

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Morfologická variabilita rodu *Trachelomonas*
(Euglenophyceae, Euglenida)
Bakalářská práce

Adéla Paulíková

Školitel: Mgr. Josef Juráň, Ph.D.

Konzultant: prof. RNDr. Jiří Neustupa, Ph.D.

České Budějovice 2023

Paulíková, A. 2023. Morfologická variabilita rodu *Trachelomonas* (Euglenophyceae, Euglenida) [Morphological variability of the genus *Trachelomonas* (Euglenophyceae, Euglenida), Bc. Thesis in Czech] - 47 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

Annotation:

This bachelor thesis deals with the topic of morphological variability of commonly occurring *Trachelomonas* species. The theoretical part of the thesis is devoted to the topic of morphological variability of the genus *Trachelomonas*. In the practical part, by utilizing geometric morphometrics programs, the shape variability of the populations of the species *Trachelomonas hispida* and *Trachelomonas armata* was studied. The results were put in context with the physicochemical conditions of the environment.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

České Budějovice, 12. 4 2023

.....

Adéla Paulíková

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat vedoucímu své bakalářské práce Mgr. Josefu Juráňovi, Ph.D. za pomoc a rady při zpracování této práce. Velké díky patří zejména panu prof. RNDr. Jiřímu Neustupovi, Ph.D. za pomoc s analýzami geometrické morfometrie, jeho ochotu a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat panu Mgr. Petru Kouteckému, Ph.D. za pomoc při vyhodnocení PCA analýzy. Děkuji mým kolegům Sáře a Piškotovi za poskytnutí vzorků, pomoc při odběrech, mikroskopování a provádění jednotlivých analýz. V neposlední řadě děkuji svému příteli a rodině za velikou podporu po celou dobu mého studia.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
1.1 Krásnoočka	1
1.1.1 Charakteristika rodu <i>Trachelomonas</i>	3
1.1.2 Schránka <i>Trachelomonas</i>	5
1.1.2 Životní cyklus <i>Trachelomonas</i>	12
1.1.3 Morfologický a molekulární přístup k taxonomii <i>Trachelomonas</i>	14
1.2 Geometrická morfometrika.....	19
1.2.1 Analýza relativních warpů (PCA)	21
1.2.2 Diskriminační kanonická analýza (CVA).....	21
2. CÍLE PRÁCE.....	22
3. METODIKA	23
3.1 Výběr lokalit	23
3.1.1 Mladohaklovský rybník	23
3.1.2 Velký Vávrovský rybník.....	24
3.1.3 Královský rybník	24
3.1.4 rybník Zběhov.....	24
3.1.5 bezejmenný rybník přezdívaný Mlýnský.....	25
3.2 Odběry fytoplanktonu a mikroskopování	25
3.3 Chemická analýza vody	26
3.4. Analýzy dat za pomoci geometrické morfometrie	26
4. VÝSLEDKY	28
4.1 Analýza relativních warpů (PCA)	28
4.1.1 Analýza relativních warpů pro <i>Trachelomonas hispida</i>	28
4.1.2 Analýza relativních warpů pro <i>Trachelomonas armata</i>	30
4.2 Diskriminační kanonická analýza (CVA).....	33
4.3 Chemická analýza vody	35
5. DISKUSE	36
6. ZÁVĚR	39
7. SEZNAM LITERATURY	40
7.1 Internetové zdroje a programy	47
7.1.1 Internetové zdroje	47
7.1.2 Programy.....	47

1. ÚVOD

1.1 Krásnoočka

Fotosyntetická krásnoočka (Euglenophyceae) jsou široce rozšíření, jednobuněční bičíkovci třídy Euglenida (Bicudo & Menezes, 2016). Krásnoočka spadají do superskupiny Discoba, která mimo jiné zahrnuje například Heterolobosea, Diplonema, Kinetoplastida patřící mezi prvoky (Adl et al., 2019). Euglenida jsou blízce příbuzní skupině Kinetoplastida (Esson & Leander 2006), do které patří mnozí lidscí parazité, například *Trypanosoma* a jí blízce příbuzný *Bodo* (Jackson et al., 2008). Euglenida sdílejí s bičíkovci skupiny Kinetoplastida reliktní znaky a společně formují dvě hlavní podskupiny v rámci velké skupiny Euglenozoa (Esson & Leander, 2006).

Euglenida

Zástupci spadající do již zmiňované třídy Euglenida zastávají důležitou roli producentů a konzumentů jak ve sladkovodních, tak mořských biotopech (Weitere, 2018). Fagotrofní (tj. bakteriovorní nebo eukaryovorní) mohou obývat jak sladkovodní, brakické tak i mořské biotopy. Vznášejí se ve vodním sloupci, kde chytají potencionální potravu. Pro osmotrofní a fotoautotrofní linie je význačný výskyt zejména ve vodním sloupci sladkovodních biotopů. Výskyt fotoautotrofních druhů ale není zcela omezen jen na sladké stojaté vody. Některé fotoautotrofní druhy mohou obývat také brakické vody a ústí řek, buď plavou ve vodním sloupci, nebo setrvávají v sedimentech. Jen velmi malé množství fotoautotrofních druhů je součástí mořského planktonního společenstva. Jde například o Eutreptiales, bazální linii v rámci Euglenophyceae, nebo o druh *Euglena rustica* (Leander et al., 2017).

Pohyb krásnooček je zajišťován tažnými bičíky, které vycházejí z ampuly. Jsou tvořeny paraxonemálními tyčinkami a podélnou axonemou (Leander et al., 2017). Na povrchu bičíku se vyskytují krátká vlákna zvaná mastigonemata, která jsou tvořena glykoproteiny (Grain et al., 1988). Většina Euglenid má dva bičíky, ale vyskytují se zde i výjimky. Například někteří zástupci rodu Eutreptiales, kteří mohou mít čtyři viditelné bičíky (Leander et al., 2017). Všichni zástupci rodu Euglenales (například *Euglena*, *Phacus*, *Trachelomonas*) mají jeden dlouhý bičík, který je funkční při plavání, a druhý bičík, který nevychází z ampuly (Leedale, 1962).

U fagotrofních zástupců k otvoru bičíku přiléhá potravní aparát neboli MTR pocket, který je určen k chytání a požívání kořisti (většinou bakterií) (Triemer & Farmer, 1991).

Všichni zástupci krásnooček disponují částí cytoskeletu, takzvanou pelikulou. Tato specifická vrstva je evoluční novinkou u krásnooček (Leander et al., 2017). Sestává z určitého počtu bílkovinných proužků tvořených skupinou proteinů zvaných artikuliny (Marrs & Bouck, 1992). Tyto proužky jsou propojené pomocí mikrotubulů (Leander et al., 2017) a táhnou se od anteriorního (předního) po posteriorní (zadní) konec (Esson & Leander, 2008). Proužky pelikuly se mohou formovat podélně nebo šroubovitě. Podélně uspořádané proužky jsou pevně spojeny s jednotlivými buňkami, a tudíž nemohou měnit svůj tvar. Naproti tomu šroubovitě uspořádané proužky jsou mezi sebou propojeny zvláštním způsobem. Je mezi nimi artikulační zóna, která umožňuje takzvaný euglenoidní pohyb. Tento pohyb je způsoben klouzáním na spojích mezi proužky a taktéž je přirovnáván k peristaltickému pohybu střev (Leander et al., 2001).

Množství pelikulárních proužků se u různých zástupců liší. Jejich metabolie a počet závisí především způsobu, kterým daný organismus získává živiny (Leander, 2004). Nejnížší počet pelikulárních proužků (8–10–12) mají bakteriovorní druhy. Proužky srůstají do pevné rigidní pelikuly. U eukaryovorních druhů je počet proužků o něco vyšší (20–60). Pohybují se klouzavým (euglenoidním) pohybem, aby umožnili metabolii. Fotoautotrofní a sekundárně osmotrofní druhy mají od 16 do 120 proužků pelikuly a jsou schopné metabolie. Některé fotoautotrofní a sekundárně osmotrofní druhy mohou mít sekundárně rigidní pelikulu (Leander et al., 2017).

Euglenophyceae

Ke vzniku euglenoidních fototrofů (Euglenophyceae) došlo při sekundární endosymbióze, kdy heterotrofní eukaryovor pozřel zelenou řasu (Hjorth et al., 2004). To vedlo nejen k přítomnosti chloroplastů v eukaryovorním hostiteli, ale také k velkému množství dalších adaptací, například schopnosti udržet se ve fototické zóně (Leander, 2004).

Chloroplasty krásnooček jsou samy o sobě zelené a ohraničené třemi membránami. Většina plastidů krásnooček obsahuje nápadný pyrenoid, jehož součástí je enzym RuBisCO. Výjimku tvoří malé diskoidní chloroplasty rodů *Discoplastis*, *Lepocinclis*, *Phacus* a *Euglenaformis*, které pyrenoidy zcela postrádají (Leander et al., 2017). Tylakoidy jsou

přítomny ve trojicích a obsahují chlorofyl *a* i chlorofyl *b*, který je přítomen v menším množství (Cavalier-Smith, 1981). K ukládání zásobních látek slouží u krásnooček paramylonová zrna. Ta se nacházejí v buňce ve formě krystalizovaných sacharidů β -1,3-glukanu. Jsou rozmístěna po celé cytoplazmě a velmi často jsou spojena s pyrenoidy. Plastidy, ve kterých se pyrenoidy nachází na obou stranách, se nazývají diplopyrenoidní a plastidy s pyrenoidem na jedné straně haplopyrenoidní (Leander et al., 2017).

Nefototrofní výjimkou Euglenophyceae jsou bezbarvá krásnoočka, která druhotně ztratila svou schopnost fotosyntetizovat, a bazální *Rapaza*, která svým mixotrofním typem metabolismu kombinuje heterotrofní a fototrofní způsob výživy (Bicudo & Menezes 2016).

Všichni jedinci (Euglenophyceae) mohou reagovat na intenzitu a směr světla a podle toho se mohou orientovat ve vodním sloupci (Kuznicki et al., 1990). To je zajišťováno fotorecepčním aparátem, který je používán k fototaxi. Fotorecepční aparát je složen z rozšířené kapsy bičíku zvané rezervoár, fotosenzorického zduření (ampule) na bázi dorzálního bičíku a v neposlední řadě ze stínicí struktury založené na bázi karotenoidů, konkrétně beta karotenoidů – stigma (Leander, 2004).

1.1.1 Charakteristika rodu *Trachelomonas*

Rod *Trachelomonas* je v rámci Euglenophyceae součástí Euglenales a dále se řadí do čeledi Euglenaceae (Bicudo & Menezes 2016).

Společně se *Strombomonas* je na rozdíl od ostatních rodů, které spadají do Euglenophyceae, vybaven pevnou schránkou zvanou lorika. Monáda (buňka) uvnitř loriky má výlučně euglenoidní formu buňky a je schopná se uvnitř loriky volně pohybovat, na rozdíl od jiných lorikálních rodů, jako je *Ascoglena*, která je v posteriorní části k lorice pevně připojena. Ačkoliv jsou druhy nejčastěji popisovány na základě morfologie loriky (Rosowski, 2003), Pringsheim (1953) uvedl možnost popisovat druhy i na základě chloroplastů.

Jedinci *Trachelomonas* mají ve většině případů fototrofní typ metabolismu a disponují tedy chloroplasty, které se zde vyskytují v počtech od 1 do 15 (Rosowski, 2003). Chloroplasty mohou být malé diskoidní bez pyrenoidů a s rozptýlenými paramylonovými zrny, nebo větší štítovité, které mají pyrenoidy s paramylonovými čepičkami, nebo bez nich (Pringsheim, 1953). V některých případech se vyskytují i bezbarvé formy s osmotrofním typem metabolismu, které zcela postrádají chloroplasty (Pringsheim, 1957).

V této práci se zabývám především dvěma druhy, a to *Trachelomonas hispida* a *Trachelomonas armata*.

Trachelomonas hispida je běžně a kosmopolitně vyskytující se druh, který je přítomen v různých typech vod, jako například rybnících, mokřadech nebo kalužích (Wołowski & Walne, 2007). Lorika může být tmavě i světle zbarvená, oválná až eliptická, většinou pokrytá dlouhými špičatými trny. Otvor, kterým vychází bičík, je často lemován trubicovitým límcem. Samotný bičík může až dvojnásobně přesahovat délku schránky (Poniewozik, 2018). Buňka uvnitř loriky disponuje 8–10 diskovitými chloroplasty většinou s pyrenoidy, nebo bez nich (Wołowski & Walne, 2007).

Výskyt druhu *Trachelomonas armata* je zaznamenán kosmopolitně nejčastěji v rybnících, jezerech, nebo dokonce příkopech a tento druh je považován za běžně se vyskytující. Má široce elipsoidní, až ovoidní tvar loriky se zřetelným zúžením v anteriorní části, kde se mohou v některých případech vyskytovat krátké trny. Otvor bičíku je obklopený krátkým prstencovým zesílením. Posteriovní část je široce zaoblená a většinou jsou zde přítomné robustní trny (Kim et al., 2000; Dillard, 2000). Bičík je až dvojnásobně delší než samotná lorika. Chloroplasty jsou přítomné ve vysokých počtech, většinou bez pyrenoidů (Kim et al., 2000)



Obr. 1: *Trachelomonas hispida* vyfotografovaná pod světelným mikroskopem (Olympus BX51, orig.). **Obr. 2:** *Trachelomonas armata* vyfotografovaná pod světelným mikroskopem (Olympus BX51, orig.).

1.1.2 Schránka *Trachelomonas*

Schránka *Trachelomonas*, neboli lorika, je extracelulární struktura vznikající na povrchu euglenoidní monády, která izoluje monádu od vnějšího prostředí. Slouží především jako ochrana před potencionálními predátory, kterým znesnadňuje konzumaci monády. Dále jako ochrana před znečištěním, tím, že je využívána jako filtr vody, která vstupuje dovnitř. Schránky jsou velmi variabilní a v současné době je na nich z velké části postavená taxonomie rodu (Pereira & Azeiteiro, 2003).

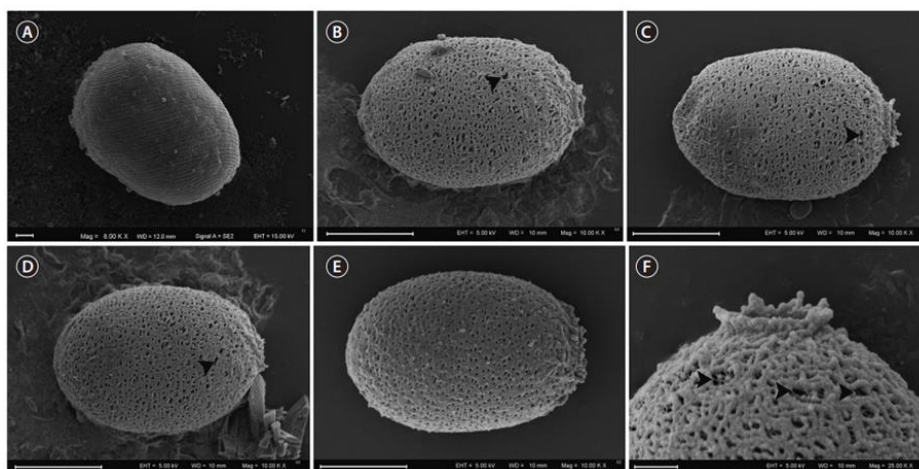
1.1.2.1 Formace schránky

Loriku si každá mateřská buňka musí tvořit *de-novo*, to znamená, že proces její tvorby začíná poté, co mateřská buňka opustí loriku a buněčným dělením vzniknou dvě dceřiné buňky (Poniewozik et al., 2018). Proces tvorby loriky, jehož průběh se u konkrétních druhů může lišit. Formace loriky by nebyla možná bez mukopolysacharidů, které jsou produkovány po celé buňce prostřednictvím slizových tělísek (Conforti et al., 1994). Nejprve se začne tvořit tenká hyalinní membrána, která je v pozdějších fázích díky přítomnosti slizových tělísek mineralizována (Pereira & Azeiteiro, 2003).

Způsob produkce slizu je u konkrétních druhů odlišný. Některé druhy ukládají sliz mimo tuto membránu, zatímco jiné jej ukládají vnitřně (Pereira & Azeiteiro 2003). Například u *T. reticulata* je sliz produkován podél každého pásu pelikuly a postupně tvoří síťovitý útvar. Výsledná mineralizovaná lorika má poté spirálovitou strukturu (Brosnan et al., 2005). Naopak *T. oblonga* var. *punctata* ukládá sliz dovnitř (Pereira & Azeiteiro 2003). Tento, složitější způsob formace probíhá zpočátku identicky jako u zmíněné *T. reticulata*. V raném vývojovém stádiu je tvořen vláknitý síťovitý útvar, skrz který je později vylučován další sliz (Brosnan et al., 2005). Dále dochází k odbourání počáteční membrány a procesem mineralizace se tvoří lorika, která akumuluje minerály ve formě granulí a tvoří tak pevnou pórovitou strukturu (Pereira & Azeiteiro 2003).

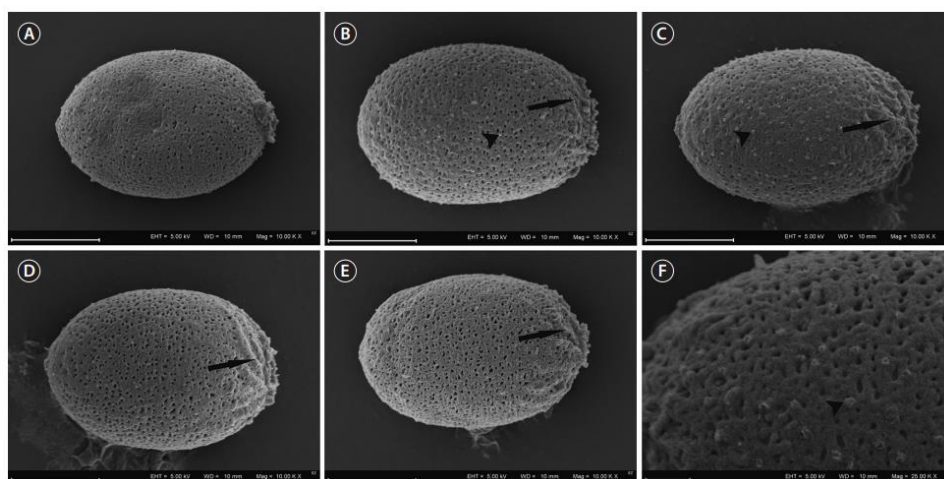
Mladé loriky jsou na počátku svého vývoje zcela bezbarvé. Jejich struktura je velmi tenká, křehká a vzhledem připomíná síť s velkými oky. Struktura této síťované vrstvy se v průběhu vývoje stává hustší. Lorika začíná akumulovat ionty z vody, a proto má v této fázi vývoje dvě vrstvy. Vnitřní, kterou tvoří počáteční, již zmiňovaná, hyalinní lorika, a vnější granulovanou vrstvu, která podléhá procesům mineralizace. Akumulace iontů začíná

v některých případech na předním (anteriorním) konci loriky a postupuje k zadnímu (posteriornímu) konci (Poniewozik et al., 2018).



Obr. 3: Proces tvorby loriky. Snímky *Trachelomonas hispida* v raných fázích vývoje z elektronové mikroskopie. (A) mladá buňka bez loriky po procesech buněčného dělení, (B–D) tvorba tenké hyalinní perforované loriky, (E–F) tvorba druhé mineralizované vrstvy (Poniewozik et al., 2018, upraveno).

Lorika plně vyvinutých zástupců *Trachelomonas* nabývá pevné, silné a méně průhledné struktury s malými póry. Po ukončení procesů mineralizace dojde k odbourání vnitřní hyalinní vrstvy. Ve většině případů je schránka zbarvená a na svém povrchu tvoří trny nebo výběžky (Poniewozik et al., 2018).



Obr. 4: Proces tvorby loriky. Snímky plně vyvinuté loriky *Trachelomonas hispida* z elektronové mikroskopie. (A) límec okolo apikálního otvoru, (B–E) tvorba spirálních žebér v okolí apikálního otvoru (znázorněna protáhlou šipkou), (B, C a F) tvorba granulí na stěně loriky (znázorněna malou šipkou) (Poniewozik et al., 2018, upraveno).

1.1.2.2 Chemické složení a zbarvení schránky

Chemické složení loriky je rozdílné nejen v rámci jednotlivých druhů, ale i vnitrodruhově. V průběhu svého vývoje loriky akumulují ionty prvků v závislosti na charakteru okolního prostředí a stávají se z nich pevné struktury (Pereira et al., 2003).

Ve velkém množství se zde vyskytuje kyslík, uhlík, železo a dále jsou zde přítomné ionty fosforu, síry, křemíku, chloru, sodíku, draslíku a vápníku. Některé minerály, jako například zinek, hořčík, hliník, mangan, měď, nikl a titan, jsou přítomny v nízkých koncentracích (Pereira et al., 2003). Mezi hlavní prvky, které se zásadně podílejí na stavbě loriky patří železo a mangan (West & Walne 1980), které se vyskytují společně v různých poměrech (Pereira & Azeiteiro 2003). Ionty železa obsažené v lorice zodpovídají za její růst a tvorbu výrůstků na povrchu. Loriky, které se vyskytují v prostředí bohatém na ionty železa, mají obvykle výraznější ornamentaci (Pereira et al., 2003). Ta je způsobená tím, že vlivem přítomnosti železa dochází k tvorbě hustých zrnitých usazenin a následně i výběžků na povrchu loriky. Dále se na ornamentaci loriky mohou podílet i ionty manganu, které ve zvýšených koncentracích mohou ukládat husté jehlicovité usazeniny (Dunlap & Walne 1987).

Zbarvení schránky na rozdíl od morfologických struktur není taxonomicky vhodným znakem, podle kterého lze spolehlivě odlišovat jednotlivé druhy nebo vnitrodruhové taxony. Přesto se jednotlivé druhy od sebe mohou lišit různými barevnými variantami nebo odstíny. Například *T. hispida* var. *coronata* se běžně vyskytuje v červenohnědém zbarvení, *T. nigra* je téměř černá a zbarvení a *T. rugulosa* se pohybuje někde v rozmezí těchto dvou barevných extrémů. Zbarvení loriky závisí především na přítomnosti organických látek, na okolním prostředí nebo stáří schránky. U konkrétních druhů se může nepatrně lišit (Pereira & Azeiteiro 2003).

Někteří autoři, například Dunlap et al. (1983) nebo Pringsheim (1953), tvrdí, že barva loriky je důsledkem jejího chemického složení, zejména vysokých koncentrací manganu. Dunlap et al. (1983), Dunlap & Walne (1987) a Donnelly (1979) prováděli pokusy na kulturách *Trachelomonas* a dospěli k podobným výsledkům. Loriky z média obohaceného o mangan měly v obou případech hustě jehlicovité struktury a tmavě zlatavou, až hnědou barvu. Oproti tomu loriky z média obohaceného o ionty železa měly granulované struktury a hyalinní, až světlehnědé zbarvení. Jiní autoři, například (Conforti et al., 1994, Wang et al., 2003), naopak vyvrátili teorie o tom, že by přítomnost manganu a železa měla nějaký vliv na zbarvení loriky.

Chemické složení loriky a jeho závislost na tvorbě struktur nebo zbarvení loriky je těžké přesně definovat. Byla prokázána přítomnost železa a křemíku a jejich vliv na ornamentaci. Ostatní prvky (společně s manganem) se vyskytují nepravidelně a jejich přítomnost se zdá být silně ovlivněna prostředím (Poniewozik, 2017).

1.1.2.3 Variabilita schránky

Lorika *Trachelomonas* nabývá obrovské fenotypové plasticity. Schránky se od sebe odlišují svojí velikostí, tvarem, vzhledem vnějších struktur, nebo i vnitřní stavbou a mají různé barevné varianty v závislosti na jejich chemickém složení (Poniewozik, 2017). Variabilita ve tvaru schránky může být zapříčiněna ekologickými faktory, jako jsou rozpuštěné ionty ve vodě, pH nebo vodivost. Kupříkladu zvýšená koncentrace železa ve vodním prostředí může ovlivnit vnější strukturu loriky zvyšováním počtu trnitých výběžků nebo granulovaných struktur na jejím povrchu (Dunlap & Walne 1987). Významnou roli hraje i rozdílný způsob formace loriky u konkrétních druhů. Pokud tvorba schránky probíhá jedním ze složitějších způsobů (viz formace loriky u *T. oblonga* var. *punctata*, zmíněno v kapitole formace schránky), může být ovlivněna její pórovitost a ornamentace (Brosnan et al., 2005).

Variabilita schránek se v první řadě projevuje v jejich celkovém tvaru, který je u konkrétních druhů *Trachelomonas* více, či méně odlišný. Pro determinaci některých druhů může být tvar schránky zásadní. Naopak u jiných druhů k tomu slouží jiné struktury (Dillard, 2000). Loriky mají značné tvarové rozpětí, od kulatých, až po složitější formy. Zcela kulaté schránky se objevují například u *T. volvocina* nebo *T. volvocinopsis*. Od zcela kulovitěho tvaru se mírně odlišují loriky *T. cervicula*, které jsou subsférické. Elipsoidní tvar mají loriky například *T. hispida* nebo *T. oblonga*. Široce elipsoidní loriky lze najít i u *T. armata* a *T. planctonica*. Dále existuje několik druhů oválných lorik, které mohou být například příčně nebo široce oválné. Příčně oválné můžeme vidět u *T. curta* a široce oválné u *T. rotunda*. U některých druhů se vyskytují obovoidní loriky, které mají například již zmiňované *T. rotunda*, vejčité u *T. armata* nebo obvejčité loriky. Dále válcovité loriky, které jsou k vidění například u *T. abrupta*. Mezi druhy, které mají poměrně ojedinělý tvar, patří například *T. caudata* s výrazným kaudálním výběžkem, kuželovitě protažená *T. conica* nebo větvenovitá *T. magdaleniana*. Dalšími ojediněle se vyskytujícími tvary jsou hruškovitý nebo pytlíkovitý tvar (Wołowski & Walne 2007).

Dalším prvkem, který značně ovlivňuje variabilitu schránky, je přítomnost vnějších struktur (Dillard, 2000). Jedná se například o límce nebo trny v okolí apikálního otvoru. Límce mohou být rovné nebo cylindrické a dosahují různých velikostí, jak do délky, tak do šířky. Loriky mohou mít kolem apikálního otvoru kromě límců i ohyby, prstencovité ztlustěliny nebo trny či výběžky. Loriky *Trachelomonas* mohou mít hladký povrch nebo se zde mohou vyskytovat různé struktury, například žebra nebo strie. Například u *T. punctata*, může mít lorika tečkovaný povrch. U zástupců *T. verrucosa* var. *granulata*, nabývá lorika silně granulované struktury. Po celém povrchu loriky mohou být výběžky, které mají několik různých typů. Od krátkých a úzkých trnů přes papily až po dlouhé a široké nebo kónické trny, které mohou být ostré nebo tupé. Jejich distribuce je různá a mohou být například rozmístěné pouze sporadicky jako u *T. globularis*, nebo pravidelně po celém povrchu, jako je tomu u *T. hispida* (Wołowski & Walne 2007).

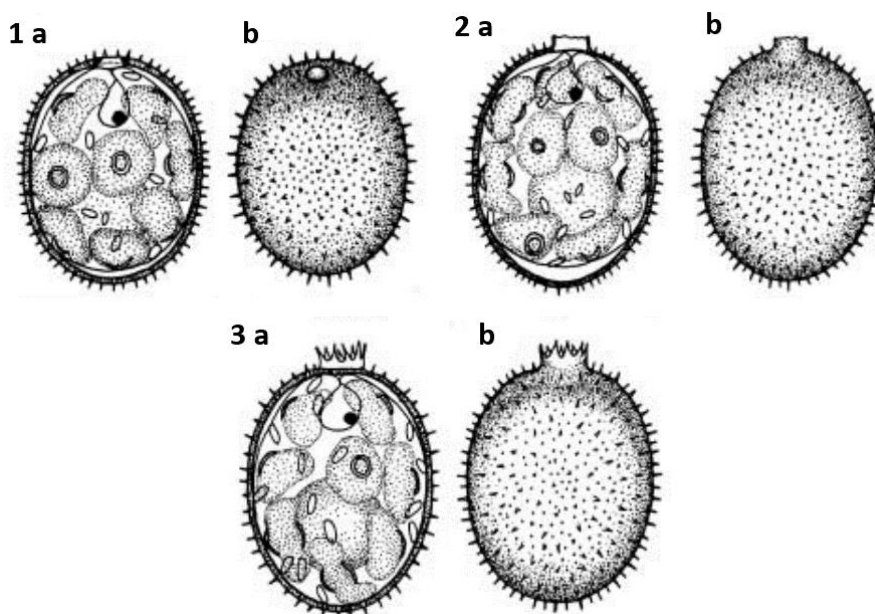
Podle Poniewozik et al. (2018) hrají výběžky nebo trny na stěnách loriky důležitou roli, protože mohou být v přírodních podmínkách buňkou využívány k obraně před zachycením a pozřením predátory. Navrhují, že výběžky zvětšují povrch loriky a zároveň její vztlak. Společně s jinými strukturami, jako jsou dlouhé zakřivené límce u *T. volvocinopsis* nebo vrásčitá struktura loriky u *Strombomonas* potenciálně snižují rychlost potápění a pomáhají se lépe vznášet ve vodním sloupci. V případě druhů z kulturních podmínek docházelo k absenci trnů či jiných struktur, protože v kultuře na zástupce *Trachelomonas* nepůsobil žádný selekční tlak v podobě predátorů (Poniewozik et al., 2018).

Schránky *Trachelomonas* nabývají u konkrétních druhů různých velikostí. Velikosti loriky jsou v případě kulatých zástupců měřeny jako jejich průměr (Wołowski & Walne 2007). Nejmenších a zároveň i největších velikostí loriky v rozmezí 5–32 μm dosahuje v rámci kulatých zástupců *T. volvocina* (Dillard, 2000). V případě ostatních zástupců je měřena délka a šířka loriky (Wołowski & Walne 2007), přičemž nejmenší zástupci *T. oblonga* dosahují na délku 12–19 μm a 10–13 μm na šířku. Naopak mezi největší zástupce patří *T. superba*, která má na délku 38–55 μm a na šířku 30–39 μm a *T. armata* o rozměrech 37–54 μm na délku a 22–39 μm na šířku (Dillard, 2000).

Variabilita *Trachelomonas hispida*

Trachelomonas hispida má velké množství různých variant a forem. Celkově bylo popsáno 31 vnitrodruhových taxonů (Guiry & Guiry 2023). Lorika *T. hispida* má většinou pravidelně eliptický tvar. V mnoha případech se může vyskytovat i podélně eliptický nebo obvejčitý tvar. Známa je i varianta s viditelným prodloužením loriky na posteriorním konci. Po celém povrchu loriky se zpravidla nacházejí ostny nebo malé bradavičky. Existují varianty s límcem na anteriorním konci, nebo zcela bez něj. Límec může být bez zjevných struktur, lemován záhyby, žebry nebo trnitými výběžky a může mít různou délku. Někdy je jen velmi krátký, jindy delší a po obvodu ozubený (Poniewozik, 2018).

Mezi nejhojněji se vyskytující variety patří například *Trachelomonas hispida* var. *hispida*, která zcela postrádá límec a po celém svém povrchu má krátké a ostré trny (Wołowski & Walne 2007). Další běžně se vyskytující varietou je *Trachelomonas hispida* var. *coronata*, jejíž povrch je pokrytý ostny a vyznačuje se dlouhými trny v apikální části loriky, které svým vzhledem připomínají korunu. Mezi další poměrně běžně se vyskytující variety patří *Trachelomonas hispida* var. *granulata*, jejíž povrch není pokrytý ostny, ale malými jemnými granulemi (Poniewozik, 2016). Za zmínku stojí i *Trachelomonas hispida* var. *crenulatocollis*, která má v porovnání s var. *coronata* poměrně kratší a válcovitý límec se zubatým okrajem (Kim et al. 2000).

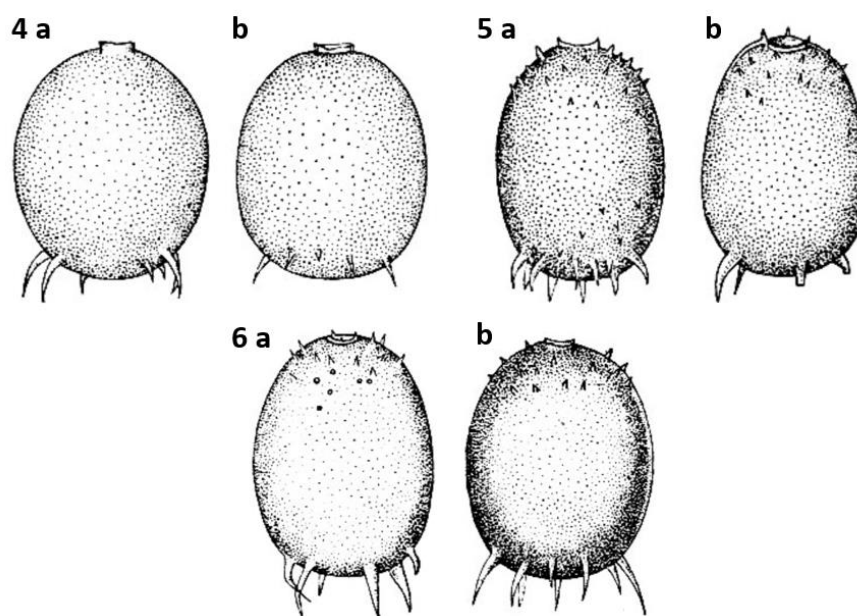


Obr. 5: Příklady variet *Trachelomonas hispida*. (1 a, b) *Trachelomonas hispida* var. *hispida*, (2 a, b) *Trachelomonas hispida* var. *crenulatocollis* (3 a, b) *Trachelomonas hispida* var. *coronata*. (Kim et al., 2000, upraveno).

Variabilita *Trachelomonas armata*

Trachelomonas armata má stejně jako *T. hispida* mnoho různých variant. Celkově bylo popsáno 22 vnitrodruhových taxonů (Guiry & Guiry 2023). Schránky jsou většinou elipsoidní, až vejčité se zúženým anteriorním koncem a široce zaobleným posteriorním koncem. Anteriorní konec je u některých typů rovný, u jiných se mohou objevovat ztlustěliny, nízký límec nebo ostré ostny v jeho okolí. Na posteriorním konci loriky se vyskytuje prstenec zahnutých dlouhých ostnů, které mohou být v některých případech redukovány. Povrch schránky je hladký nebo tečkovaný (Dillard, 2000).

Běžně se vyskytující varieta *Trachelomonas armata* var. *armata* může mít v okolí apikálního otvoru prstencové zesílení, které je někdy mírně ozubené. V posteriorní části se vyskytuje několik kónických trnů, které mají různé velikosti (Kim et al., 2000). Další varieta, jako například *Trachelomonas armata* var. *heterospina*, má v anteriorní části krátký límec, který je přímo obklopen asi 8 ostrými trny. Na předním konci loriky je několik krátkých trnů a na zadním konci se vyskytuje několik dlouhých, ale i kratších trnů. Varieta *Trachelomonas armata* var. *gorfieyii* na rozdíl od dvou předchozích variet nemá tak širokou loriku. Apikální otvor je obklopen krátkým límcem a kónickými ostny, v anteriorní části jsou taktéž přítomné krátké kónické ostny. Na posteriorním konci lze pozorovat delší a silnější kónické ostny (Wołowski & Walne, 2007). Další kosmopolitně běžně se vyskytující varietou je *Trachelomonas armata* var. *steinii*. Vyznačuje se nepravidelnými krátkými kónickými ostny v anteriorní části a široce zaoblenými a dlouhými robustními ostny v posteriorní části loriky (Kim et al., 2000).



Obr. 6: Příklady variet *Trachelomonas armata*. (4 a, b) *Trachelomonas armata* var. *armata*, (5 a, b) *Trachelomonas armata* var. *heterospina*, (6 a, b) *Trachelomonas armata* var. *steinii*. (Safonova 1987, upraveno).

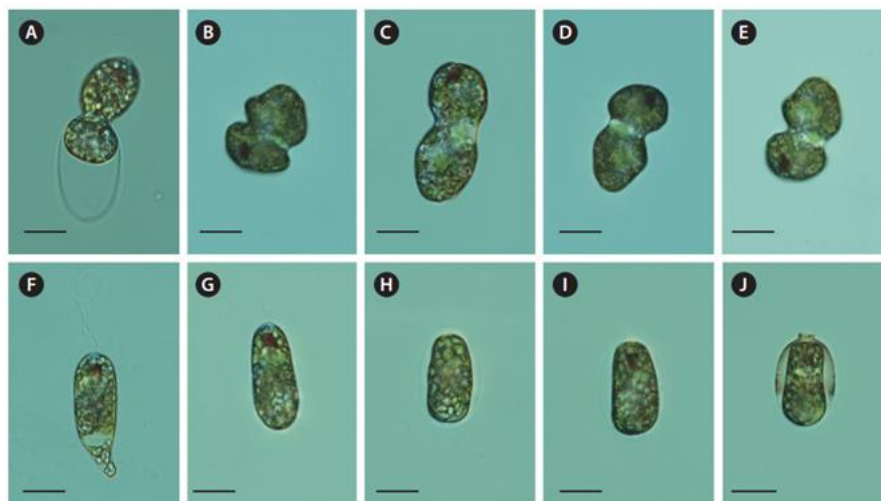
1.1.2 Životní cyklus *Trachelomonas*

Jediným potvrzeným reprodukčním mechanismem u krásnooček je buněčné dělení, kterým z dospělé mateřské buňky vznikají buňky dceřiné. Krásnoočka jsou uniparentální, tj. z každé mateřské buňky vznikají mitózou a cytokinezí buňky dceřiné. Dva nově vzniklé protoplasty mají mírně odlišnou velikost a jsou vzájemné klony. Dělení mateřské monády může nastat v pohyblivém, plazivém, palmeloidním nebo cystickém stádiu buňky a může mít různou podobu v závislosti na druhu (Rosowski, 2003).

Dělení mateřských buněk neboli cytokinezi předchází dělení buněčného jádra mitózou a uspořádání nového stigmatu pomocí rodičovských stigmatických granulí. Mateřská monáda je v této fázi pomyslně rozdělená na dva dceřiné protoplasty. Anteriorní protoplast má vlastní stigma, bičík a přední část kanálu, odkud bičík vychází. Vykazuje aktivní metabolismus, který je pravděpodobně impulzem pro to, aby monáda opustila loriku. To nastává ve fázi, kdy se dceřiný anteriorní protoplast začne stahovat a postupně vystupuje otvorem ven. Když je celá anteriorní buňka venku z loriky, metabolicky se projevuje a postupně nabývá normálního tvaru. Je stále ještě spojena s posteriorním protoplastem pomocí bezbarvého cytoplazmatického vlákna. Naopak dceřiný protoplast v posteriorní části loriky se vlivem pohybu anteriorního protoplastu natahuje a zcela vyplňuje vzniklý prostor v lorice. Obě buňky jsou od sebe po nějaké době konečně odděleny vlivem točení vnější buňky (Singh, 1956). V některých případech loriku opouští oba protoplasty (Rosowski, 2003). Tento způsob buněčného dělení je označován jako normální. Buňky se ovšem nemusejí rozmnožovat pouze tímto normálním způsobem buněčného dělení. Může docházet k různým modifikacím, které jsou v mnoha případech druhově specifické. Například u *T. variabilis* jsou oba dceřiné protoplasty organizovány uvnitř rodičovské loriky a následně se uvolní jejím rozbitím (Singh, 1956). Dceřiné monády si musejí vytvořit vlastní loriku *de-novo* a její vzhled a složení se v průběhu vývoje mění (Poniewozik et al., 2018).

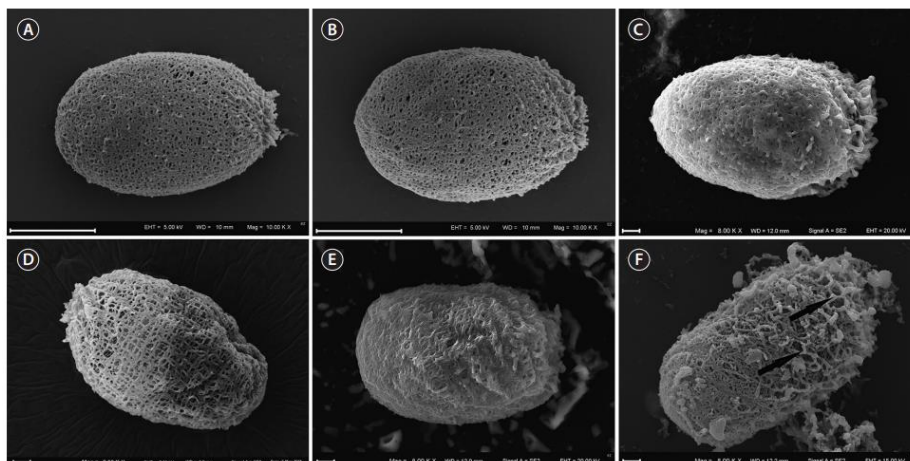
Nově vzniklá lorika má hladký a z velké části perforovaný povrch bez vnějších struktur a výběžků (Poniewozik et al., 2018). V průběhu dalšího vývoje je nasycená minerálními solemi z okolního prostředí (Pereira & Azeiteiro 2003). Zcela vyvinutá lorika je

mineralizována za pomoci iontů a tvoří pevnou strukturu. Společně s působením environmentálních faktorů, jako je pH, vodivost aj., mohou vznikat různé struktury, jako jsou ostny a různé výběžky (West & Walne 1980), viz kapitola 1.1.2.1 formace schránky.



Obr. 7: Procesy dělení a formace loriky *Trachelomonas hispida*. (A) monáda opouštějící loriku, (B–E) procesy buněčného dělení monády, (F a G) mladé monády po rozdělení, (H a I) formování tenké hyalinní loriky, (J) proces mineralizace od horního ke spodnímu konci loriky (Poniewozik et al., 2018, upraveno).

Na konci životního cyklu lorika podléhá mnoha změnám. V první řadě se mění její celková struktura. Jednotlivá vnější mineralizovaná vlákna se postupně rozvolňují od předního konce, odhalují vnitřní síťovitou strukturu a stávají se poněkud vrásčitými (West & Walne 1980). Struktura loriky je tedy opět síťovitá a rozvolněná jako na počátcích jejího vývoje a již neobsahuje mineralizovanou silnou vrstvu (Poniewozik et al., 2018). Rozdílná morfologie loriky závisí především na jejím stáří, ale i na fyzikálně-chemických faktorech okolního prostředí (West & Walne 1980).



Obr. 8: Snímky loriky *Trachelomonas hispida* na konci životního cyklu z elektronové mikroskopie. (A–E) lorika stále ještě s límcem a žebry okolo apikálního otvoru, (C–F) viditelná změna jejich tvaru, (F) vnější mineralizovaná vlákna se uvolňují (znázorněno šipkou) a odhalují vnitřní síťovitou strukturu. (Poniewozik et al., 2018, upraveno).

1.1.3 Morfologický a molekulární přístup k taxonomii *Trachelomonas*

V této kapitole jsou zmiňovány přístupy k taxonomii rodu *Trachelomonas*. Jsou porovnávány systémy *Trachelomonas* postavené na morfologických a molekulárních datech, které jsou diskutovány v rámci fylogenetických stromů. První z nich je založen na kombinovaných jaderných SSU, LSU a plastidových LSU rDNA sekvencích od autorů Jiang et al. (2022), druhý na SSU a LSU rDNA od autorů Ciugulea et al. (2008).

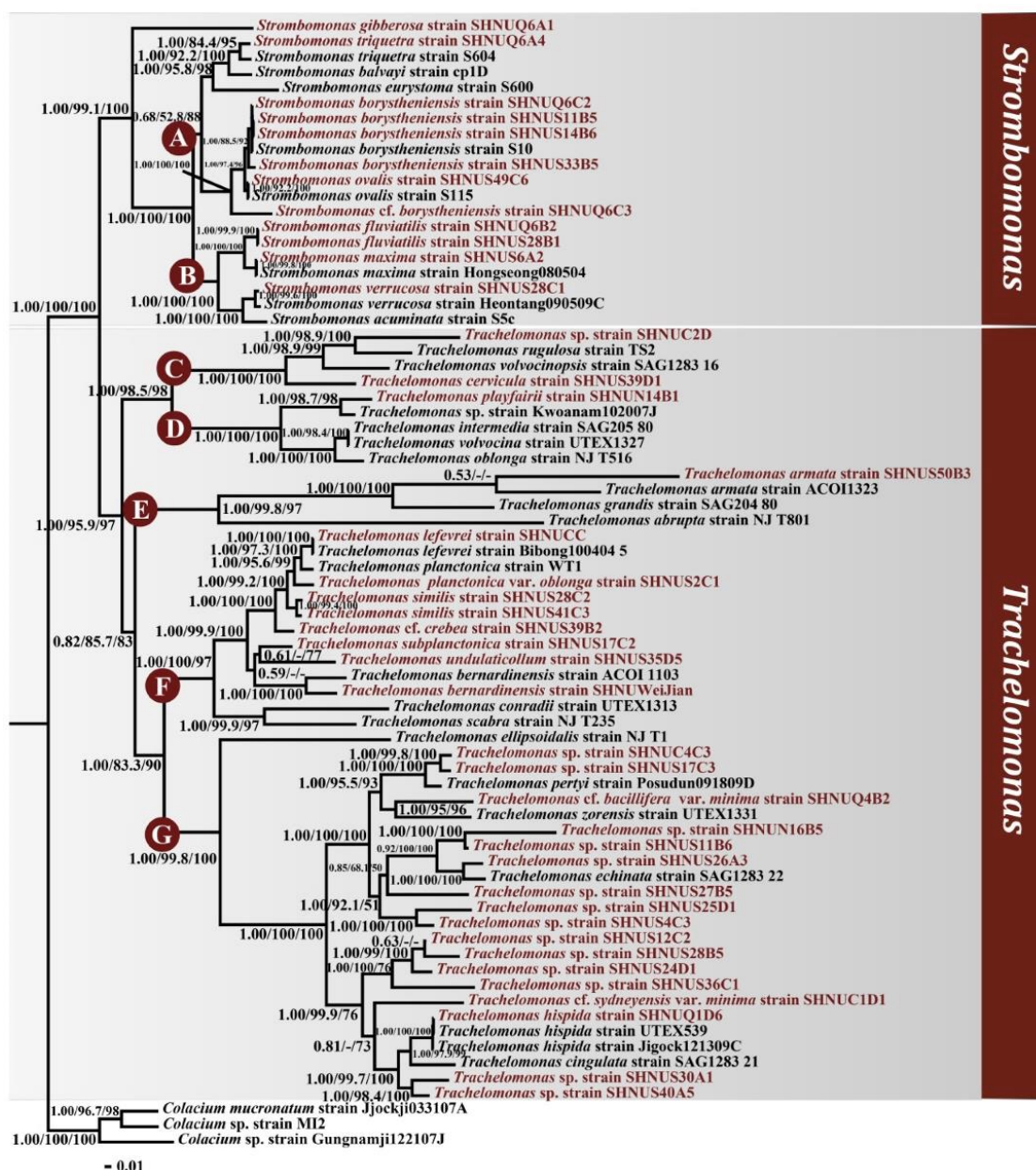
Taxonomie *Trachelomonas* je postavená nejen na morfologii loriky, ale také na charakteristikách protoplastů a molekulárních datech (Jiang et al., 2022). Podobně jako je tomu u jiných skupin, jsou i *Trachelomonas* náchylné k chybné identifikaci založené pouze na základě morfologických dat. Má to hned několik důvodů. Například velmi omezené množství morfologických znaků, vnitrodruhová modifikace v důsledku vlivu prostředí, absence pohlavního rozmnožování a v neposlední řadě i kryptická diverzita (Čalasan et al., 2020). Pojem kryptická diverzita v zásadě znamená, že zástupci morfologicky vypadají stejně, ale ve skutečnosti jsou jinými druhy (Čepička, 2019). V současné době jsou molekulární data dostupná pouze u 22 druhů z 374 popsáných druhů *Trachelomonas* (Guiry & Guiry 2023). V mnoha popsáných případech nejsou názvy druhů sjednocené a bývají často zastaralé bez autentických morfologických dat. Je proto důležité propojit morfologické a molekulární systémy a upřesnit názvy jednotlivých taxonů (Čalasan et al., 2020).

Pro pochopení morfologického systému *Trachelomonas* byly definovány determinační znaky v rámci konkrétních druhů. Nejobecnějším znakem je celkový tvar loriky, dále je důležitá přítomnost nebo absence límce nebo jeho různé podoby a formy. Přítomnost nebo absence trnů, výběžků, papil v okolí apikálního otvoru či po celém povrchu loriky a v neposlední řadě struktura loriky. V některých případech může být spolehlivým determinačním znakem i počet, tvar chloroplastů a přítomnost pyrenoidů (Dillard, 2000).

Trachelomonas jsou v rámci morfologického systému rozdělovány do dvou skupin. Rotundatae, kteří mají zaoblenou dolní část loriky a Caudatae, u kterých je lorika protažená do kaudální části. V rámci skupiny Rotundatae se rozdělují na dalších pět podsekcí: Sphaericae, Ellipticae, Ampulliformes, Sacctae a Longisetae (Huber-Pestalozzi, 1955). Tyto skupiny byly například autorem Shi et al. (1999) dále rozděleny podle ornamentace a tvaru loriky na skupiny: Volvocinae, Curtae, Oblongae, Cylindricae, Ovoidae, Hispidae, Pyriformes, Caudatae a Scabrae. Morfologický systém loriky popisují podrobně v kapitole 1.1.2.3 Variabilita schránky.

Podle molekulárního systému se dělí na pět silně podporovaných skupin neboli kladů podle fylogenetických stromů na obr. 9 a na obr. 10.

První fylogenetický strom podle autorů Jiang et al. (2022) obsahoval pět molekulárně podpořených kladů (C–G) kulturních populací *Trachelomonas*. V rámci bazálního kladu označeného jako C, měli zástupci kulturních populací *Trachelomonas* sp. kmene SHNUC2D, *T. regulosa*, *T. volvocinopsis* a *T. cervicula* kulaté loriky bez límců či trnů a více než pět chloroplastů s haplopyrenoidy. Zástupci *T. playfairii*, *Trachelomonas* sp. kmene Kwoanam102007 J, *T. intermedia*, *T. volvocina*, *T. oblonga* zařazení do kladu D, měli obdélníkovité loriky s límcem nebo ztlustěninami v oblasti apikálního otvoru. Schránky neměly žádné trny nebo výběžky a všichni zástupci měli 8–10 chloroplastů s haplopyrenoidy. Klad E zahrnuje tři blízce příbuzné druhy *T. abrupta*, *T. grandis* a *T. armata* mající oválný tvar schránky s trny a krátkými límci nebo prstencovitým ztlustěním v oblasti apikálního otvoru (Jiang et al., 2022).



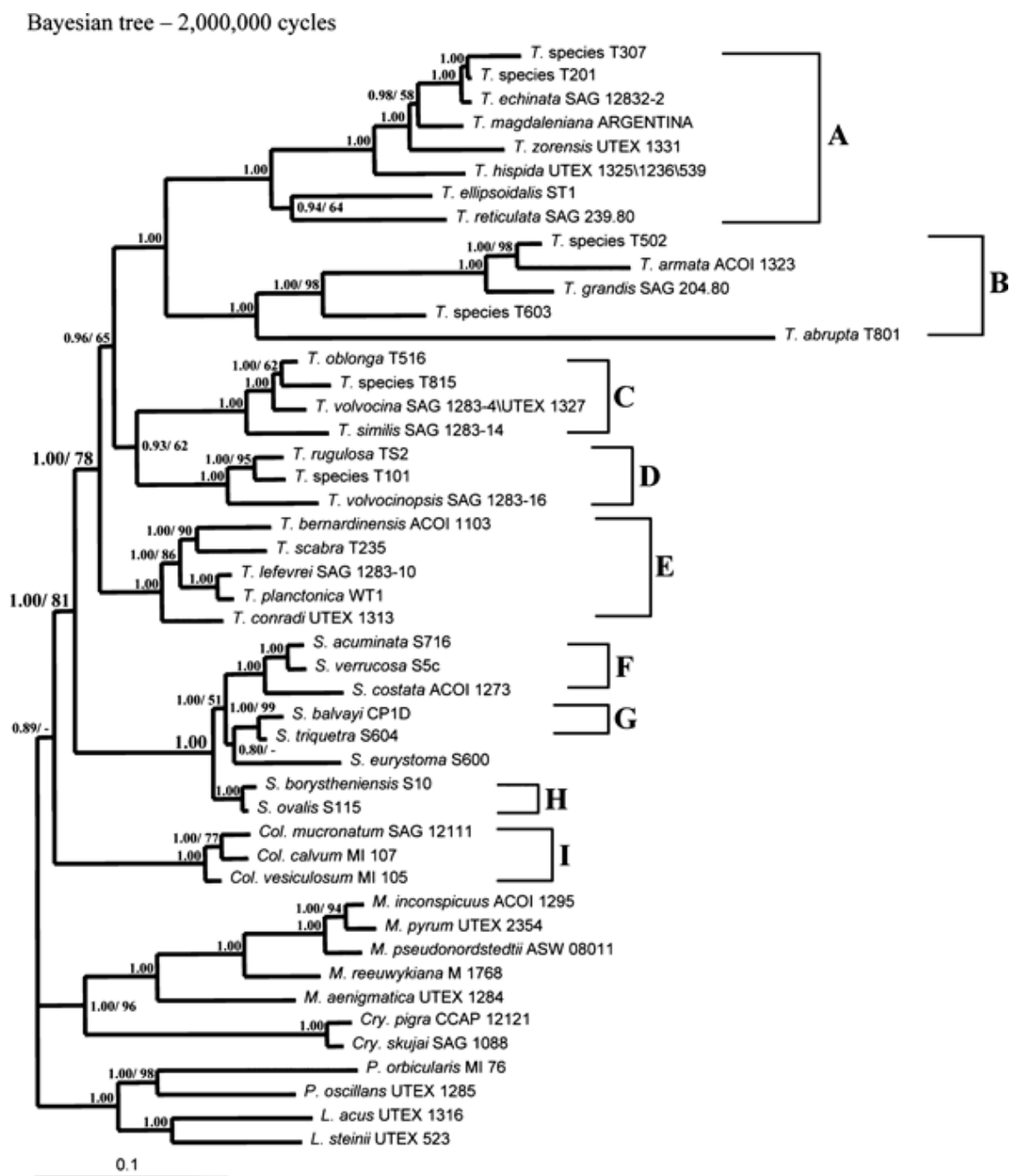
Obr. 9: Fylogenetický strom *Trachelomonas* a *Strombomonas* založený na kombinovaných jaderných SSU, LSU a plastidových LSU rDNA sekvencích (Jiang et al., 2022).

Klad F obsahuje 9 druhů a je rozdělen na několik větví. *T. lefevrei*, *T. planctonica*, *T. planctonica* var. *oblonga*, *T. similis* a *T. cf. crebea* jsou součástí jedné větve. *T. subplanctonica*, *T. bernardinensis* a *T. undulaticollum* jsou součástí druhé větve a *T. conradii* a *T. scabra* zaujímají pozici v rámci odštěpené bazální větve tohoto kladu. Zástupci tohoto kladu měli kulatou nebo oválnou loriku s malými límcí nebo prstencovitým zesílením v oblasti apikálního otvoru. Byla zde pozorovaná absence trnů a buňky měly 7–18 chloroplastů s haplopyrenoidy (Jiang et al., 2022).

Do kladu **G** bylo zahrnuto 11 druhů v rámci kulturních populací *Trachelomonas*. Jediným nezávislým druhem je *T. ellipsoidalis*. Druhy, které jsou součástí tohoto kladu mají největší morfologickou diverzitu. Loriky nabývají obdelníkových, kulatých, eliptických až zcela kulatých forem, které mají na povrchu trny nebo výběžky. Mohou mít krátké límce, nebo prstencovité zesílení. Buňky obsahují chloroplasty, mající haplo- nebo diplopyrenoidy (Jiang et al., 2022).

Z výše popsaných tvarových charakteristik kulturních populací vyplývá, že klady **C–F** mají nějaký morfologický vzorec a druhy jsou si tedy svou tvarovou charakteristikou blízké. V rámci těchto kladů jsou morfologická a molekulární data podobná. Klad **G** je velmi tvarově různorodý a zahrnuté druhy nemají jasný morfologický vzorec. Tento klad tedy nelze považovat za shodný s molekulárními daty (Jiang et al., 2022).

Druhý fylogenetický strom podle autorů Ciugulea et al. (2008) rozděluje *Trachelomonas* v rámci molekulárního systému opět do pěti kladů označených (**A–E**). V tomto fylogenetickém stromě je pořadí charakterizovaných kladů naopak. Klad **A** je nejodvozenější a klad **E** nejbanálnější. Druhy, které měly na svých lorikách ostny, výlučně spadaly do kladů **A** a **B** s výjimkou druhů *T. reticulata* a *T. grandis*, u kterých se trny nevyskytovaly. Všechny druhy v kladu **A** měly eliptické loriky s límcem nebo prstencovými ztlustěninami a chloroplasty s pyrenoidy a paramylonem po obou stranách (diplopyrenoidy). Výjimkou v rámci kladu **A** byla *T. reticulata*, která zde druhotně ztratila chloroplasty. U ostatních kladů (**B–E**) byly přítomné haplopyrenoidy. Druhy, které byly zařazeny do kladu **B** si byly velmi podobné tvarem a velikostí a lišily se od sebe jen mírně v ornamentaci loriky. Většina druhů v rámci tohoto kladu měla vejčité loriky s mohutnými ostny převážně na zadním konci loriky. *T. abrupta* se v rámci tohoto kladu zásadně odlišovala svým eliptickým tvarem loriky od zbytku druhů. Klad **C** zahrnoval převážně malé kulaté až eliptické loriky s hladkým povrchem a výrazným prstencovitým ztlustěním nebo malým límcem v oblasti apikálního otvoru. Součástí kladu **D** byly tři morfologicky velmi podobné druhy s hladkým či drsným povrchem loriky bez viditelné ornamentace. Největší morfologická diverzita byla pozorována u druhů, které byly součástí kladu **E**. Loriky tohoto kladu nabývaly oválných až vakovitých forem s různě dlouhými límcem v apikální části loriky (Ciugulea et al., 2008).



Obr. 10: Fylogenetický strom zahrnující *Trachelomonas* založený na SSU a LSU rDNA sekvencích. (Ciugulea et al., 2008)

Z charakteristik tohoto fylogenetického stromu je zjevné, že klad **A** až na výjimky (*T. reticulata* a *T. grandis*) má silný morfologický vzorec týkající se přítomnosti ostnů a diplopyrenoidů v chloroplastech. Ostatní klady **B–E** mají haplopyrenoidy. Klad **B** má zcela zřejmou tvarovou charakteristiku. Oproti ostatním kladům je klad **E** velmi tvarově variabilní a nelze ho s molekulárními daty srovnávat (Ciugulea et al., 2008).

1.2 Geometrická morfometrika

Geometrickou morfometriku neboli vědu o tvarech popsal na konci 20. století Fred Bookstein v knize *Geometric Tools for Morphometric Data*. Její předchůdkyně klasická morfometrika byla v minulosti nezbytnou součástí vědecké práce. Tato forma morfometriky je založená pouze na vzdálenostech jednotlivých struktur a úhlech mezi nimi. Kvůli své jednotvárnosti, která je způsobená individuálním měřením struktur, špatně vypovídá o zákonitostech vývoje, a proto byla nahrazena geometrickou morfometrikou (Neustupa, 2006).

Základem geometrické morfometriky jsou **D’Arcy Thompsonovy transformační mřížky**. Transformacemi těchto souřadnicových mřížek lze matematicky vyjádřit i proměny velmi složitých tvarů (Neustupa, 2006). Pro tvarovou analýzu jsou nezbytné takzvané **landmarky**, které se digitálně umísťují po obvodu zkoumaného objektu, a každý jeden landmark zaujímá konkrétní souřadnice. Umístění těchto landmarků je zcela nenáhodné a má určitá pravidla. V první řadě musí být landmarky vzájemně homologické, to znamená, že jejich poloha musí být shodná u všech analyzovaných objektů. V celém souboru sledovaných objektů budou mít landmarky stejnou polohu. Významným kritériem je i konkrétní umístění landmarků. To hraje zásadní roli v pozdějších analýzách tvaru, a je proto důležité, aby landmarky byly umístěny na místo, které je něčím specifické a lze ho snadno identifikovat u všech zkoumaných objektů. Typickým příkladem může být roh nebo průsečík dvou linií. Dále je důležité v dostatečné míře charakterizovat tvar zkoumaného objektu nebo jeho části a zvolit vhodný počet landmarků. Nelze opomenout ani důležitost dodržování správného pořadí, ve kterém jsou landmarky digitalizovány. Výše zmíněné charakteristiky landmarků odkazují na takzvané pevné nebo fixní landmarky (Zelditch et al., 2004).

Druhý typ je označován jako semilandmarky, jejichž účelem je zachytit tvar v místech, jako jsou například křivky nebo povrchy kam pevné landmarky nelze umístit. Semilandmarky jsou digitalizovány ve větších počtech mezi pevnými landmarky (Barbeito-Andrés et al., 2012).

Poté, co je soubor zkoumaných objektů počítačově digitalizován za pomoci landmarků, následuje takzvaná **prokrustovská analýza**. Jejím cílem je porovnat všechny digitalizované objekty v souboru dat a zajistit, aby vzdálenosti mezi landmarky, které se navzájem shodují, byly v souhrnu co nejmenší. Každý digitalizovaný objekt lze libovolně posouvat, otáčet nebo zmenšovat či zvětšovat, ale pozice landmarků zůstává stále stejná. Po provedení prokrustovské

analýzy zůstane u každého objektu pro každý landmark tzv. **zbytková vzdálenost**. Tedy vzdálenost příslušného landmarku od průměrného objektu celé sady, která poskytuje informace o tvaru každého jednotlivého zkoumaného objektu (Neustupa, 2006).

Pro analýzu zbytkových vzdáleností se využívá metoda **thin – plate – spline** neboli analýza ohebných plátů. Pomocí této metody je možné popsat konkrétní změny poloh jednotlivých landmarků a zjistit, jak a kde se v daném souboru objektů mění tvar. Metoda thin – plate – spline je založena na výpočtech pomocí geometrické funkce, která modeluje změny tvaru celého objektu jako „zmuchlání“ hypotetického dokonale tenkého a pružného plechu (Neustupa, 2006). Tato funkce je spojitá a mapuje body jednoho tvaru na odpovídající body jiného tvaru (Zelditch et al., 2004). Morfologické změny mezi dvojicí objektů jsou znázorněny pomocí D’Arcy Thompsonových transformačních mřížek (Neustupa, 2006). Snímky z transformačních mřížek lze využít například pro obrazové znázornění výsledků (Zelditch et al., 2004).

Za pomoci výše popisovaných geometricko-morfometrických metod lze modelovat celkovou změnu tvaru mezi jednotlivými páry objektů ve zkoumaném souboru. Pokud je takto popsán celý soubor a jsou k dispozici všechny informace o vzájemných tvarových změnách mezi objekty, lze definovat **tvaroprostor**. Tvaroprostor je hypotetický dvou-, tří- nebo i mnohorozměrný prostor, ve kterém probíhá veškerá změna tvaru a lze ho popsat podle význačných os. Osy tvaroprostoru mohou popisovat určité procento tvarové variability a lze je tedy považovat za trendy, podle kterých k tvarovým transformacím v souboru dochází (Neustupa, 2006).

Nástroje geometrické morfometricky jsou v současné době považovány za nejsofistikovanější v analýze biologických tvarů. Tyto nástroje jsou využívány zejména v oblastech organické biologie, nejčastěji ve vědních oborech zabývajících se rybami a savci, kde slouží ke zkoumání evolučních pochodů. Dále poté v botanických oborech, kde jsou využívány ke studiu tvarové variability (Neustupa, 2006). Mezi tyto obory patří i fykologie, kde se geometrická morfometrika používá například ke studiu tvaru a evolučních vztahů rozsivek (Bacillariophyceae), zlativek (Chrysophyceae) nebo makroskopických zelených řas (Chlorophyta) (Neustupa & Němcová, 2007). Mimo jiné se tato vědní disciplína stala standardní také v antropologii či lékařství (Neustupa, 2006).

1.2.1 Analýza relativních warpů (PCA)

Geometrická morfometrika využívá k definici tvaroprostoru analýzu relativních deformací (warpů), neboli PCA (Neustupa, 2006). Účelem PCA je zjednodušení původního souboru dat a usnadnění jejich interpretace tím, že se původní proměnné nahradí novými hypotetickými proměnnými (principal components PCs) (Zelditch et al., 2004). Touto metodou jsou postupně vymezovány jednotlivé osy (PC) podle toho, kolik procent tvarové variability v souboru popisují (Neustupa, 2006).

1.2.2 Diskriminační kanonická analýza (CVA)

Účelem CVA je zjednodušit původní soubor dat, tj. co nejvíce zjednodušit popis rozdílů mezi jednotlivými skupinami dat. Podobně jako u PCA analýzy jsou zde původní data nahrazena novými proměnnými (the canonical variates CVs). Na rozdíl od analýzy PCA, která se používá k popisu rozdílů mezi jedinci, CVA popisuje rozdíly mezi jednotlivými průměry skupin v souboru dat (Zelditch et al., 2004).

2. CÍLE PRÁCE

Hlavní cíle mé práce byly:

1. Literární rešerše k tématu schránky rodu *Trachelomonas* a jejich role v taxonomii rodu (formace schránky, morfologická variabilita rodu a jeho taxonomie založená jak na morfologii, tak na některých molekulárně podložených pracích).
2. Studium morfologické variability, především změna tvaru loriky, na přírodních populacích s dominancí běžnějších druhů rodu *Trachelomonas* a to s využitím nástrojů geometrické morfometriky.

3. METODIKA

3.1 Výběr lokalit

V průběhu vegetační sezóny 2022, bylo na základě výskytu dvou zkoumaných druhů *Trachelomonas* vybráno celkem 5 rybníků na Českobudějovicku a Jindřichohradecku. Výběr byl proveden podle toho, v jaké míře se tam zmiňované druhy vyskytovaly, aby bylo možné je v potřebné míře najít a vyfotografovat. U Českých Budějovic byly vzorky planktonu odebrány na Mladohaklovském rybníce a Velkém Vávrovském rybníce, které jsou součástí komplexu Vrbenských rybníků, na Královském rybníce v obci Rudolfovo a na rybníce Zběhov, který je součástí Holubovské Bašty. Poslední rybník se nachází v obci Lomy u Kunžaku.

3.1.1 Mladohaklovský rybník

48.9904328N, 14.4370331E

Jedná se o neveliký rybník se vzplývající vegetací, který je z větší části lemován rozlehlými litorálními porosty rákosin a vysokých ostríc (*Carex* sp.). Na hrázi je vysázeno několik dubů letních (*Quercus robur*) a v bezprostředním okolí rybníka se také nachází podmáčená bezkolencová louka.



Obr. 11: Mladohaklovský rybník (Martin Číhal, 2020)

3.1.2 Velký Vávrovský rybník

48.9928428N, 14.4398103E

Vodní plocha nacházející se v blízkosti Mladohaklovského rybníka. Na hrázi se nachází stromořadí dubů letních (*Quercus robur*). Hráze rybníka jsou lemovány rákosinami, třtinou křovištní (*Calamagrostis epigejos*) a ostřicemi (*Carex elata*). Vyskytuje se zde i Bublinatka (*Utricularia* sp.).



Obr. 12: Velký Vávrovský rybník (Milan Číhal, 2020)

3.1.3 Královský rybník

48.9909172N, 14.5420553E

Jde o poměrně malý rybník, který je součástí kaskády rybníků Rudolfovského potoka. Na hrázi, která je zpevněná balvany a vysoká zhruba 5 metrů, jsou vysazeny lípy, které jsou významným krajinným prvkem lokality (Hlušíčková et al., 2004). V roce 1963 byla hráz zapsána jako kulturní památka (Národní památkový katalog, 2023).

3.1.4 rybník Zběhov

48.9926461N, 14.3060628E

Rybník je na severovýchodní hrázi lemován stromořadím dubů letních (*Quercus robur*) společně s břízami (*Betula* sp.) a olšemi (*Alnus* sp.). Po celém obvodu rybníka se vyskytují rozsáhlé rákosiny s příměsí ostřice (*Carex* sp.). Na západním břehu rybníka se vyskytují vrby (*Salix* sp.).

3.1.5 bezejmenný rybník přezdívaný Mlýnský

49.1102141N, 15.1571036E

Jedná se o malý rybník nacházející se na okraji vesnice Lomy. V jeho okolí jsou rodinné domy, tudíž je do rybníka pravidelně vypouštěn odpad a užitková voda. V okolí rybníka rostou přerušovaně porosty rákosin a na východním břehu se vyskytuje škumpa (*Rhus* sp.) společně s porosty vrb (*Salix* sp.).

3.2 Odběry fytoplanktonu a mikroskopování

Vzorky fytoplanktonu byly odebírané od července do října 2022 na zmiňovaných lokalitách. Na každé z lokalit byla nejprve změřena vodivost a teplota vody pomocí konduktometru (HI98129, Hanna Instruments) a dále pH pomocí pH metru (HI98108, Hanna Instruments). Průhlednost byla naměřená pomocí Secchiho desky. Vzorky planktonu byly odebírané pomocí planktonní sítě o velikosti ok 20 μm . Dále bylo odebráno 2 x 100 ml vody pro chemické rozboru vody. Vzorky planktonu byly uchovávány v lednici a vzorky pro rozboru vody v mrazničce.

Tab. 1: Naměřené hodnoty vodivosti, pH, průhlednosti a teploty v rámci každého odběru.

Název lokality	Datum	Vodivost [$\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$]	pH	Průhlednost [cm]	Teplota [°C]
Velký Vávrovský r.	3.8 2022	398	9,86	36	32,5
Královský r.	7.8 2022	378	8,71	80	25,0
Mladohaklovský r.	26.10 2022	330	8,30	72	18,0
Bezejmenný r.	23.8 2022	128	7,44	40	20,1
r. Zběhov (1)	19.9 2022	315	7,3	26	16,6
r. Zběhov (2)	30.10 2022	340	9,1	50	6,7

Vzorky fytoplanktonu byly co nejdříve po odebrání sledované pod mikroskopem (Olympus BX51) a zájmové druhy *Trachelomonas* byly focené pomocí kamery (Olympus DP74) pod zvětšením 40x v programu cellSens (Olympus Corporation, Japan). *Trachelomonas hispida* se vyskytovala na lokalitách Velký Vávrovský rybník, Královský rybník, Mladohaklovský rybník a rybník Zběhov (2). Z každé uvedené lokality bylo vyfoceno 50 snímků odlišných jedinců. *Trachelomonas armata* se vyskytovala na lokalitách Velký

Vávrovský rybník, Královský rybník, Mlýnský rybník a rybník Zběhov (1). Z každé uvedené lokality bylo vyfoceno 30 snímků odlišných jedinců.

3.3 Chemická analýza vody

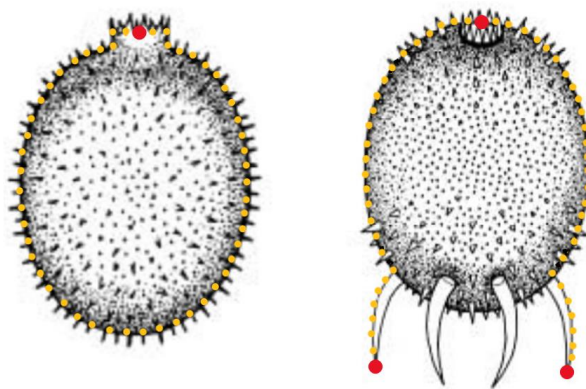
Chemická analýza vody byla prováděna za pomoci multimetru (HI83200, Hana Instruments). Vzorky byly bezprostředně po odmražení postupně přelévány do kyvet a byly měřeny koncentrace iontů NH_4^+ , PO_4^{3-} , Mn, Fe a Si. Měření jednotlivých iontů bylo prováděno zvlášť podle protokolů pro jednotlivé analýzy konkrétních iontů. Měření bylo vždy provedeno dvakrát pro ověření správnosti výsledku.

3.4. Analýzy dat za pomoci geometrické morfometriky

Pro vyhodnocení tvarové variability souboru snímků *T. hispida* a *T. armata* byly využity programy geometrické morfometriky – tpsUtil ver. 1.81 (Rohlf, 2021), tpsDig2 ver. 2.31 (Rohlf, 2017) a Past ver. 4.03 a ver. 2.17c (Hammer et al. 2001), kde byly za pomoci multivariační metody (PCA) graficky znázorněny její výsledky. Následující postup byl konzultován s panem prof. RNDr. Jiřím Neustupou, Ph.D., který je specialistou na geometrickou morfometriku.

V první řadě bylo potřeba za využití programu TpsUtil převést formát pořízených fotografií v programů cellSens, tedy převést fotografie z formátu tif na formát tps, který je nezbytný pro práci v programu tpsDIG (Hodač, 2005).

Následně byl tento společný soubor ve formátu tps otevřen v programu tpsDIG a byla provedena digitalizace (Rohlf, 2017). Vzhledem k rozdílnému tvarovému charakteru vybraných druhů *Trachelomonas* muselo být použito jiné rozložení a počty landmarků a semilandmarků. V případě *Trachelomonas hispida* bylo použito 99 semilandmarků a 1 pevný landmark na anteriorním konci v místě, kde vychází bičík. U *Trachelomonas armata* bylo rozmístěno vždy 29 semilandmarků na každé straně společně se 3 pevnými landmarky. Dva z nich na posteriorním konci na konci výběžků loriky a jeden na anteriorním konci u vývodu bičíku. Je důležité, aby semilandmarky byly stejně daleko od sebe (tj. vzájemně ekvidistantní). Rozložení landmarků graficky znázorňuje Obr. 13 (Ústní sdělení panem prof. RNDr. Jiřím Neustupou, Ph.D. dne 2.11 2022).



Obr. 13: Rozmístění landmarků a semilandmarků u *Trachelomonas hispida* a *Trachelomonas armata*. Červeně jsou znázorněny pevné landmarky, žlutě semilandmarky (Kim et al., 2000, upraveno)

Dále byl tpsUtil znovu využit pro převedení formátu tps na formát nts, který je vyžadován programem Past (Hodač, 2005).

Soubor ve formátu nts byl importován do programu Past ver. 4.03 a jednotlivé lokality byly od sebe barevně odděleny. Poté byla všechna data v souboru označena (Hammer et al., 2001). Následně byla provedena prokrustovská superimpozice, díky níž byly všechny digitalizované objekty počítačově srovnány tak, aby mezi nimi byly co nejmenší vzdálenosti (Neustupa, 2006). Tyto zbytkové vzdálenosti z prokrustovské superimpozice byly analyzovány multivariační metodou (PCA), neboli analýzou relativních warpů (Hammer et al., 2001).

S využitím PCA byla vytvořena tabulka (summary), která vymezovala osy (hlavní komponenty) podle toho, jaké procento variability v souboru vysvětlovaly (Neustupa, 2006). Dále byl ze souboru dat vytvořen bodový diagram. Ten barevně znázorňoval lokality na jednotlivých osách. Z tohoto diagramu bylo možné vyčíst, jakou podobnost mezi sebou zvolené lokality mají. Následně bylo možné modelovat deformace v rámci jednotlivých os za pomoci funkce (deformations). Byly znázorněny deformace os, které popisovaly největší procento variability v souboru. Tyto deformace v nejvyšších hodnotách os slouží jako grafické znázornění tvarových extrémů v souboru (Hammer et al., 2001).

Dále byla pro kontrolu provedena diskriminační analýza v programu Past ver. 2.17c (Hammer et al., 2001), neboli analýza kanonických variát (CVA) s využitím skóre s prvních 10 os popisujících tvarovou variabilitu v rámci PCA analýzy.

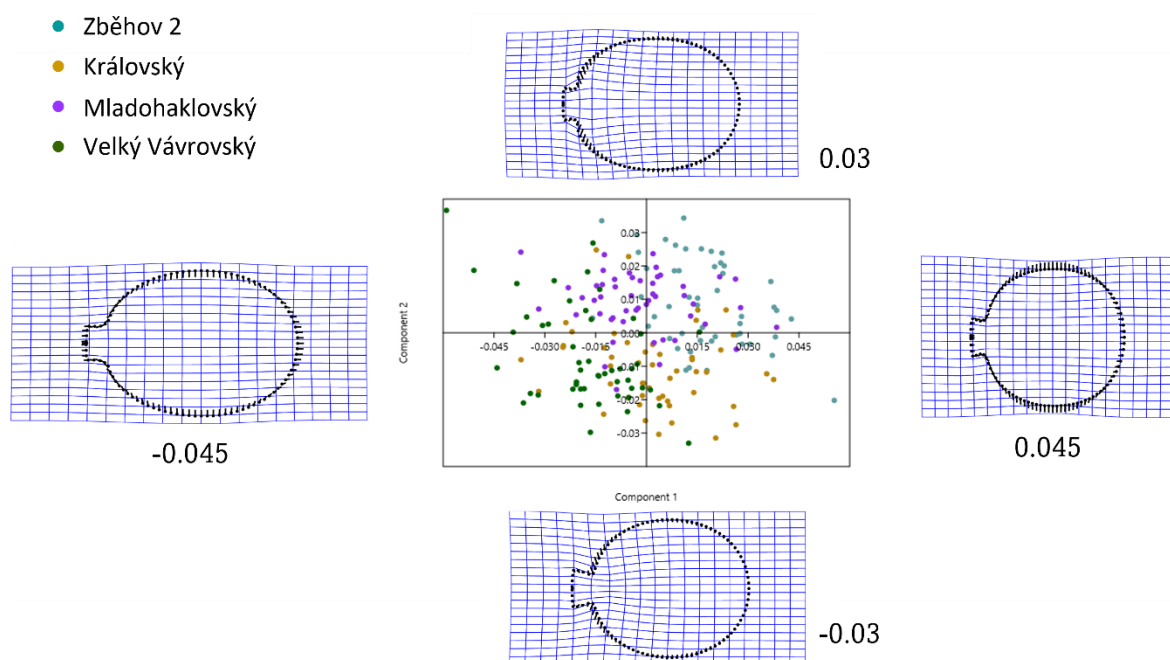
4. VÝSLEDKY

V následující kapitole jsou prezentovány výsledky analýz mého souboru dat z roku 2022 prováděných v programech Past ver. 4.03 a 2.17c (Hammer et al., 2001) a výsledky analýz vody.

4.1 Analýza relativních warpů (PCA)

Pro vysvětlení tvarové variability mnou analyzovaných souborů fotografií *T. hispida* a *T. armata* v rámci jednotlivých lokalit, na kterých byly prováděny odběry, byla nejprve provedena analýza hlavních komponent (PCA). Výsledkem analýzy PCA byly bodové diagramy, jejichž správnost byla konzultována s prof. RNDr. Jiřím Neustupou, Ph.D.

4.1.1 Analýza relativních warpů pro *Trachelomonas hispida*



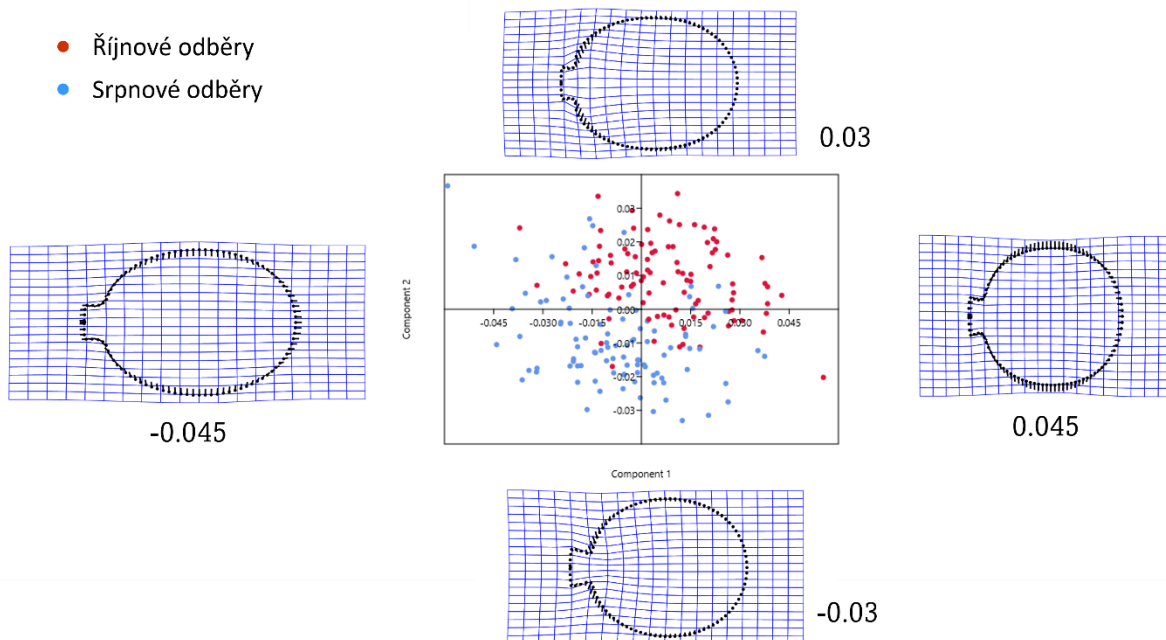
Obr. 14: Bodový diagram druhu *Trachelomonas hispida* vytvořený za pomoci PCA v prostorech 1. a 2. osy. Po stranách jsou graficky znázorněné tvarové extrémy v rámci os. U každého extrému je uvedena číselná hodnota udávající jeho polohu na ose. Barevně jsou odděleni zástupci druhu v rámci konkrétních lokalit. (vytvořeno v Past, ver. 4.11, upraveno)

Z bodového diagramu *T. hispida* lze na první pohled vyvodit to, že náhodně vybraní sledovaní zástupci tohoto druhu jsou vzhledem ke svým vzdálenostem v bodovém diagramu morfologicky velmi odlišní. Jejich variabilita je popsána především v rámci osy 1 (PC 1), která

popisuje 44.984 % variability a osy 2 (PC 2), která popisuje 27.439 % variability. Zbylé osy popisovaly malé a zanedbatelné procento variability.

Osa 1 na obrázku 14. znázorňuje tvarovou změnu v rámci celkového tvaru loriky. Na ose 1 lze pozorovat, že loriky blíží se k záporným hodnotám nabývají značně protáhlého a zploštělého tvaru. Naopak loriky v kladných hodnotách vykazují kulatý a méně protáhlý tvarový trend. Osa 2 zobrazuje tvarové změny v oblasti límce. Kladné hodnoty v rámci této osy patrně ukazují tvarovou deformaci, která límec na jeho bázi rozšiřuje, záporné hodnoty naopak znázorňují jeho zúžení.

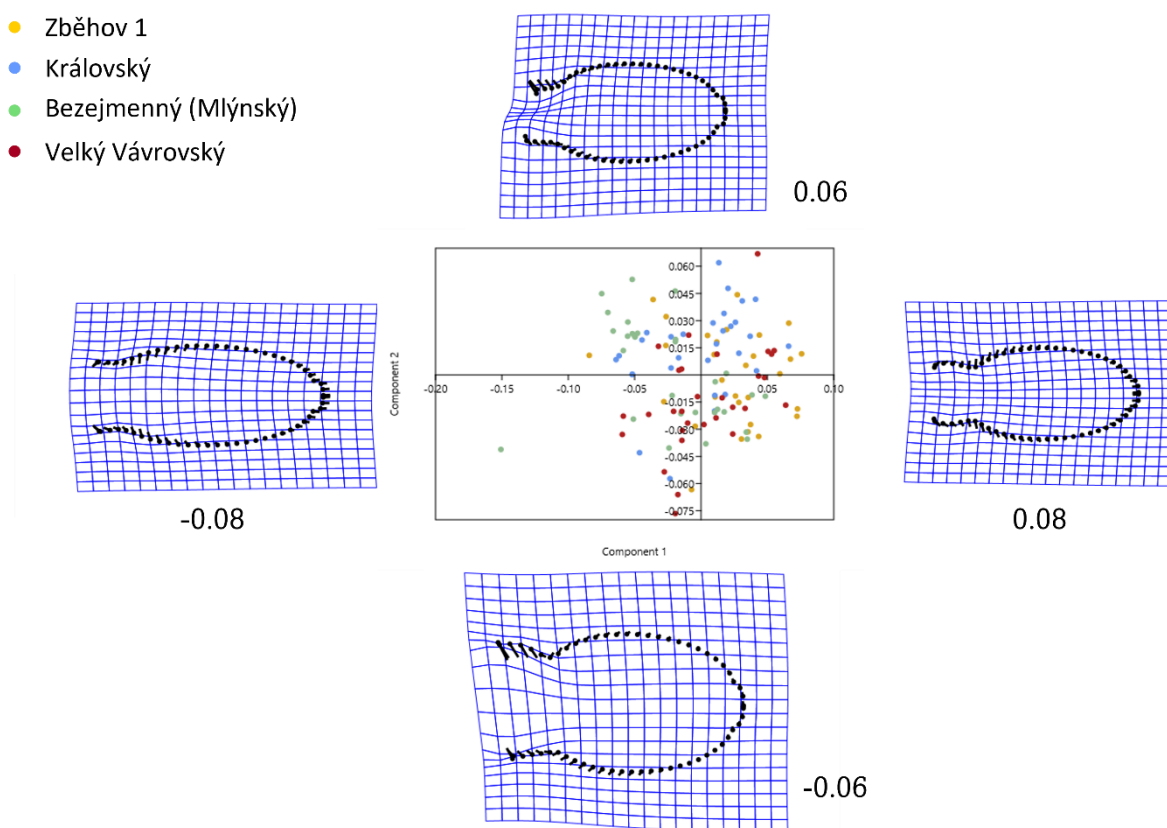
V bodovém diagramu lze pozorovat, že jednotlivé populace popsané v rámci os 1 a 2, jsou od sebe víceméně odděleny a každá z nich v grafu zaujímá jinou pozici. Například poloha fialově označených zástupců odebraných na lokalitě Mladohaklovský rybník, je omezena víceméně na horní část grafu a její zástupci mají spíše oválný tvarový trend s kratším límcem rozšířeným na bázi. Tato lokalita se tedy zcela zřetelně odlišuje od lokality Velký Vávrovský rybník, jejíž zástupci jsou označeni zeleně a vyskytují se z větší části v dolní polovině grafu. Zástupci z lokality Velký Vávrovský rybník mají víceméně oválný tvar, ale límec je značně protáhlejší a v některých případech více zúžen na bázi.



Obr. 15: Bodový diagram druhu *Trachelomonas hispida* vytvořený za pomoci PCA analýzy, v prostorech 1. a 2. osy. Po stranách jsou graficky znázorněné tvarové extrémy v rámci os. U každého extrému je uvedena číselná hodnota udávající jeho polohu na ose. Barevně jsou oddělené lokality podle doby odběru. (vytvořeno v Past, ver. 4.11, upraveno)

Dále byl s pomocí PCA vytvořen bodový diagram na obrázku 15. Barevně byly označeny měsíce, ve kterých byly vzorky odebrány. Červenou barvou byly vyznačeni zástupci z říjnových odběrů a modře zástupci ze srpnových odběrů. Z grafu lze odvodit, že se hodnoty na ose 2 mezi sebou z hlediska měsíce odběru lišily. Zástupci z říjnových odběrů svým tvarem odpovídali morfotypu blízcímu se k hodnotám v horní polovině grafu a zástupci srpnových odběrů spíše morfotypu v dolních hodnotách grafu. Hodnoty na ose 1 se mezi sebou z hlediska měsíce odběru nelišily.

4.1.2 Analýza relativních warpů pro *Trachelomonas armata*



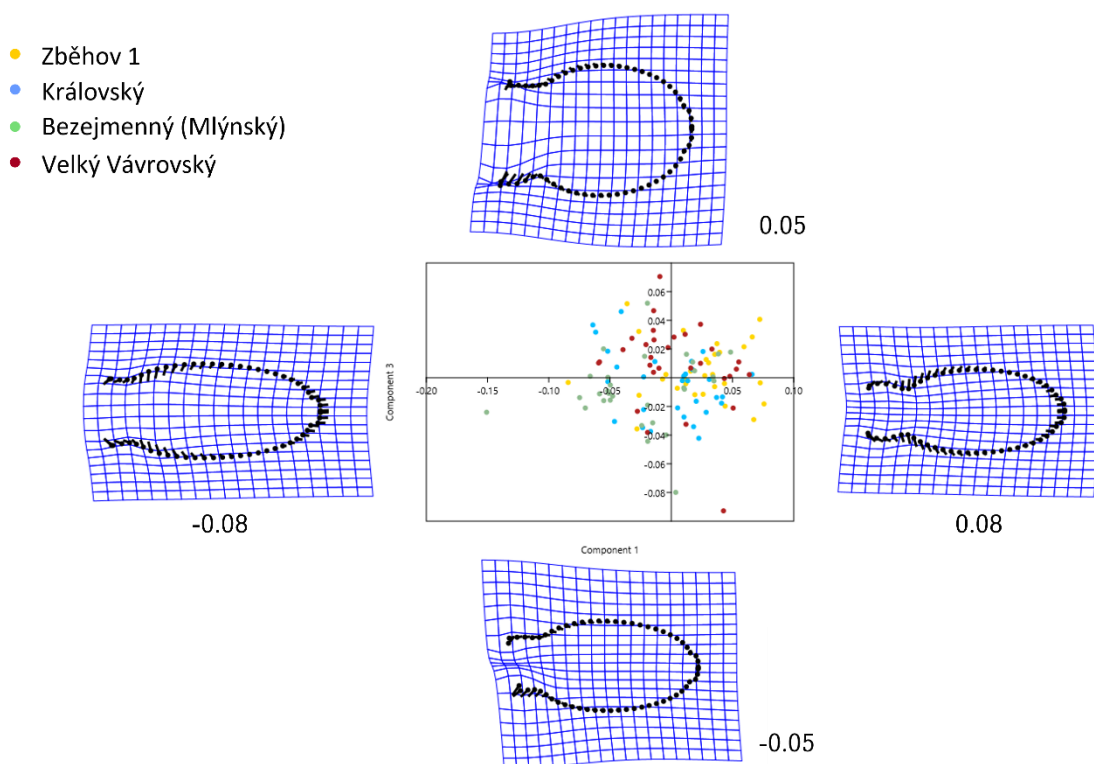
Obr. 16: Bodový diagram druhu *Trachelomonas armata* vytvořený za pomoci PCA analýzy, v prostorech 1. a 2. osy. Po stranách jsou graficky znázorněné tvarové extrémy v rámci os, kdy anteriorní část je vždy otočená směrem doprava. U každého extrému je uvedena číselná hodnota udávající jeho polohu na ose. Barevně jsou odděleni zástupci druhu v rámci konkrétních lokalit. (vytvořeno v Past, ver. 4.11, upraveno)

V bodovém diagramu *T. armata* lze stejně jako u *T. hispida* pozorovat, že jednotliví vybraní zástupci tohoto druhu se svojí morfologií vzájemně odlišují. Překryv lokalit je ale značně vyšší než u zástupců *T. hispida*. Jejich variabilita je popsána v rámci osy 1 (PC 1), osy

2 (PC 2) a osy 3 (PC 3). Osa 1 popisuje v souboru *T. armata* 41.973 %, osa 2 popisuje 20.081 % a osa 3 popisuje 16.022 % variability. Další osy, stejně jako v předchozím případě, popisovaly velmi malé a zanedbatelné procento variability.

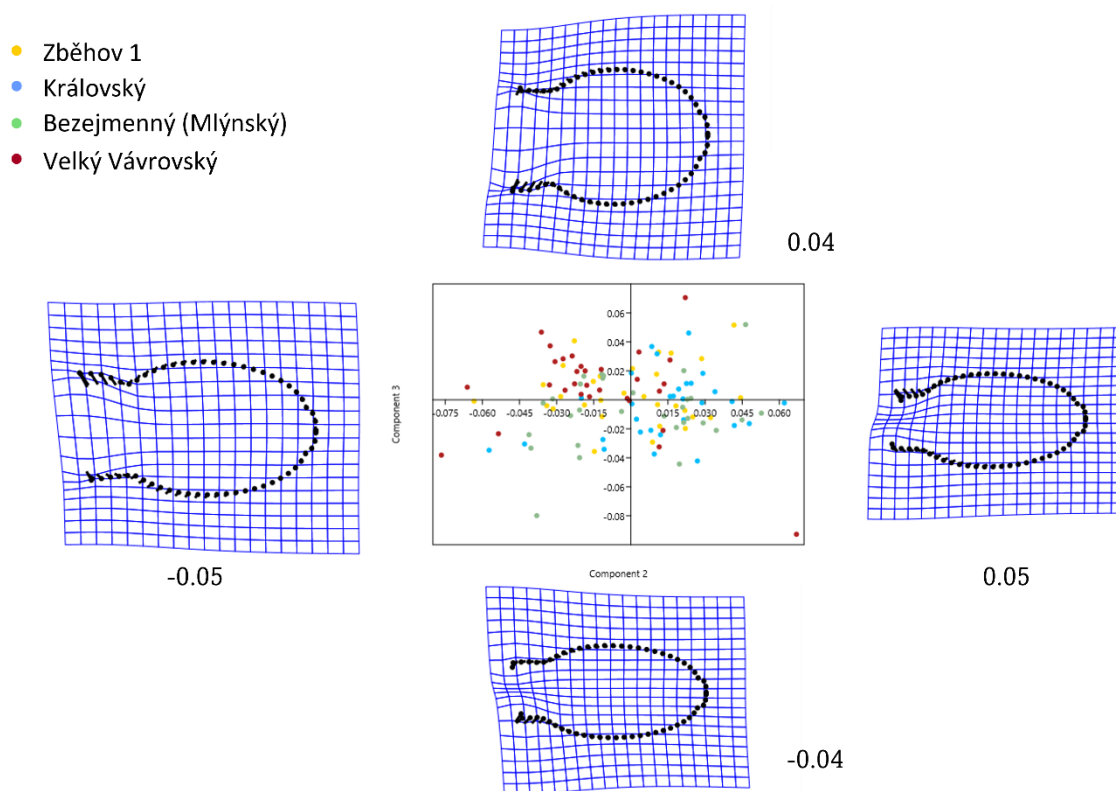
Osa 1 na obrázku 16. znázorňuje způsob zakřivení ostnů v posteriorní části loriky. Zástupci, jejichž ostny se v posteriorní části vytáčejí směrem ven se přibližují k záporným hodnotám na ose 1. Naopak zástupci, kteří mají zaoblené ostny směrem k sobě, lze vidět v kladných hodnotách. Osa 2 taktéž zobrazuje tvarové změny ostnů v posteriorní oblasti schránky. V kladných hodnotách lze pozorovat zužování vzdálenosti mezi ostny, které jsou natočeny směrem k sobě. Ostny v posteriorní části zástupců v záporných hodnotách této osy, jsou naopak natočené směrem od sebe a vzdálenost mezi nimi roste. Tito zástupci mají také oproti jiným značně větší velikost loriky jako takové.

Z tohoto bodového diagramu v rámci osy 1 a 2 nelze určit jaký tvarový charakter lorik převládá v rámci konkrétních populací, jelikož se jejich zástupci z velké části překrývají. Populace nevykazují žádný převládající trend ve tvaru loriky a jejich zástupci se v grafu vyskytují v různých rozdílných hodnotách. Dále byly vytvořené bodové diagramy, které zahrnují 3. osu (PC 3). Ta v souboru popisovala poměrně vysoké procento variability 16.022 %.



Obr. 17: Bodový diagram druhu *Trachelomonas armata* vytvořený za pomoci PCA analýzy v prostorech 1. a 3. osy. Po stranách jsou graficky znázorněné tvarové extrémy v rámci os. U každého extrému je uvedena číselná hodnota udávající jeho polohu na ose. Barevně jsou odděleni zástupci druhu v rámci konkrétních lokalit. (vytvořeno v Past, ver. 4.11, upraveno)

Přesto, že se při zobrazení bodového diagramu osy 1 a 3 neobjevují žádné nové tvarové trendy, lze pozorovat rozdílné umístění jednotlivých zástupců. V tomto případě opět nepřevládá žádný konkrétní tvarový trend jednotlivých zástupců. Je zde vidět výrazně vyšší shlukovitost což znamená, že jsou si zástupci vzájemně tvarově podobnější.



Obr. 18: Bodový diagram druhu *Trachelomonas armata* vytvořený za pomoci PCA analýzy v prostorech 2. a 3. osy. Po stranách jsou graficky znázorněné tvarové extrémy v rámci os. U každého extrému je uvedena číselná hodnota udávající jeho polohu na ose. Barevně jsou odděleni zástupci druhu v rámci konkrétních lokalit. (vytvořeno v Past, ver. 4.11, upraveno)

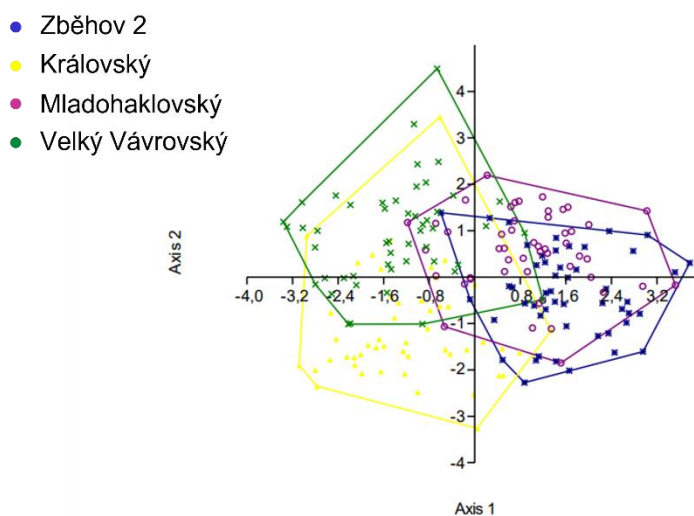
Při zobrazení bodového diagramu osy 2 a 3 si lze povšimnout značné podobnosti znázorněných tvarových deformací na obou těchto osách. Z obrázku 18 je zřetelné, že osy popisují velmi podobné tvarové trendy, ale jsou vůči sobě asymetrické. Je tedy možné říct, že tyto dva tvarové trendy znázorňující vzdálenosti a natočení ostnů popisují v souboru *T. armata* největší variabilitu (Ústní sdělení panem prof. RNDr Jiřím Neustupou, Ph.D. dne 4.4 2023).

4.2 Diskriminační kanonická analýza (CVA)

Pro statistické ověření výsledků PCA analýzy byla v programu Past, ver. 2.17c provedena diskriminační kanonická analýza CVA. Všechny skupiny byly za využití funkce MANOVA/CVA vzájemně porovnány.

Tab. 2: Výsledky analýzy variance MANOVA/CVA pro *Trachelomonas hispida* s Bonferroniho korekcí, Wilksova lambda 0,1902, $p = 6,644E^{-50}$.

	Zběhov (2)	Královský	Mladohakl.	Vávrovský
Zběhov (2)		$5,80513E^{-18}$	$3,63217E^{-05}$	$1,286E^{-20}$
Královský	$5,80513E^{-18}$		$5,11162E^{-16}$	$3,23177E^{-10}$
Mladohakl.	$3,63217E^{-05}$	$5,11162E^{-16}$		$2,81518E^{-14}$
Vávrovský	$1,286E^{-20}$	$3,23177E^{-10}$	$2,81518E^{-14}$	



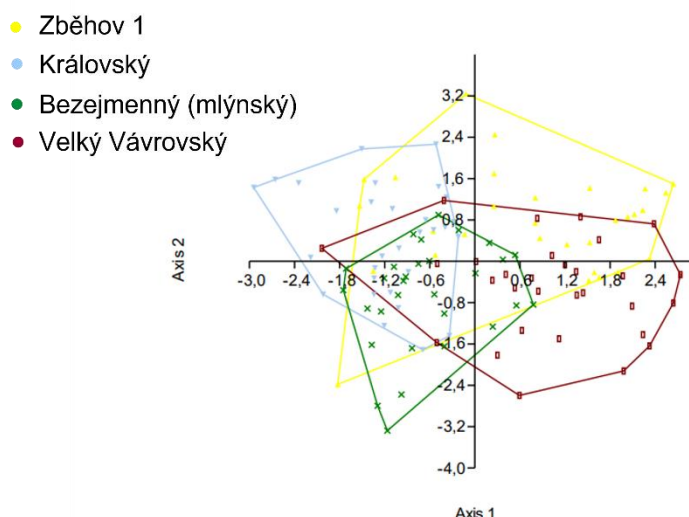
Obr. 19: Bodový diagram *Trachelomonas hispida* vytvořený pomocí CVA analýzy. (vytvořeno v Past, ver. 2.17c, upraveno)

Přesto, že v bodovém diagramu *T. hispida* na obrázku 19 dochází k menším překryvům jednotlivých skupin, je patrné, že se lokality od sebe odlišují. V rámci kontroly byla provedena diskriminační analýza (MANOVA/CVA), která výslednými hodnotami (Wilksova lambda 0,1902, $p = 6,644E^{-50}$) potvrdila, že se mezi sebou jednotlivé lokality liší. Vzhledem k nízké hodnotě pravděpodobnosti byla nulová hypotéza o tom, že se od sebe lokality neliší zamítnutá.

V tabulce 2 jsou jednotlivé lokality porovnávány mezi sebou za využití skupinových testů. Všechny lokality se mezi sebou průkazně odlišují.

Tab. 3: Výsledky analýzy variance MANOVA/CVA pro *Trachelomonas armata* s Bonferroniho korekcí, Wilksova lambda 0,3206, $p = 6,212E^{-14}$.

	Zběhov (1)	Královský	Mlýnský.	Vávrovský
Zběhov (1)		$6,60814E^{-05}$	0,000237993	0,0319569
Královský	$6,60814E^{-05}$		0,0349696	$4,5987E^{-06}$
Mlýnský	0,000237993	0,0349696		0,000652319
Vávrovský	0,0319569	$4,5987E^{-06}$	0,000652319	



Obr. 20: Bodový diagram *Trachelomonas armata* vytvořený pomocí CVA analýzy. (vytvořeno v Past, ver. 2.17c, upraveno)

Stejně jako v případě *T. hispida* byla i u *T. armata* pro kontrolu provedena diskriminační analýza (MANOVA/CVA). Výsledné hodnoty (Wilksova lambda 0,3206, $p = 6,212E^{-14}$) potvrdily průkaznou odlišnost mezi lokalitami i přesto, že v tomto případě se lokality v bodovém diagramu na obrázku 20 více překrývají. Tabulka 3 znázorňuje výsledky skupinových testů, ze kterých vyplývá, že se jednotlivé lokality od sebe průkazně odlišují. Hodnoty pravděpodobnosti jsou v tabulce 3 pro *T. armata* značně vyšší, což znázorňuje větší podobnosti mezi lokalitami než u *T. hispida*, jejíž hodnoty v tabulce 2 jsou řádově nižší a jednotlivé lokality jsou tedy více variabilní.

4.3 Chemická analýza vody

Tab. 4: Výsledky chemické analýzy iontů NH_4^+ , PO_4^{3-} , Mn, Fe a Si ve vodě na jednotlivých lokalitách.

Název lokality	NH_4^+ [mg.l ⁻¹]	PO_4^{3-} [mg.l ⁻¹]	Mn [mg.l ⁻¹]	Fe [mg.l ⁻¹]	Si [mg.l ⁻¹]
Velký Vávrovský r.	0,40	1,00	0,10	0,14	0,29
Královský r.	0,11	0,60	0,10	0,17	0,67
Mladohaklovský r.	0,82	1,00	0,10	0,29	0,15
Bezejmenný r.	0,28	1,80	0,10	0,70	0,34
r. Zbřehov (1)	0,41	1,50	-	-	-
r. Zbřehov (2)	0,29	0,90	-	-	-

5. DISKUSE

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda jsou populace běžných druhů *Trachelomonas* morfologicky variabilní. Jinými slovy, zda se od sebe jednotliví zástupci v populaci liší a případně do jaké míry se liší.

V rámci přírodních populací zkoumaných druhů *T. hispida* a *T. armata* byly s využitím programů geometrické morfometriky vytvořené bodové diagramy znázorňující morfologickou variabilitu a tvarové trendy těchto populací. U obou druhů je zřejmé, že se od sebe jednotliví zástupci poměrně dost tvarově odlišují, jak v rámci populací, tak jednotlivé populace mezi sebou, což bylo prokázáno diskriminační analýzou. Diskriminační analýza ve svých výsledcích ukázala, že v rámci *T. armata* si byly jednotlivé lokality podobnější než u *T. hispida*, jejíž lokality byly variabilnější. Tvarová odlišnost zástupců v rámci jedné populace může být způsobená například tím, že druhy mají veliké množství různých variet nebo intraspecifických taxonů (Guiry & Guiry 2023), na které v této práci nebyl brán zřetel. Naopak odlišnost ve tvaru schránek mezi populacemi může být zapříčiněna rozdílnými environmentálními podmínkami konkrétních lokalit (Dunlap & Walne 1987).

Z bodového diagramu prvních dvou hlavních komponent druhu *Trachelomonas hispida* lze usoudit, že zástupci odebraní na lokalitách Mladohaklovský rybník a rybník Zběhov jsou velmi tvarově odlišní od zástupců, kteří se nacházeli na lokalitách Velký Vávrovský rybník a Královský rybník. Na základě zaznamenaných odběrových dat na lokalitách bylo zjištěno, že tyto rozsáhlé odlišnosti ve tvaru u zmíněných dvojic rybníků jsou způsobené sezonalitou. Jedna dvojice lokalit (Velký Vávrovský a Královský rybník) byla odebrána na začátku srpna a druhá (Mladohaklovský rybník a rybník Zběhov) na konci října. Tato skutečnost je podpořená studií Marshall (2001), kde byly zahrnuté druhy *Trachelomonas hispida* var. *coronata*, *Trachelomonas hispida* a *Trachelomonas volvocina*, které disponovaly značnou fenotypovou variabilitou. Bylo zjištěno, že variabilita byla způsobena sezonalitou, která značně ovlivňovala vývoj konkrétních druhů. Se sezonalitou úzce souvisí i teplota vody, ve které byly vzorky planktonu odebírány. Naměřené teploty srpnových odběrů byly 32,5 °C a 25 °C a teploty naměřené v rámci říjnových odběrů byly 18 °C a 6,7 °C. Wołowski & Walne (2007) ve své studii potvrdili, že teplota má z fyzikálně-chemických parametrů největší vliv na vývoj a formaci loriky *Trachelomonas*. Vzhledem k mnou naměřeným teplotním hodnotám, které se výrazně odlišují i v rámci sezónních odběrů, nelze přímo usoudit, že by v mých výsledcích hrála teplota zásadní roli. Pro potvrzení toho, že teplota má nějaký prokazatelný vliv, by lokality musely být vybírané pouze na základě teploty vody, nebo by

bylo vhodné tento pokus provést s kulturami *Trachelomonas*. Z výsledků bodového diagramu druhu *Trachelomonas armata* je zřejmé, že jednotlivé populace se z velké části překrývají a není zde žádný převládající tvarový trend v rámci lokalit. Bylo ale zjištěno, že druhá a třetí komponenta v bodovém diagramu popisuje stejné, ale asymetrické tvarové trendy ostnů v posteriorní části. Bylo tedy navrženo, že tyto tvarové změny určují v souboru největší variabilitu (Ústní sdělení panem prof. RNDr. Jiřím Neustupou, Ph.D. dne 4.4.2023).

Kromě sezonality u druhu *Trachelomonas hispida* nebyly ani u jednoho z druhů potvrzeny jiné souvislosti s dalšími ekologickými faktory, jako například s pH, vodivostí, průhledností nebo teplotou, která již byla diskutována výše. Rovněž nebyla pozorována žádná spojitost morfologie lorik s ionty a prvky obsaženými ve vodě, kde dominovaly ionty PO_4^{3-} o průměrné koncentraci $1,1 \text{ mg.l}^{-1}$ a NH_4^+ o průměrné koncentraci $0,4025 \text{ mg.l}^{-1}$. Při výpočtu průměru byla vyřazena lokalita Zběhov, jelikož zde nebyly k dispozici kompletní data o analýzách vody. V nižších koncentracích byl přítomný i křemík, železo a mangan, přičemž mangan byl přítomen ve všech zahrnutých lokalitách jen ve velmi malém množství $0,10 \text{ mg.l}^{-1}$. Přítomnost křemíku, železa a manganu v lorikách byla porovnávána se studií Wołowski et al. (2016), kde autoři taktéž zaznamenali křemík a železo, ale nebyla prokázána přítomnost manganu. Naopak ve studii Pereira & Azeiteiro (2003) byl mangan společně se železem přítomen ve vysokých koncentracích. Ve studii Pereira et al. (2003) bylo potvrzeno, že pH stejně jako teplota hraje důležitou roli při formaci loriky a může mít vliv na mineralizaci loriky. Zejména se jedná o mineralizaci zinkem a mědí. Neustupa & Hodač (2005) ve svém článku zabývající se řasou *Pediastrum duplex* potvrdili, že pH průkazně souvisí s velikostí a tvarem buněk této řasy.

Na základě zmíněných studií (Dunlap & Walne 1987; Marshall, 2001; Wołowski & Walne, 2007; Wołowski et al., 2016; Pereira et al., 2003; Pereira & Azeiteiro, 2003; Neustupa & Hodač, 2005) je zřejmé, že ekologické faktory mají prokazatelný vliv na morfologickou variabilitu schránek. To, že v této práci ekologické faktory nepřinesly žádné souvislosti s formací schránky, mohlo být způsobeno tím, že lokality nebyly z důvodu nedostatku nebo malé abundance zájmových organismů vybírány na základě těchto fyzikálně-chemických podmínek. Podmínky byly na jednotlivých lokalitách zcela náhodné, a proto nebylo možné otestovat, zda mají nějaký prokazatelný vliv na morfologii schránek.

Je důležité zmínit, že výsledky mohly být ovlivněny několika aspekty. V první řadě byla tato práce založená na přírodních populacích *Trachelomonas*. Je tedy zřejmé, že kromě

morfologické diverzity mohla být do souboru zahrnutá i geneticky způsobená diverzita populací. Výsledky mohly být omezené malým množstvím získaných dat. Tento problém se mohl projevit u druhu *T. armata*, u kterého bylo k dispozici méně dat než u druhu *T. hispida*, protože abundance tohoto druhu byla ve vzorcích velmi nízká. Drobné odchylky výsledků mohly být způsobené i pořizováním fotografií druhů. Konkrétně se tento aspekt mohl projevit na zástupcích *T. armata*, kteří mají na posteriorní části několik ostnů. Zástupci byli vždy před vyfotografováním srovnáni tak, aby leželi v jedné rovině a byly zaostřené jen dva ostny v krajních částech viz obrázek 19. Pro analyzování tvaru všech přítomných struktur by bylo u obou druhů vhodné, pořizovat fotografie s použitím elektronové mikroskopie. Výsledky mohly být ovlivněny také ruční digitalizací jednotlivých objektů, která je v naprosté většině případů doprovázena drobnou chybovostí. Chybovost digitalizace se mohla projevit z důvodu problematického umístění pevných landmarků na kulatém objektu s minimem vhodných míst pro umístění pevných landmarků. Ukázalo se tedy, že *Trachelomonas* nejsou vhodnými organismy pro dvoudimenzionální morfologické metody.

Obr. 21: Vzorová ukázka srovnaného a zaostřeného zástupce *Trachelomonas armata* vyfotografovaného pod světelným mikroskopem (Olympus BX51, orig.).



Součástí této bakalářské práce měl být i kultivační experiment s kulturami předem vytipovaných druhů *Trachelomonas*. Vzhledem k nepříznivým podmínkám, ve kterých byly kultivovány a nevyhovujícímu médiu se nepodařilo je udržet na živu. Proto byla tato část práce vyřazena. Využití kultur *Trachelomonas* namísto přírodních populací by mohlo prokázat efekt zmiňovaných fyzikálně-chemických faktorů na schránky *Trachelomonas*. Podmínky by mohly být uměle řízeny a mohlo by se tak zamezit tomu, že jsou do studie zahrnuté i jiné faktory jako například genetická variabilita.

Výsledky této bakalářské práce nelze porovnat s výsledky jiných prací nebo studií, jelikož analýzy za pomoci geometrické morfometriky nebyly doposud na krásnoočkách prováděny.

6. ZÁVĚR

S využitím nástrojů geometrické morfometriky, jsem ve vzorcích fytoplanktonu z pěti lokalit nasbíraných na území jižních Čech v roce 2022, identifikovala tvarovou variabilitu a hlavní tvarové trendy schránek populací *Trachelomonas hispida* a *Trachelomonas armata*. Výsledky byly uvedeny do kontextu s ekologickými vlastnostmi prostředí.

Ukázalo se, že schránky obou zkoumaných druhů *Trachelomonas* disponují vysokou morfologickou variabilitou, jak v rámci konkrétních zástupců, tak jednotlivých lokalit. U druhu *Trachelomonas armata* nebyla objevena žádná souvislost s ekologickými vlastnostmi prostředí. V rámci druhu *Trachelomonas hispida* byla sezonalita jediným ekologickým vlivem, který nějakým způsobem ovlivňoval morfologii schránky. Bylo by proto vhodné, ověřit efekt fyzikálně-chemických faktorů na formaci loriky, provedením kultivačního experimentu.

7. SEZNAM LITERATURY

Adl, S. M., D. Bass, Ch. E. Lane, et al., 2018. Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **66**(1), 4-119. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jeu.12691>

Barbeito-Andrés, J., M. Anzelmo, F. Ventricea M. L. Sardi, 2012. Measurement error of 3D cranial landmarks of an ontogenetic sample using Computed Tomography. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. **2**(2), 77-82. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2012.05.005>

Bicudo, C. & M. Menezes, 2016. Phylogeny and Classification of Euglenophyceae: A Brief Review. *Frontiers: in Ecology and Evolution*. **4**, 17 p. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fevo.2016.00017>

Brosnan, S., P. J. P. Brown, M. A. Farmer & R. E. Triemer, 2005. Morphological separation of the euglenoid genera *Trachelomonas* and *Strombomonas* (Euglenophyta) based on lorica development and posterior strip reduction. *Journal of Phycology*. **41**(3), 590-605. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.00068.x>

Cavalier-Smith, T., 1981. Eukaryote kingdoms: Seven or nine?. *Biosystems*. **14**(3-4), 461-481. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0303-2647\(81\)90050-2](https://doi.org/10.1016/0303-2647(81)90050-2)

Ciugulea, I., M. A. Nudelman, S. Brosnan & R. E. Triemer, 2008. Phylogeny of the euglenoid loricate genera *Trachelomonas* and *Strombomonas* (Euglenophyta) inferred from nuclear SSU and LSU rDNA. *Journal of Phycology*. **44**(2), 406-418. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00472.x>

Conforti, V., P. L. Walne & J. R. Dunlap, 1994. Comparative ultrastructure and elemental composition of envelopes of *Trachelomonas* and *Strombomonas* [Euglenophyta]. *Acta Protozoologica*. **33**(2), 71-78.

Čalasan, A. Ž., J. Kretschmann & M. Gottschling, 2020. Contemporary integrative taxonomy for sexually deprived protists: A case study of *Trachelomonas* (Euglenaceae) from western Ukraine. *TAXON*. **69**(1), 28-42. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/tax.12206>

Čepička, I., 2019. Diverzita protist. *Živa*. **5**, 220-223.

Dillard, G. E., 2000. *Freshwater Algae of the Southeastern United States. Part 7: Pigmented Euglenophyceae*. Bibliotheca Phycologica: Berlin, 135 p. ISBN 3-443-60033-6.

Donnelly L. S. 1979. Comparative cellular ultrastructure and chemical characterization of envelopes of three species of *Trachelomonas* (Euglenophyta). Ph.D. Dissertation, University of Tennessee, Knoxville.

Dunlap, J. R. & P. L. Walne, 1987. Variations in envelope morphology and mineralization in *Trachelomonas lefevrei* (Euglenophyceae). *Journal of Phycology*. **23**(4), 556-564. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1987.tb04205.x>

Dunlap, J. R., P. L. Walne & J. Bentley, 1983. Microarchitecture and elemental spatial segregation of envelopes of *Trachelomonas lefevrei* (Euglenophyceae). *Protoplasma*. **117**, 97-106. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF01288348>

Esson, H. & B. Leander, 2006. A model for the morphogenesis of strip reduction patterns in phototrophic euglenids: evidence for heterochrony in pellicle evolution. *Evolution & Development*. **8**(4), 378–388. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2006.00110.x>

Esson, H. & B. Leander, 2008. Visualizing the complex substructure of euglenid pellicle strips with SEM. *Phycologia*. **47**(5), 529-532. Dostupné z: <https://doi.org/10.2216/08-26.1>

Grain, J., J. P. Mignot & P. Puytorac, 1988. Ultrastructures and evolutionary modalities of flagellar and ciliary systems in protists. *Biology of the Cell*. **63**(2), 219-237.

Hjorth, E., K. Hadfi, S.B. Gould, O. Kawach, M.S. Sommer, S. Zauner a U.G. Maier, 2004. Zero, one, two, three, and perhaps four - Endosymbiosis and the gain and loss of plastids. *Endocytobiosis Cell Research*. **15**, 459-468.

Hlušíčková, H. et al., 2004. *Technické památky v Čechách, na Moravě a ve Slezsku. IV. Díl, Š-Ž, slovníky, dodatky*. 1. vyd. Libri: Praha 550 p. ISBN 80-7277-042-X.

Hodač L., 2005. Morfologie a fenotypická plasticita druhu *Pediastrum duplex* (Chlorophyceae). Bakalářská seminární práce, Praha: 50 p.

Huber-Pestalozzi, G. 1955. *Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie. 4. Teil, Euglenophyceen*. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung: Stuttgart, 606 p.

Jackson, A. P., M. A. Quail & M. Berriman, 2008. Insights into the genome sequence of a free-living Kinetoplastid: *Bodo saltans* (Kinetoplastida: Euglenozoa). *BMC Genomics*. **9**, 1-11. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-594>

Jiang, X., X. Chen, W. Pang & Q. Wang, 2022. Phylogeny of *Trachelomonas* and *Strombomonas* (Euglenaceae) Based on Morphological and Molecular Data. *Diversity*. **14**(8), 623 p. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/d14080623>

Kim, J.-T., S.-M. Boo & A. Coute, 2000. Taxonomic and Floristic Accounts of the Genus *Trachelomonas* Ehrenberg 1833 (Euglenophyceae) from Korea. *Korean Journal of Ecology and Environment*. **33**(2), 80-108.

Kuznicki, L., E. Mikołajczyk, P. L. Walne & E. Hildebrand, 1990. Photobehavior of Euglenoid Flagellates: Theoretical and Evolutionary Perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*. **9**(4), 343-369. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/07352689009382295>

Leander, B., 2004. Did trypanosomatid parasites have photosynthetic ancestors?. *Trends in Microbiology*. **12**(6), 251–258. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(04\)00092-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(04)00092-7)

Leander, B., G. Lax, A. Karnkowska & A. G. B. Simpson, 2017. Euglenida.
In: Archibald, J. M., Simpson, A. G. B. & C. Slamovits et al. *Handbook of the Protists* [online]. Springer International Publishing: Cham, 1-42. ISBN 978-3-319-32669-6 Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-319-32669-6_13-1

Leander, B., R.P Witek & M.A. Farmer, 2001. Trends in the evolution of the euglenid pellicle. *Evolution*. **55**(11), 2215-2235. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00737.x>

Leedale, G. F. 1962. Euryhaline Euglenoid Flagellates. *Nature* **194**, 1133–1134. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/1941133a0>

Marrs, J. A. & G. B. Bouck, 1992. The two major membrane skeletal proteins (articulins) of *Euglena gracilis* define a novel class of cytoskeletal proteins. *Journal of Cell Biology*. **118**(6), 1465-1475. Dostupné z: <https://doi.org/10.1083/jcb.118.6.1465>

Marshall, H. G., 2001. Trachelomonas spp. and Other Euglenophyceae Taxa in a Southeastern Virginia Lake. *Virginia Journal of Science*, **52**(1), 13-24.

Neustupa, J., 2006. Co je to geometrická morfometrika aneb morfologie znovu na scéně. *Živa*. **2**, 54-56.

Neustupa, J., & Hodač, L. 2005. Changes in shape of the coenobial cells of an experimental strain of *Pediastrum duplex* var. *duplex* (Chlorophyta) reared at different pHs. *Preslia*, **77**(4), 439-452.

Neustupa, J. & Y. Němcová, 2007. A geometric morphometric study of the variation in scales of *Mallomonas striata* (Synurophyceae, Heterokontophyta). *Phycologia*. **46**(2), 123-130. Dostupné z: <https://doi.org/10.2216/05-61.1>

Pereira, M. J. & U. M.M. Azeiteiro, 2003. Structure, organization and elemental composition of the envelopes of *Trachelomonas* (Euglenophyta): a review. *Acta Oecologica*. **24**, 57-66. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1146-609X\(03\)00017-1](https://doi.org/10.1016/S1146-609X(03)00017-1)

Pereira, M. J., U. M.M. Azeiteiro, F. Gonçalves & A. M.V.M. Soares, 2003. Inorganic composition of the envelopes of *Trachelomonas* Ehr. (Euglenophyta). *Acta Oecologica*. **24**, 317-324. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1146-609X\(03\)00027-4](https://doi.org/10.1016/S1146-609X(03)00027-4)

Poniewozik, M., 2016. The euglenoid genus *Trachelomonas* (Euglenophyta) from eastern Poland. Study on morphology and ultrastructure of envelopes with comments on morphologically similar species. *Phytotaxa*. **278**(3), 181-211. Dostupné z: <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.278.3.1>

Poniewozik, M., 2017. Element Composition of *Trachelomonas* Envelopes (Euglenophyta). *Polish Botanical Journal*. **62**(1), 77-85. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/pbj-2017-0007>

Poniewozik, M., E. Zięba & E. Sajnaga, 2018. Envelope development and variation in *Trachelomonas hispida* (Euglenophyta). *Algae*. **33**(4), 305-318. Dostupné z: <https://doi.org/10.4490/algae.2018.33.11.9>

Pringsheim, E. G., 1953. Observations on Some Species of Trachelomonas Grown in Culture. *New Phytologist*. **52**(3), 238-266. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1953.tb05213.x>

Pringsheim, E. G., 1957. Two Species of Trachelomonas (Euglenineae) without Chlorophyll. *Nature*. **180**, 1296-1297. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/1801296a0>

Rosowski, J. R., 2003. Photosynthetic euglenoids. In: Wehr JD & Sheath RG, et al. *Freshwater Algae of North America* [online]. Elsevier: Lincoln, 383-422. ISBN 9780127415505. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-012741550-5/50011-8>

Safonova T. A. 1987. *Euglenovye vodorosli Zapadnoy Sibiri* [Euglenophytes of the Western Siberia]. Novosibirsk: 192 p. (In Russ.).

Shi, Z., Wang, Q., Xie, S., Dai, J., 1999. *Flora Algarum Sinicarum Aquae Dulcis. Tomus VI. Euglenophyta*. Science Press: Beijing, 93–98.

Singh, K. P., 1956. Studies in the genus Trachelomonas. II. Cell structure and reproduction with special reference to *T. grandis*. *American Journal of Botany*. **43**(4), 274-280. Dostupné z: <https://doi.org/10.2307/2438944>

Triemer, R. E. & M. A. Farmer, 1991. An ultrastructural comparison of the mitotic apparatus, feeding apparatus, flagellar apparatus and cytoskeleton in euglenoids and kinetoplastids. *Protoplasma*. **164**, 91-104. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/bf01320817>

Wang Q.-X., Liu H.-J., Yu J., Sun S.-Q., Zhang D.-W. & Bao W.-M. 2003. Comparative studies on the fine structure and elemental composition of envelopes of *Trachelomonas* and *Strombomonas* (Euglenophyta). *Acta Bot. Sinica*. **45**(5), 601-607.

Weitere, M., M. Erken, N. Majdi, et al., 2018. The food web perspective on aquatic biofilms. *Ecological Monographs*. **88**(4), 543-559. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ecm.1315>

West, L. K. & P. L. Walne, 1980. *Trachelomonas* *Hispida* var. *Coronata* (Euglenophyceae), II. Envelope and substructure. *Journal of Phycology*. **16**(4), 498-506. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1980.tb03067.x>

Wołowski, K., Poniewozik, M., & Juráň, J. 2016. Morphological variability of loricae in *Trachelomonas* caudata complex (Euglenophyta). *Cryptogamie, Algologie*, **37**(2), 97-108.

Wołowski, K. & P. L. Walne, 2007. *Strombomonas* and *Trachelomonas* species (Euglenophyta) from south-eastern USA. *European Journal of Phycology*. **42**(4), 409-431. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/09670260701702508>

Zelditch, M., D. Swiderski, H. Sheets & W. L. Fink, 2004. *Geometric Morphometrics for Biologists*. Elsevier: New York, 443 p. ISBN 0-12-77846-08.

7.1 Internetové zdroje a programy

7.1.1 Internetové zdroje

Číhal, M., 2020. Mladohaklovský rybník. In: *Mapy.cz* [online]. Dostupné z: <https://mapy.cz/zakladni?source=base&id=2026605&gallery=1&sourcep=foto&idp=2819385&x=14.4369894&y=48.9906761&z=17> [navštíveno. 13.3 2023].

Číhal, M., 2020. Velký Vávrovský rybník. In: *Mapy.cz* [online]. Dostupné z: <https://mapy.cz/zakladni?source=base&id=2026605&gallery=1&sourcep=foto&idp=2819385&x=14.4369894&y=48.9906761&z=17> [navštíveno. 13. 3 2023].

Guiry, M.D. in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2023. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. *AlgaeBase*. [online] Dostupné z: <https://www.algaebase.org> [navštíveno. 1.4 2023]

Národní památkový katalog 2023 [online]. Dostupné z: <https://www.npu.cz/cs>. [navštíveno. 1.4 2023]

7.1.2 Programy

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., & Ryan, P.D., 2001. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 9 pp.

Rohlf, J. F., 2017. TpsDig2, version 2.31. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.

Rohlf, J. F., 2021. TpsUtil, version 1.81. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.