

# Három halbiológiai vizsgálatok során használt morfometriai módszer ismételhetőségének és szubjektívitasának értékelése

Takács Péter<sup>1</sup>, Vitál Zoltán<sup>1</sup>, Ferincz Árpád<sup>2</sup>, Staszny Ádám<sup>3</sup>

<sup>1</sup>MTA ÖK Balatoni Limnológiai Intézet, 8237 Tihany, Klebelsberg Kuno u. 3.

<sup>2</sup>Szent István Egyetem, Halgazdálkodási Tanszék, Gödöllő

## Kivonat:

Jelen munkánkban arra keressük a választ, hogy a halbiológiában gyakran használt különféle morfometriai módszerek mennyire adnak megbízható/ismételhető eredményeket, illetve mennyire befolyásolja a különböző módszerekkel végzett mérések eredményeit a mérést végzők személye. A vizsgálatokat három kutató, egymástól függetlenül, három különböző módszerrel (klasszikus tolmérős, testalak és pikkelyalak analízis) végezte el három halfaj (bodorka ezüstkárász, küsz) három a Balaton vízgyűjtőjéről származó populációjának 30-30 egyedén, háromszori ismétlésben. Az ismételt mérések hasonlósága mindhárom mérőnél a testalak analízis esetében volt a legmagasabb (átl. $\pm$ SD = 0,899 $\pm$ 0,10) ezt követte a pikkely geometriai analízise (átl. $\pm$ SD = 0,695 $\pm$ 0,20) és a klasszikus módszernél volt a legalacsonyabb (átl. $\pm$ SD = 0,293 $\pm$ 0,16). Ugyanakkor a kapott eredményeket a mérő személye a klasszikus morfometriai vizsgálatok esetében befolyásolta a legnagyobb mértékben. Eredmények ezek mellett arra is mutatnak, hogy nemcsak a mérő személye, hanem az adott faj vizsgálatára felhasznált morfometriai módszer is jelentősen befolyásolhatja a kapott eredményeket, illetve az ezekből levont következtetéseket.

## Kulcsszavak:

alak analízis, pikkely morfometria, tolmérő, Mantel-teszt, CVA, PERMANOVA

## Bevezetés

A természettudományos kutatások során a legtöbb esetben a vizsgált objektum számunkra fontos tulajdonságait valamilyen módon számszerűsíteni igyekszünk. A kinyert adatokat a megfelelő statisztikai módszerrel elemezzük és következtetéseinket az így kapott eredményekből vonjuk le. Ugyanakkor a vizsgálati objektumaink egyes tulajdonságainak számszerűsítése többféle módszerrel történhet, illetve sok esetben a statisztikai elemzésnek alávetni kívánt adatsorok több személytől származhatnak. Így annak ellenére, hogy általában a méréseket jól definiált protokollok alapján végezzük, jogosan merülhet fel a kérdés, hogy a kapott eredményeket mennyire befolyásolhatja a mérő személye, vagy a mérési módszer típusa.

A morfometriai módszereket régóta használják a biológiában. Eredetileg az egyes fajok elkülönítése is pusztán morfológiai jegyeik alapján történt (Lindsey 1963), de a test mérhető paramétereinek eltérései fajon belüli kategóriák (pl.: ivari dimorfizmus, vagy izolált entitások, populációk) elkülönítésére (Rohlf 1990), illetve bizonyos környezeti tényezők hatásainak kimutatására is alkalmazsak (Jørgensen et al. 2008). A testalakbéli különbségek kimutatására többféle módszert is használnak (Trapani 2003, Ibañez et al. 2007, Nowak 2011), de viszonylag kevés információ áll rendelkezésünkre a különféle módszerek ismételhetőségéről és megbízhatóságáról (Arnqvist & Martensson 1998). Emellett, bár számos publikációban találunk utalást arra, hogy a mérő személyéből adódó különbségeket érdemes úgy kiiktatni, hogy az összes mérést ugyanazzal a személlyel végeztetjük el (Lehtinen et al. 2012, Lee 1982).

Jelen munkánkban arra keressük a választ, hogy a halbiológiában gyakran használt morfometriai vizsgálati módszerek mennyire adnak megbízható és ismételhető eredményeket, emellett arra hogy az egyes módszerek esetében milyen mértékben befolyásolhatja az eredményeket a mérést végzők személye.

## Anyag és módszer

A vizsgálatokat három kutató (M1, M2, M3), három különböző módszerrel, a testalak (GMT) és pikkelyalak (GMP) geometriai analízise, valamint „klasszikus”, tolmérős mérések (TM) három halfaj (bodorka, küsz és ezüstkárász), három Balaton vízgyűjtőjéről származó po-

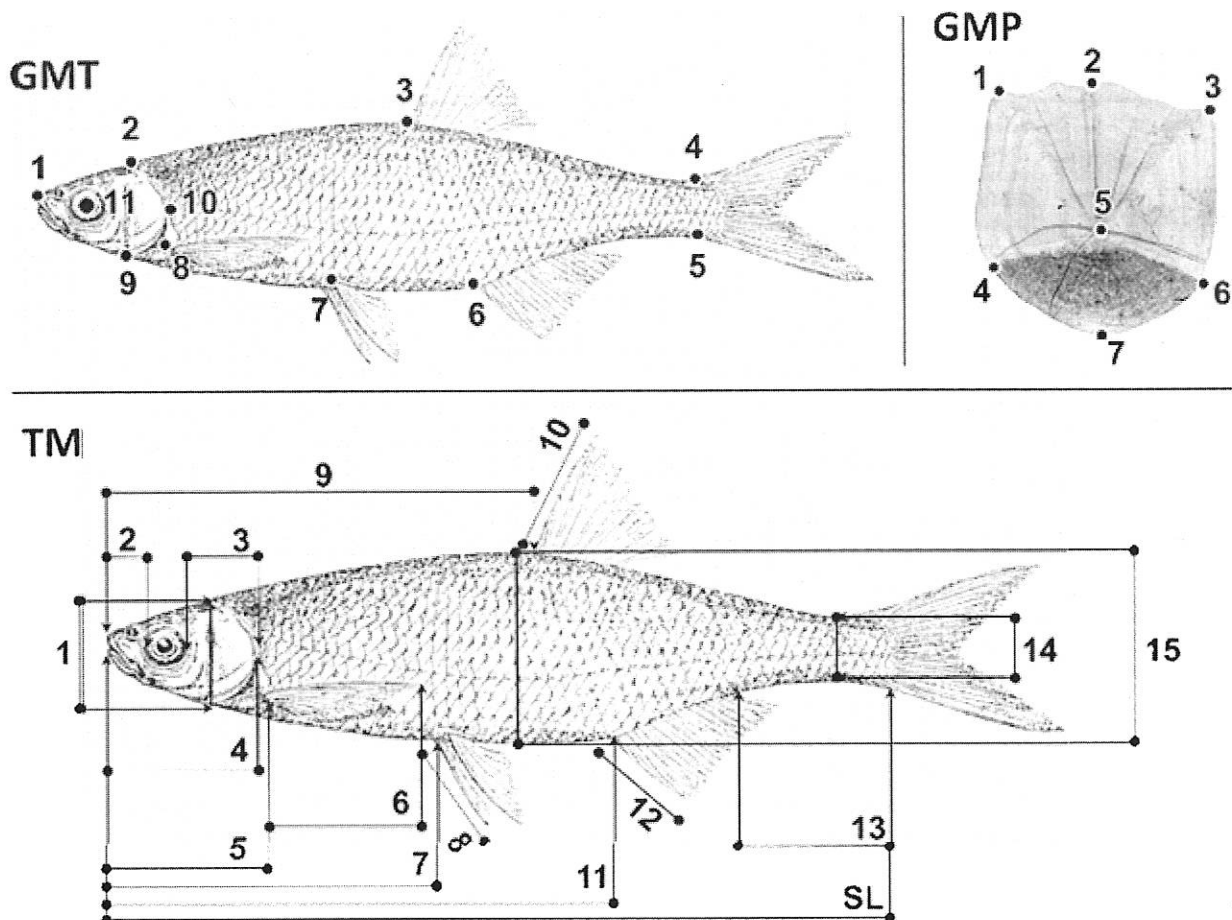
pulációján háromszori ismétlésben végezte el. A vizsgálatokhoz a kis-balatoni Zala szakasról (koord.: N-46.63498 E17.17531), az Edericsi-patak (koord.: N 46.79983 E17.38822), illetve a Pogányvölgyi-víz torkolatából (koord.: N46.75362 E17.56720) 30-30-30 egyedet gyűjtöttük be. Ezeket szegfűszegolajos túlaltatás után egyedi haljelekkel láttunk el, lefényképeztünk, és pikkelymintát vettünk róluk. Ezután az összes egyedet 4%-os formalinban tartósítottuk. A pikkelyeket letisztítottuk és felső megvilágítású lapskennerrel digitalizáltuk. Minden egyes halról, illetve a pikkelyről készült fotón tpsDig2 (Rohlf 2010) szoftver segítségével hét illetve tíz mérőpont koordinátáit vettük föl. A hagyományos morfometriai módszer (TM) esetében század-milliméteres pontosságú digitális tolmérő használatával 16 testparamétert rögzítettünk (1. ábra) a tartósított egyedeken. A nyers adatok standardizálását a GMT és GMP esetében teljes Prokrusztész illesztéssel (Klingenberg 2011), a TM mérések esetében a fajonkénti átlagos standard testhosszakra (SL) végeztük el (Elliott 1995).

A mérők személyének eredményekre gyakorolt hatásának (szubjektívitas) kimutatására minden egyed esetében random módon egy-egy mérősortozatot választottunk ki a háromszori ismétlésből mindegyik módszer esetében és az így kapott adatsorokat kanonikus variancia-analízissel (CVA) valamint kétutas PERMANOVA-val (Anderson 2001) elemeztük. Az utóbbi módszerrel egyrészt a mérő, másrészt a gyűjtőhely elkülönülésben játszott szerepét vizsgáltuk.

Mivel az egyes módszereknél a mért változók száma és azok dimenziója is eltért, ezért az ugyanazon az állományokon végzett ismételt mérősortozatok standardizált adataiból euklideszi távolsággal egyenként távolságmátrixokat képeztünk és ezek hasonlóságát (így az adott módszerrel végzett mérések ismételhetőségét) páronkénti összehasonlásban elvégzett Mantel-tesztek (Mantel 1967) korrelációs értékével („R”) jellemeztük. A kapott „R” értékek 0 és 1 között változhatnak. Amely az első esetben a két félmátrix, így az ismételt mérések teljes eltérését, az utóbbi esetben a két mérősortozat abszolút egyezését jelenti. Mivel a méréseink ismételhetőségét az adatsorokból képzett félmátrixok hasonlóságaként számszerűsítettük, ezért csak az azonos objektumokon, ugyanazon mérő által végzett mérősortozatok hasonlóságát vizsgál-

tuk. A kapott „R” értékeket „mérő”, „faj” és „módszer” színtelen csoportosítottuk. Az egyes csoportokba hason-

lósági értékeinek különbségeit nemparametrikus Kruskal-Wallis teszttel elemeztük.

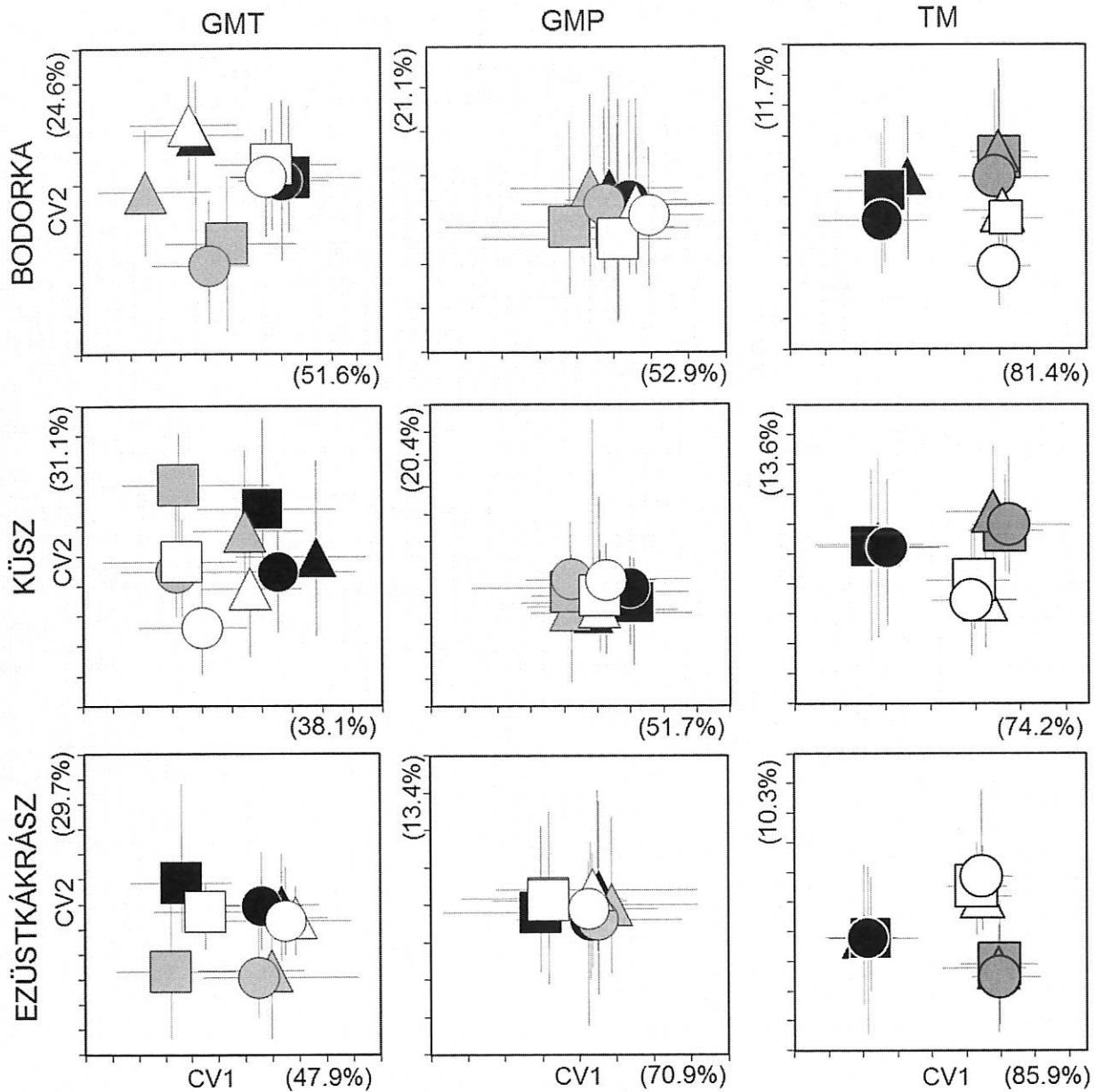


1. ábra Az egyes morfometriai módszerekkel mért változók. GMT: test geometriai morfometria, GMP: pikkely geometriai morfometria, TM: tradicionális morfometriai módszerrel mért változók (SL: standard testhossz)

### Eredmények

A vizsgálatot végzők mérési eredményekre gyakorolt hatásának vizsgálata során jelentős eltéréseket tapasztaltunk az egyes módszerek esetében. A GMT esetében a diszkriminancia analízisek eredményei azt mutatják, hogy az egyazon mérő által produkált adatsorokból számított (a 2. ábra plotjain azonos árnyalattal jelölt) csoportcentroidok egymáshoz viszonyított helyzete mindhárom vizsgált faj esetében hasonlóan alakult. Tehát az egyes mintavételi helyekről származó állományok hasonló módon különülnek el egymástól függetlenül attól, hogy ki végezte a méréseket. Ugyanakkor a mérők eredményekre gyakorolt hatása is megfigyelhető az ábrákon, mivel a különböző árnyalatokkal jelölt objektumok nem

fednek át egymással, hanem vagy az x, vagy az y tengely mentén valamilyen irányban eltolódtak egymástól. A GMP esetében hasonló mintázat figyelhető meg, de az egyes adatsorok pontfelhői erőteljesen átfednek, így a csoportcentroidok is sokkal közelebb helyezkednek el egymáshoz. A TM módszer esetében az azonos helyeket szimbolizáló azonos síkidomok árnyalatuk, tehát a mérést végző személyek alapján különülnek el egymástól mindhárom vizsgált fajnál. A kétutas PERMANOVA elemzés eredményei szerint fajtól függetlenül, mindhárom vizsgálati módszer esetében a mintavételi helyek és a mérést végző személynek is szignifikáns hatása van a kapott eredményekre.



2. ábra A morfometriai mérések standardizált adatsorain elvégzett kanonikus variancia-analízisek eredményei. A jobb áttekinthetőség érdekében csak a csoportcentroidokat, illetve az adatsorokból képzett pontfelhő  $x$  és  $y$  koordinátáinak szélső értékeit tüntettük fel. Azonos árnyalatokkal jelöltük az azonos mérő által elvégzett mérések adatsorait (fekete: M1, szürke: M2, fehér: M3), illetve azonos síkidomokkal az azonos mintahelyről származó állományok csoportcentroidjait ( $\Delta$ : Zala,  $\square$ : Edericsi-p.,  $\circ$ : Pogányvölgyi-víz). A zárójelben lévő számok az adott tengelyen ábrázolt varianciarányt jelzik.

Ugyanakkor a GMT esetében a magasabb „F” értékek arra utalnak, hogy ennél a módszernél a mintavételi helynek mindhárom faj esetében jelentősebb elkülönítő szerepe volt, mint a mérő személyének (1. táblázat). A GMP módszer esetében ez már csak az ezüstkárász állományai esetében teljesül. A TM módszerrel felvett adatok analízisének eredményei viszont mindhárom fajnál azt mutatták, hogy a mérő személyének jóval nagyobb szerepe van az elkülönülés kialakításában, mint az állományok származási helyének. A különböző módszerekkel elvégzett mérések ismételtetésének vizsgálata azt az eredményt hozta, hogy a mérők között a legtöbb esetben nincs szignifikáns különbség a megismételt mérések hasonlóságában, és a szórások is sok esetben hasonlóak

(3. ábra I. szint). Ugyanakkor az adatokat „faj” és „módszer” szinten összegezve jelentős különbségeket találunk az egyes csoportok között (3. ábra II. és III. szint). A különböző módszerek a legtöbb esetben szignifikánsan eltérő ismételtetését mutatnak a különböző fajok esetében. Az ezüstkárász esetében azonban a GMP vizsgálatok jobban ismételtetők ( $av.\pm SD = 85,4\pm 0,06$ ), mint a GMT vizsgálatok ( $av.\pm SD = 82,4\pm 0,13$ ). Az adatokat „módszer” szinten összegezve viszont általánosságban elmondható, hogy a GMT módszer ismételtetésége („R”) a legnagyobb ( $av.\pm SD = 0,899\pm 0,10$ ) melyet a GMP ( $av.\pm SD = 0,695\pm 0,20$ ) követ. A legalacsonyabb hasonlósági módszer közül a TM bír ( $av.\pm SD = 0,293 \pm 0,16$ ).

	Módszer	GMT		GMP		TM	
		F	p	F	p	F	p
bodorka	forrás						
	hely	<b>9,809</b>	<b>0,0001</b>	2,421	<b>0,0085</b>	5,691	<b>0,0001</b>
	mérő	5,839	<b>0,0001</b>	<b>6,673</b>	<b>0,0001</b>	<b>73,037</b>	<b>0,0001</b>
	interakció	0,320	0,9995	0,885	0,6123	1,8855	<b>0,0155</b>
küsz	hely	<b>7,912</b>	<b>0,0001</b>	3,221	<b>0,0004</b>	7,3949	<b>0,0001</b>
	mérő	6,284	<b>0,0002</b>	<b>4,441</b>	<b>0,0001</b>	<b>58,132</b>	<b>0,0001</b>
	interakció	0,361	0,9890	0,867	0,6325	1,4161	0,0882
ezüstkárász	hely	<b>17,882</b>	<b>0,0001</b>	<b>9,805</b>	<b>0,0001</b>	3,2112	<b>0,0016</b>
	mérő	5,978	<b>0,0001</b>	1,730	0,0558	<b>91,975</b>	<b>0,0001</b>
	interakció	0,448	0,9989	0,419	0,9962	1,3849	0,1192

1. táblázat. Az adatsorokon elvégzett kétutas PERMANOVA analízisek eredményei. A szignifikáns ( $p < 0,05$ ) értékeket félkövér betűtípussal emeltük ki.

### Értékelés

A több mérő személyvel, több fajon, több morfometriai módszerrel elvégzett morfometriai vizsgálat sorozatunk eredményei alapján megállapítható, hogy az összehasonlított módszerek mindegyikénél kimutatható a mérést végző személyek eredményekre gyakorolt szignifikáns hatása. Ugyanakkor ezek a hatások csak a TM esetében voltak olyan jelentősek, hogy felülírták a gyűjtőhelyek elkülönülésre gyakorolt hatásait. Hangsúlyoznunk kell azonban, hogy a vizsgált állományok egy vízgyűjtőn belüli, hasonló környezeti feltételeket biztosító mintahelyekről származnak, így valószínűleg a köztük lévő morfometriai eltérések sem lehetnek igazán számottevőek. Míg a küsz és a bodorka esetében a három összevetett módszer ismételtetősége szignifikánsan csökkent a GMT, GMP és TM sorrendben, addig az ezüstkárász esetében a GMT és GMP ismételtetősége között nem találtunk szignifikáns különbséget. Ez vélhetően annak tudható be, hogy az ezüstkárász karakterisztikusabb pikkelyalakkal jellemezhető, mint a másik két vizsgált faj, így ezen a mérőpontok jobban beazonosíthatók, mint a testen kijelölt pontok. Eredményeink tehát felhívják a figyelmet arra, hogy a morfometriai vizsgálatok tervezésekor a vizsgálni kívánt faj adottságainak ismeretében (ú.n. pikkelyalak) minden esetben érdemes mérlegelni, hogy milyen módszerrel történjen a vizsgált tulajdonságok számmá konvertálása. Emellett az eredmények értékelésekor, különösen akkor ha vizsgálatunk célja, hasonló környezeti adottságú élőhelyeken vagy egymáshoz közel fekvő állományok morfometriai különbségeinek feltárása fokozottan szem előtt kell tartani, hogy az általunk vizsgált mindhárom módszer, különböző mértékben ugyan de egyéni, szubjektív hatásokkal terhelt.

### Köszönetnyilvánítás:

Munkánkat a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0038 azonosítójú pályázat támogatta.

### Irodalom

- Anderson M.J. (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26:32-46.
- Arnqvist, G., & Martensson, T. (1998) Measurement error in geometric morphometrics: empirical strategies to assess and reduce its impact on measures of shape. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 44(1-2), 73-96.
- Elliott N. G., Haskard K. and Koslow J. A., (1995) Morphometric analysis of orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*) off the continental slope of southern Australia. *J. Fish Biol.* 46, 202-220.
- Ibañez, A. L., Cowx, I. G., & O'Higgins, P. (2007) Geometric morphometric analysis of fish scales for identifying genera, species, and local populations within the Mugilidae. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 64(8), 1091-1100.
- Jørgensen, H. B., Pertoldi, C., Hansen, M. M., Ruzzante, D. E., & Loeschcke, V. (2008) Genetic and environmental correlates of morphological variation in a marine fish: the case of Baltic Sea herring (*Clupea harengus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 65(3), 389-400.
- Klingenberg, C. P. (2011) MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11(2), 3530-357.
- Lee, J. C. (1982) Accuracy and precision in anuran morphometrics: artifacts of preservation. *Systematic Biology*, 31(3), 266-281.
- Lehtinen, R. M., Glaw, F., Andreone, F., Pabijan, M., & Vences, M. (2012) A new species of putatively pond breeding frog of the genus *Guibemantis* from southeastern Madagascar. *Copeia*, 2012(4), 648-662.
- Lindsey, C. C. (1963) Sympatric occurrence of two species of humpback whitefish in Squanga Lake, Yukon Territory. *Journal of the Fisheries Board of Canada* 20.3: 749-767.
- Nowak, M., Mendel, J., Szczerbik, P., Klaczak, A., Mikołajczyk, T., Ozga, K., & Popek, W. (2011) Contributions to the morphological variation of the common gudgeon, *Gobio gobio* complex (Teleostei: Cyprinidae), in the upper Vistula drainage (southeast Poland). *Archives of Polish Fisheries*, 19(1), 37-49.
- Rohlf, F. J. (2010) tps dig2, digitize landmarks and outlines, version 2.16. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rohlf, F. J. (1990) Morphometrics. *Annual review of Ecology and Systematics* 21: 299-316.
- Anderson, M. J. (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26:32-46.
- Trapani, J. (2003) Geometric morphometric analysis of body-form variability in *Cichlasoma minckleyi*, the Cuatro Ciénegas cichlid. *Environmental Biology of Fishes*, 68(4), 357-369.

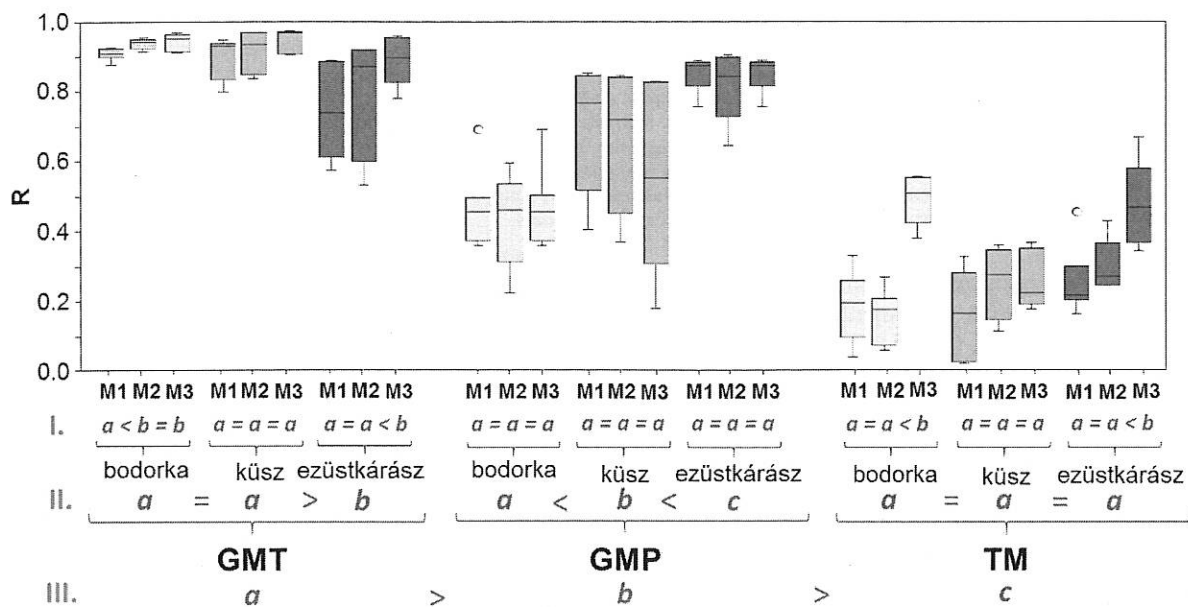
### Accuracy and subjectivity analyses of three ichthyological morphometric methods

#### Abstract:

In present study three widely used fish morphometric methods, the landmark based Geometric Morphometry on Body (GMB) and on Scales (GMS) and the Traditional Morphometry (TM) were compared to each other from the aspect of repeatability and subjectivity. Our aims were to assess how the method, and the between expert variabilities affect the results of the analyses made on the same subjects. Therefore 30-30 specimens of three common Cyprinid species (bleak, roach, prussian carp) collected from three sampling sites were measured. After tagging by individual marks and scale sample collection, high resolution digital image of each specimen were taken. After these procedures the studied individuals were preserved in 4-10% formalin solution. GMB (on 11 variables) and GMS (on 7 variables) analyses were processed on digital images of bodies and scales. TM (16 variables) measurements were made on the conserved specimens using digital caliper by the same experts. All data were

standardized and analyzed with Mantel tests Canonical Variate Analyses and PERMANOVA. Similarity of the repeated measurements (repeatability) was the highest in case of GMB ( $av.\pm SD = 0,899\pm 0,10$ ), followed by the GMP ( $av.\pm SD = 0,695\pm 0,20$ ), and the lowest average value was detected in the case of TM method ( $av.\pm SD = 0,293\pm 0,16$ ). In some cases the between-expert differences were higher, than the population level differences, suggesting the considerably high subjectivity of the compared methods. The results of PERMANOVA analysis were also supported our findings. Moreover in the case of GMS and TM the measurer had significantly higher influence on the results than in the case of GMB.

Key words: **shape analysis, scale, traditional morphometry, CVA, Mantel-test, PERMANOVA**



3. ábra: Az ismételt mérésorozatokat átlagos hasonlóság „R” értékeinek boxplotjai. Egy-egy boxban a 25 és 75%-os kvartilis közötti értékeket tartalmazza. A boxból kinyúló vonalak a minimum és maximum értékeket ábrázolják. A kiugró értékeket (melyek az interkvartilist másfélszeresen meghaladó értékek) körrel jelöltük. A szürke római számokkal jelzett azonos szinteken (I: „mérő” szint, II: „faj” szint, III: „módszer” szint) azonos betűvel jelzett csoportok nem különböznek szignifikánsan egymástól (Kruskall-Wallis teszt,  $p < 0,05$ )