum denticulatum</i> F.GAY											1																										
<i>Euglena cf. granulata</i> DUJARDIN											1																										
<i>Euglena gymnodinioides</i> ZAKRYŠ					1																																
<i>Euglena hemichromata</i> SKUJA					1																																
<i>Euglena mutabilis</i> SCHMITZ					1					1																											
<i>Euglena spirogyra</i> EHRENBERG	1																						3					1					2				
<i>Gymnodinium aeruginosum</i> STEIN	1	2	2																																		
<i>Gymnodinium</i> sp.					1					1	2																										
<i>Characium</i> sp.					1																																
<i>Chlamydomonas</i> sp.					3	1	2	2	2					1	1	3	1																				
<i>Keratococcus</i> sp.													1					1																			
<i>Kirchneriella contorta</i> (SCHMIDLE) BOHL.					1	2																															

