

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

MORFOLOGICKÁ VARIABILITA FOTOSYNTETICKÝCH KRÁSNOOČEK

Bakalářská práce

Sára Brožíková

Vedoucí práce: Mgr. Josef Juráň, Ph.D.

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

České Budějovice 2023

Brožíková, S. (2023). Morfologická variabilita fotosyntetických krásnooček. [Morphological variability of photosynthetic Euglenophyta. Bc. Thesis, in Czech.] – 48 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

This bachelor thesis summarizes studies focused on the morphology and ontogenesis of Euglenophyta. In addition, it describes morphological changes in their cells which are mostly caused by a high amount of organic substances in the water. In the experiment populations of *Phacus longicauda* and *Phacus orbicularis* were collected from eleven ponds during the year 2022. Photographs of both organisms were analysed by the method of geometric morphometry. It was proved that populations of *P. longicauda* and *P. orbicularis* were morphologically different in different localities. The shape was also affected by environmental factors as pH, conductivity, water temperature and organic enrichment.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích,

dne

podpis studenta

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli, Mgr. Josefovi Juráňovi, Ph.D., za pomoc při psaní této bakalářské práce, za důležité podklady a všechny cenné tipy a rady. Dále panu prof. RNDr. Jiřímu Neustupovi, Ph.D., který mně a mojí kolegyni Adéle poskytl individuální konzultaci ohledně geometrické morfometriky, a také za to, že mi několikrát s velkou trpělivostí pomohl při potížích s prováděním této metody. Děkuji i panu Mgr. Petrovi Kouteckému, Ph.D., za pomoc a názor při vyhodnocení celého pokusu. Poděkování patří také Bc. Jaroslavovi Kubínovi a Adéle Paulíkové za poskytnutí některých vzorků, za pomoc s mikroskopováním či práci s programy. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svému příteli a rodině za podporu a doprovázení na cestách za vzorkováním.

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Taxonomie a popis zájmových organismů.....	4
1.1.1	<i>Phacus longicauda</i> (Ehrenberg) Dujardin 1841.....	7
1.1.2	<i>Phacus orbicularis</i> Hübner 1886.....	9
1.2	Ontogeneze krásnooček	13
1.3	Vlivy prostředí ovlivňující morfologii krásnooček	14
1.4	Geometrická morfometrika	16
1.4.1	Landmarkování a prokrustovská analýza.....	18
1.4.2	Analýza hlavních komponent (PCA).....	19
1.4.3	Diskriminační kanonická analýza (CVA).....	19
2	Cíle práce.....	20
3	Metodika.....	21
3.1	Popis lokalit.....	21
3.1.1	Bezejmenný rybník (Hluboká u Borovan).....	22
3.1.2	Borský rybník.....	22
3.1.3	Břilický rybník.....	22
3.1.4	Lišovský rybník.....	23
3.1.5	Rybník Bendík.....	23
3.1.6	Rybník Bezdrev	23
3.1.7	Rybník Děkanec	23
3.1.8	Velký Vávrovský rybník.....	24
3.1.9	Zlivský rybník	24
3.1.10	Žárský rybník	25
3.1.11	Žofínský rybník	25

3.2	Odběr vzorků a naměřené parametry	26
3.3	Determinace, fotografování a uchování vzorků	27
3.4	Analýza vody	27
3.5	Geometrická morfometrika a PCA	27
4	Výsledky	30
4.1	Výsledky analýzy vody	30
4.2	Morfologická variabilita fotosyntetických krásnooček	30
4.2.1	<i>Phacus longicauda</i>	30
4.2.2	<i>Phacus orbicularis</i>	35
5	Diskuze	38
6	Závěr	41
7	Citace	42

1 Úvod

Krásnoočka, patřící do oddělení Euglenophyta, jsou eukaryotické organismy s monadoidní stélkou, která je typická jednobuněčností a přítomností alespoň jednoho viditelného bičíku. Jsou to volně žijící organismy, které netvoří kolonie, s výjimkou rodu *Colacium* (Wołowski & Hindák, 2005). Krásnoočka jsou z hlediska přítomnosti chloroplastů rozdělována do dvou skupin – zelená (fotosyntetická) a bezbarvá (nefotosyntetická). Z fylogenetického hlediska pak zahrnují mnoho linií, které se liší způsobem výživy (Zakryš *et al.*, 2017).

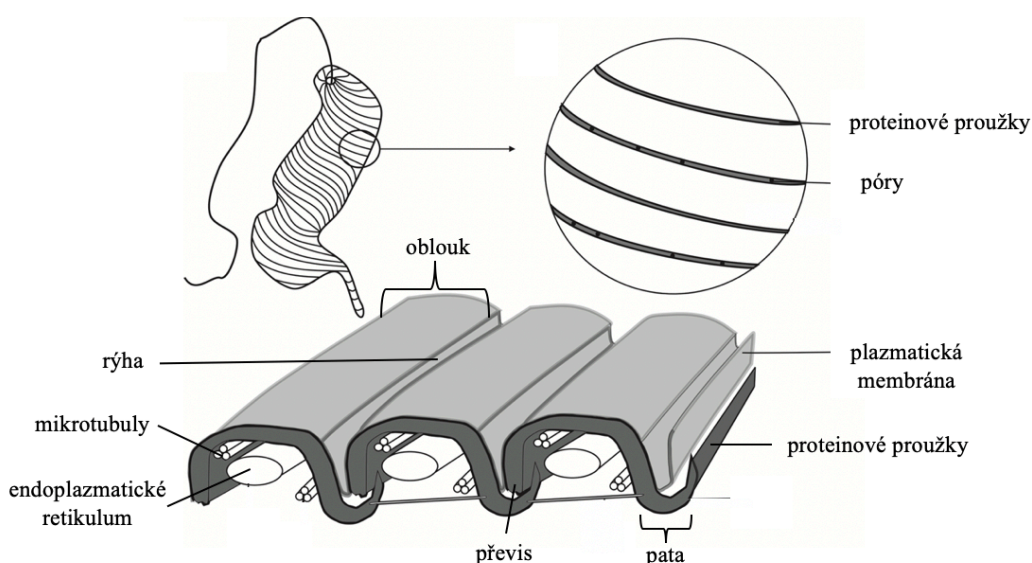
Rozlišujeme fotosyntetická krásnoočka, která mají chloroplasty získané pohlcením zelené řasy, tedy chloroplasty zformované sekundární endosymbiózou, a jsou tak schopná fotosyntetizovat. Mezi jejich pigmenty patří chlorofyl *a* a *b*, β -karoten a některé xantofyly (Triemer & Zakryš, 2015). Dále existují bezbarvá krásnoočka, která žádné pigmenty ani chloroplasty nemají a vyživují se výhradně heterotrofním způsobem (Wołowski & Hindák, 2005). Nefotosyntetická krásnoočka mohou mít vyvinutý tyčinkovitý trávicí aparát umožňující fagotrofii nerozpuštěných částic jako jsou např. bakterie či detrit. Pokud však aparát chybí, organismy využívají osmotrofní způsob výživy a ke svému životu potřebují přijímat z prostředí rozpuštěné látky (Rosowski, 2003). Zajímavým případem je poměrně nedávné objevení mixotrofie u mořského druhu *Rapaza viridis*. Tento organismus má vlastní chloroplasty, ale navíc vyhledává potravu v podobě zelené řasy *Tetraselmis*. V laboratorních podmínkách byl prováděn na *Rapaza viridis* pokus, který ukázal, že není schopna přežít v podmínkách bez světla a bez přísunu kořisti *Tetraselmis*. Bylo tedy prokázáno, že *Rapaza viridis* vyžaduje jak fotosyntézu, tak zelenou řasu k tomu, aby dokázala přežít a dosáhla nutriční rovnováhy. Tento způsob výživy je poměrně vzácný, jedná se o přechodné stádium mezi fagotrofním a fototrofním způsobem výživy. *Rapaza viridis* je vůbec jediným mixotrofním druhem mezi krásnoočkami (Yamaguchi *et al.*, 2012).

Krásnoočka jsou kosmopolitní organismy. Většina fotosyntetických druhů je součástí planktonu a obývá sladkovodní prostředí (Wołowski & Hindák, 2005). Mezi nejběžnější biotopy patří vody bohaté na organické látky jako jsou rybníky. Velmi vzácně se pak může jednat o mezotrofní či oligotrofní biotopy, avšak ne o tekoucí vody. Krásnoočka však mohou obývat i extrémní stanoviště, např. *Euglena mutabilis* odolává pH v rozmezí 1–8,6 (Triemer & Zakryš, 2015). Konkrétně se vyskytuje v kyselých prostředích jako jsou rašeliniště, místa s přetrvávající vulkanickou činností či kyselé důlní drenáže

(Halter *et al.*, 2012). Pouze několik fototrofů (např. *Eutreptia*, *Rapaza*) je adaptováno na mořské či brakické vodní prostředí (Triemer & Zakryš, 2015).

Nejnápadnějším poznávacím znakem fotosyntetických krásnooček je červená „světločivná“ skvrna, stigma, která není součástí chloroplastů, ale vždy samostatně leží ve vnitřním prostoru buňky (Rosowski, 2003). Je složena z malých kapének karotenoidů a nachází se poblíž ampule, odkud vycházejí bičíky (Wołowski & Hindák, 2005). Stigma byla dříve považována za hlavní fotoreceptor v buňce, ale později se ukázalo, že fotoreceptivní funkci nese jiná struktura. Konkrétně jde o paraflagelární tělísko, které je součástí paraflagelární lišty v bičíku. Stigma se nachází v blízkosti paraflagelárního tělíska a funguje jako jeho stínítko. Buňka pak dokáže rozeznávat, z jakého směru světlo přichází (Häder & Iseki, 2017).

Dalším typickým společným znakem krásnooček je jejich buněčný povrch – pelikula (Rosowski, 2003). Pelikula je charakterizována jako pevná vrstva, která se nachází těsně pod plazmatickou membránou a je složena z mikrotubulů, části endoplazmatického retikula a proteinových proužků. Jednotlivé proužky se skládají z cytoskeletálního proteinu zvaného artikulin (Gonçalves & Figueredo, 2020). Pelikulární proužky mají v příčném průřezu tvar písmena „S“. Úsek, kde dochází ke kontaktu dvou proužků, se označuje jako artikulační zóna. Zde převis jednoho proužku nasedá na patu sousedního proužku, díky čemuž dochází ke spojení. Zásadní částí pelikuly, která je dobře viditelná pod mikroskopem a dají se podle ní určovat jednotlivé druhy krásnooček, je oblouk (Leander *et al.*, 2007).



Obrázek 1: Popis jednotlivých komponent pelikuly krásnooček
(Gonçalves & Figueredo 2020, upraveno).

Buňky některých rodů jako je např. *Trachelomonas* či *Strombomonas* jsou obklopeny slizovitým obalem, který se označuje jako lorika (Rosowski, 2003). Slizový obal je po vytvoření mineralizován, a to nejčastěji železem, manganem nebo oxidem křemičitým. Tyto látky se podílejí na celkovém vzhledu loriky a způsobují žlutavé až hnědo-oranžové zbarvení (Triemer & Zakryš, 2015).

Každý organismus může mít pelikulu složenou z různého počtu proteinových proužků. V rámci druhu se však počet výrazně neliší a je víceméně konstantní (Esson & Leander, 2010). Esson & Leander (2010) uvádí, že se počet může pohybovat v rozmezí 4–120 proužků, které jsou uspořádány lineárně nebo spirálně od anteriorní (přední) do posteriorní (zadní) části buňky. Organismy, které mají spirálně uspořádané proužky, jsou schopné metabolického pohybu (Leander *et al.*, 2007), který je označován jako euglenní pohyb (Yamaguchi *et al.*, 2012). Ten je umožněn tím, že v zónách artikulace dochází k překryvu sousedních proužků, resp. jeden proužek klouže přes druhý (Yamaguchi *et al.*, 2012). U fotosyntetických krásnooček všechny pelikulární proužky nemají stejnou délku. Některé jsou natolik krátké, že nedosáhnou na zadní konec buňky a jsou tak zakončeny dříve. Délka proteinového proužku se odvíjí od jejího stáří. Nejkratší proužky jsou nejmladší a nejdelší proužky naopak nejstarší (Esson & Leander, 2010).

Zásobní látkou všech krásnooček je sacharid β -1,3-glukan neboli paramylon (Monfils *et al.*, 2011). Paramylonová zrna se nejčastěji nacházejí volně v cytoplazmě, ale někdy tvoří čepičky nad pyrenoidem, který je součástí chloroplastů (Triemer & Zakryš, 2015). Paramylonová zrna vykazují mezi druhy velkou variabilitu. Liší především v počtu, tvaru a umístění. Rozlišuje se několik typů zrn – např. diskoidní, elipsoidní či tyčinkovité (Monfils *et al.*, 2011). Na obrázku 2 je představena jejich rozmanitost u rodu *Phacus*.



Obrázek 2: Typy paramylonových zrn u rodu *Phacus* (Tell & Conforti, 1986, upraveno).

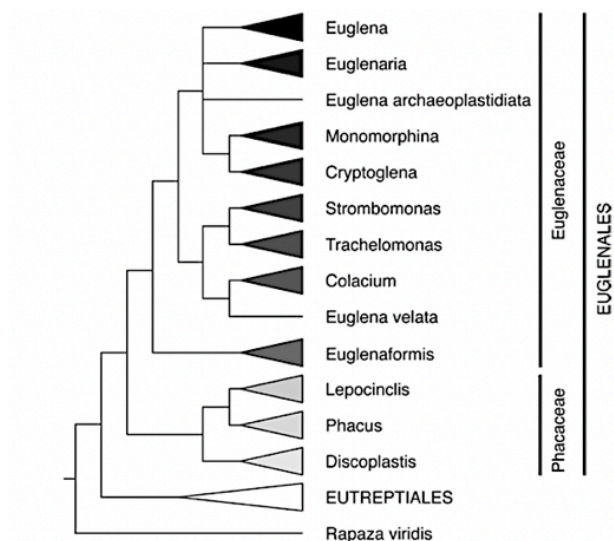
Krásnoočka se rozmnožují nepohlavním podélným dělením pohyblivých i klidových stádií (Chapman & Chapman, 1973). V nepříznivých podmínkách mohou tvořit

klidová – palmeloidní – stádia. V principu organismus odhodí bičík a přemění se na kulovitý útvar, který je obalen slizem. Tato palmeloidní stádia mohou tvořit rozsáhlé slizovité kolonie (Wołowski & Hindák, 2005).

1.1 Taxonomie a popis zájmových organismů

Krásnoočka jsou řazena mezi Euglenozoa, která spadají pod nadskupinu eukaryot zvanou Discoba (Adl *et al.*, 2019). Euglenozoa je monofyletická skupina zahrnující čtyři podskupiny organismů – Diplonemida, Kinetoplastida, Symbiontida a Euglenida. Tyto skupiny se sice liší v morfologii a životních strategiích, ale přesto mají několik společných vlastností (Kostygov *et al.*, 2021). Mají specificky uspořádaný kořen bičíku se dvěma bazálními tělísky a třemi asymetricky orientovanými mikrotubulárními kořeny. Spojuje je také přítomnost paraflagelární lišty v jednom nebo v obou bičících. Dále se u nich vyskytují specifické orgány, tubulární extrusomy, jako jsou mukocysty či trichocysty (Zakryš *et al.*, 2017), které jsou při mechanickém nebo chemickém podráždění vymršťovány z membrány buňky. Pravděpodobně se uplatňují při lovu kořisti, při obraně před predátorem nebo umožňují sekreci materiálu při cystaci. Tyto struktury jsou mimo jiné důležité při determinaci druhů (Rosati & Modeo, 2003).

Fotosyntetická krásnoočka zahrnují tři evoluční linie. Za jednu z nich je považován mixotrofní druh *Rapaza*. Druhou linií jsou mořské Eutreptiales a poslední jsou sladkovodní Euglenales. Euglenales se pak rozděluje do dvou čeledí – Phacaceae a Euglenaceae. Na obrázku 3 níže je viditelné rozdělení rodů krásnooček do čeledí (Zakryš *et al.*, 2017).

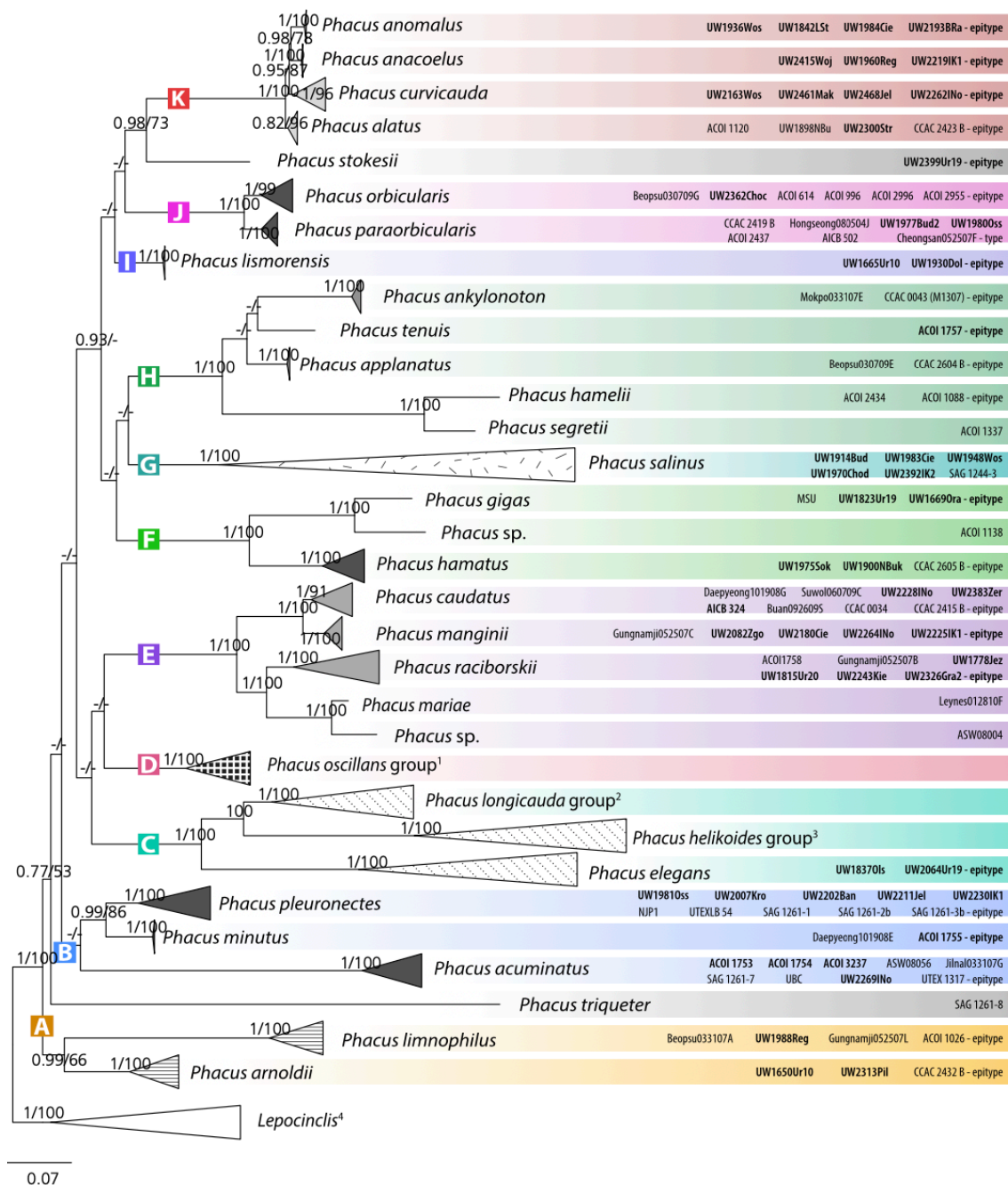


Obrázek 3: Fylogenetický strom řádu Euglenales (Zakryš *et al.*, 2017).

Tato bakalářská práce je zaměřena na krásnoočka rodu *Phacus*. Jeho obvykle ploché, válcovité až vejčité buňky připomínající lístek mají tuhou pelikulu, což zajišťuje stálý a neměnný tvar organismu (Ciugulea & Triemer, 2010). Z buňky vybíhá různě dlouhý kaudální výběžek, který může být rovný nebo zahnutý, záleží však na konkrétním druhu. Pelikulární proužky jsou od apikálního do posteriorního pólu uspořádány podélně nebo spirálovitě (Rosowski, 2003). Povrch buněk je hladký, někdy se navíc mohou objevovat přídatné struktury v podobě bradaviček (Wołowski & Hindák, 2005). V buňce se nachází mnoho malých diskovitých chloroplastů bez pyrenoidů (Ciugulea & Triemer, 2010). Paramylonová tělíska jsou dost variabilní. Jejich počet i tvar se může měnit mezi druhy i prostředím, ve kterém se organismy nacházejí. Často jsou dvě, prstencovitého či diskovitého tvaru. Jindy se však v buňkách může vyskytovat velké množství malých paramylonových zrn. Tyto struktury se však vyskytují i v různých kombinacích (Wołowski & Hindák, 2005). V současné době je známa i jediná bezbarvá forma rodu *Phacus*, kterou je *Phacus ocellatus* (Łukomska-Kowalczyk *et al.*, 2020).

V rámci rodu *Phacus* bylo popsáno velké množství taxonů – v současné době je uváděno 165 taxonomicky uznávaných druhů a 89 vnitrodruhových taxonů (Guiry & Guiry, 2023). Jejich počty se však vlivem molekulárních a morfologických revizí neustále mění. Dochází k úpravám jejich popisů, ke změnám v jejich označení anebo jsou zařazeny pod zcela jiný taxon. Tým Łukomska-Kowalczyk *et al.* (2020) provedl revizi taxonomie rodu *Phacus* založenou právě na molekulárních a morfologických znacích. Podařilo se jim vytvořit velký fylogenetický strom rodu *Phacus*, který zahrnuje 50 druhů, z nichž některé byly na fylogenetický strom zařazeny vůbec poprvé. Fylogenetický strom je rozdělen do jedenácti kladů a dvou větví obsahujících samostatné sekvence (*P. stokesii* a *P. triqueter*). Díky provedení této analýzy byly získány bližší informace o zobrazených druzích a některé z nich byly zrevidovány a přeřazeny do nových odpovídajících kladů (Łukomska-Kowalczyk *et al.*, 2020).

Pro zkoumání morfologické variability byly vybrány dva zájmové druhy, a to *Phacus longicauda* a *Phacus orbicularis*. Jejich podrobnější popisy jsou k dispozici v následujících podkapitolách. *P. longicauda* je na fylogenetickém stromě od Łukomska-Kowalczyk *et al.* (2020) zařazen do kladu „C“ (obr. 4), kam spadají velké buňky s dlouhými kaudálními výběžky. *P. orbicularis* je pak začleněn do kladu „J“ (obr. 4), kde se nachází jeho sesterský druh *P. paraorbicularis* (Łukomska-Kowalczyk *et al.*, 2020).



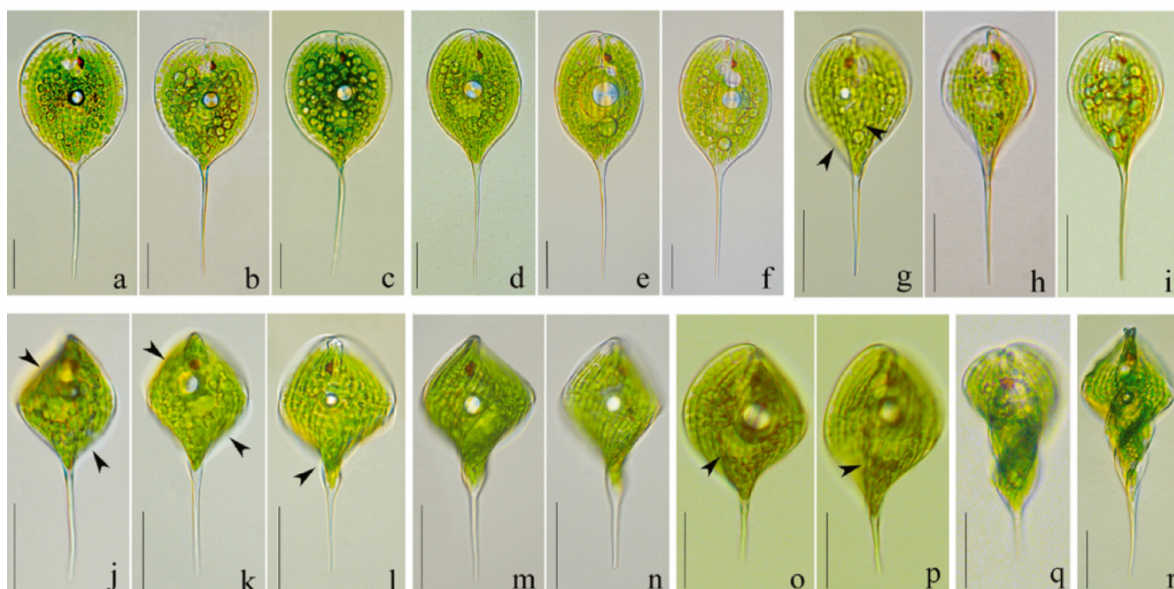
Obrazek 4: Fylogenetický strom rodu *Phacus* založený na 136 nSSU rDNA sekvencích, druhy označené číslem zahrnují více organismů, jejich výčet je viditelný níže:

¹*Phacus oscillans* group zahrnuje druhy *P. brevisulcus*, *P. oscillans*, *P. longisulcus*, *P. smulkowskianus*, *P. granum*, *P. polytrophos*, *P. minimus*, *P. claviformis*, *P. hordeiformis*, *P. inflexus*, *P. parvulus*, *P. viridioryza*, *P. pusillus*, *P. skujae*, ²*Phacus longicauda* group zahrnuje druhy *P. ranula*, *P. convexus*, *P. tortus*, *P. cordatus*, *P. longicauda*, *P. circumflexus* a druh neznámé morfologie *Phacus* sp. Burni081809, ³*Phacus helicoides* group zahrnuje druhy *P. crassus*, *P. cristatus*, *P. helicoides* (Łukomska-Kowalczyk et al., 2020).

1.1.1 *Phacus longicauda* (Ehrenberg) Dujardin 1841

Phacus longicauda (obr. 5, d–f) se vyznačuje široce vejčitými buňkami, které v obrysu připomínají hruškovitý tvar. Buňka je pokryta podélně uspořádanými pelikulárními pruhy. Z přední části buňky, která je zaoblená, vychází jeden bičík, který je kratší než celková délka buňky (Ciugulea & Triemer, 2010). Zadní část buňky vybíhá do dlouhého, rovného, špičatě zakončeného kaudálního výběžku (Wołowski & Hindák, 2005). V buňce se nacházejí diskovité chloroplasty a obvykle jedno velké paramylonové zrno s velkým množstvím malých paramylonových zrn (Ciugulea & Triemer, 2010).

V minulosti byl tento druh mnohdy nesprávně popisován či identifikován. Existovalo mnoho morfologicky podobných taxonů, které byly od *Phacus longicauda* složitě odlišitelné. Např. Pochmann (1942) klasifikoval morfologicky odlišné jedince podobající se typovému organismu *P. longicauda* ihned jako nové poddruhy. Autoři si v té době osvojily užívání termínů, které popisovaly jakým způsobem se mezi sebou jednotlivé formy druhů lišily. Forma „*cordata*“ a „*rotunda*“ označovala změnu ve tvaru, kdežto forma „*major*“ změnu ve velikosti buňky. Termíny „*madagassica*“ či „*insecta*“ značily přítomnost vrubů na buňkách. V tabulce 1 níže je zobrazen stručný přehled taxonů, které byly dříve klasifikovány jako formy, variety nebo poddruhy *P. longicauda* (Łukomska-Kowalczyk *et al.*, 2015).



Obrázek 5: Zobrazení druhů *Phacus cordata* (a–c), *Phacus longicauda* (d–f), *Phacus rotunda* (g–i), *Phacus circumflexus* (j–l), *Phacus tortus* (m, n), *Phacus crassus* (o, p), *Phacus cristatus* (q) a *Phacus helicoides* (r), (Łukomska-Kowalczyk *et al.*, 2015, upraveno).

Tabulka 1: Stručný přehled některých variet, forem a poddruhů *Phacus longicauda* a jejich současný název (Guiry & Guiry, 2023; Łukomska-Kowalczyk *et al.*, 2015).

Popsaná forma, varieta či poddruh	Dnešní název
<i>Phacus longicauda</i> var. <i>insectus</i> Koczwara 1915	<i>Phacus longicauda</i> (Ehrenberg) Dujardin 1841
<i>Phacus longicauda</i> var. <i>major</i> Svirenko 1915	
<i>Phacus longicauda</i> subsp. <i>insectus</i> (Koczwara) Pochmann 1942	
<i>Phacus longicauda</i> subsp. <i>madagassicus</i> Pochmann 1942	
<i>Phacus longicauda</i> subsp. <i>major</i> (Svirenko) Pochmann 1942	
<i>Phacus longicauda</i> var. <i>madagassicus</i> (Pochmann) Huber-Pestalozzi 1955	
<i>Phacus longicauda</i> f. <i>insectus</i> Huber-Pestalozzi 1955	<i>Phacus cordatus</i> (Pochmann) Zakrýs & Łukomska 2015
<i>Phacus longicauda</i> subsp. <i>cordatus</i> Pochmann 1942	
<i>Phacus longicauda</i> f. <i>cordatus</i> (Pochmann) Popova 1955	<i>Phacus rotundus</i> (Pochmann) Zakrýs & Łukomska 2015
<i>Phacus longicauda</i> f. <i>rotundus</i> (Pochmann) Popova 1955	
<i>Phacus longicauda</i> var. <i>rotundus</i> (Pochmann) Huber-Pestalozzi 1955	<i>Phacus tortus</i> (Lemmermann) Skvortzov 1928
<i>Phacus longicauda</i> var. <i>tortus</i> Lemmermann 1910	

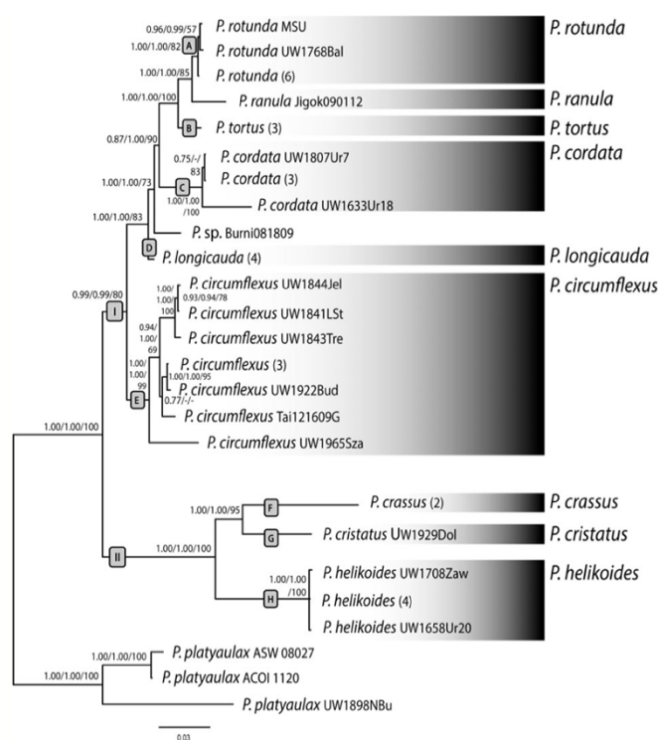
Podle databáze Algaebase bylo popsáno asi 34 taxonů (forem, variet, poddruhů) *P. longicauda*, z nichž některé byly synonymizovány (Guiry & Guiry, 2023; Łukomska-Kowalczyk *et al.*, 2015). Ukazuje se, že je *P. longicauda* vnitrodruhově variabilní, neboť popsané variety a formy, které byly synonymizovány, popisovaly jeden a ten samý druh. Po poslední molekulární revizi bylo vymezeno šest taxonů, které jsou podobné *P. longicauda* a dva nové taxony byly objeveny. Tyto druhy tvoří na fylogenetickém stromu dvě sesterské skupiny (Łukomska-Kowalczyk *et al.*, 2015).

Skupina I – *P. longicauda*, *P. tortus*, *P. circumflexus*, *P. cordata* a *P. rotunda*

Skupina II – *P. helicoides*, *P. crassus* a *P. cristatus*

První skupina fylogenetického stromu (obr. 6, A–E) zahrnuje druhy *P. tortus*, *P. circumflexus* a *P. cordata* s listovitými buňkami, které jsou do různé míry stočené. Dále sem patří *P. rotunda* a *P. longicauda* s rovnými buňkami (Łukomska-Kowalczyk *et al.*, 2015).

Druhá skupina fylogenetického stromu (obr. 6, F–H) zahrnuje druhy, které nemají listovité buňky a jsou spirálně stočené. Extrémní formou je *P. helicoides*, který má podobu lodního šroubu. Nově objevené druhy *P. crassus* a *P. cristatus* pak nemají takovýto extrémní stupeň stočení (Łukomska-Kowalczyk *et al.*, 2015).



Obrázek 6: Fylogenetický strom vytvořený na základě 25 SSU rDNA sekvencí (Łukomska-Kowalczyk *et al.*, 2015).

1.1.2 *Phacus orbicularis* Hübner 1886

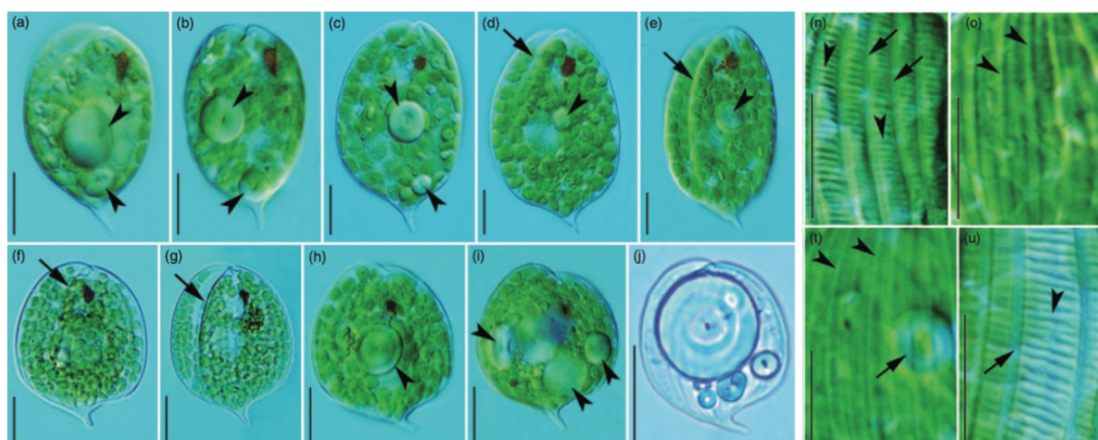
Phacus orbicularis (obr. 7, f–j) má okrouhlé až vejčité buňky. Z přední části buňky, která je široce zaoblená, vychází jeden bičík, jehož délka je srovnatelná s celkovou délkou buňky. Zadní část buňky je zakončená krátkým, zahnutým kaudálním výběžkem (Dillard, 2000). Buňka je pokryta podélně uspořádanými pelikulárními pruhy, mezi kterými se nachází příčné strie (Wołowski & Hindák, 2005). Právě příčné strie dnes slouží jako důležitý determinační znak pro rozlišení druhů *P. orbicularis* a *P. pleuronectes* pod světelným mikroskopem (Esson & Leander, 2010). V buňce se nachází velké množství diskovitých chloroplastů a jedno až dvě diskoidní paramylonová zrna (Wołowski & Hindák, 2005).

P. orbicularis a *P. pleuronectes* jsou velmi podobné druhy. Před existencí molekulárně podpořených prací se mnoho autorů snažilo tyto dva organismy odlišit pomocí

morfologických charakteristik. Na základě toho vznikalo velké množství taxonů (forem, variet), které však nebyly příliš užitečné, neboť nepomohly s identifikací druhů. Např. varieta „*undulatus*“ popisovala změny v buněčných hřbetech, forma „*caudatus*“, „*cingeri*“ či „*communis*“ značila odchylky od předepsané velikosti buněk a změnu zakřivení kaudálního výběžku. Později se však ukázalo, že rozlišování variet a forem podle velikosti buněk, počtu paramylonových zrn či zakřivení kaudálního výběžku nemá smysl. Tyto vlastnosti jsou totiž ovlivněny vnějšími podmínkami prostředí, ontogenetickým stádiem nebo také fyziologickým stavem buněk. Na základě toho byly variety a formy synonymizovány a přiřazeny k příslušnému druhu (Kosmala *et al.*, 2007 a). Tabulka 2 shrnuje některé formy a variety *P. orbicularis*, které byly dříve popsány (Guiry & Guiry, 2023; Kosmala *et al.*, 2007 a).

Tabulka 2: Stručný přehled některých variet, forem a poddruhů *Phacus orbicularis* a jejich současný název (Guiry & Guiry, 2023; Kosmala *et al.*, 2007 a).

Popsaná varieta, forma, poddruh	Dnešní název
<i>Phacus orbicularis</i> var. <i>undulatus</i> Skvortzov 1917	<i>Phacus orbicularis</i> Hübner 1886
<i>Phacus orbicularis</i> var. <i>caudatus</i> Skvortzov 1928	
<i>Phacus orbicularis</i> var. <i>cingeri</i> (Roll) Svirenko 1938	
<i>Phacus orbicularis</i> f. <i>communis</i> Popova 1947	
<i>Phacus orbicularis</i> f. <i>cingeri</i> (Roll) Safonova 1976	
<i>Phacus orbicularis</i> f. <i>gigas</i> (A.M.Cunha) Popova 1955	<i>Phacus gigas</i> A.M.Cunha 1913
<i>Phacus orbicularis</i> var. <i>zmudae</i> Namyslowski 1921	<i>Phacus circulatus</i> Pochmann 1942



Obrázek 7: Zobrazení druhů *Phacus hamelii* (a, b), *Phacus pleuronectes* (c–e) a *Phacus orbicularis* (f–j), dále detail periplastové ornamentiky *P. orbicularis* (n, u), *P. hamelii* (o) a *P. pleuronectes* (t), (Kosmala *et al.*, 2007 a, upraveno).

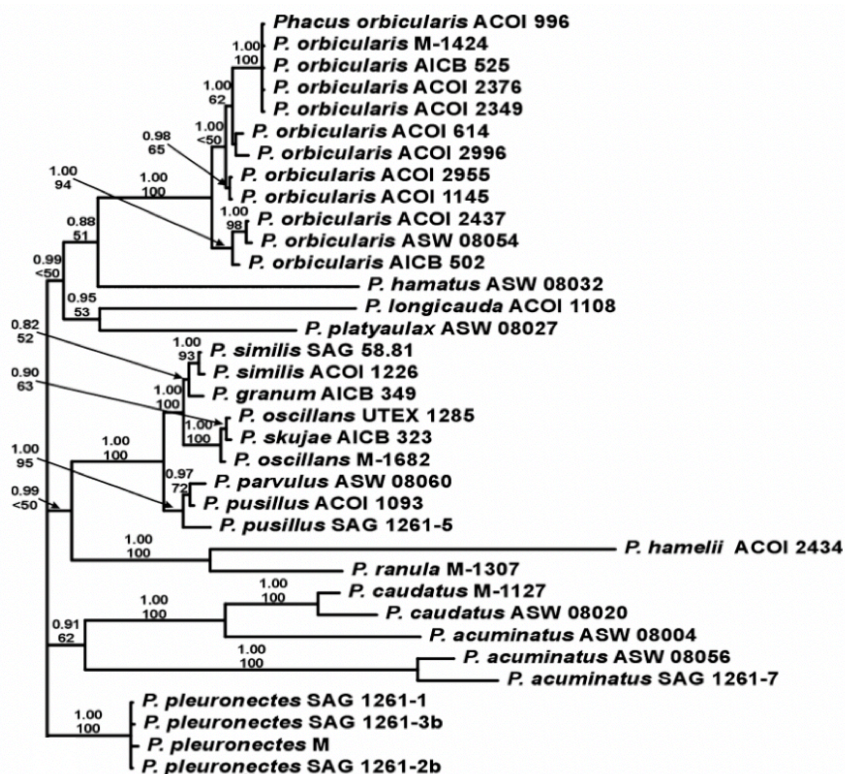
Díky masivnímu rozvoji molekulárních metod bylo možné v roce 2007 provést molekulární revizi organismů podobných *P. orbicularis* (Kosmala *et al.*, 2007 a). Podle databáze Algaebase bylo popsáno asi 14 taxonů (variet, forem) *P. orbicularis*. Mnoho z nich bylo zrevidováno a synonymizováno (Guiry & Guiry, 2023; Kosmala *et al.*, 2007 a). Byl vytvořen fylogenetický strom se čtyřmi liniemi. Výsledkem molekulární studie bylo zjištění, že *P. orbicularis* a *P. pleuronectes* nejsou tak příbuzné, jak se dříve myslelo. Více příbuzné *P. orbicularis* jsou druhy *P. hamatus*, *P. platyaulax* a *P. longicauda* (Kosmala *et al.*, 2007 a).

Skupina I – *P. orbicularis*, *P. hamatus*, *P. longicauda* a *P. platyaulax*

Skupina II – *P. granum*, *P. oscillans*, *P. pusillus*, *P. parvulus*, *P. similis*, *P. hamelii*, *P. ranula*

Skupina III – *P. acuminatus* a *P. caudatus*

Skupina IV – *P. pleuronectes*



Obrázek 8: Fylogenetický strom vytvořený na základě 18S rDNA (Kosmala *et al.*, 2007 a).

První klad fylogenetického stromu je rozdělen na dvě sesterské skupiny zahrnující vždy dva druhy *Phacus*. V první skupině je zařazen *P. orbicularis* a *P. hamatus*. Jak již bylo řečeno, typickým diagnostickým znakem *P. orbicularis* jsou příčné strie. *P. hamatus* se vyznačuje specifickými buňkami, které připomínají v obrysu tvar citronu, dále má dlouhý,

zakřivený ocas a nemá příčné strie (stejně jako *P. pleuronectes*). Ve druhé skupině je zařazen *P. longicauda* a *P. platyaulax* (Kosmala *et al.*, 2007 a).

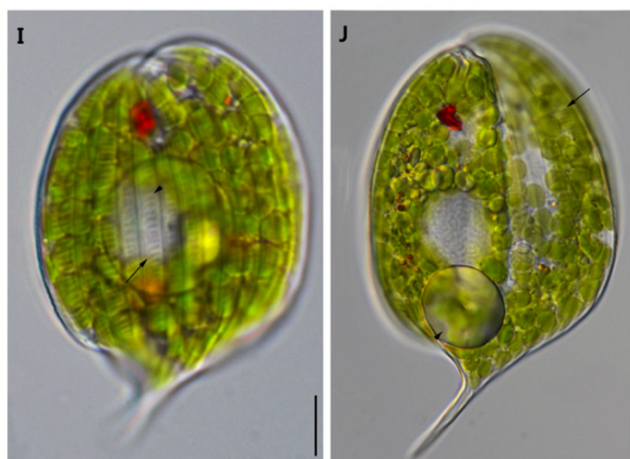
Druhý klad fylogenetického stromu se skládá ze dvou monofyletických skupin. První skupina sestává z blízce příbuzných pěti druhů *Phacus*, zatímco druhá skupina zahrnuje dva geneticky odlišné druhy *Phacus* viz obrázek 8 (Kosmala *et al.*, 2007 a).

Třetí klad fylogenetického stromu zahrnuje *P. acuminatus* a *P. caudatus*. Čtvrtý klad fylogenetického stromu patří druhu *P. pleuronectes* (Kosmala *et al.*, 2007 a).

V roce 2014 prováděli Kim & Shin fylogenetickou analýzu rodu *Phacus*, přičemž se podařilo popsat sedm nových druhů *Phacus*. Jedním z nově popsaných druhů byl *P. paraorbicularis*, který je na první pohled identický s *P. orbicularis*. V tabulce 3 jsou porovnány vlastnosti *P. orbicularis* a *P. paraorbicularis* (Kim & Shin, 2014).

Tabulka 3: Charakteristiky druhů *Phacus orbicularis* a *Phacus paraorbicularis* (Kim & Shin, 2014).

	<i>Phacus orbicularis</i>	<i>Phacus paraorbicularis</i>
Velikost	délka 30–73 μm, šířka 24–49 μm	délka 54–105 μm, šířka 35–72 μm
Tvar, pelikula	ploché široce vejčité buňky, které jsou zakončené zahnutým kaudálním výběžkem, pelikula s příčnými striemi	ploché široce vejčité buňky, které jsou zakončené zahnutým kaudálním výběžkem, pelikula s příčnými striemi
DNA	helix 25: GAU AUG GCU GCG CCA GAG helix 25': UUC UUA GAC CGC UGC CAG AUC	helix 25: GAU AUU ACA GCG CCA GAG helix 25': UUC UUA GAC CGC UGU AAG AUC



Obrázek 9: *Phacus orbicularis* (I) a *Phacus paraorbicularis* (J), (Kim & Shin, 2014).

Ukázalo se, že lze tyto dva druhy odlišit pouze na základě velikostí buněk nebo porovnáním jejich sekvencí DNA. Studie Kim & Shin (2014) přinesla zjištění, že *P. orbicularis* vykazuje kryptickou diverzitu. Zahrnuje odlišné jedince, které není možné pod světelným mikroskopem správně identifikovat, protože vykazují stejné morfologické znaky, ale liší se geneticky.

1.2 Ontogeneze krásnooček

Ontogeneze krásnooček je v současné době málo probádaným tématem. Dosud nevznikla žádná studie na rodu *Phacus*, která by cíleně zkoumala jeho ontogenetický vývoj. Tato kapitola tedy shrnuje pouze základní poznatky týkající se vývoje krásnooček, které byly zaznamenány během experimentálních kultivací.

U *Phacus orbicularis* byly během kultivace pro zkoumání fylogenetické analýzy zaznamenány rozdílné velikosti buněk, které souvisely s vývojovým stádiem. V první fázi kultivace byly pozorovány malé buňky, které se masivně množily. S přibývajícím počtem jedinců se pak kultury začaly přepĺňovat, reprodukční rychlost se postupně snižovala a organismy namísto dělení a tvorby nových buněk začaly investovat do větších velikostí. Se zhoršujícími se podmínkami růstu v kulturách souvisela i změna počtu, tvaru a zastoupení paramylonových zrn v buňkách. V mladých kulturách starých několik dní se mezi paramylonovými zrny objevovalo jedno až dvě nápadně větší paramylonová zrna. Ta se během růstu začala postupně zvětšovat, až nakonec zabírala většinu vnitřního prostoru buněk. Kultura stará dva až tři měsíce, s velikostně dospělými buňkami, pak měla většinou jedno či dvě velká paramylonová zrna. Takovýto charakter vývoje však není stejný u všech organismů. U *P. orbicularis* byla zaznamenána vývojová variabilita mezi kmeny, ale také v rámci jednoho kmene. V rámci kmene také záleželo na tom, jak moc je buňka zatížena paramylonem. Pokud hodně, tak byl u dospělých buněk pozorován kulatější tvar a buňky byly méně ploché (Kosmala *et al.*, 2007 a).

Také u rodu *Monomorphina* byly během kultivace zaznamenány buněčné změny související se stářím buněk. V minulosti byla *Monomorphina* součástí rodu *Phacus*, proto by informace o ontogenezi mohly být pro tuto studii užitečné (Marin *et al.*, 2003). V raných fázích vývoje byl u tohoto rodu zaznamenán výskyt jednoho parietálního chloroplastu. Ve stárnoucích kulturách se v chloroplastu začaly vytvářet drobné perforace, až nakonec došlo k roztrhnutí chloroplastu na více částí. Vnitřní obsah starších buněk proto pod světelným mikroskopem vypadal jako že obsahuje dva větší chloroplasty nebo mnoho malých

chloroplastů. To samozřejmě nebyla pravda, neboť byl jeden chloroplast roztrhán na více kousků. Dva chloroplasty mohly být v buňce pozorovány pouze v období před samotným dělením buňky. Dále se v mladých buňkách, mezi chloroplastem a pelikulou, nacházela dvě malá paramylonová zrna. Se stárnoucími buňkami se paramylon začal zvětšovat až do okamžiku, kdy se mezi chloroplastem a pelikulou nenacházelo žádné volné místo. Během stárnutí se také zvyšoval počet drobnějších paramylonových zrn v cytoplazmě, přičemž se plnil vnitřní prostor buňky a zakulacoval se celkový tvar. Další vlastnosti jako je velikost, plochost či tvar buněk také souvisí s ontogenetickým stádiem, nicméně tyto znaky jsou považovány za velice subjektivní (Kosmala *et al.*, 2007 b).

Ontogenetický vývoj je o něco více probádanější u rodu *Trachelomonas*, který má loriku. V současných studiích však neexistuje mnoho poznatků o tom, jak vypadá organismus na počátku svého vývoje v době, kdy ještě postrádá loriku, ale důraz je kladen spíše na samotnou formaci loriky. U *Trachelomonas* jsou zaznamenány tři vývojová stadia během růstu. Na počátku převládají nahé buňky, které jsou průhledné. Jejich průhlednost se začne postupně snižovat, až se nakonec vyvinou neprůhledné buňky opatřené hnědou lorikou (Žerdoner Čalasan *et al.*, 2020). V kulturách starých tři až čtyři týdny bylo u *T. grandis*, *T. ellipsoidalis*, *T. cingulata* či *T. variabilis* zaznamenáno, že jejich protoplasty pravděpodobně vlivem nepříznivých podmínek opouštěly loriky. Nahé buňky měly vřetenovitý tvar, na obou koncích byly zúžené a vykazovaly rychlý pohyb (Singh, 1956).

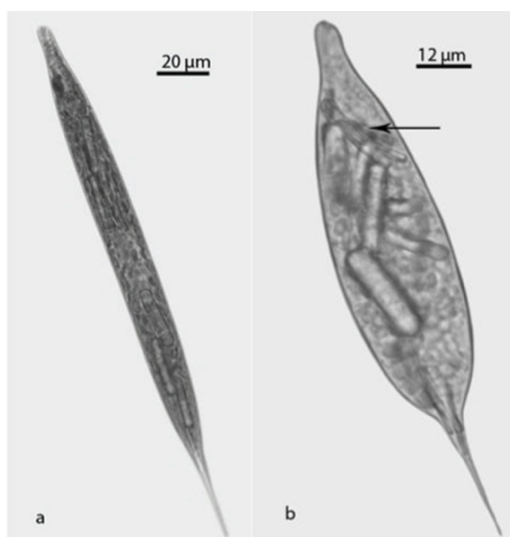
1.3 Vlivy prostředí ovlivňující morfologii krásnooček

Na základě aktuálních studií a z nich získaných poznatků můžeme usuzovat, že hlavním faktorem, který ovlivňuje morfologii krásnooček, jsou organické látky. Variabilitě v morfologii krásnooček byla věnována pozornost především v Argentině, kde se nachází řeka Matanza, která je známá vysokou koncentrací organických látek. Tato řeka je kontaminována materiálem, který je přiváděn odpadní vodou, z nedalekého masného průmyslu (Conforti, 1998). To, že se organická hmota běžně a neúmyslně dostává do vodního prostředí, není způsobeno pouze průmyslovou činností, ale také domácími a zemědělskými procesy (Conforti *et al.*, 2017). V ekosystému, který je kontaminován, dochází ke změnám koncentrace živin, zejména fosfátů, dusičnanů a chloridů. Krásnoočka obvykle osidluje prostředí s obsahem organických látek, avšak nadměrná koncentrace organických látek v ekosystému způsobuje řadu změn v morfologii a ultrastruktuře jejich buněk (Nannavecchia *et al.*, 2014).

V mnoha pokusech byly z řeky Matanza odebrány vzorky planktonu, ze kterých byly vyizolovány některé druhy krásnooček. Vyizolované druhy byly kultivovány v médiu obohaceném o hovězí extrakt. Bylo sledováno, jakým způsobem krásnoočka na vyšší hladinu organických látek reagují a do jaké míry je to dokáže ovlivnit (Conforti, 1998; Nannavecchia *et al.*, 2014; Conforti *et al.*, 2017). Podle Nannavecchia *et al.* (2014) je u druhů *Phacus brachykentron*, *Phacus tortus* a *Lepocinclis acus* reakce stejná.

U všech zmíněných organismů došlo ke změně velikosti buňky, a to buď zkrácením délky a zvětšením šířky u *Lepocinclis acus* nebo tvorbou zářezů v celkovém obrysu buňky u *Phacus brachykentron* (Nannavecchia *et al.*, 2014; Conforti *et al.*, 2017). Další nápadnou změnou bylo zvýšení počtu a velikosti paramylonových zrn. Paramylonová zrna by tedy neměla sloužit jako významný determinační znak, protože vnější prostředí odráží jejich podobu. Dva stejné druhy z různých míst se tak mohou lišit právě paramylonovými zrny (Conforti, 1998; Nannavecchia *et al.*, 2014; Conforti *et al.*, 2017). V buňkách ještě docházelo k přesunu jádra ze středu buňky ke stěně buňky (Nannavecchia *et al.*, 2014; Conforti *et al.*, 2017). U *P. brachykentron* bylo navíc pozorováno rozšíření některých pelikulárních proužků a přítomnost chloroplastů s neuspořádanými tylakoidními membránami (Nannavecchia *et al.*, 2014). U *L. acus* zase došlo ke zvýšení počtu pelikulárních proužků (Conforti *et al.*, 2017). V kulturách byly také pozorovány rozpadlé buňky, ze kterých se do média uvolňovala paramylonová zrna. Tato skutečnost značí, že buňky dokáží měnit svůj tvar jen do určitého stupně. Pokud je deformace extrémnější, tak ji již nedokáží udržovat a buňka se roztrhne (Nannavecchia *et al.*, 2014; Conforti *et al.*, 2017).

U *P. brachykentron* a *L. acus* byly morfologické změny zaznamenány již po 48 hodinách. Řasy jsou velmi náchylné na měnící se podmínky prostředí. Jejich rychlá odpověď na nárůst organických látek by se v budoucnu mohla hojně využívat pro detekci organického znečištění vod (Nannavecchia *et al.*, 2014; Conforti *et al.*, 2017). Podle nynějších studií se již začíná experimentovat se systémy, které jsou založeny na pozorování řasových indikátorových organismů. Tyto systémy se používají jak v přírodě, tak v laboratorních podmínkách a mají tu výhodu, že nejsou finančně náročné. Řasy mají díky své velikosti vysoký poměr povrchu ku objemu, a tak velmi rychle zachytávají kontaminanty z prostředí. Kromě toho se vyznačují rychlou reprodukční rychlostí. V případě snížení reprodukční rychlosti a zaznamenání morfologických změn organismů lze detekovat znečištění a odhadnout kvalitu vody v daném místě (Bauer *et al.*, 2012).



Obrázek 10: Buňka *Lepocinclis acus* v normálních podmínkách (a) a buňka kultivovaná v médiu obohaceném o hovězí extrakt (b), (Conforti *et al.*, 2017).

Lepocinclis acus má tu schopnost, že dokáže odolávat stresu v podmínkách, které jsou nepříznivé pro jeho žití a reaguje na ně morfologickými změnami. Právě díky této vlastnosti se *L. acus* využívá pro detekci kontaminace v podobě nadbytečného množství živin, kovů či pesticidů. Stejně jako v předchozích studiích, byla u *L. acus* zaznamenána změna tvaru buněk zapříčiněná vyšším množstvím organických látek ve vodě. Dále byla vlivem vyššího množství organických látek zaznamenána i dezorganizace paramylonových zrn. Tato skutečnost však v minulosti pozorována nebyla, paramylonová zrna vždy jen nabývala v počtu. V místech, kde byla vyšší hladina těžkých kovů, bylo zaznamenáno zvětšování objemu buněk a odbarvování chloroplastů i stigmatu (Bauer *et al.*, 2012).

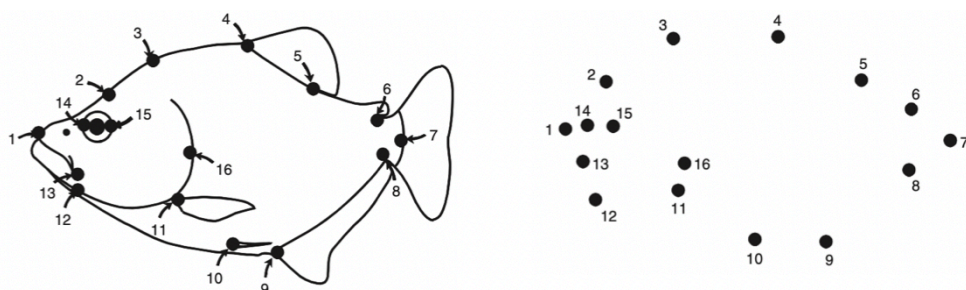
1.4 Geometrická morfometrika

Morfologie, jakožto věda zkoumající tvary, je nedílnou součástí mnoha biologických oborů. V minulosti byla základním nástrojem pro utváření taxonomie organismů, avšak počátkem molekulární éry začala její důležitost mírně ustupovat (Neustupa, 2006). S nástupem počítačové techniky a zdokonalováním statistických metod se morfologie opět začala využívat k různým studiím. Vznikla sofistikovaná metoda, geometrická morfometrika (Adams *et al.*, 2004), která se využívá k odhalování tvarových rozdílů mezi skupinou objektů či k mapování morfologické variability (Mitteroecker & Gunz, 2009).

Geometrická morfometrika je statistická metoda, která analyzuje tvar na základě kartézských souřadnic orientačních bodů neboli landmarků (Mitteroecker & Gunz, 2009). Landmarky jsou místa na objektu, která jsou nezaměnitelná, jsou společná pro celou analyzovanou skupinu organismů (Zelditch *et al.*, 2012 a) a je možné jejich pozici počítačově digitalizovat (Neustupa, 2006). Zelditch *et al.* (2012 a) uvádí několik podmínek, které landmarky musí splňovat:

- (1) landmarky jsou homologní anatomické lokusy;
- (2) landmarky nemění polohu ani vzdálenost vzhledem k jiným landmarkům;
- (3) umístění landmarků musí pokrýt celou morfologii daného objektu;
- (4) nalezení landmarků na objektu musí být jednoduché a opakovatelné;
- (5) landmarky leží v jedné rovině.

Kromě landmarků existují i semilandmarky neboli body, které analyzují obrys objektu. Na obrys není možné ukládat landmarky, neboť obrys je u každého objektu odlišný a neobsahuje homologní lokusy. Přesto může poskytovat důležité biologické informace (Slice, 2007). Kombinací landmarků a semilandmarků pak můžeme získat komplexnější informaci o tvaru objektů (Adams *et al.*, 2004).



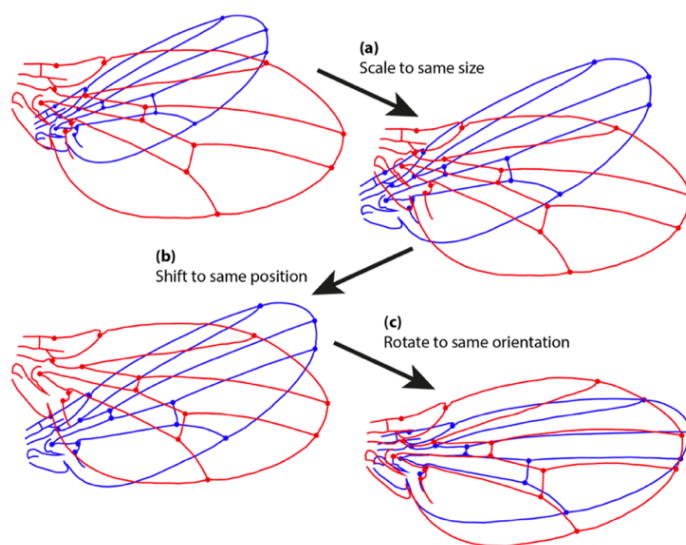
Obrázek 11: Umístění 16 landmarků na obrysu ryby (Zelditch *et al.*, 2012 a, upraveno)

Geometrická morfometrika má velké využití v mnoha odvětvích. Své uplatnění nachází v zoologii, botanice, antropologii a v poslední době se využívá i v lékařství k predikci některých onemocnění v rané fázi života člověka (Neustupa, 2006). Tato disciplína je velmi přínosná a není pochyb o tom, že se v budoucích letech bude dále rozvíjet (Slice, 2007).

1.4.1 Landmarkování a prokrustovská analýza

Prvním krokem geometrické morfometrie je umístování bodů (landmarků a semilandmarků) na objekty. Umístěním bodů získáváme 2D (případně 3D) souřadnice. Získané souřadnice však nemohou být v této podobě dále analyzovány, neboť obsahují informace o orientaci, poloze a měřítku. Tyto netvarové charakteristiky musí být napřed odstraněny. Poté mohou být souřadnice použity k dalšímu zpracování (Adams *et al.*, 2004).

Dalším krokem je prokrustovská analýza, díky které jsou eliminovány netvarové charakteristiky. Souřadnice si tak zachovávají pouze informaci o svém tvaru (Klingenberg, 2015). V principu jde o to, že jsou všechny analyzované objekty přeloženy na sebe a jsou uspořádány tak, aby si landmarky se stejným číslem co nejvíce odpovídaly, resp., aby mezi nimi byla co nejkratší vzdálenost (Neustupa, 2006; Slice, 2007). Každý objekt tak může být zmenšován, zvětšován a otáčen, avšak pozice landmarků zůstává pořád stejná (Neustupa, 2006).



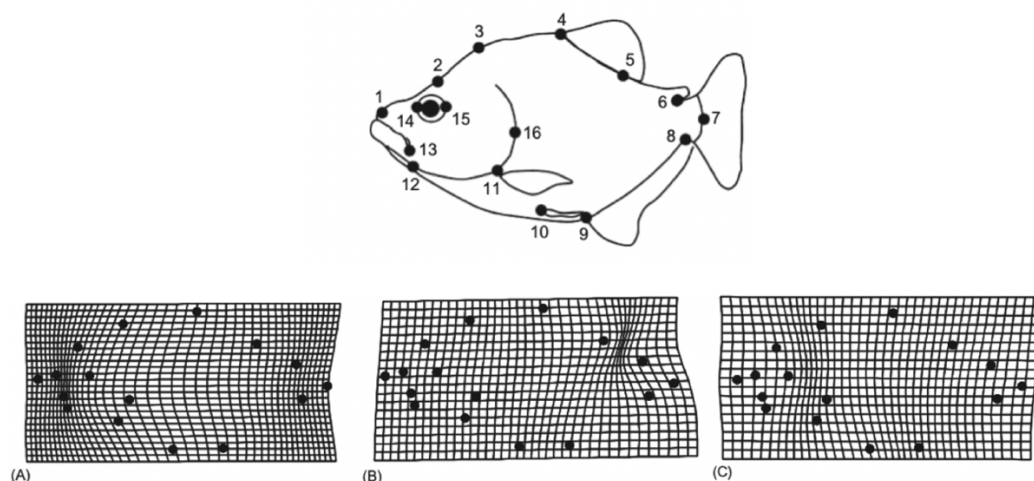
Obrázek 12: Prokrustovská analýza – převedení objektů na stejnou velikost (a), převedení objektů do stejné pozice (b), otočení objektů (c), (Klingenberg, 2015)

Po provedení prokrustovské analýzy mají všechny landmarky každého objektu tzv. zbytkovou vzdálenost. To je vzdálenost konkrétního landmarku objektu od landmarku, který je vypočítán jako průměrný landmark ze všech objektů. Zbytkové vzdálenosti poskytují informace o tvaru jednotlivých objektů (Neustupa, 2006).

1.4.2 Analýza hlavních komponent (PCA)

K vlastnímu zpracování dat se pak využívají nejrůznější analýzy. Asi nejvyužívanější z nich je tzv. analýza hlavních komponent neboli PCA (Paul *et al.*, 2013). Tato analýza dokáže zredukovat nepodstatné informace ve složitých a obsáhlých datech tak, aby v nich byly stále zachovány odchylky a nedocházelo k žádnému zkreslování výsledků (Karamizadeh *et al.*, 2013). Z velkého množství informací tak vystoupí ty, které jsou významné a podílejí se nějakým způsobem na celkovém vyhodnocení pokusu či studie (Paul *et al.*, 2013).

Pro vizualizaci trendu morfologické změny se využívají deformační mřížky, které jsou utvářeny pomocí funkce thin-plane spline. To si lze představit jako dokonale tenký plát, který se ohýbá v místech, kde je zaznamenána jakákoliv změna tvaru (Neustupa, 2006). Deformační mřížky jsou považovány za velmi efektivní interpretaci 2D dat (Zelditch *et al.*, 2012 b).



Obrázek 13: Deformační mřížky zobrazující tři různé morfologické změny ve tvaru těla ryby (Zelditch *et al.*, 2012 b, upraveno).

1.4.3 Diskriminační kanonická analýza (CVA)

Diskriminační kanonická analýza (CVA) je metoda, která se využívá k popisu rozdílů mezi skupinami objektů. CVA testuje, zda se mezi sebou liší průměry analyzovaných skupin objektů, zatímco PCA popisuje pouze rozdíly mezi objekty (Zelditch, 2004).

Diskriminační kanonická analýza se provádí v programu Past za pomoci funkce MANOVA/CVA, která zjišťuje, zda mají skupiny stejný průměr. Pokud je prokázán signifikantní rozdíl mezi skupinami, za pomoci skupinových testů lze zjistit, které dvojice skupin objektů se mezi sebou liší (Hammer *et al.*, 2001).

2 Cíle práce

Hlavní cíle této bakalářské práce jsou:

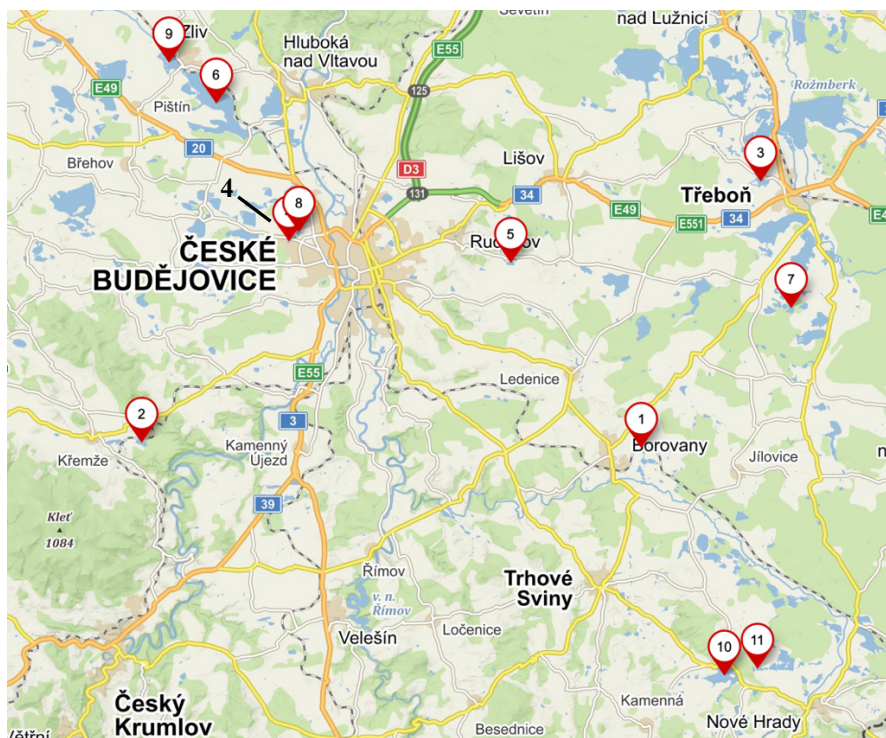
- 1) vypracování literární rešerše o morfologické variabilitě fotosyntetických krásnooček a zhodnocení toho, jak se mění morfologie v průběhu ontogeneze a jaké vlivy prostředí ovlivňují morfologii fotosyntetických krásnooček;
- 2) zkoumání vnitrodruhové variability na vybraných druzích *Phacus longicauda* a *Phacus orbicularis* pomocí metod geometrické morfometriky.

3 Metodika

3.1 Popis lokalit

Během vegetační sezóny roku 2022 byly odebrány vzorky planktonu z jihočeských rybníků, avšak ve výzkumné části bylo nadále pracováno pouze s těmi vzorky, ve kterých byl pozorován výskyt druhů *Phacus orbicularis* a *Phacus longicauda*. Celkem bylo nalezeno 11 vyhovujících lokalit.

- 1) **Bezejmenný rybník**, Hluboká u Borovan (48.9000489 N, 14.6634764 E)
- 2) **Borský rybník**, Křemže (48.9024294 N, 14.3371842 E)
- 3) **Břilický rybník**, Třeboň (49.0142067 N, 14.7413172 E)
- 4) **Lišovský rybník**, České Budějovice (48.9886892 N, 14.4332317 E)
- 5) **Rybník Bendík**, Hlincová Hora (48.9794431 N, 14.5780225 E)
- 6) **Rybník Bezdrev**, Zliv (49.0477650 N, 14.3857458 E)
- 7) **Rybník Děkanec**, Domanín (48.9600458 N, 14.7611514 E)
- 8) **Velký Vávrovský rybník**, České Budějovice (48.9928428 N, 14.4398103 E)
- 9) **Zlivský rybník**, Zliv (49.0652514 N, 14.3550364 E)
- 10) **Žárský rybník**, Žár (48.8023317 N, 14.7175258 E)
- 11) **Žofínský rybník**, Žár (48.8051736 N, 14.7390725 E)



Obrázek 14: Mapa vybraných lokalit (mapový podklad z <https://mapy.cz>).

3.1.1 Bezejmenný rybník (Hluboká u Borovan)

Nedaleko města Borovany, směrem na Hlubokou u Borovan, vedle rybníka Krčín, leží malá vodní plocha, která podle map nemá žádné jméno. V této bakalářské práci tedy ponese pracovní název „rybníček u Hluboké u Borovan“. Voda zde byla zakalená, ale nebyl zde patrný vodní květ. Bylo zřejmé, že se zde nachází mnoho ryb. Tento rybník je pravděpodobně soukromý a je možné, že se využívá k hospodářským účelům. Na vodní hladině bylo navíc nainstalované zařízení, které zajišťovalo okysličování vody. Podle geologické mapy zde převažuje pískovité, štěrkovité až jílovité podloží (Paleček, 2017).



Obrázek 15 a 16: Lokalita rybníček u Hluboké u Borovan (foceno na podzim 2022).

3.1.2 Borský rybník

Tento rybník má své sídlo v Křemži. Na první pohled byl Borský rybník hojně obrostlý rákosem a na vodní hladině byl ve velké míře opad ze stromů. Na několika místech byly pozorovány velké nádoby se zrním pro vodní ptactvo. Hojně se zde vyskytovaly kachny. Vzorek planktonu byl odebrán z betonových schodů, které byly součástí tohoto rybníka. Na základě geologické mapy je podloží rybníka tvořeno peridotitem což je magmatická hornina (Paleček, 2017).

3.1.3 Břilický rybník

Břilický rybník je součástí Břilické rybníční soustavy, vyskytující se v obci Břilice, nedaleko Třeboně. Na této lokalitě se velmi hojně vyskytovala trhutka rýnská (*Riccia rhenana*). Vzorek planktonu byl odebírán z přístupného místa na hrázi. Geologická mapa ukazuje, že se zde nachází pískovité, štěrkovité až jílovité podloží (Paleček, 2017).

3.1.4 Lišovský rybník

Lišovský rybník je součástí Vrbenských rybníků. Jedná se o chráněný komplex rybníků a mokřadů v Českých Budějovicích. Vrbenské rybníky jsou významné díky výskytu velkého množství druhů ptáků.

Lišovský rybník byl v době návštěvy obýván hejnem labutí. I přesto byla lokalita v dobrém stavu a nebyla tolik znečištěná vodními ptáky. Na Lišovském rybníku byla místy viditelná vegetace vodních rostlin. Hojně zde rostly také duby a břízy. Podle geologické mapy zde převažuje jílovité, pískovité až štěrkovité podloží (Paleček, 2017).

3.1.5 Rybník Bendík

Rybník Bendík se rozkládá v obci Hlincová Hora nedaleko Českých Budějovic a má rozlohu okolo 7 hektarů (Liebscher & Rendek, 2014). V blízkosti tohoto rybníka se nacházela podmáčená louka. Samotný rybník byl pak hodně obrostlý rákosinami. Podle geologické mapy v této oblasti převažuje granolit (bělokámen) (Paleček, 2017).

3.1.6 Rybník Bezdrev

Rybník Bezdrev se rozprostírá v městečku Zliv a je označován za druhý největší rybník Jihočeského kraje. Svou rozlohou, 520 hektarů, je zároveň i druhým největším rybníkem České republiky (Košinová, 2021). Do rybníka je voda přiváděna Bezdrevským a Mydlovarským potokem. Bezdrev pak svým odtokem zásobuje několik malých rybníčků v okolí (Křivánek *et al.*, 2012).

Bezdrev má velké rybo-hospodářské využití. Díky množství kaprů, které se zde vychová, je Bezdrev považován za největšího producenta kaprů v České republice (Křivánek *et al.*, 2012). Je významný i z hlediska výskytu řady vodních ptáků (Liebscher & Rendek, 2014). Rybník Bezdrev má jemné písčité dno a řada návštěvníků ho využívá k rekreačním účelům (Košinová, 2021). Na základě geologické mapy se zde nachází pískovcové až jílovité podloží (Paleček, 2017).

3.1.7 Rybník Děkanec

Rybník Děkanec se nachází v obci Domanín a je součástí CHKO Třeboňsko. Voda z Děkance, spolu s dalšími rybníky, odtéká do Opatovického rybníka v Třeboni (Liebscher

& Rendek, 2014). Po obvodu rybníka převažoval výskyt dubů a břehy byly místy zarostlé rákosem. Rybník Děkanec byl v době odebírání vzorku v poměrně dobrém stavu. Geologická mapa ukazuje, že se zde nachází pískovité, štěrkovité až jílovité podloží (Paleček, 2017).



Obrázek 17 a 18: Břeh rybníku Děkanec (vlevo), odběr vzorku planktonu planktonní sítíkou (vpravo), (foceno na podzim 2022).

3.1.8 Velký Vávrovský rybník

Velký Vávrovský rybník je také jedním z několika Vrbenských rybníků v Českých Budějovicích. Vzhledem k tomu, že se zde nacházelo velké množství labutí, kachen a také lysek, byl rybník poměrně dost znečištěný a mírně zapáchal.

Podle geologické mapy se zde, stejně jako v případě Lišovského rybníka, vyskytuje jílovité, pískovité až štěrkovité podloží (Paleček, 2017).

3.1.9 Zlivský rybník

Zlivský rybník, jak sám název napovídá, sídlí ve Zlivi. Hovoří se o tom, že byl v minulosti Zlivský rybník a rybník Bezdrev jeden velký vodní komplex, ale po nějaké době od sebe byly rybníky odděleny hrází a vznikly z nich dvě samostatné jednotky (Křivánek *et al.*, 2012). Zlivský rybník je stejně jako Bezdrev napájen Bezdrevským potokem (Liebscher & Rendek, 2014). Podle geologické mapy by mělo být podloží rybníka tvořeno především pískem a štěrkem (Paleček, 2017).

Zlivský rybník měl místy kamenité břehy, které byly obrostlé rákosem, keřovými porosty a dřevinami jako je bříza či dub. Při pohledu na vodní plochu byly viditelné ostrůvky

vegetací, které zřejmě slouží jako útočiště pro vodní ptáky. V době odběru byla voda čistá a bez náznaku vodního květu.

3.1.10 Žárský rybník

Žárský rybník, nacházející se v obci Žár, je poměrně starý rybník. První zmínky o něm pocházejí již ze 13. století (Liebscher & Rendek, 2014). Asi nejvýznamnější je zde ostrov, který je vybudován přibližně v jedné třetině vodní plochy, a dokonce je možné se k němu dostat díky přístupové cestě směrem od Nových Hradů. Okolo celého rybníka byla rozprostřená travinná vegetace s mohutnými stromy v pozadí. V době odebrání vzorku planktonu byl Žárský rybník částečně vypuštěn. Hladina vody totiž začínala až téměř po 40 metrech od původního břehu. Odhalené koryto rybníka bylo bahnité. Geologická mapa ukazuje, že se zde nachází podloží v podobě dvojslídých granitů neboli žuly (Paleček, 2017).



Obrázek 19 a 20: Pohled na lokalitu Žárského rybníka (foceno na podzim 2022).

3.1.11 Žofínský rybník

Žofínský rybník je součástí rybníční soustavy na Janovce, nacházející se asi 2 km od obce Žár. Rybník byl v době návštěvy poměrně špinavý a u břehu byl patrný lehký vodní květ. Byly zde také nalezeny dvě mrtvé plotice, což může souviset s počátečními anoxickými podmínkami ve vodním prostředí. Podle geologické mapy by zde mělo převládat pískovcové až jílovité prostředí (Paleček, 2017).

3.2 Odběr vzorků a naměřené parametry

Počátek sezóny 2022 byl poněkud opožděnější než obvykle, neboť dlouhou dobu přetrvávalo chladné jarní počasí a fotosyntetická krásnoočka rodu *Phacus* nebyla na běžně známých lokalitách k nalezení. Vlastní odběry probíhaly až v měsících od konce června do konce září 2022.

Při odebírání vzorků byla používána planktonní síťka s oky o velikosti 20 μm , multimetry značky Hanna Instruments (modely HI98303 a HI98108), Secchiho deska a v neposlední řadě lahvičky na odběr planktonu a analýzu vody. Na každé lokalitě byla změřena vodivost, pH, teplota vody a Secchiho deskou byla zjištěna průhlednost. Po odebrání vzorku planktonu z dané lokality byla navíc odebrána voda z příslušné vodní plochy do lahviček o objemu 100 ml, které byly po vzorkování zamrazeny v mrazáku a později použity pro chemický rozbor vody. Parametry naměřené na jednotlivých lokalitách jsou shrnuty v tabulce 4 níže.

Tabulka 4: Vybrané lokality s naměřenými parametry.

Datum odběru	Lokalita	pH	Vodivost [$\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$]	Teplota vody [$^{\circ}\text{C}$]	Průhl. [cm]
30.6. 2022	r. Hluboká u B.	8,76	220	25,7	40
10.7. 2022	Břilický r.	7,60	330	19,2	15
21.7. 2022	Žárský r.	8,97	216	26,9	20 (dno)
21.7. 2022	Žofinský r.	11,02	193	30,9	13
26.7. 2022	r. Bendík	7,88	239	25,5	53
14.8. 2022	V. Várovní r.	9,49	435	23,8	20
14.8. 2022	Lišovský r.	10,26	339	24,0	30
18.9. 2022	Zlivský r.	9,00	301	13,1	32
18.9. 2022	Bezdravský r.	8,90	489	13,0	40
28.9. 2022	r. Děkanec	9,61	156	15,1	25
28.9. 2022	Borský r.	10,74	500	12,8	30

3.3 Determinace, fotografování a uchování vzorků

Všechny vzorky planktonu byly pod mikroskopem značky Olympus BX 51 řádně prohlédnuty. Z každého vzorku, resp. lokality, pak bylo pomocí fotoaparátu Olympus DP74 a programu cellSens (Olympus Corporation) pořízeno z každého vzorku 40 fotografií druhu *Phacus orbicularis* nebo *Phacus longicauda*. Celkem tedy vzniklo 320 fotografií *P. longicauda* (8 lokalit) a 160 fotografií *P. orbicularis* (4 lokality). Pouze na jedné lokalitě, v Břilickém rybníku, se podařilo nafotit oba druhy.

Vzorky byly následně zafixovány formaldehydem a uskladněny v lednici, aby bylo možné se k nim vrátit později v případě potřeby dofocení některých fotografií.

3.4 Analýza vody

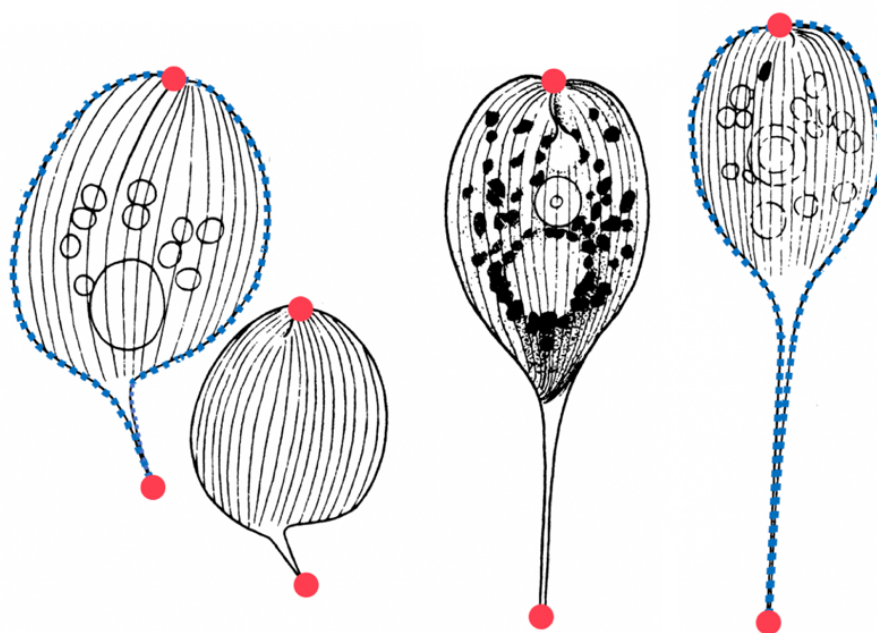
Dále byla provedena analýza vody, která byla odebírána současně se vzorkem planktonu. Na spektrofotometru značky Hanna Instruments (model HI83200 Multiparameter photometer) byla provedena analýza fosforu a dusíku, kde bylo měřeno množství amonného kationtu (NH_4^+) a fosforečného aniontu (PO_4^{3-}) podle příslušných protokolů. Kromě těchto dvou paramentů byl ze vzorků vody zjištěn celkový obsah organického uhlíku (TOC). Tato analýza byla provedena na botanickém ústavu v Třeboni pomocí přístroje Skalar Formacs^{HT} podle příslušného protokolu.

3.5 Geometrická morfometrika a PCA

Proto, aby mohla být zjištěna vnitrodruhová variabilita vybraných druhů krásnooček, byly potřeba nafocené fotografie daných druhů a dále počítačové programy tpsUtil, ver. 1.81 (Rohlf, 2021), tpsDig, ver. 2.31 (Rohlf, 2017) a Past, ver. 4.11 a ver. 2.17 (Hammer *et al.*, 2001). Následující postup byl projednán se specialistou na geometrickou morfometriku, panem prof. RNDr. Jiřím Neustupou, Ph.D., na domluvené konzultaci 2.11. 2022 v Praze.

V první řadě byla celá složka se 40 nafocenými fotografiemi *Phacus longicauda* či *Phacus orbicularis* z konkrétní lokality (např. z Lišovského rybníka) převedena do tps soboru. Tuto funkci, a také mnoho dalších, provádí tpsUtil. Díky tomu byl získán tps soubor, se kterým bylo možné dále pracovat, neboť programy na geometrickou morfometriku neuměly rozpoznat fotografie v běžném formátu. Tps soubor byl následně vložen do dalšího programu, a to konkrétně do programu tpsDig (konzultováno s prof. RNDr. Jiřím Neustupou, Ph.D., 2.11. 2022; metodika Hodač, 2007).

TpsDig byla klíčovou aplikací geometrické morfometrie. Zde se na zobrazené objekty umísťovaly pevné body neboli landmarky a také semilandmarky, které analyzovaly celkový obrys objektu. V případě druhů *Phacus* byly landmarky umísťované do dvou míst. První z nich byl orientován na konec kaudálního výběžku a druhý do místa, kde vybíhal bičík, tedy do apikální části buňky. Tato místa byla vybrána proto, že jsou jasně identifikovatelná, neměnná a vyskytují se u všech jedinců rodu *Phacus*. Po umístění pevných bodů následovalo umístění semilandmarků po obvodu daného objektu. Vzhledem k tomu, že dva pevné body (landmarky) rozdělovaly *Phacus* na dvě poloviny, bylo potřeba, aby každá polovina objektu obsahovala stejné množství semilandmarků. Tato skutečnost nemusela být kontrolována ručně. Program tpsDig umožnil umístění potřebného množství semilandmarků do obrysu a navíc umísťoval body ekvidistančně neboli ve stejné vzdálenosti od sebe. Mezi dvěma pevnými body bylo vždy na každé straně umístěno 29 semilandmarků. Na obrázku 21 jsou zobrazeny morfortypy krásnooček *P. longicauda* a *P. orbicularis* s názorným označením landmarků a semilandmarků. Celkový počet landmarků a semilandmarků pro každý objekt byl 60 (konzultováno s prof. RNDr. Jiřím Neustupou, Ph.D., 2.11. 2022; metodika Hodač, 2007).



Obrázek 21: Znázornění umístění landmarků (červené body) a semilandmarků (modré tečkované křivky) na *Phacus orbicularis* (vlevo) a *Phacus longicauda* (vpravo), (Pochmann 1942, upraveno).

V okamžiku, kdy byly na všech 40 objektech označeny zmíněné důležité body (landmarky a semilandmarky), mohl být celý soubor uložen ve formátu tps. Tento postup byl následně proveden u všech lokalit. Hlavním cílem praktické části bylo porovnání vnitrodruhové variability. Aby byla analýza provedena, bylo potřeba spojit lokality se stejným druhem a vytvořit tak dva velké tps soubory – jeden pro *P. longicauda* a druhý pro *P. orbicularis*. Tyto dva tps dokumenty byly následně analyzovány samostatně. Nejprve bylo potřeba z tps souboru ručně odstranit jakýkoliv text a následně ho přeformátovat do nts souboru, opět za pomoci programu tpsUtil. Následně mohl být soubor importován do programu Past, ver. 4.11 (popsal prof. RNDr. Jiří Neustupa, Ph.D., 2.11. 2022).

V Past, ver. 4.11 byly soubory nejprve pro lepší orientaci upraveny tak, aby byla každá lokalita odlišena jinou barvou. Poté byla provedena prokrustovská analýza. Ta umožnila orientaci všech objektů tak, aby si jejich body vzájemně odpovídaly. Následně byla v programu Past, ver. 4.11 provedena analýza hlavních komponent (PCA), díky které bylo možné popsat vnitrodruhovou variabilitu *P. longicauda* a *P. orbicularis* (metodika Hodač, 2007). Pro kontrolu výsledků byla navíc z prvních deseti PC os, vysvětlujících největší množství variability, provedena diskriminační analýza (CVA).

4 Výsledky

4.1 Výsledky analýzy vody

Tabulka 5 níže shrnuje celkové výsledky z analýzy vody. U Břilického rybníka chybí parametr TOC. Tento vzorek byl obdržen od kolegy a bohužel z této lokality nebyl k dispozici další vzorek vody, který by mohl být odeslán na botanický ústav do Třeboně na TOC.

Tabulka 5: Výsledky analýzy vody.

Datum odběru	Lokalita	NH ₄ ⁺ [mg.l ⁻¹]	PO ₄ ³⁻ [mg.l ⁻¹]	TOC [mg.l ⁻¹]
30.6. 2022	r. Hluboká u Bor.	0,65	0,1	29,4
10.7. 2022	Břilický r.	0,44	1,3	–
21.7. 2022	Žárský r.	0,45	1,5	35,1
21.7. 2022	Žofínský r.	0,42	1,1	56,5
26.7. 2022	r. Bendík	0,25	1,4	21,5
14.8. 2022	V. Várovní r.	0,21	0,8	39,6
14.8. 2022	Lišovský r.	0,41	1,1	33,6
18.9. 2022	Zlivský r.	0,26	1,5	24,1
18.9. 2022	Bezdravský r.	0,15	0,3	21,2
28.9. 2022	r. Děkanec	0,31	0,5	24,3
28.9. 2022	Borský r.	0,50	1,2	31,2

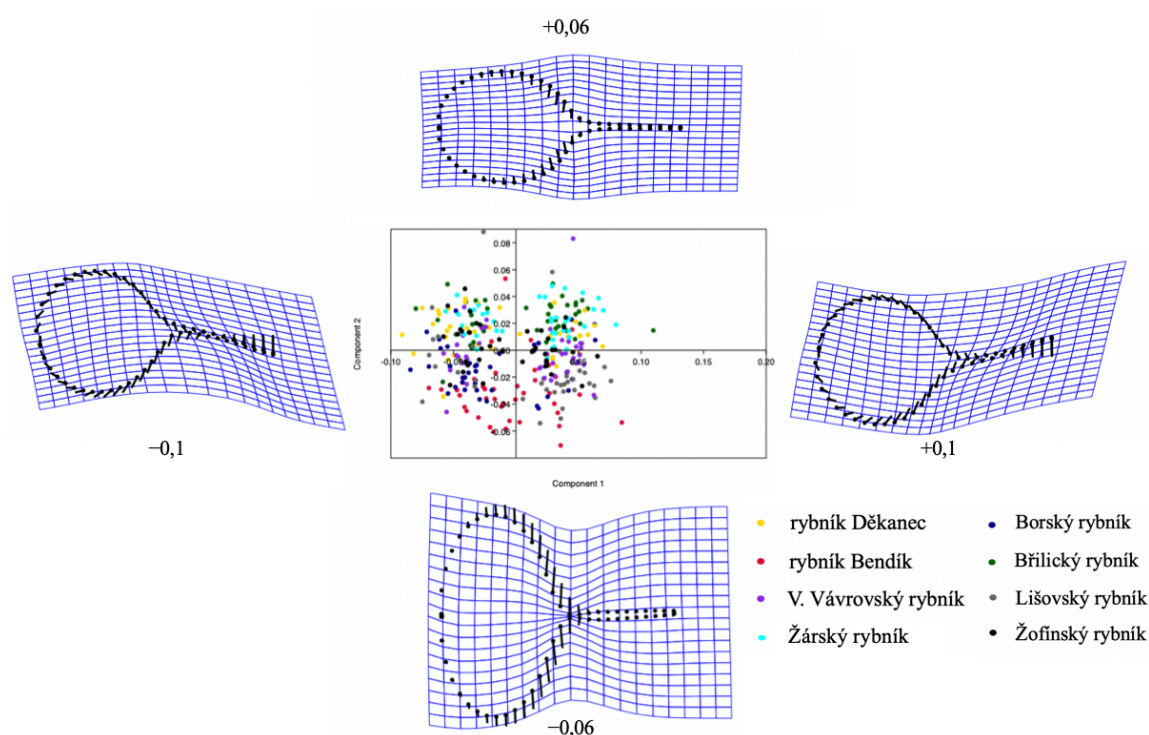
4.2 Morfologická variabilita fotosyntetických krásnooček

4.2.1 *Phacus longicauda*

Z bodového diagramu (obr. 22), který byl získán provedením PCA u druhu *Phacus longicauda*, lze na první pohled rozeznat dva barevné shluky teček oddělené mezerou. Obecně platí, že tečky, resp. objekty, které jsou si blíže vzdálené, jsou si podobnější než ty, které jsou od sebe více vzdálené. Osa 1 rozděluje analyzované organismy do dvou skupin podle toho, zda mají kaudální výběžek orientovaný směrem nahoru nebo dolů. Osa 1 tedy

nemá žádný biologický význam. Stejně tak na deformačních mřížkách osy 1 není zaznamenána změna tvaru, ale pouze rozdělení organismů podle orientace kaudálního výběžku. To, jak je kaudální výběžek nasměrovaný, je čistě náhoda. *P. longicauda* je plochý, symetrický organismus a při focení není možné rozeznat, kde je jeho spodní a svrchní strana. Kdyby byla data symetrizovaná, tak by tato osa zmizela. Její přítomnost výsledkům nevadí, nicméně ji nelze interpretovat i přes to, že vysvětluje 66,1 % celkové variability (konzultováno s prof. RNDr. Jiřím Neustupou, Ph.D., 27. 3. 2023).

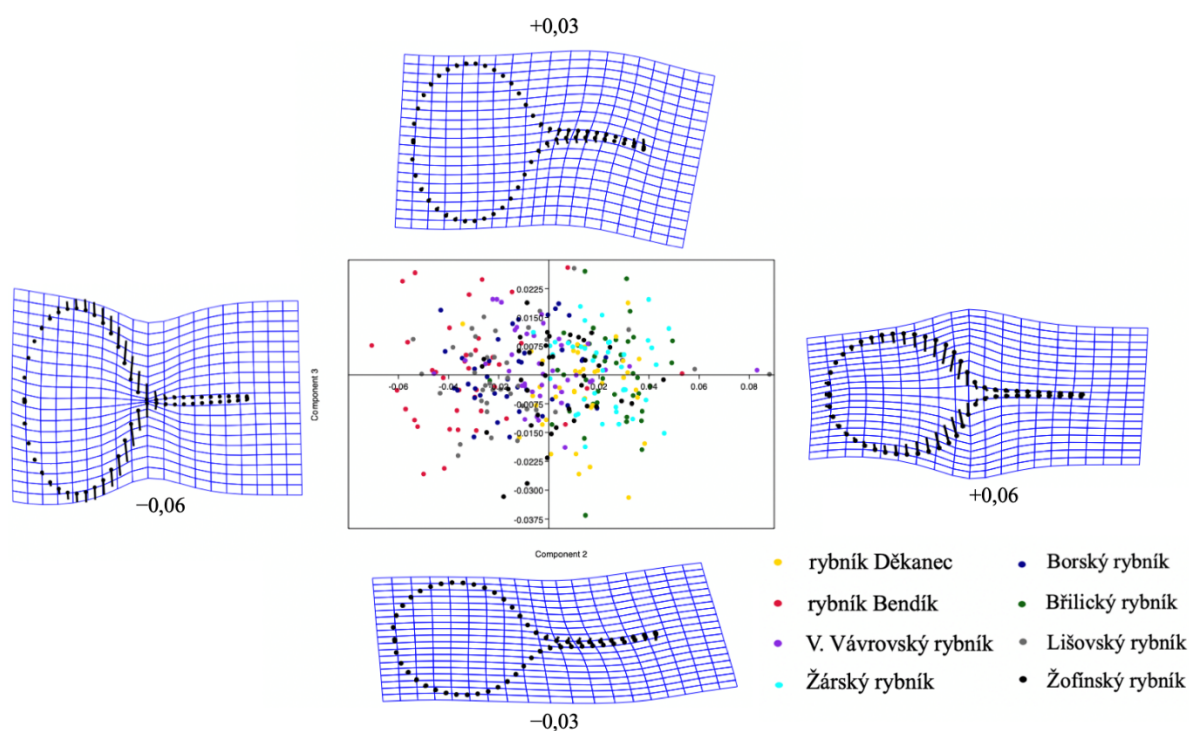
Osa 2, vysvětlující 25 % celkové variability, již reprezentuje tvarovou změnu. Deformační mřížky osy 2 znázorňují především změny v šířkách buněk. Objekty, které se nacházejí v záporných hodnotách (např. rybník Bendík), budou mít buňky poměrně dost široké, naopak objekty, které se blíží kladným hodnotám (např. Žárský rybník), budou mít spíše kulatější charakter buněk.



Obrázek 22: Bodový diagram os PC 1 a 2 u druhu *Phacus longicauda* se zobrazením deformačních mřížek reprezentujících vždy extrémní tvar druhu na příslušné ose (číselné hodnoty u deformačních mřížek udávají, v jakých místech grafu leží vyobrazený morfotyp). Procento vysvětlené variability na ose 1 je 66,1 %, procento vysvětlené variability na ose 2 je 25 % (generováno z Past, ver. 4.11, upraveno).

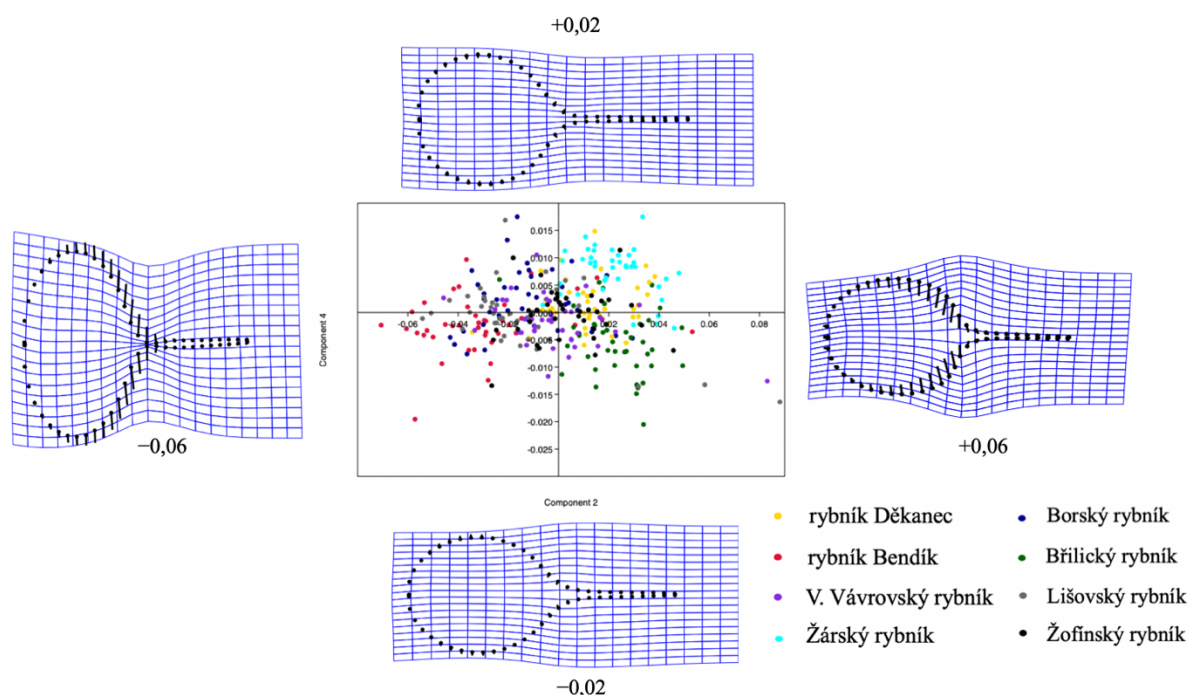
Z bodového diagramu, který byl znázorněn pomocí osy 1 a 2, nebylo získáno mnoho informací o tvarové variabilitě. Proto byly vytvořeny další bodové diagramy, které znázorňují závislost osy 2 na ose 3 a 4. Tyto osy, oproti dalším, ještě popisují vyšší procento variability, proto byly zohledněny a použity pro zobrazení tvarových změn.

Osa 3, vysvětlující 4,4 % variability, a vyobrazené deformační mřížky (obr. 23), znázorňují opět změnu v šířkách buněk a také v zakřivení kaudálního výběžku. V předchozím případě, kdy byla na deformačních mřížkách vyobrazena odlišná orientace kaudálního výběžku, nebylo možné výsledky interpretovat. Nicméně v tomto případě dochází k tvarovým změnám v obou polovinách deformačních mřížek. Tato osa tak popisuje tvarovou změnu a lze ji užít k charakteristice objektů. Z grafu je viditelné, že se některé populace odlišují od ostatních. Např. organismy z Žárského rybníka jsou na grafu orientovány pouze v pravé části, zatímco organismy z rybníka Bendík jsou v levé části grafu.



Obrázek 23: Bodový diagram os PC 2 a 3 u druhu *Phacus longicauda* se zobrazením deformačních mřížek reprezentujících vždy extrémní tvar druhu na příslušné ose (číselné hodnoty u deformačních mřížek udávají, v jakých místech grafu leží vyobrazený morfotyp). Procento vysvětlené variability na ose 2 je 25 %, procento vysvětlené variability na ose 3 je 4,4 % (generováno z Past, ver. 4.11, upraveno).

Osa 4, která vysvětluje 1,4 % celkové variability, již popisuje relativně málo tvarových změn. Deformační mřížky osy 4 (obr. 24) znázorňují jen drobné rozdíly v celkovém tvaru objektů. K tvarovým změnám dochází i v místě, kde kaudální výběžek vystupuje z buňky. Díky rozložení PC os 2 a 4 pozorujeme na obrázku 24, že barevně odlišené lokality působí zatím nejkompaktnějším dojmem a jen minimální množství objektů se nachází ve větší vzdálenosti. Např. objekty Žárského nebo Břilického rybníka víceméně leží, s drobnými odchylkami, v jednom kvadrantu. Díky PC osám 2 a 4 si lze asi nejlépe představit, jaký morfotyp druhu *P. longicauda* převládá na dané lokalitě.



Obrázek 24: Bodový diagram PC osy 2 a 4 u druhu *Phacus longicauda* se zobrazením deformačních mřížek reprezentujících vždy extrémní tvar druhu na příslušné ose (číselné hodnoty u deformačních mřížek udávají, v jakých místech grafu leží vyobrazený morfotyp). Procento vysvětlené variability na ose 2 je 25 %, procento vysvětlené variability na ose 4 je 1,4 % (generováno z Past, ver. 4.11, upraveno).

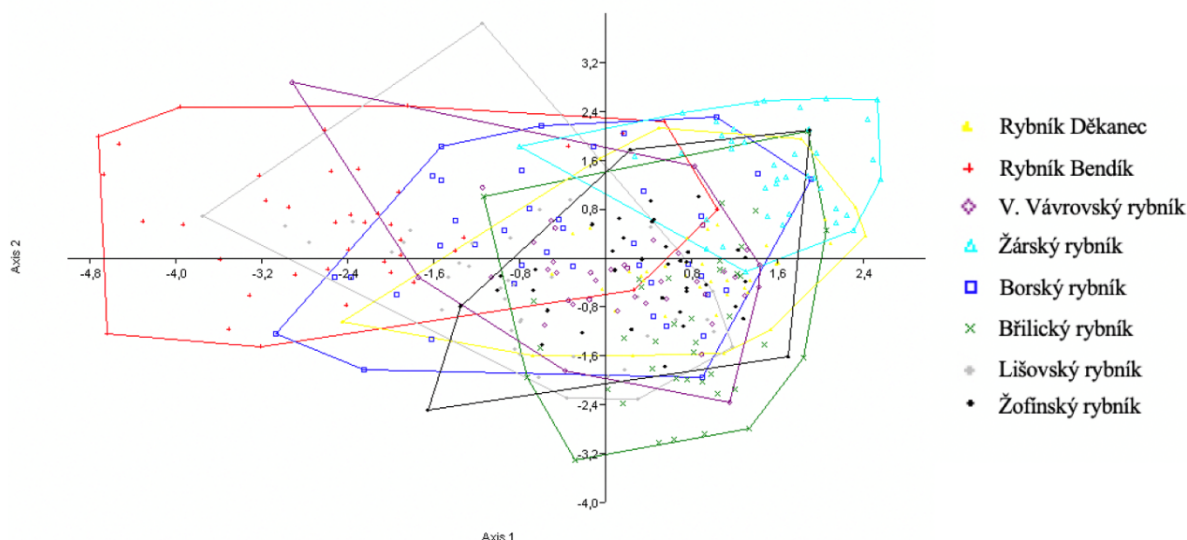
Ze všech grafů je na první pohled pravděpodobné, že se mezi sebou budou jednotlivé populace *P. longicauda* z různých lokalit lišit. Pro potvrzení tohoto výsledku byla provedena diskriminační analýza za použití funkce MANOVA/CVA v programu Past, ver. 2.17. Na základě získaného výsledku (Wilksova lambda = 0,1373; $p = 3,745 \times 10^{-88}$) bylo potvrzeno, že populace organismů nejsou identické. Dále, aby bylo zjištěno, zda se mezi sebou všechny

lokality liší nebo jsou identické, byly provedeny skupinové testy, jejichž výsledky jsou shrnuty v tabulce 6. Z tabulky 6 vyplývá, že se dvě dvojice lokalit vzájemně neliší, a jsou tím pádem „identické“. U dvojice Žofínský a Žárský rybník je výsledek, že se tyto lokality průkazně neliší, akceptovatelný. U dvojice Velký Vávrovský a Žofínský rybník však byla získána nepravděpodobně vysoká hodnota 1. Takovýto výsledek by značil, že jsou tyto dvě lokality z hlediska analyzovaných organismů, totožné. Jednalo by se o velkou náhodu, neboť prostředí, ve kterém organismy žijí je velmi variabilní, a je ovlivňováno lokálními podmínkami.

Tabulka 6: Výsledky diskriminační analýzy u druhu *Phacus longicauda* s Bonferroniho korelací (Wilksova lambda = 0,1373), kde červeně zabarvené výsledky znamenají, že se lokality vzájemně liší a nezabarvené výsledky, že jsou „identické“.

	Bendík	Borský	Břilický	Děkanec	Lišovský	V. Váv.	Žárský	Žofínský
Bendík	–	$3,78 \times 10^{-10}$	$5,10 \times 10^{-17}$	$3,53 \times 10^{-16}$	$8,31 \times 10^{-11}$	$2,36 \times 10^{-13}$	$8,06 \times 10^{-20}$	$1,83 \times 10^{-13}$
Borský	$3,78 \times 10^{-10}$	–	$1,06 \times 10^{-9}$	0,00077	0,00454	0,01807	$2,73 \times 10^{-10}$	0,03877
Břilický	$5,10 \times 10^{-17}$	$1,10 \times 10^{-9}$	–	$8,01 \times 10^{-5}$	$4,22 \times 10^{-10}$	$2,04 \times 10^{-6}$	$6,37 \times 10^{-12}$	0,00036
Děkanec	$3,5 \times 10^{-16}$	0,00077	$8,01 \times 10^{-5}$	–	$3,10 \times 10^{-5}$	0,00017	$4,89 \times 10^{-6}$	0,19363
Lišovský	$8,31 \times 10^{-11}$	0,00454	$4,22 \times 10^{-10}$	$3,10 \times 10^{-5}$	–	$2,23 \times 10^{-6}$	$1,13 \times 10^{-14}$	$2,92 \times 10^{-6}$
V. Váv.	$2,36 \times 10^{-13}$	0,01807	$2,04 \times 10^{-6}$	0,00017	$2,23 \times 10^{-6}$	–	$5,87 \times 10^{-10}$	1
Žárský	$8,10 \times 10^{-20}$	$2,73 \times 10^{-10}$	$5,37 \times 10^{-12}$	$4,89 \times 10^{-6}$	$1,13 \times 10^{-14}$	$5,87 \times 10^{-10}$	–	$2,63 \times 10^{-8}$
Žofínský	$1,83 \times 10^{-13}$	0,03877	0,00036	0,19363	$2,92 \times 10^{-6}$	1	$2,63 \times 10^{-8}$	–

Skutečnost, že jsou lokality V. Vávrovský a Žofínský rybník totožné, nepotvrzuje ani obrázek 25. Kdyby byl výsledek správný, tak by se výseče těchto lokalit měly v plném rozsahu překrývat, což se bohužel neděje. Při provádění této analýzy pravděpodobně došlo k chybě, která po opakovaném zkoumání nebyla odhalena. Data byla znovu nahrána do programu Past, ver. 4.11, obarvena podle lokalit a analyzována podle doporučeného postupu. Dokonce i souřadnice landmarků a semilandmarků byly úplně odlišné, nicméně i přesto diskriminační analýza udává, že jsou průměry souřadnic z těchto skupin identické.



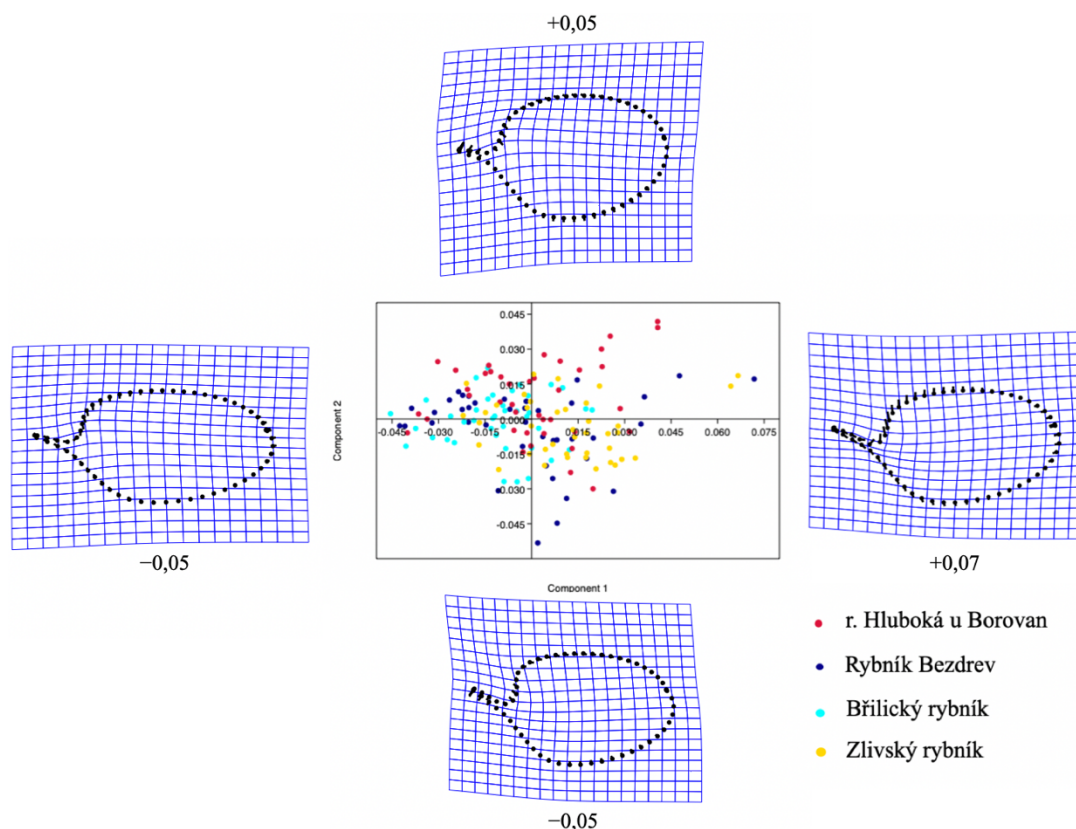
Obrázek 25: Výsledek CVA u druhu *Phacus longicauda* zobrazující, jak se mezi sebou jednotlivé lokality liší (generováno z Past, ver. 2.17).

4.2.2 *Phacus orbicularis*

Na grafu a vygenerovaných deformačních mřížkách u druhu *Phacus orbicularis* (obr. 26) je patrné, že obě osy, PC 1 i PC 2, vykazují biologický význam a reprezentují změny tvaru organismů. Na ose 1, která vysvětluje 47,1 % celkové variability, dochází ke změnám velikosti buněk. Objekty, které na bodovém diagramu leží v záporných hodnotách (např. Břilický rybník), budou mít buňky o něco delší než organismy, které se nachází v kladných hodnotách bodového diagramu (např. Zlivský rybník či rybník Bezdrev).

Osa 2 popisující 24,3 % variability zobrazuje asymetrii v oblasti kaudálního výběžku. Organismy dosahující záporných hodnot budou mít kaudální výběžek více zakřivený (např. rybník Bezdrev) než organismy blízké se kladným hodnotám bodového diagramu (např. rybník Hluboká u Borovan).

Další osy 3 (9,2 % vysvětlené variability) a 4 (6 % vysvětlené variability) a jejich příslušné deformační mřížky představovaly opět změny v oblasti kaudálního výběžku. Mezi změnami však byly pouze minimální rozdíly. Populace *P. orbicularis* není potřeba reprezentovat dalšími bodovými diagramy s deformačními mřížkami. Bodové diagramy sestavené různou kombinací PC os dále nevykazovaly kompaktnější rozpořádání objektů a deformační mřížky stále popisovaly změny v zakřivení kaudálního výběžku. Obrázek 26 tedy dostatečně popisuje změny týkající se populací *P. orbicularis* na různých místech nálezů.

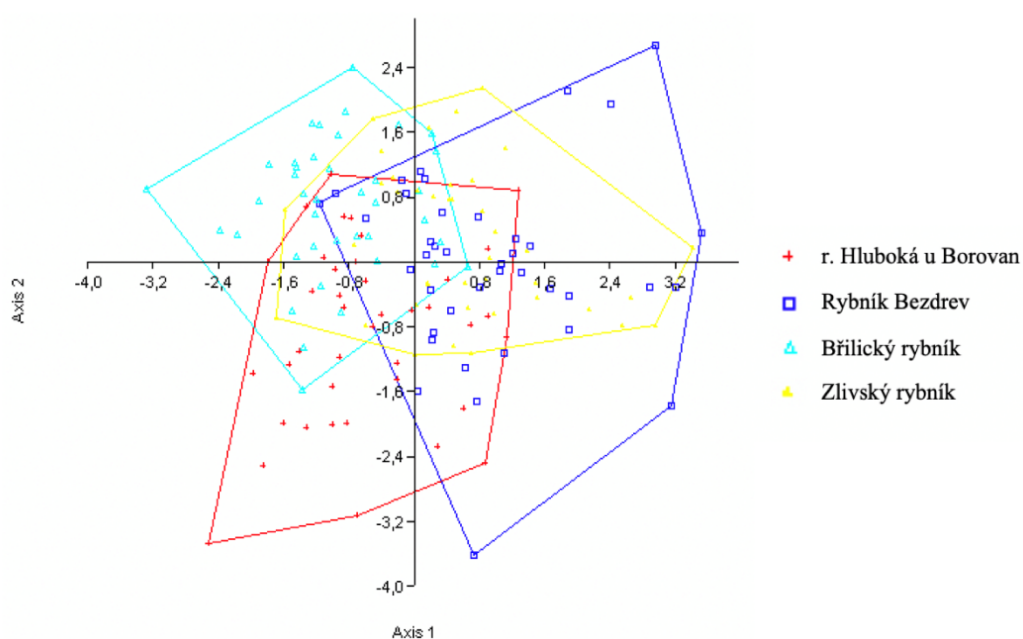


Obrázek 26: Multivariační metoda u druhu *Phacus orbicularis* se zobrazením deformačních mřížek reprezentujících vždy extrémní tvar druhu na příslušné ose (číselné hodnoty u deformačních mřížek udávají, v jakých místech grafu leží vyobrazený morfotyp). Procento vysvětlené variability na ose 1 je 47,1 %, procento vysvětlené variability na ose 2 je 24,3 % (generováno z Past, ver. 4.11, upraveno).

I v případě tohoto druhu lze z grafu předpokládat, že se mezi sebou jednotlivé populace druhu *P. orbicularis* z různých lokalit liší. V programu Past, ver. 2.17 byla provedena diskriminační analýza pomocí funkce MANOVA/CVA, která tento předpoklad potvrdila (Wilksova lambda = 0,3928; $p = 1,796 \times 10^{-16}$). Z obrázku 27 je patrné, že se všechny čtyři analyzované lokality překrývají, nicméně skupinové testy, jejichž výsledky jsou zobrazeny v tabulce 7, prokázaly, že se mezi sebou lokality, kromě Zlivského rybníka a rybníka Bezdrev, průkazně liší. Objekty ze Zlivského rybníka a rybníka Bezdrev jsou si tedy podobnější než jiné dvojice objektů z lokalit.

Tabulka 7: Výsledky diskriminační analýzy u druhu *Phacus orbicularis* s Bonferroniho korelací (Wilksova lambda = 0,3928), kde červeně zabarvené výsledky znamenají, že se lokality vzájemně liší a nezabarvené výsledky, že jsou si podobnější.

	rybník Bezdrev	Břilický rybník	rybník H. u B.	Zlivský rybník
rybník Bezdrev	–	4,59186×10 ⁻⁷	1,1497×10 ⁻⁵	0,0812321
Břilický rybník	4,59186×10 ⁻⁷	–	0,000287708	2,51202×10 ⁻⁵
rybník H. u B.	1,14978×10 ⁻⁵	0,000287708	–	5,68998×10 ⁻⁵
Zlivský rybník	0,0812321	2,51202×10 ⁻⁶	5,68998×10 ⁻⁵	–



Obrázek 27: Výsledek CVA u druhu *Phacus orbicularis* zobrazující, jak se mezi sebou jednotlivé lokality liší (generováno z Past, ver. 2.17).

5 Diskuze

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo zkoumání morfologické variability fotosyntetických krásnooček a zjištění, zda se mezi sebou populace stejného druhu z různých rybníků morfologicky liší. Díky analýze hlavních komponent (PCA) a diskriminační kanonické analýze (CVA) byla prokázána vnitrodruhová variabilita v rámci dvou zkoumaných druhů, a to *Phacus longicauda* a *Phacus orbicularis*. Lokality, jejichž objekty byly analyzovány při experimentu, nebyly vybírány podle určitých parametrů, ale pouze na základě toho, zda se zde vyskytovaly druhy *P. longicauda* a *P. orbicularis*. Mezi vybranými rybníky nebyla pozorována žádná podobnost. Každé stanoviště, ve kterém se krásnoočka nacházejí, je ovlivňováno lokálními podmínkami a vyznačuje se specifickými chemickými a fyzikálními parametry jako je teplota vody, pH, vodivost či zastoupení určitých prvků. Právě různé parametry vodního prostředí značně ovlivňují lokální populace organismů a podílí se na jejich morfologické variabilitě.

Na základě studie Neustupa & Hodač (2005) bylo zjištěno, že pH ovlivňuje velikost a tvar řasy *Pediastrum*. Přesto, že dosud nebyla provedena takováto studie na krásnoočkách, je zcela jasné, že i u nich budou různé hladiny pH ovlivňovat jejich morfologii. Přesto, že u některých analyzovaných lokalit bylo naměřeno podobné pH, nebyla nalezena žádná spojitost, která by s jistotou popisovala typ morfologické změny v závislosti na pH. Na usuzování toho, do jaké míry pH způsobuje změny ve tvaru krásnooček, bylo k dispozici také malé množství dat a v zásadě se nejedná o jediný faktor prostředí, který by ovlivňoval jejich morfologii. Další experimenty s geometricko-morfologickým využitím, konstruované stejným způsobem jako u *Pediastrum*, by tak mohly přinést nové poznatky do tohoto tématu.

Také teplota vody jistě přispěla k velké variabilitě zkoumaných jedinců rodu *Phacus*. Nejnižší teplota vody, 13,0 °C, byla naměřena po polovině září a naopak nejvyšší teplota vody, 30,9 °C, byla naměřena ke konci července. Tyto hodnoty nebyly změřeny na stejných lokalitách, ani v podobném časovém úseku, a proto by bylo obtížné jejich objekty porovnávat. Již několik výzkumníků (Atkinson *et al.*, 2003; Neustupa *et al.*, 2008) svými experimenty potvrzuje, že se s rostoucí teplotou prostředí snižuje velikost těla eukaryotických buněk. Atkinson *et al.* (2003) dokonce navrhli přesnou zákonitost, která říká, že pokud se voda v běžných podmínkách prostředí (cca 15 °C) začne oteplovat, tak se s každým zvýšeným stupněm Celsia snižuje velikost buněk vodních protist o asi 2,5 %. Do této bakalářské práce měl být zahrnut i pilotní experiment, při kterém by se kultury druhů *P. longicauda*

a *P. orbicularis* vystavovaly různým podmínkám. Bylo by tedy zajímavé porovnávat velikosti populací kultivovaných v různých teplotních podmínkách a následně vyhodnotit, zda teorie týmu Atkinson *et al.* (2003) platí i v případě krásnooček. Kultivační podmínky pro *P. longicauda* a *P. orbicularis* bohužel nebyly příznivé a kultury se nepodařilo udržet životaschopné. Původní praktická část této bakalářské práce byla naplánovaná jako sezonní odběry na předem vybraných lokalitách s tím, že se bude zkoumat jakým způsobem se během vegetační sezony populace vyvíjí. Kvůli nepříznivým podmínkám nebylo možné vybrané druhy z počátku nalézt, proto musela být praktická část upravena do odlišné podoby a odběr z dané lokality probíhal vždy jednou a ne několikrát v průběhu sezony. Tím pádem byla vyloučena možnost velikostně porovnat druhy *P. longicauda* a *P. orbicularis* z různých časových období.

Jednotlivé lokality se také lišily v množství celkového organického uhlíku. Conforti (1998), Nannavecchia *et al.* (2014) či Conforti *et al.* (2017) ve svých pokusech obohacovaly kultury krásnooček o hovězí extrakt, což prokazatelně způsobilo morfologické změny jejich buněk. Všechny tyto experimenty však byly založeny pouze na komparativním porovnání organismů, proto by nebylo od věci stejný experiment zopakovat a změny v jejich tvaru analyzovat pomocí moderních morfometrických metod. Každopádně, jak současné studie ukazují, množství organických látek v prostředí hraje významnou roli.

Při zkoumání morfologické variability fotosyntetických krásnooček nebylo jednoznačně prokázáno, jakým způsobem teplota vody, pH či množství organických látek ve vodě ovlivňují morfologii krásnooček. Pro zjištění těchto zákonitostí je potřeba provádět cílené kultivační experimenty na vybraných druzích organismů. Nicméně na základě všech zmíněných studií (Conforti, 1998; Atkinson *et al.*, 2003; Neustupa & Hodač, 2005; Neustupa *et al.*, 2008; Nannavecchia *et al.*, 2014; Conforti *et al.*, 2017) lze předpokládat, že morfologie krásnooček úzce souvisí s chemicko-fyzikálními aspekty prostředí. Každé prostředí je unikátní, a proto není divu, že byla potvrzena u obou druhů, *Phacus longicauda* i *Phacus orbicularis*, vysoká vnitrodruhová variabilita.

V neposlední řadě je potřeba zmínit několik věcí, které mohly ovlivnit výsledky experimentu. Je potřeba podotknout, že zájmové druhy byly odebírány z přirozeného prostředí, a tak mohly být do experimentu zahrnuty jedinci různé genetické diverzity či různého vývojového stádia. K minimálním odchylkám mohlo dojít také při aplikaci geometrické morfometriky. Fotografie druhů *Phacus* byly vždy foceny tak, aby objekty ležely v jedné rovině, nebyly zkroucené ani nijak jinak přetočené. I přes to se mezi jednotlivými

fotografiemi mohly vyskytnout drobné nuance. Landmarky a semilandmarky by tak v rámci špatně orientovaných objektů mohly být umístovány nepřesně. Tato skutečnost však nikdy nebyla prováděna vědomě a fotografie byly vybrány tak, aby bylo zamezeno špatnému umístování orientačních bodů, nicméně je potřeba počítat s možnými drobnými odchylkami. Dále, jak již bylo zmíněno, ve výsledcích, u tabulky 6, vyšla ve skupinových testech u druhu *P. longicauda* příliš vysoká hodnota pravděpodobnosti, která by vypovídala o tom, že jsou dvě lokality, Žofínský a Velký Vávrovský rybník, úplně identické. Takovýto výsledek je dosti podezřelý, ale samozřejmě není nemožný. Jednalo by se však o velkou náhodu. Pokud by tato skutečnost platila, stejný výsledek by byl viditelný z grafu, a to tak, že by se tyto dvě lokality plně překrývaly. To, jak bylo předem očekáváno, graf nedokazoval. S největší pravděpodobností tedy muselo dojít k chybě. Ta však po opakovaných pokusech nebyla nalezena.

6 Závěr

- 1) Byla vypracována literární rešerše shrnující poznatky současných studií o fylogenezi, taxonomii a ontogenezi krásnooček a v neposlední řadě také faktorech prostředí, které se podílejí na formování jejich tvaru.
- 2) Výsledkem experimentální části bakalářské práce bylo zjištění, že se populace organismů *Phacus longicauda* a *Phacus orbicularis* morfologicky liší v rámci druhu. Byly zaznamenány rozdílné morfologické vlastnosti stejného druhu na různých lokalitách, které jsou zapříčiněny specifickými vlastnostmi vodního prostředí.

7 Citace

Adams, D.C., Rohlf, F.J., & Slice D.E. (2004). Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology*, **71**(1), 5-16. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/11250000409356545>

Adl, S. M., Bass, D., Lane, C.E., *et al.* (2019). 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>

Atkinson, D., Ciotti, B.J., & Montagnes, D.J.S. (2003). Protists decrease in size linearly with temperature: ca. 2.5% °C⁻¹. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 270(1533), 2605-2611. Dostupné z: <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2538>

Bauer, D.E., Conforti, V., Ruiz, L., & Gómez, N. (2012). An *in situ* test to explore the responses of *Scenedesmus acutus* and *Lepocinclis acus* as indicators of the changes in water quality in lowland streams. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **77**, 71-78. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.10.021>

Chapman, V. J., & Chapman, D.J. (1973). Euglenophyta, Xanthophyta, Chloromonadophyta. In: *The Algae*, 2. vydání [online]. Londýn: The Macmillan Press Ltd, 124-143. ISBN 978-1-349-27912-8. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-349-27910-4_6 [19. 6. 2022]

Ciugulea, I., & Triemer, R.E. (2010). *A Color Atlas of Photosynthetic Euglenoids*. East Lansing: Michigan State University Press. ISBN 0870138790.

Conforti, V. (1998). Morphological changes of Euglenophyta in response to organic enrichment. *Hydrobiologia*, **369**, 277-285. Dostupné z <https://doi.org/10.1023/A:1017049910481>

Conforti, V.T., Ruiz, L.B., & Leonardi, P.I. (2017). Ultrastructural alterations in *Lepocinclis acus* (Euglenophyta) induced by medium with high organic matter content. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **5**. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00141>

Dillard, G.E. (2000). *Freshwater algae of the Southeastern United States, Part 7 Pigmented Euglenophyceae*. Berlín: Bibliotheca Phycologica. ISBN 3-443-60033-6.

Esson, H.J., & Leander B.S. (2010). Evolution of distorted pellicle patterns in rigid photosynthetic euglenids (*Phacus* Dujardin). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **57**(1), 19-32. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2009.00447.x>

Gonçalves, C. de A., & Figueredo C.C. (2020). What we really know about the composition and function of microalgae cell coverings? - an overview. *Acta Botanica Brasilica*, **34**(4), 599-614. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/0102-33062020abb0309>

Guiry, M.D., & Guiry, G.M. (2023). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org> [21. 3. 2023]

Häder, D.P., & Iseki, M. (2017). Photomovement in *Euglena*. In: Schwartzbach, S.D., Shigeoka, S., ed. *Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology* [online]. Cham: Springer International Publishing. ISBN 978-3-319-54908-8. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-319-54910-1_11 [6.6. 2022]

Halter, D., Goulhen-chollet, F., Gallien, S., *et al.* (2012). *In situ* proteo-metabolomics reveals metabolite secretion by the acid mine drainage bio-indicator, *Euglena mutabilis*. *The ISME Journal*, **6**(7), 1391-1402. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.198>

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.

Hodač, L. (2007). Geometrická morfometrika při studiu populační dynamiky a ekologie rodu *Pediastrum* v eutrofních vodních nádržích. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky. Vedoucí práce Neustupa, Jiří.

Karamizadeh, S., Abdullah, S.M., Manaf, A.A., Zamani, M., & Hooman A. (2013). An overview of principal component analysis. *Journal of Signal and Information Processing*, **4**(3), 173-175. Dostupné z: <https://doi.org/10.4236/jsip.2013.43B031>

Kim, J.I., & Shin, W. (2014). Molecular phylogeny and cryptic diversity of the genus *Phacus* (Phacaceae, Euglenophyceae) and the descriptions of seven new species. *Journal of Phycology*, **50**(5), 948-959. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jpy.12227>

Klingenberg, C.P. (2015). Analyzing fluctuating asymmetry with geometric morphometrics: concepts, methods, and applications. *Symmetry*, **7**(2), 843-934. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/sym7020843>

Kosmala, S., Bereza, M., Milanowski, R., Kwiatowski, J., & Zakryś, B. (2007 a). Morphological and molecular examination of relationships and epitype establishment of *Phacus pleuronectes*, *Phacus orbicularis*, and *Phacus hamelii*. *Journal of Phycology*, **43**(5), 1071-1082. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00386.x>

Kosmala, S., Milanowski, R., Brzóska, K., Pékala, M., Kwiatowski, J., & Zakryś, B. (2007 b). Phylogeny and systematics of the genus *Monomorphina* (euglenaceae) based on morphological and molecular data. *Journal of Phycology*, **43**(1), 171-185. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00298.x>

Kostygov, A. Y., Karnkowska, A., Votýpka, J., Tashyreva, D., Maciszewski, K., Yurchenko, V., & Lukeš J. (2021). Euglenozoa: taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. *Open Biology*, **11**(3). Dostupné z: <https://doi.org/10.1098/rsob.200407>

Košinová, M. (2021). Rybník Bezdrev. *Třeboňsko* [online]. Dostupné z: <https://www.trebonsko.cz/rybnik-bezdrev-druhy-nejvetsi-cesky-rybnik> [20. 3. 2023]

Křivánek, J., Němec, J., & Kopp, J. (2012). *Rybníky v České republice*. Praha: Jan Němec – Consult. ISBN 978-80-903482-9-5.

Leander, B.S., Esson, H.J., & Breglia, S.A. (2007). Macroevolution of complex cytoskeletal systems in euglenids. *BioEssays*, **29**(10), 987-1000. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bies.20645>

Liebscher, P., & Rendek, J. (2014). *Rybníky České republiky*. Praha: Academia. ISBN 978-80-200-2368-1.

Łukomska-kowalczyk, M., Fells, A., Chaber, K., Milanowski, R., & Zakryś, B. (2020). Taxon-rich phylogeny and taxonomy of the genus *Phacus* (Euglenida) based on morphological and molecular data. *Journal of Phycology*, **56**(5), 1135-1156. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jpy.13028>

Łukomska-Kowalczyk, M., Karnkowska, A., Milanowski, R., Łach, L., Zakryś, B., & Clerck, O.D. (2015). Delimiting species in the *Phacus longicauda* complex (Euglenida) through morphological and molecular analyses. *Journal of Phycology*, **51**(6), 1147-1157. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jpy.12352>

Marin, B., Palm, A., Klingberg, M.A.X., & Melkonian, M. (2003). Phylogeny and taxonomic revision of plastid-containing Euglenophytes based on SSU rDNA sequence comparisons and synapomorphic signatures in the SSU rRNA secondary structure. *Protist*, **154**(1), 99-145. Dostupné z: <https://doi.org/10.1078/143446103764928521>

Mitteroecker, P., & Gunz, P. (2009). Advances in geometric morphometrics. *Evolutionary Biology*, **36**, 235-247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11692-009-9055-x>

Monfils, A. K., Triemer, R.E., & Bellairs E.F. (2011). Characterization of paramylon morphological diversity in photosynthetic euglenoids (Euglenales, Euglenophyta). *Phycologia*, **50**(2), 156-169. Dostupné z: <https://doi.org/10.2216/09-112.1>

Nannavecchia, P., Tolivia, A., & Conforti, V. (2014). Ultrastructural alterations in *Phacus brachykentron* (Euglenophyta) due to excess of organic matter in the culture medium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **101**, 36-41. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.12.007>

Neustupa, J. (2006). Co je to geometrická morfometrika aneb morfologie znovu na scéně. *Živa*, **54**(2), 54-56. Dostupné z: <https://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/co-je-to-geometricka-morfometrika-aneb-morfologie.pdf>

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. Dostupné z: <https://www.preslia.cz/P054CNeu.pdf>

- Neustupa, J., Šťastný, J., & Hodač, L. (2008). Temperature-related phenotypic plasticity in the green microalga *Micrasterias rotata*. *Aquatic Microbial Ecology*, **51**, 77-86. Dostupné z: <https://doi.org/10.3354/ame01184>
- Paleček, M. (2023). Geovědní mapy 1:500000. *Česká geologická služba* [online]. Dostupné z: <https://mapy.geology.cz/geocr500/> [20. 3. 2023]
- Paul, L.C., Suman, A.A., & Sultan, N. (2013). Methodological analysis of principal component analysis (PCA) method. *International Journal of Computational Engineering & Management*, **16**(2), 32-38. Dostupné z: http://www.ijcem.org/papers032013/ijcem_032013_06.pdf
- Pochmann, A. (1942). *Synopsis der Gattung Phacus*. Archiv für Protistenkunde, **5**(2), 121-252.
- Rohlf, F.J. (2017). TpsDig2, version 2.31. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rohlf, F.J. (2021). TpsUtil, version 1.81. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rosati, G., & Modeo, L. (2003). Extrusomes in ciliates: diversification, distribution, and phylogenetic implications. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **50**(6), 383-402. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2003.tb00260.x>
- Rosowski, J.R. (2003). Photosynthetic euglenoids. In: Wehr, J.D., & Sheath, R.G., ed. *Freshwater Algae of North America* [online]. Elsevier, 383-422. ISBN 9780127415505. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-012741550-5/50011-8> [29. 6. 2022]
- 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>

Slice, D.E. (2007). Geometric morphometrics. *Annual Review of Anthropology*, **36**, 261-281. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev.anthro.34.081804.120613>

Tell, G., & Conforti, V. (1986). *Euglenophyta pigmentadas de la Argentina*. Berlín: Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung. ISBN 3-443-60002-6.

Triemer, R.E., & Zakryś, B. (2015). Photosynthetic Euglenoids. In: Wehr, J.D., Sheath, R.G., & Kociolek, J.P., ed. *Freshwater Algae of North America* [online]. Elsevier, 2. vydání, 459-483. ISBN 9780123858764. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385876-4.00010-4> [28. 8. 2022]

Wołowski, K., & Hindák F. (2005). *Atlas of Euglenophytes*. Bratislava: Veta. ISBN 8022408360.

Yamaguchi, A., Yubuki, N., & Leander B.S. (2012). Morphostasis in a novel eukaryote illuminates the evolutionary transition from phagotrophy to phototrophy: description of *Rapaza viridis* n. gen. et sp. (Euglenozoa, Euglenida). *BMC Evolutionary Biology*, **12**(1), 1-16. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-29>

Zakryś, B., Milanowski, R., & Karnkowska, A. (2017). Evolutionary Origin of Euglena. In: Schwartzbach, S.D., Shigeoka, S., ed. *Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology* [online]. Cham: Springer International Publishing. ISBN 978-3-319-54908-8 Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-319-54910-1_1 [6. 6. 2022]

Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., & Sheets, H.D. (2012 a). Introduction. In: *Geometric Morphometrics for Biologists* [online]. Elsevier, 2. vydání. ISBN 9780123869036. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386903-6.00001-0> [1. 3. 2023]

Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., & Sheets, H.D. (2012 b). The Thin-plate spline: visualizing shape change as a deformation. In: *Geometric Morphometrics for Biologists* [online]. Elsevier, 2. vydání. ISBN 9780123869036. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386903-6.00005-8> [9. 3. 2023]

Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., Sheets, H.D., & Fink, W.L. (2004) Ordination methods. In: *Geometric Morphometrics for Biologists* [online]. Elsevier. ISBN 9780127784601. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-012778460-1/50009-0> [4. 3. 2023]

Žerdoner Čalasan, A., Kretschmann, J., & Gottschling, M. (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>