

VYUŽITÍ OBRYSOVÉ ANALÝZY PŘI SLEDOVÁNÍ MORFOLOGICKÉ VARIABILITY LISTŮ RODU BŘÍZA (*BETULA* L.)

OBSERVATION OF THE MORPHOLOGICAL VARIABILITY OF LEAVES IN *BETULA* L. GENUS USING THE QUANTITATIVE EVALUATION OF OUTLINE SHAPES

JANA EŠNEROVÁ¹⁾ - JAN VÍTÁMVÁS¹⁾ - TEREZA KOŇASOVÁ¹⁾ - FILIP KOLÁŘ²⁾ - MARTIN BALÁŠ¹⁾ - PETR KARLÍK¹⁾ - DANIEL ZAHRADNÍK¹⁾ - MIROSLAVA KŘÍŽOVÁ³⁾ - JOSEF STACHO¹⁾ - NAĎA RAŠÁKOVÁ³⁾ - JAN STEJSKAL¹⁾ - IVAN KUNES¹⁾

¹⁾ Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta lesnická a dřevařská, Praha

²⁾ Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha

³⁾ Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta životního prostředí, Praha

ABSTRACT

Variability in leaf lamina shape among different taxa of *Betula* L. genus in the Czech Republic was assessed using the quantitative evaluation of outline shapes. The study was especially focused on the border mountains and the central part of the republic. 342 specimens were tested in total. The specimens of the tetraploid and diploid birch taxa were clearly distinguishable. The location of the widest part of blade seems to be the most relevant sign for the determination between two above-mentioned groups. On the contrary, distinguishing between the tetraploid taxa was not successful. Even though it was observed that the geographic area and the height of the specimen have a significant impact on the variability of the blade shape of tetraploid taxa, preliminary *in situ* taxa determination did not coincide with the geometric morphometry results. Other tested variables (wetness of the site and the altitude) also did not significantly correlate with the leaf shape. The failure of discrimination among the tetraploid *Betula* populations thus might imply either insufficient discriminative power of the leaf shape characters or an incorrect taxonomy. Final conclusions on discrimination of Czech *Betula* L. taxa, however, will need an employment of genetic analyses.

Klíčová slova: geometrická morfometrika (GMM), obrysová analýza, variabilita listů, rod bříza, Česká republika

Key words: geometric morphometrics (GMM), quantitative evaluation of shapes, variability of leaves, *Betula* L. genus, Czech Republic

ÚVOD

Morfologie listů se často využívá při popisu taxonů, případně v systematické (BELL, BRYAN 2008). I když se v posledním desetiletí zvyšuje zájem o studium listů pomocí moderních metod geometrické morfometrie (GMM), stále převažuje používání metod klasických (VISCOSI, CARDINI 2011). Za účelem zjištění velikosti a tvaru sledovaného objektu GMM analyzuje relativní pozice anatomických bodů (tzv. landmarks) a skupin bodů, které se mohou použít k proložení křivek (tzv. outlines) a ploch (JENSEN 2003). Dalším možným přístupem GMM je tzv. obrysová analýza, která vytváří matematický popis celkového tvaru zkoumaného objektu a je tak vhodná k popisu méně komplikovaných tvarů, kde je však třeba zachytit i rozdíly spočívající ve velmi jemných odchylkách proporcí (NEUSTUPA 2006). Pro taxonomii je důležité, že sledování objektů může probíhat i nezávisle na jejich velikosti, což je při využití klasických morfometrických postupů obtížné (JENSEN 2003). Pozorované rozdíly ve tvarech je pak možné graficky vyjádřit, a to jak pomocí konkrétních obrysů, tak grafů vyjadřujících vzájemné vztahy (ADAMS et al. 2004). V taxonomii i ostatních oblastech tvoří spojení morfometrických a genetických studií velmi silný nástroj pro pochopení původu fenotypové variability (KLINGENBERG 2010). I přes to, že se GMM využívá daleko více spíše při výzkumech zabývajících se hmyzem nebo savci, objevují se v menší míře i práce

zaměřené na botaniku. Zcela klíčová se tato metoda jeví v moderní systematice řas (NEUSTUPA, HODAČ 2005; FRÁNKOVÁ et al. 2009; NEUSTUPA et al. 2011) a bývá využívána při studiu kritických skupin dvouděložných rostlin. Obrysovou analýzu lze využít i při studiu bylin (např. ve studii korunních lístků různých kultivarů *Primula sieboldii*, YOSHIOKA et al. 2004) a dřevin. V dendrologii byla GMM využita např. pro sledování hybridizace amerických dubů (JENSEN 1990; JENSEN et al. 1993) nebo pro taxonomické studie dubů evropských (VISCOSI et al. 2009a, b). Další studie se týkají planých růží (OLSSON, PRENTICE 2001) nebo kříženců *Prunus spinosa* s *P. domestica* ssp. *insititia* (NIELSEN, OLRIK 2001). V rámci České republiky je nám známa zatím jediná plnohodnotně publikovaná studie. Ta se zabývala revizí apomiktického druhu *Sorbus bohemica* a v jejím důsledku došlo k vylišení dalších dvou nových endemických taxonů (LEPŠÍ et al. 2009). Kromě taxonomických studií se začínají objevovat i studie využívající GMM k hodnocení vlivu environmentálních faktorů na rostliny (např. VISCOSI et al. 2009b; SCHMERLER et al. 2012).

Cílem studie bylo zhodnocení změny tvaru listů zástupců rodu bříza v České republice v závislosti na různých okolnostech, zejména na jejich taxonomické determinaci, stanovištních podmínkách nebo geografické poloze. K tomuto vyhodnocení bylo právě využito metod geometrické morfometrie.

Jako podpora pro rozlišení diploidních a tetraploidních zástupců byla využita metoda průtokové cytometrie (SUDA 2005; DOLEŽEL et al. 2007; KRON et al. 2007; SUDA, PYŠEK 2010).

MATERIÁL A METODIKA

V rámci ČR byly v devíti oblastech odebrány vzorky stromových zástupců rodu bříza (*Betula*). Sběr byl soustředěn zejména na oblast Krkonoš, Krušných hor, Jizerských hor, Jeseníků, Adršpaško-teplických skal, Brd a Šumavy, doplňkové sběry pak byly provedeny v okolí Prahy a Plzně (lokality Klánovický les a Kamenný rybník). Počet hodnocených jedinců z jednotlivých oblastí je uveden v tab. 1. Z každého jedince (označeného unikátním kódem) byly odebrány dvě větvičky s plně vyvinutými listy. Z důvodu eliminování vlivu zastínění na velikost a tvar listů byla každá větvička odebrána z jiné části koruny. Z každé větvičky pak byly hodnoceny dva listy, tzn. z jednoho jedince byly hodnoceny celkem čtyři listy. Pokud to bylo možné, byl každý sledovaný jedinec v terénu zaměřen pomocí GPS a byly u něj změřeny základní dendrometrické veličiny. Dále byly zaznamenány stanovištní charakteristiky. Ještě v terénu byla každá větvička označena kódem zvoleným pro příslušného jedince a poté založena jako herbarová polozka.

Samotná příprava materiálu pro zpracování pomocí GMM spočívala v naskenování čtyř vybraných listů z jednoho jedince pomocí skeneru HP Scanjet 4370 a jejich následná úprava v grafickém programu. Cílem práce je zjištění morfologické variability listové čepelce, proto byly v grafickém programu odstraněny řapíky. Dále bylo v nutných případech provedeno sjednocení barvy listové čepelce tak, aby výsledná data zkruslena díky drobnému mechanickému poškození (změna barvy, drobné stopy po žíru hmyzu apod.). Tvar čepelce však zůstal vždy zachován.

Jednotlivé listy takto převedené do digitální podoby byly zpracovávány pomocí programového balíku SHAPE ver. 1.3 (IWATA, UKAI 2002). Tento programový balík umožňuje převod obrysů listů na matema-

tické vyjádření pomocí eliptických Fourierových deskriptorů (KUHLL, GIARDINA 1982). Jak již bylo uvedeno, za účelem eliminování vlivu zastínění na tvar listu byly z každého jedince sledovány čtyři listy. Pro konečné hodnocení však bylo nutné získat tvar pouze jednoho „průměrného“ listu na jedince. Aby tedy do konečného hodnocení vstupoval pouze jeden list na jednoho jedince, byly hodnoty koeficientů normalizovaných eliptických Fourierových deskriptorů všech čtyř listů z jednoho jedince v této fázi zprůměrovány. Vznikl tak „průměrný“ list každého jedince. Tyto „průměrné“ listy byly dále vyhodnoceny pomocí analýzy hlavních komponent (využita kovarianční matice) a její výsledky byly graficky znázorněny v programu PAST ver. 2.17b (HAMMER et al. 2001) a Microsoft Excel. Sledována byla proměnlivost listové čepelce u diploidních a tetraploidních zástupců. Příslušnost k ploidní skupině byla určována pomocí průtokové cytometrie (blíže viz KARLÍK et al. 2010). Dále byla sledována variabilita listové čepelce tetraploidních zástupců (počet hodnocených jedinců v každé oblasti je uveden v tab. 1) v závislosti na geografické oblasti, na předběžném terénním taxonomickém zařazení, na míře zamokření stanoviště (suché vs. podmáčené), na nadmořské výšce a na výšce jedinců. Zde je nutné podotknout, že taxonomické zařazení jedince probíhalo pouze na základě terénní zkušenosti a podle znaků uváděných v určovací literatuře. Nebylo tedy podpořeno žádnou genetickou metodou, a proto je nutné tyto výsledky brát s jistou rezervou (genetické analýzy jsou na odebraném materiálu prováděny, výsledky však nejsou zatím kompletně k dispozici).

Statistická významnost rozdílů ve variabilitě tvaru listů jednotlivých skupin bříz byla vyhodnocena pomocí Boxova M-testu. Variabilita přitom byla vyjádřena ve formě kovariančních matic skóru a směrech prvních dvou hlavních komponent. Bylo ukázáno (Box 1949, 1950), že za předpokladu rovnosti kovariančních matic má testovací statistika

$$T = - \left(1 - \left(\frac{\sum_{i=1}^k 1}{\sum_{i=1}^k v_i} - \frac{1}{\sum_{i=1}^k v_i} \right) \left(\frac{2p^2 + 3p - 1}{6(p+1)(k-1)} \right) \right) \left(\sum_{i=1}^k v_i h |S_i| - \left(\sum_{i=1}^k v_i \right) h |S_{PL}| \right)$$

kde S_i je výběrová kovarianční matice skóru pro i -tou skupinu stromů, p je řád kovarianční matice (v našem případě $p = 2$), k je počet porovnávaných skupin (v závislosti na počtu skupin v jednotlivých grafech), $v_i = n_i - 1$, kde n_i je počet měření v i -té skupině stromů a

$$S_{PL} = \sum_{i=1}^k v_i S_i / \sum_{i=1}^k v_i$$

rozdělení $\chi^2_{\frac{1}{2}(k-1)p(p+1)}$

Rozdíl kovariančních matic tedy považujeme za statisticky významný, pokud $T \geq \chi^2_{\frac{1}{2}(k-1)p(p+1)}(\alpha)$

Výsledky všech provedených testů jsou uvedeny v tab. 2.

Tab. 1.

Počet hodnocených jedinců v jednotlivých geografických oblastech
Number of evaluated specimens in each geographic area

Geografická oblast/Geographic area	Počet všech hodnocených jedinců/ Total number of evaluated specimens	Počet hodnocených tetraploidních jedinců/Number of evaluated tetraploid specimens
Adršpaško-teplické skály	71	45
Brdy	19	17
Jeseníky	48	35
Jizerské hory	68	51
Krkonoše	74	68
Krušné hory	19	10
Šumava	23	20
Plzeň – Kamenný rybník	10	9
Praha – Klánovický les	10	8
Celkem hodnoceno/In total	342	263

VÝSLEDKY

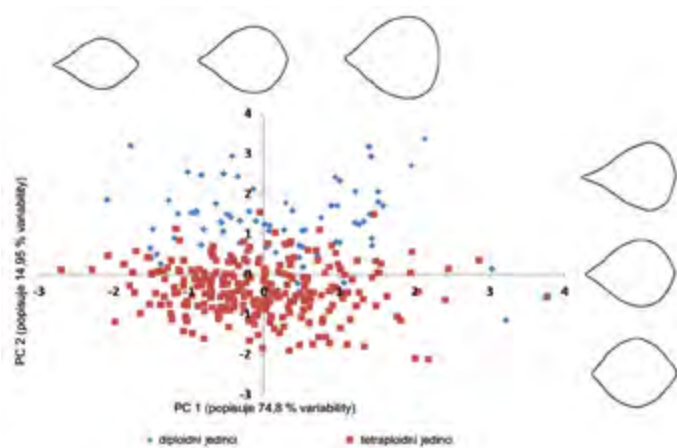
Obrysová analýza listové čepelce zástupců rodu bříza (*Betula*) ukázala, že pomocí této metody lze rozlišit diploidní a tetraploidní zástupce. Odlišení obou těchto skupin bylo statisticky vysoce významné (tab. 2). Největší vliv na tvar listů u diploidních a tetraploidních zástupců má úhel báze a umístění nejširšího místa čepelce (obr. 1). Oba tyto znaky popisují celkem téměř 90% veškeré tvarové variability. Jedinci patřící k diploidnímu druhu bříza bělokorá mají listy nejširší spíše ve spodní části, kdežto tetraploidní zástupci mají listy nejširší spíše uprostřed. I když úhel báze je znakem, který vykazoval největší variabilitu ve změně tvaru listu, nelze jej použít k rozlišení diploidních a tetraploidních jedinců, protože jde napříč oběma skupinami.

Tab. 2.

 Výsledky Boxových M-testů pro jednotlivé testované skupiny
 Results of Box M-test for particular testing groups

Testované skupiny (číslo obrázku)/Tested groups (Fig.)	Testovací statistika/ M-value	Kritická hodnota/ Critical value	Hladina významnosti/ Level of significance
Diploidní vs. tetraploidní jedinci (obr. 1)/ Diploid vs. tetraploid specimens (Fig. 1)	14,307	7,815	0,0025
Tetraploidní jedinci dle předběžného taxonomického určení (obr. 2)/ Tetraploid specimens based on preliminary site determination (Fig. 2)	9,292	12,592	0,1578
Tetraploidní jedinci dle geografické příslušnosti (obr. 3)/ Tetraploid specimens based on geographic area (Fig. 3)	43,405	36,415	0,0089
Tetraploidní jedinci dle zamokření (obr. 4)/ Tetraploid specimens based on humidity (Fig. 4)	0,475	7,815	0,9245
Tetraploidní jedinci dle nadmořské výšky (obr. 5)/ Tetraploid specimens based on altitude (Fig. 5)	8,449	16,919	0,4896
Vybraní tetraploidní jedinci dle nadmořské výšky (obr. 6)/ Selected tetraploid specimens based on altitude (Fig. 6)	1,813	7,815	0,6121
Tetraploidní jedinci dle výšky stromu (obr. 7)/ Tetraploid specimens based on height (Fig. 7)	15,510	16,919	0,0778
Tetraploidní jedinci dle výšky (2 skupiny – do 15,00 m a více než 15,01)/ Tetraploid specimens based on height (2 groups – up to 15.00 m and above 15.01 m)	8,054	7,815	0,0449
Vybraní tetraploidní jedinci dle předběžného taxonomického určení (obr. 8)/ Selected tetraploid specimens based on preliminary site determination (Fig. 8)	5,825	12,592	0,4430

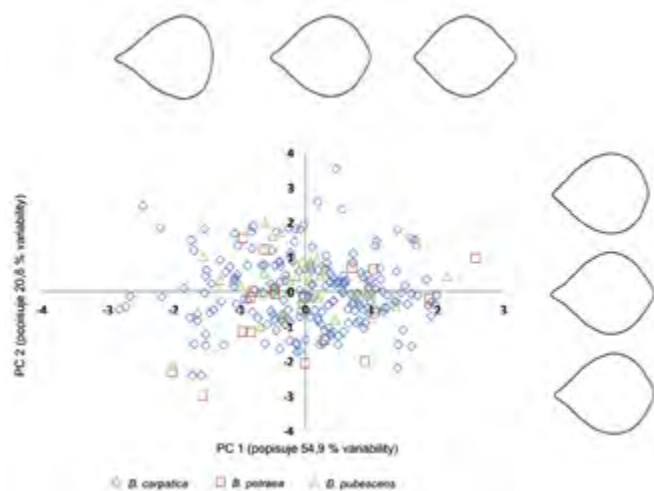
Poznámka: Tučně jsou v tabulce vyznačeny statisticky průkazné rozdíly skupin.
 Note: Significant differences in groups are shown in bold type.


Obr. 1.

PCA analýza všech sledovaných diploidních (N = 79) a tetraploidních (N = 263) jedinců. V grafu jsou znázorněny rekonstruované tvarové obrysy listové čepele příslušející k pozicím ± 2 směrodatné odchylky na daných osách diagramu

Fig. 1.

PCA analysis of the total number of the tested diploid (N = 79) and tetraploid (N = 263) specimens. Axis PC 1 explains 74.8% of variability, axis PC 2 explains 14.95% of variability. The graph shows the reconstructed leaf shapes belonging to positions ± 2 SD on the given axes of the diagram (blue diamond – diploid individuals, red square – tetraploid individuals)


Obr. 2.

PCA analýza sledovaných tetraploidních jedinců v závislosti na předběžném určení taxonu v terénu (*B. carpatica*: N = 223; *B. petraea*: N = 11; *B. pubescens*: N = 29). V grafu jsou znázorněny rekonstruované tvarové obrysy listové čepele příslušející k pozicím ± 2 směrodatné odchylky na daných osách diagramu

Fig. 2.

PCA analysis of evaluated tetraploid specimens based on preliminary *in situ* determination (*B. carpatica*: N = 223; *B. petraea*: N = 11; *B. pubescens*: N = 29). Axis PC 1 explains 54.9% of variability, axis PC 2 explains 20.6% of variability. The scheme shows the reconstructed leaf shapes belonging to positions ± 2 SD on the given axes of the diagram (blue diamond – *B. carpatica*, red square – *B. petraea*, green triangle – *B. pubescens*)

V dalším kroku byl analyzován tvar listové čepel u tetraploidních jedinců s ohledem na taxonomické rozlišení. Diploidní jedinci již dále hodnoceni nebyli z toho důvodu, že všichni náleželi k jednomu taxonu, a to bříze bělokoré – *B. pendula*. Vzhledem k tomu, že nedošlo k žádnému výraznému rozlišení tetraploidních zástupců do jasně oddělených skupin (obr. 2), můžeme usuzovat, že pokud má rozlišování různých taxonů ve skupině tetraploidních bříz (v této studii byli jedinci řazeni k bříze pýřité – *B. pubescens*, bříze karpatské – *B. carpatica* a bříze „skalní“ – *B. petraea*) genetické opodstatnění, není možné je zřetelně rozlišit na základě změny celkového tvaru listů.

Souvislost tvarové změny tetraploidních zástupců byla dále sledována v rámci geografických oblastí (obr. 3). Z uvedeného ordinačního diagramu nelze vypořádat žádný konkrétní tvar listu vázaný na určitou geografickou oblast. Přesto byl vliv geografické oblasti statisticky významný (tab. 2).

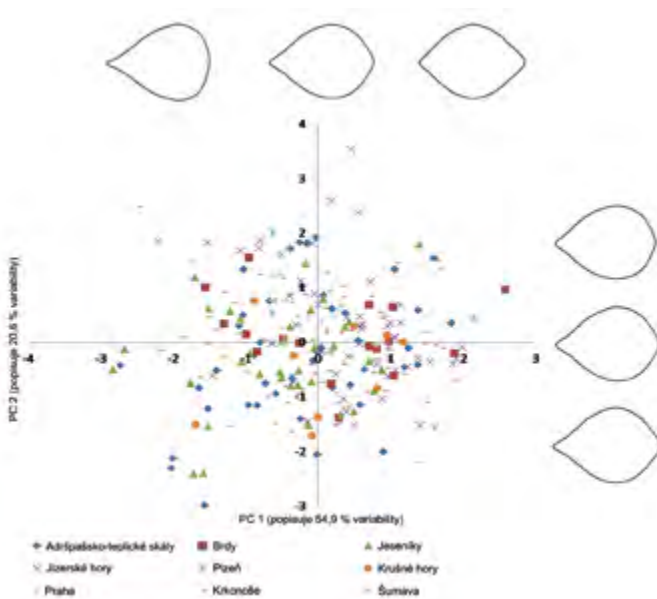
Vyhodnocen byl také tvar listů tetraploidních jedinců na konkrétních stanovištních podmínkách, a to na míře podmáčení stanoviště a na nadmořské výšce (obr. 4 a 5). U těchto kritérií nebyl prokázán významný vliv na konkrétní tvar listu (tab. 2). Typický tvar listu nebyl pozorován ani pro užší výběr tetraploidních zástupců s ohledem na nadmořskou výšku (obr. 6), který sestával pouze z vybraných jedinců rostoucích v krajních mezích nadmořských výšek odebra-

ných jedinců, a to konkrétně jedinci rostoucí do 600 m n. m. a nad 1150 m n. m.

Při hodnocení proměnlivosti listů v závislosti na výšce jedince (obr. 7) byla pozorována souvislost v rozptylu hodnot s tímto faktorem. U jedinců majících výšku do pěti nebo do deseti metrů je variabilita tvaru listů velká, daleko větší než u jedinců s výškou větší než 10,01 a 15,01 m. Právě u jedinců majících výšku vyšší než 15,01 m byla pozorována statisticky průkazně nižší variabilita ve srovnání s ostatními jedinci, jak bylo potvrzeno pomocí Boxova M-testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (tab. 2).

DISKUSE

Poměrně výrazné rozlišení diploidních a tetraploidních stromových zástupců rodu bříza do dvou skupin je plně v souladu s výsledky studie, která byla provedena na břízách z oblasti Krkonoš pomocí klasické morfometriky (EŠNEROVÁ et al. 2012). Toto zjištění je v plném souladu i se zahraničními studiemi (ATKINSON, CODLING 1986). Ve studii z Krkonoš (EŠNEROVÁ et al. 2012) prokazovaly téměř všechny morfologické znaky spojené s tvarem listové čepel statistickou významnost pro rozlišení diploidních a tetraploidních zástupců.

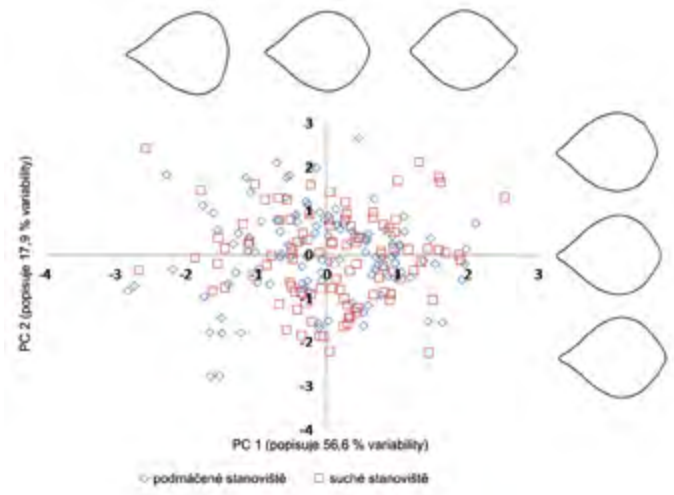


Obr. 3.

PCA analýza sledovaných tetraploidních jedinců v závislosti na příslušnosti ke geografické oblasti (počty sledovaných jedinců v jednotlivých oblastech jsou uvedeny v tab. 1). V grafu jsou znázorněny rekonstruované tvarové obrysy listové čepelí příslušející k pozicím ± 2 směrodatné odchylky na daných osách diagramu

Fig. 3.

PCA analysis of evaluated tetraploid specimens based on geographic area (the numbers of evaluated specimens in each area are given in Tab. 1). Axis PC 1 explains 54.9% of variability, axis PC 2 explains 20.6% of variability. The scheme shows the reconstructed leaf shapes belonging to positions ± 2 SD on the given axes of the diagram (blue diamond – the area of Adršpaško-teplické skály, red square – Brdy region, green triangle – Jeseníky Mountains, violet cross – Jizerské hory Mountains, blue star – Plzeň surroundings, yellow circle – Krušné hory Mountains, blue cross – Praha surroundings, pink short line – Krkonoše Mountains, green short line – Šumava Mountains)



Obr. 4.

PCA analýza sledovaných tetraploidních jedinců v závislosti na míře zamokření stanoviště (podmáčené stanoviště N = 115; suché stanoviště N = 104). V grafu jsou znázorněny rekonstruované tvarové obrysy listové čepelí příslušející k pozicím ± 2 směrodatné odchylky na daných osách diagramu

Fig. 4.

PCA analysis of evaluated tetraploid individuals based on wetness of the site (waterlogged site N = 115; dry site N = 104). Axis PC 1 explains 56.6% of variability, axis PC 2 explains 17.9% of variability. The scheme shows the reconstructed leaf shapes belonging to positions ± 2 SD on the given axes of the diagram (blue diamond – individuals growing below 699 m a. s. l., red square – individuals growing between 700 and 899 m a. s. l., green triangle – individuals growing between 900 and 1099 m a. s. l., violet cross – individuals growing above 1100 m a. s. l.)

U tetraploidních zástupců je rozlišování však již složitější. Vyhodnocení obrysů listů provedené v závislosti na pracovním určení taxonů dle určovacích klíčů neposkytlo signifikantní výsledky. To může být způsobeno tím, že podstatné determinační znaky nejsou přímo závislé na tvaru listové čepele (např. odění). Může se však také jednat o příčiny mající povahu genetickou spočívající v existenci alopolyploidního komplexu s velmi drobnými rozdíly mezi jednotlivými taxony. Je možné, že jednotlivé drobné taxony jsou vázány na jednotlivá pohoří či oblasti, což může být naznačeno signifikantní závislostí mezi tvarem listu a příslušností ke geografické oblasti (tab. 2). Tyto rozdíly jsou však velmi drobné a nelze vysledovat závislost mezi konkrétním tvarem a konkrétní oblastí (např. v jedné geografické oblasti není pouze jeden typ báze listu, viz obr. 3).

Dále se ukázalo, že průkazný vliv má také výška jedince. U tetraploidních jedinců, kteří měli výšku do 15 metrů, byl pozorován velký rozptyl ve tvaru listové čepele, daleko větší než u vyšších jedinců. To může úzce souviset se stářím jedince, kdy mladí jedinci vytvářejí přirozeně daleko více variabilní listy než jedinci starší. Dalším vysvětlením může být taxonomická příslušnost. Jak uvádějí ÚRADNÍČEK et al. (2001), výšek nad 15 metrů mohou dorůstat pouze zástupci *B. pubescens*. Oproti tomu se ve výškové kategorii pod 15 metrů mohou vyskytnout zástupci všech tří námi sledovaných tetraploidních taxonů (včetně *B. pubescens*).

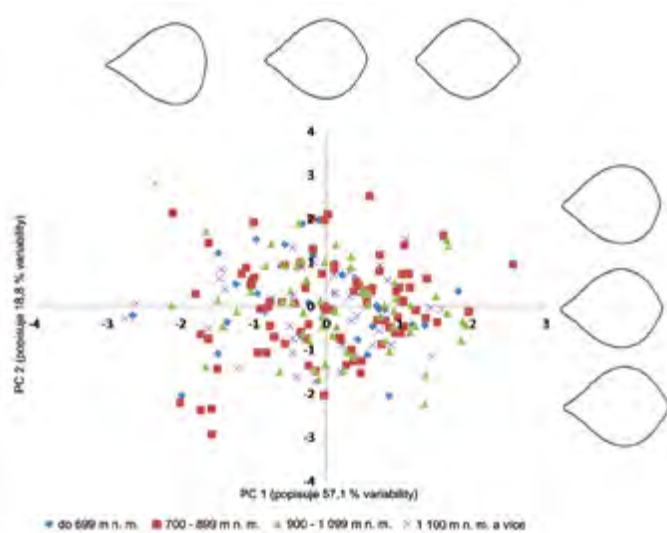
Ostatní sledované faktory, jako je vlhkost stanoviště a nadmořská výška, mají zřejmě na změnu tvaru listové čepele pouze malý vliv. Při hodnocení těchto faktorů nedošlo pomocí PCA analýzy k jasnému rozlišení tetraploidních bříz. Nicméně vliv stanovištních podmínek na variabilitu listů u rodu bříza vyloučit nelze, protože ve studii z ob-

lasti Krkonoš (EŠNEROVÁ et al. 2012), kde byla variabilita listů hodnocena pomocí klasické morfometrie v závislosti na vlhkosti, se jeden ze sledovaných znaků blížil k hranici slabě signifikantní závislosti.

Na základě zjištění průkazného vlivu výšky jedince na rozptyl tvaru listů byla znovu provedena PCA analýza obrysu tvaru listů pro jednotlivé tetraploidní taxonomické skupiny (obr. 8) s tím, že z analýzy byli vyloučeni malí/mladí jedinci (jako kritérium byla zvolena výška větší než 5 m a obvod kmene větší než 30 cm). Byl tak znovu testován vliv obrysu listové čepele v souvislosti s pracovním taxonomickým zařazením. I přes toto provedené omezení se v grafu jednoznačně žádné vzájemně rozlišitelné skupiny nevytvořily.

ZÁVĚR

Obrysová analýza se ukázala jako vhodný nástroj ke sledování morfologické variability listů u rodu bříza, zejména z toho důvodu, že ve srovnání s klasickou morfometrikou umožňuje podstatně rychlejší zpracování velkého objemu dat. Měření velkého počtu znaků pomocí klasické morfometrie je časově velice náročné. I přesto se však ukazuje, že analýza samotného tvaru listové čepele nepostačuje pro dobré rozlišování drobných taxonů u tetraploidních zástupců. Obrysovou analýzu je tedy možno brát jako jednu z metod dobře použitelných pro vyhodnocování dat u rodu bříza, nelze ji však využívat samotnou. Jak bylo pozorováno ve studii zabývající se rodem bříza v oblasti Krkonoš (EŠNEROVÁ et al. 2012), kde hlavní metodou pro analyzování dat

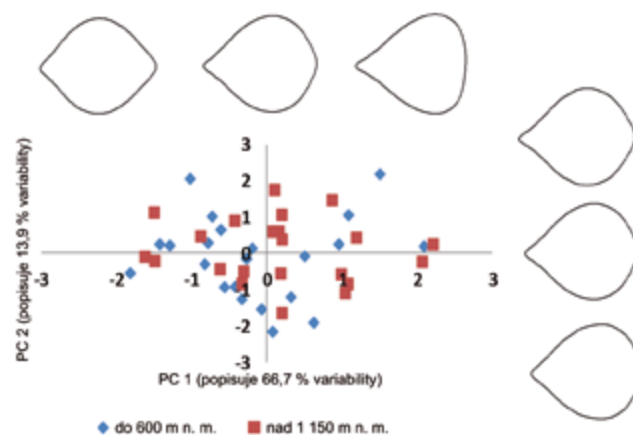


Obr. 5.

PCA analýza sledovaných tetraploidních jedinců v závislosti na nadmořské výšce, ve které rostou (do 699 m: N = 30; 700–899 m: N = 86; 900–1099 m: N = 62; nad 1100 m: N = 41). V grafu jsou znázorněny rekonstruované tvarové obrysy listové čepele příslušející k pozicím ± 2 směrodatné odchylky na daných osách diagramu

Fig. 5.

PCA analysis of evaluated tetraploid specimens dependence on altitude (below 699 m: N = 30; 700–899 m: N = 86; 900–1099 m: N = 62; above 1100 m: N = 41). Axis PC 1 explains 57.1% of variability, axis PC 2 explains 18.8% of variability. The scheme shows the reconstructed leaf shapes belonging to positions ± 2 SD on the given axes of the diagram (blue diamond – waterlogged site, red square – dry site)



Obr. 6.

PCA analýza vybraných tetraploidních jedinců v závislosti na nadmořské výšce, ve které rostou (do 600 m: N = 22; nad 1150 m: N = 22). V grafu jsou znázorněny rekonstruované tvarové obrysy listové čepele příslušející k pozicím ± 2 směrodatné odchylky na daných osách diagramu

Fig. 6.

PCA analysis of selected evaluated tetraploid specimens dependence on altitude (below 600 m: N = 22; above 1150 m: N = 22). Axis PC 1 explains 66.7% of variability, axis PC 2 explains 13.9% of variability. The scheme shows the reconstructed leaf shapes belonging to positions ± 2 SD on the given axes of the diagram (blue diamond – individuals growing below 600 m a. s. l., red square – individuals growing above 1150 m a. s. l.)

byla klasická morfometrika, znaky, které by mohly být využitelné pro rozlišení taxonů, nemusejí mít nutně souvislost s obrysem listové čepele (např. odění čepele, poměry úhlů žilek). Obrysová analýza se tedy jeví jako vhodný nástroj pro studium rodu bříza pro poměrně rychlé zhodnocení znaků ovlivňujících tvar listové čepele. Na základě získaných výsledků lze pak omezit počet měřených znaků pomocí klasické morfometricky.

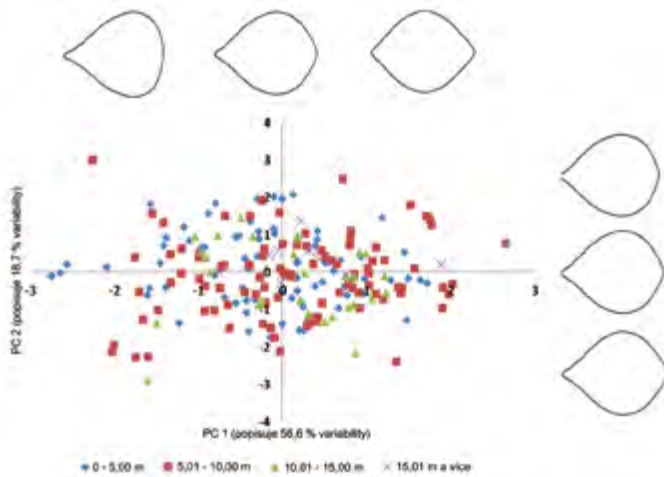
Výsledky provedených studií využívajících pouze metod geometrické a klasické morfometricky jednoznačně neurčily vhodné determinační znaky pro vylíšení jednotlivých, zejména drobných, taxonů bříz. Další vyhodnocování morfometrických dat se proto neobejde bez zahrnutí výsledků genetických analýz.

Poděkování:

Tento příspěvek vznikl za podpory grantových projektů „Vztah populace břízy karpatské a typu stanoviště ve vrcholových horských polohách“ – CIGA ČZU (20104308), „Funkční potenciál vybraných listnatých dřevin a jejich vnášení do jehličnatých porostů v Jizerských horách“ – NAZV (QH 92087) a „Analýza genetických vztahů populací horských bříz“ – IGA FLD (201130). Poděkování patří také kolegům z regionů, kteří nám doporučili lokality pro sběr materiálu a pomohli zajistit provedení terénních prací. Nelze také opomenout kolegy z Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, kteří nám umožnili provedení cytometrických analýz a poskytli cenné rady při vyhodnocování dat – zejména děkujeme Tomáši Urfusovi a Petru Vítovi.

LITERATURA

- ADAMS D.C., SLICE D.E., ROHLF F.J. 2004. Geometric morphometrics: Ten years of progress following the ‚revolution‘. *Italian Journal of Zoology*, 71: 5–16.
- ATKINSON M.D., CODLING A.N. 1986. A reliable method for distinguishing between *Betula pendula* and *B. pubescens*. *Watsonia*, 16: 75–76.
- BELL A., BRYAN A. 2008. *Plant form: an illustrated guide to flowering plant morphology*. London, Timber Press: 432 s.
- BOX G.E.P. 1949. A general distribution theory for a class of likelihood criteria. *Biometrika*, 36: 316–346.
- BOX G.E.P. 1950. Problems in the analysis of growth and linear curves. *Biometrics*, 6, 362–389.
- DOLEŽEL J., GREILHUBER J., SUDA J. 2007. *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*. Weinheim, Wiley: 454 s.
- EŠNEROVÁ J., KARLÍK P., ZAHRADNÍK D., KOŇASOVÁ T., STEJSKAL J., BALÁŠ M., RAŠÁKOVÁ N., STACHO J., VÍTÁMVÁS J., LUKÁŠOVÁ M., KUNEŠ I. 2012. Morfologická variabilita rodu bříza (*Betula* L.) v Krkonoších se zaměřením na tetraploidní zástupce. *Zprávy lesnického výzkumu* 57: 112–125.

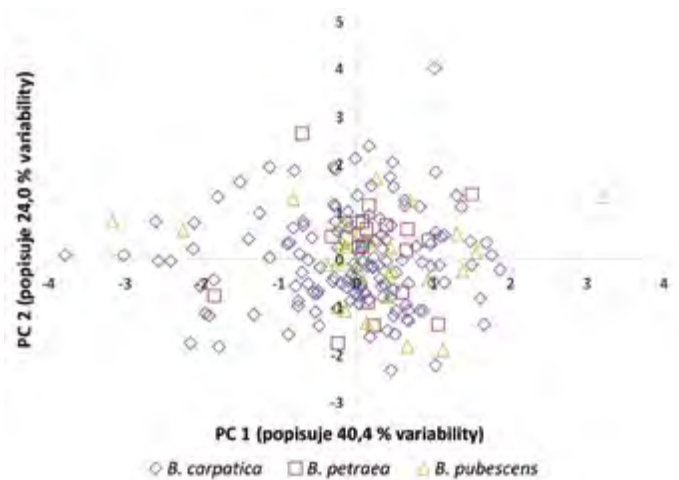


Obr. 7.

PCA analýza variability tvaru listové čepele tetraploidních zástupců v závislosti na výšce jedince (do 5 m: N = 77; 5,01–10,00 m: N = 96; 10,01–15,00 m: N = 31; nad 15,01 m: N = 10). V grafu jsou znázorněny rekonstruované tvarové obrysy listové čepele příslušející k pozicím ± 2 směrodatné odchylky na daných osách diagramu

Fig. 7.

PCA analysis of evaluated tetraploid specimens dependence on height of individuals (below 5 m: N = 77; 5.01–10.00 m: N = 96; 10.01–15.00 m: N = 31; above 15.01 m: N = 10). Axis PC 1 explains 56.6% of variability, axis PC 2 explains 18.7% of variability. The scheme shows the reconstructed leaf shapes belonging to positions ± 2 SD on the given axes of the diagram (blue diamond – individuals with the height up to 5 m, red square – individuals with the height between 5.01 and 10.00 m, green triangle – individuals with the height between 10.01 and 15.00 m, violet cross – individuals with the height above 15.01 m)



Obr. 8.

PCA analýza sledovaných tetraploidních jedinců v závislosti na terénním určení taxonu s vyloučením malých/mladých jedinců (*B. carpatica*: N = 209; *B. petraea*: N = 20; *B. pubescens*: N = 33)

Fig. 8.

PCA analysis of evaluated tetraploid specimens based on preliminary onsite determination (*B. carpatica*: N = 209; *B. petraea*: N = 20; *B. pubescens*: N = 33). In the analysis small/young trees were excluded. The first axis explains 40.4% of variability; the second axis explains 24.0% of variability (blue diamond – *B. carpatica*, red square – *B. petraea*, green triangle – *B. pubescens*)

- FRÁNKOVÁ M., POULÍČKOVÁ A., NEUSTUPA J., PICHRTOVÁ M., MARVAN P. 2009. Geometric morphometrics – a sensitive method for diatom morphospecies distinguishing: a case study on the sympatric populations of *Reimeria sinuata* and *Gomphonema tergestinum* (*Bacillariophyceae*) from the River Bečva, Czech Republic. *Nova Hedwigia*, 88: 81–95.
- HAMMER Ø., HARPER D.A.T., RYAN P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. [online]. *Palaeontologia Electronica*, 4 (1): 9 s. [cit. 25. září 2012]. Dostupné na World Wide Web: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf.
- IWATA H., UKAI Y. 2002. SHAPE: a computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. *Journal of Heredity*, 93: 384–385.
- JENSEN R.J. 1990. Detecting shape variation in oak leaf morphology: a comparison of rotational-fit methods. *American Journal of Botany*, 77: 1279–1293.
- JENSEN R.J., HOKANSON S.C., ISEBRANDS J.G., HANCOCK J.F. 1993. Morphometric variation in oaks of the Apostle Islands in Wisconsin: evidence of hybridization between *Quercus rubra* and *Quercus ellipsoidalis* (*Fagaceae*). *American Journal of Botany*, 80: 1358–1366.
- JENSEN R.J. 2003. The conundrum of morphometrics. *Taxon*, 52: 663–671.
- KARLÍK P., EŠNEROVÁ J., URFUS T., KUNEŠ I., BALÁŠ M., VÍTÁMVÁS J., KOŇASOVÁ T., KUBEŠOVÁ M., FÉR T., VÍT P. 2010. Problematika určování druhů bříz *Betula* L. ve světle průtokové cytometrie. In: Prkňová, H., (ed.): *Bříza - Strom roku 2010*. Kostelec nad Černými lesy, 23. září 2010. Praha, Česká zemědělská univerzita: 51–56.
- KLINGENBERG C.P. 2010. Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. *Nature Reviews Genetics*, 11: 623–635.
- KRON P., SUDA J., HUSBAND B.C. 2007. Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38: 847–876.
- KUHL F.P., GIARDINA C.R. 1982. Elliptic Fourier features of a closed contour. *Computer Graphics and Image Processing*, 18: 236–258.
- LEPŠÍ M., VÍT P., LEPŠÍ P., BOUBLÍK K., KOLÁŘ F. 2009. *Sorbus portae-bohemicae* and *Sorbus albensis*, two new endemic apomictic species recognized based on a revision of *Sorbus bohemica*. *Preslia*, 81 (1): 63–89.
- NEUSTUPA J., HODAČ L. 2005. Changes in shape of the coenobial cells of an experimental strain of *Pediastrum duplex* var. *duplex* (*Chlorophyta*) reared at different pHs. *Preslia*, 77: 439–452.
- NEUSTUPA J. 2006. Co je to geometrická morfometrika aneb morfologie znovu na scéně. *Živa*, 54 (2): 54–56.
- NEUSTUPA J., ŠTASTNÝ J., NEMJOVÁ K., MAZALOVÁ P., GOODYER E., POULÍČKOVÁ A., ŠKALOUD P. 2011. A novel, combined approach to assessing species delimitation and biogeography within the well-known desmid species *Micrasterias fimbriata* and *M. rotata* (*Desmidiaceae*, *Streptophyta*). *Hydrobiologia*, 667: 223–239.
- NIELSEN J., OLRİK D. C. 2001. A morphometric analysis of *Prunus spinosa*, *P. domestica* ssp. *insititia*, and their putative hybrids in Denmark. *Nordic Journal of Botany*, 21: 349–363.
- OLSSON A., PRENTICE H. C. 2001. Morphometric diversity and geographic differentiation in six dogrose taxa (*Rosa* Sect. *Caninae*, *Rosaceae*) from the Nordic countries. *Nordic Journal of Botany*, 21: 225–241.
- SCHMERLER S.B., CLEMENT W.L., BEAULIEU J.M., CHATELET D.S., SACK L., DONOGHUE M.J., EDWARDS E.J. 2012. Evolution of leaf form correlates with tropical–temperate transitions in *Viburnum* (*Adoxaceae*). *Proceedings of the Royal Society B*, 279: 3905–3913.
- SUDA J. 2005. Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. *Živa*, 53 (1): 46–48.
- SUDA J., PYŠEK P. 2010. Flow cytometry in botanical research: introduction. *Preslia*, 82: 1–2.
- ÚRADNÍČEK L., MADĚRA P. et al. 2001. *Dřeviny České republiky*. Písek, Matice lesnická: 333 s.
- VISCOSI V., FORTINI P., SLICE D. E., LOY A., BLASI C. 2009a. Geometric morphometric analyses of leaf variation in four oak species of subgenus *Quercus* (*Fagaceae*). *Plant Biosystems*, 143: 575–587.
- VISCOSI V., LEPAIS O., GERBER S., FORTINI P. 2009b. Leaf morphological analyses in four European oak species (*Quercus*) and their hybrids: comparison of traditional and geometric morphometric methods. *Plant Biosystems*, 143: 564–574.
- VISCOSI V., CARDINI A. 2011. Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics: a simplified protocol for beginners. [online]. *Plos ONE* 6(10): e25630. DOI: 10.1371/journal.pone.0025630.
- YOSHIOKA Y., IWATA H., OHSAWA R., NINOMIYA S. 2004. Analysis of petal shape variation of *Primula sieboldii* E. Morren by elliptic Fourier descriptors and principal component analysis. *Annals of Botany*, 94: 657–664.

OBSERVATION OF THE MORPHOLOGICAL VARIABILITY OF LEAVES IN *BETULA* L. GENUS USING THE QUANTITATIVE EVALUATION OF OUTLINE SHAPES

SUMMARY

Variability in leaf lamina shape in genus *Betula* L. was assessed by the method of quantitative evaluation of outline shapes using the programme SHAPE ver. 1.3 (IWATA, UKAI 2002) on the selected areas in the Czech Republic. The study was focused on the Krkonoše Mountains, Krušné hory Mountains, Jizerské hory Mountains, Jeseníky Mountains, the area of Adršpašsko-teplické skály, Brdy region and Šumava Mountains. Less attention was given to Praha and Plzeň surroundings, where much lower number of specimens was evaluated. 342 specimens were assessed in total using the method of principal component analyses (PCA). The number of individuals evaluated in each area is given in Tab. 1. The variability of leaf lamina shapes was assessed in accordance with the ploidy level (Fig. 1) where a ploidy degree was determined by the flow cytometric analysis. It was observed that the significant characteristic, which makes the diploid and tetraploid birch individuals distinguishable, is the position of the widest part of the leaf blade. The diploid ones have the widest part in the lower part of the blade, while the tetraploid ones have it more in the middle.

Only tetraploid individuals were subsequently analysed in detail because they belonged to three taxa – *Betula carpatica*, *Betula pubescens* a *Betula petraea*, while diploid individuals belonged only to one species – *Betula pendula* and that disqualified them from further analyses.

The data were evaluated considering the following impacts – the taxa (Fig. 2), geographical area (Fig. 3), wetness of the site (Fig. 4), altitude (Fig. 5 and 6) and height of individuals (Fig. 7). It is evident, especially from the statistical evaluation of coordinates of PCA position by the Box M-test (Box 1949, 1950), that geographical area and height of individual have the biggest impact on the leaf blade shape variability (Tab. 2). Other above-mentioned impacts were not proved to be significant.

The fact that the preliminary *in situ* taxa determination was not significant could have been caused by the method used. This method works only with the leaf blade shape and not all determination traits have an impact on the blade shape (eg. hairiness). The other reason could have been the possibility of potential existence of alopolyloid complex of birch, which is manifested by very small differences between taxa. This theory can be supported by the observed significant differences of leaf shapes in connection with geographic area.

It was further observed that sampled trees taller than 15 m had less variable leaf blade shapes than those up to 15 m in height. This fact could be explained by the age of individuals. We can expect that shorter individuals are usually younger and it seems that these have more variable leaf blades than older trees. The second reason can rest on the influence of taxa. ÚRADNÍČEK et al. (2001) state that among tetraploid taxa of birch only *B. pubescens* can be taller than 15 m. Thus a higher variability of leaf blade shapes of shorter trees (0–15 m) in our results could be caused by the fact that all studied tetraploid taxa were grouped together and the group of individuals taller than 15 m belonged to only one taxon.

Due to the high variability of leaf blade shape observed in less grown trees, the repeated PCA analysis was conducted based on preliminary onsite determination. The sampled trees shorter than 5 m and less than 30 cm in breast-height circumference (Fig. 8) were excluded from this additional analysis. However, even after this exclusion, the impact of the preliminary *in situ* determination on the leaf blade shape was not significant.

To find the applicable determination traits in order to distinguish between tetraploid birches it is necessary to perform the genetic analyses in further studies.

Recenzováno

ADRESA AUTORA/CORRESPONDING AUTHOR:

Ing. Jan Vítámvás, Ph.D., Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta lesnická a dřevařská
Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 - Suchbátka, Česká republika
tel.: +420 224 382 880; e-mail: vitamvas@fld.czu.cz