

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Protistologie



Bc. Edith Buchtová

Existují u krásivek rodu *Micrasterias* teplotně korelované změny v morfologické integraci buněk?

Are there any temperature related changes in morphological integration of *Micrasterias* cells?

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Jiří Neustupa, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13. 08. 2017

Edith Buchtová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Jiřímu Neustupovi za cenné rady a podněty při psaní této práce, ale i za podporu a trpělivost během celého magisterského studia. Poděkování patří také kolegům z algologického oddělení za přátelskou a příjemnou atmosféru v pracovním prostředí. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své babičce Edith Buchtové, za podporu, laskavost a rady, jež mi věnovala nejen v průběhu studia.

Abstrakt

Micrasterias rotata je fylogeneticky i morfologicky dobře definovaným druhem, vyskytujícím se na celém území střední Evropy v rozsáhlém gradientu teploty. Pro svůj složitý tvar buněk je vhodným modelovým organismem výzkumu buněčné morfogeneze. V této diplomové práci bylo zkoumáno, zda se působení teploty jako stresového faktoru projeví odlišným vzorem morfologické integrace buněk *Micrasterias rotata* kultivovaných na teplotním gradientu. Optima a limity růstu na teplotním gradientu byly vztaženy k domovské lokalitě studovaných kmenů, izolovaných z nížinného mokřadu a vysokohorského jezera. Rozdíly v rychlosti růstu mezi kmeny naznačují lokální adaptaci na klimatické podmínky zdrojové lokality, ovšem poměrně vysoké hodnoty předpokládaného teplotního optima svědčí o vnitrodruhové evoluční adaptaci. Pravidlo snižování velikosti s teplotou se nepotvrdilo, ovšem u obou kmenů byl pozorován shodný tvarový trend. Analýza morfologické integrace v zásadě potvrdila, že buňka krásivky rodu *Micrasterias* je složena z řady morfologických modulů, které souvisí s její diferenciací na laloky a podlaloky. Integrace mezi laloky protilehlých polobuněk byla korelována spíše s rychlostí růstu. Naopak pozorovaná korelace teploty a vzájemné integrace laterálních laloků v rámci polobuňky může souviset se zvýšeným vývojovým stresem při morfogenezi, integrace v rámci polobuněk by tedy v budoucích studiích mohla být využívána k indikaci vývojového stresu.

Klíčová slova

geometrická morfometrie, *Micrasterias rotata*, modularita, morfogeneze, morfologická integrace, růstová rychlost, teplotní gradient

Abstract

Micrasterias rotata is a phylogenetically and morphologically well defined species that is widely distributed in Central Europe in a broad temperature gradient. For its complex cell shape *Micrasterias rotata* is a suitable model organism for cell morphogenesis research. This thesis investigated whether there could be a different pattern in morphological integration resulting from the temperature stress in *Micrasterias rotata* cells cultivated on a temperature gradient. The optimum and a limits of growth on the temperature gradient were related to the sampling locations of the studied strains isolated from a lowland wetland and an high alpine lake. Differences in the growth rates among the strains suggested a local adaptation to the climatic conditions of the original locations but relatively high values of the assumed optimum growth temperature suggested an intra-species evolutionary adaptation. The temperature-related size reduction rule was not confirmed; however, a similar pattern of variation in shape occurred in both strains. The morphological integration analysis has basically confirmed that the *Micrasterias* cell is composed of a number of morphological modules related to its differentiation into the lobes and sublobes. Integration between the lobes of the opposite semicell was primarily correlated with the growth rate. On the other hand, observed correlation among temperature and mutual integration of lateral lobes within a single semicell can be related to an increased developmental stress in morphogenesis thus in the future studies the semicell integration could be used as an indicator of a developmental stress.

Keywords

geometric morphometrics, growth rate, *Micrasterias rotata*, modularity, morphogenesis, Morphological integration, temperature gradient

Seznam zkratek

CS: centroidová velikost

GM: geometrická morfometrie

GPA: zobecněná Prokrustovská analýzy

MES: pufr stabilizující pH 4,5 - 6,5 ($C_6H_{13}NO_4S \cdot H_2O$)

MI: morfologická integrace

PC: hlavní komponenty PCA

PCA: analýza hlavních komponent

PLS: analýza nejmenších čtverců

Rab: rodina proteinů z nadrodiny Ras monomerických G-proteinů

MdRABE1: Rab guanosintrifosfát fosfhydroláza patřící do podskupiny RABE (Ras genu z mozku potkanů E)

SW: singulární warpy PLS analýzy

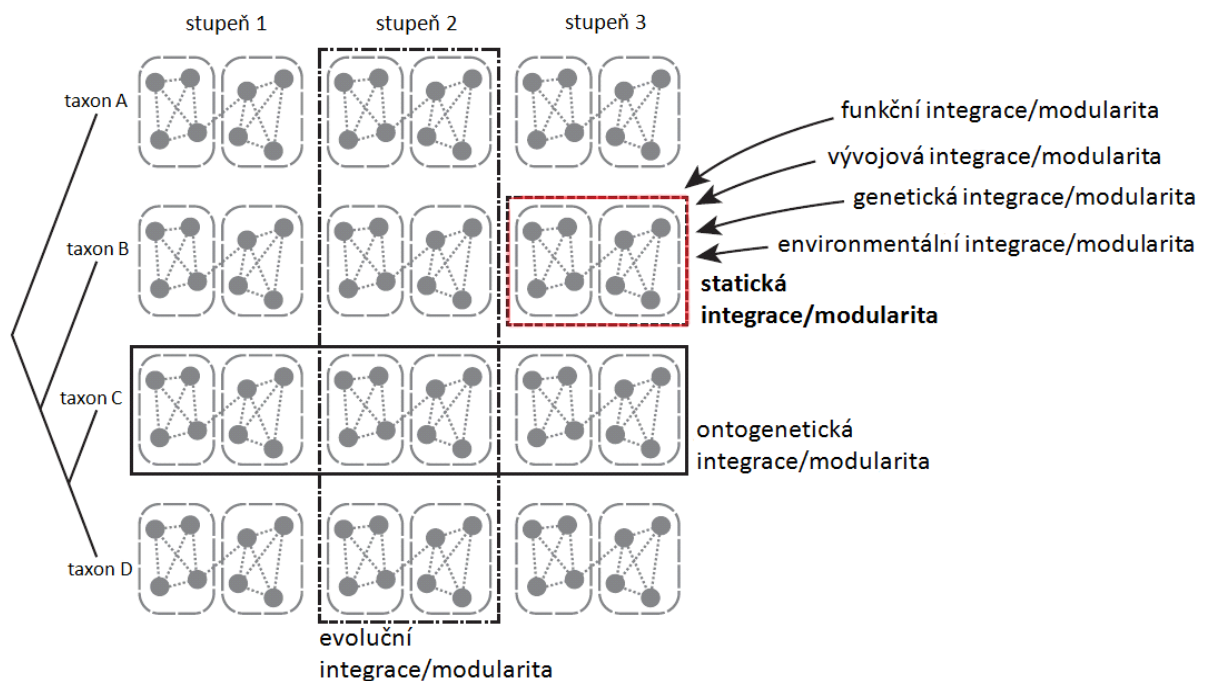
Obsah

1 Úvod.....	1
1.1 Morfologická integrace.....	2
1.1.1 Integrace morfogenetických procesů.....	2
1.1.2 Modularita.....	3
1.1.3 Statická integrace.....	5
1.2 Výzkum integrace a modularity v morfologických datech.....	6
1.2.1 Geometrická morfometrie.....	6
1.2.2 Kvantifikace integrace a modularity.....	7
1.3 Krásivky jako modelová skupina pro výzkum kvantitativní morfologie.....	8
1.3.1 Rod <i>Micrasterias</i>	9
1.3.2 <i>Micrasterias</i> jako model pro výzkum buněčné morfogeneze.....	10
1.3.3 <i>Micrasterias</i> jako model pro výzkum kvantitativní morfologie.....	12
1.4 Cíle práce.....	14
2 Materiál a metody.....	14
2.1 Odběr vzorků.....	14
2.2 Kultivace.....	15
2.3 Experiment na teplotním gradientu a analýza růstové rychlosti.....	16
2.4 Digitalizace landmarků.....	17
2.5 Analýza tvaru a velikosti buněk.....	17
2.5.1 Analýza morfologické variability.....	18
2.5.2 Hodnocení velikosti buněk a hlavní trendy morfologické variability.....	18
2.6 Analýza morfologické integrace.....	19
2.6.1 Vztah integrace k teplotě a růstové rychlosti.....	20
3 Výsledky.....	20

3.1 Růst kmenů na gradientu teploty.....	20
3.2 Vliv teploty na velikost buněk.....	22
3.3 Vliv teploty na morfologickou variabilitu.....	23
3.4 Morfologická integrace - konfigurace landmarků.....	25
3.4.1 Morfologická integrace buněčných laloků.....	25
3.4.2 Závislost morfologické integrace na teplotě a rychlosti růstu.....	32
4 Diskuze.....	33
4.1 Optima a limity růstu krásivek.....	33
4.2 Teplotně podmíněná velikost mikrořas.....	35
4.3 Vliv teploty na fenotypovou plasticitu.....	36
4.4 Integrace buněčných laloků v závislosti na teplotě a růstové rychlosti.....	36
4.4.1 Teplota jako stresový faktor.....	37
5 Závěr.....	38
6 Literatura.....	39
7 Příloha.....	47

1 Úvod

Jednotlivé části organismálních morfologií jsou typicky utvářeny tak, aby jejich funkce byla harmonicky koordinovaná se všemi částmi organismu. Proto je fenotyp každého organismu integrovaným, organizovaným a funkčním celkem (Cheverud a kol., 1983). Integrace je nedílně spojována s modularitou, kde moduly představují znaky úzce propojené do komplexních jednotek (Wagner, 1996). Organismy s vysoce korelovanými znaky v rámci modulů mají vyšší funkční účinnost, což může být adaptivní evoluční výhodou (Brock & Weinig, 2007). Integrace se projevuje na mnoha úrovních živých organismů, např. genetické, vývojové či funkční, tudíž je vhodné na ni pohlížet z víceúrovňové perspektivy. Je zprostředkována genetickými, vývojovými, environmentálními nebo fyziologickými vztahy mezi znaky. V závislosti na odpovídajících procesech tak lze rozlišit několik úrovní integrace a modularity (Obr. 1; Klingenberg, 2014; Wagner & Altenberg, 1996).



Obr. 1: Různé úrovně integrace a modularity. Diagram obsahuje čtyři příbuzné druhy, každý se třemi ontogenetickými stupni. Ontogenetická integrace a modularita se týkají variace mezi jednotlivými stupni v rámci jednotlivých druhů, zatímco evoluční úroveň se zaměřuje na variaci mezi druhy v každé dané fázi. Statická úroveň se uplatňuje na úrovni jednoho druhu a stupně. Funkční, vývojová, genetická a environmentální integrace a modularita jsou obvykle studovány ve statickém kontextu, tj. v jedné konkrétní ontogenetické fázi pro daný druh (upraveno podle Klingenberg, 2014).

1.1 Morfologická integrace

Morfologickou integraci (MI) lze definovat jako soudržnost mezi znaky, vyplývající ze vzájemných interakcí morfologických procesů a fenotypové struktury (Klingenberg, 2008). Koncepce MI existuje již více než půl století (Olson & Miller, 1958) a znovu získala pozornost v posledních letech (Pigliucci & Preston, 2004). Nicméně základní myšlenky podkládající MI jsou mnohem starší (Mayr, 1982) a některé konkrétní metody užívané pro analýzu integrace jsou samy o sobě v centru dlouhodobého zájmu, například alometrie (Huxley, 1932). Alometrie zkoumá závislost tvaru na velikosti, často charakterizovanou regresí tvaru k velikosti. (Klingenberg, 2010). Rozlišení různých úrovní, na nichž se MI uplatňuje, umožňuje srovnávat vzory integrace mezi nimi, pro získání vhledu do evolučních a vývojových procesů na základě podobnosti vzorů napříč úrovněmi integrace (Cheverud, 1982; Klingenberg a kol., 2012; Willmore a kol., 2005). Většina empirických studií je soustředěna na integraci v rámci populace a zkoumá, jak je strukturována variace mezi jednotlivci (Klingenberg, 2008). MI lze odvodit z údajů o kovarianci většího množství znaků. Kovariancí je v kontextu MI myšlen rozsah, v rámci kterého jsou navzájem propojeny různé fenotypové znaky. Míra integrace souvisí s distribucí variability v rámci prostorového uspořádání fenotypu. Integrace je nejsilnější, jestliže se variabilita dvou srovnávaných souborů znaků koncentruje v jednom rozměru, což indikuje úplnou korelaci všech měření, k čemuž nedojde, pokud je variabilita rovnoměrně distribuována přes všechny dostupné rozměry (Cheverud a kol., 1983, Wagner, 1990).

1.1.1 Integrace morfogenetických procesů

Zdrojem MI může být jakýkoli proces, vytvářející společnou varianci v mnoha znacích, od individuální variability až po dlouhodobou evoluci (Klingenberg, 2008). Při určování variability tvaru je porovnání vývojové integrace s genetickou nebo fenotypovou integrací důležité pro posouzení role vývojových procesů. Hlavní vliv na celkovou genetickou a fenotypovou variaci tvaru v populaci mají vývojové interakce, jiné faktory se podílí menší měrou (Debat & David, 2001; Klingenberg a kol., 2010). Integrace mezi znaky může působit jako evoluční omezení (constraint) tím, že soustřeďuje změny v některých specifických směrech tvaroprostoru a zároveň omezuje změny v jiných směrech. Čím je korelace silnější, tím jsou znaky více integrovány. Pokud jsou takto silně integrovány geneticky kódované znaky, jedná se o genetické *constraints*, tedy evoluční změny se projeví s větší pravděpodobností v určitém směru. Geneticky podmíněná *constraints* mohou vést k evoluční

kanalizaci (Schluter, 1996). *Constraints* se sama o sobě mohou vyvíjet jako vzory integrace v rámci variability struktury (Wagner & Altenberg, 1996).

V souvislosti s evolučními *constraints* je důležité zmínit, že evolvabilita morfologie organismu je omezena také tzv. translační symetrií, tj. násobným opakováním symetrických částí na základě společných vývojových sítí na molekulární úrovni, a případně také odlišným stupněm integrace mezi různými takovými oblastmi. Zejména části vyvíjející se diachronně, např. v různých fázích životního cyklu nebo ekologických podmínkách, se mohou zásadně lišit ve svém stupni MI. Tyto vzory mohou představovat klíčové *constraints* v evoluci biologického druhu, protože usnadňují evoluční změnu pouze části struktury, což vede k asymetrické diferenciaci tvaru znaku (Klingenberg a kol., 2012; Viscosi & Cardini, 2011). Asymetrická morfologická variace je považována za míru vývojové nestability (Klingenberg, 2015; Medarde a kol., 2013). U mnohobuněčných organismů je morfogeneze primárně založena na interakcích mezi buňkami, regulací buněčné diferenciace, adhezí a růstem tkání (Klingenberg, 2008). Rozdíly v těchto procesech pak vedou k různým vzorům morfologické symetrie a asymetrie makroskopických struktur, jako jsou listy (Graham a kol., 2015) nebo segmenty těl bezobratlých (Savriama a kol., 2016), představující vývojové moduly organismu. U morfologie jednobuněčných organismů máme ovšem podstatně méně dat o integraci a symetrické změně tvaru. Jedna z pionýrských studií byla nicméně koncentrována na integraci buněk myších spermií (Medarde a kol., 2013). V rámci hlavičky myší spermie byly identifikovány tři morfologické moduly, velmi dobře odpovídající cytoskeletální diferenciaci pod plazmatickou membránou buňky (Medarde a kol., 2013). Strukturální heterogenita cytoskeletální sítě tedy u tohoto modelového systému přímo souvisí se vzorem MI tvaru spermatické buňky. Nicméně i přes své modulární uspořádání je savčí spermie relativně kompaktní morfologickou strukturou - tedy morfogeneze buněčných částí je synchronní a oblasti odpovídající konstrukčním modulům jsou prostorově pevně propojeny. Naproti tomu několik protistních linií má vegetativní buňky s komplikovanou víceúrovňovou symetrickou morfologií, případně s různými stupni nebo vzory integrace mezi jednotlivými buněčnými částmi (Neustupa, 2013; Savriama a kol., 2010). Určitý stupeň modularity můžeme například pozorovat u krásivek rodu *Micrasterias* (Neustupa, 2017).

1.1.2 Modularita

Modularita je založena na kvantifikaci rozdílů v integraci různých prvků struktury. Moduly jsou sady znaků, které jsou interně integrovány interakcemi mezi těmito znaky, přičemž jsou relativně nezávislé na ostatních modulech. Interakce uvnitř modulů závisí na různých

mechanismech, podle odpovídajícího kontextu studie. U morfologických znaků se modularita vyskytuje ve vývojovém, genetickém, funkčním a evolučním kontextu (Klingenberg, 2008). Pro analýzu MI a modularity, je třeba interakce zodpovědné za integraci vyvodit ze vzorů kovariance mezi znaky, protože tyto interakce nejsou přímo pozorovatelné. Vymezení modulů na základě dat o vzorech kovariance je klíčové pro otázku evoluce a vývoje daného znaku (Klingenberg, 2009). Předpokládá se, že kovariance mezi skupinami znaků rozdělených do modulů bude slabší než kovariance mezi skupinami různých znaků oddělených jinak (Klingenberg & Mebus, 2003; Klingenberg & Leamy, 2004). To znamená, že systematické porovnání rozdělení znaků vytvořených podle hypotézy modularity s jiným typem členění lze použít k testování hypotézy modularity. Tento postup se využívá s využitím kvantitativních morfometrických dat u řady organismů (Klingenberg, 2009). Jako pravidlo z těchto studií vychází, že síla kovariance se pohybuje v poměrně omezeném rozsahu, což znamená, že i v případě, že kovariance mezi moduly je slabší než kovariance mezi libovolnou podmnožinou landmarků, není tento rozdíl příliš velký. Moduly nejsou vzájemně zcela nezávislé a zároveň nejsou zcela vnitřně integrovány, morfologická modularita má tendenci být otázkou stupňů (Klingenberg a kol., 2003). Existují další metody pro určení modulů na základě vzoru kovariance. Mezi ně patří tzv. "*clustering*" a řada statistických modelů, které se zabývají relativní silou integrace uvnitř a mezi moduly. Avšak z důvodu rozdílné metodologie mohou být výsledky analýz obtížně srovnatelné (Klingenberg, 2008; Mitteroecker & Bookstein, 2007). Modularitu lze nalézt u mnoha, ale ne u všech struktur. Zejména ve studii křídel much a cvrčků byla pozorována silná integrace v rámci křídla, spíše než jejich modulární struktura (Klingenberg, 2009; Klingenberg a kol., 2010). Studie savčí mandibuly a lebky, naopak svědčí o určitém stupni modularity. Srovnávací analýzy ukázaly, že se modularita může vyvinout mezi příbuznými druhy, ale existují dispozice pro modularitu, které jsou makroevolučně konzervativní (Goswami, 2006; Klingenberg, 2009). Integrace mezi různými částmi, a tedy struktura modulů, se může vyvíjet a měnit v různých fázích ontogeneze organismu (Zelditch a kol., 2006; Willmore a kol., 2006). Hallgrímsson s kolegy (2009) navrhl metaforu palimpsestu, jelikož postupné vývojové procesy mohou zanechat stopy ve vzorech kovariance znaků. Pokud jsou vzory modularity a integrace, vytvořené těmito procesy nesourodé, každá vrstva vzorů překryje další vzory. Ačkoli ve vývojových procesech existuje výrazná modularita, nemusí být potom kvůli kumulaci znaků během vývoje detekovatelná, a proto může být modularita na základě kovariance znaků nejasná. U polobuněk *Micrasterias* by tato hypotéza mohla zahrnovat vzájemné změny integračních vzorů mezi částmi organismu během morfogeneze, tedy postupné oddělení jednotlivých

vyvíjejících se laloků a lalůčků, které jsou méně integrované s rostoucím počtem větvení laloků v buňce. Relativně slabou, ale signifikantní integraci mezi vzdálenějšími částmi dospělých polobuněk pak lze vysvětlit jako zbytek jejich těsnějšího vztahu v dřívějších fázích vývoje (Neustupa, 2017).

1.1.3 Statická integrace

V empirických studiích integrace a modularity se nejčastěji používá statická úroveň. Jedná se o kolísání variability mezi jednotlivci v homogenním vzorku, kde všechny vzorky pocházejí ze stejného druhu a ontogenetické fáze (Gould, 1966; Klingenberg & Zimmermann, 1992). Ve statickém kontextu jsou obvykle studovány vývojová, funkční, genetická a environmentální integrace a modularita (Klingenberg, 2014). Na environmentální integraci lze pohlížet v rámci dvou kontextů, buď jako na integraci zbytkové složky v kvantitativní genetické analýze nebo na integraci fenotypových změn v důsledku odlišných podmínek prostředí (Pélabon a kol., 2013). Komponentou environmentálního vlivu je fenotypická plasticita, která může mít zásadní evoluční význam. Plasticita je reakcí vývojového systému na změnu environmentálních faktorů. Je-li plasticita adaptivní a morfologické změny slouží k optimalizaci výkonu některé funkce za různých podmínek prostředí, existuje jasná vazba na funkční integraci. Také náhodné komponenty vývojové nestability mohou poskytnout informace o vývojových interakcích mezi jednotlivými částmi (Klingenberg, 2010). Základem plasticity jsou epigenetické procesy, environmentální stimulus může ovlivnit vývoj a výsledný efekt se projeví v dospělosti (Young & Badyaev, 2007). Jako environmentální stimulus mohou působit fyzikální faktory, například teplota (Debat a kol., 2009).

Teplota má nezanedbatelný vliv na organismy s velkou vnitrodruhovou plasticitou, mezi něž náleží i planktonní a bentické řasy, například krásivky (Glenk, 1994; Meindl, 1990). Malé vodní plochy, jež krásivky tradičně obývají, jsou vystaveny velkým výkyvům v důsledku měnících se sezónních a denních teplotních podmínek. Buňky mohou v zimě čelit silnému mrazu, ale také teplotám vyšším než 30 °C během léta (Weiss & Lütz-Meindl, 1999; Weiss a kol., 1999). Teplota nižší než 9 °C sice umožňuje růst, ten je však značně zpomalen a na dospělé buňce jsou patrné malformace (Meindl, 1990). Pokud jsou buňky krásivky rodu *Micrasterias* vystaveny teplotám okolo 30 °C, je značně akcelerována rychlost jejich růstu a u vyšších teplot se objeví teratogenní změny. Změna velikosti buněk a variace tvaru vlivem vyšší teploty byla pozorována také u *Micrasterias rotata*, což dokládá souvislost fenotypové plasticity s teplotou (Neustupa a kol., 2008). V nepřímé návaznosti na tyto předchozí studie,

se tato diplomová práce zabývá environmentální integrací na úrovni jednoho ontogenetického stádia klonální populace druhu *Micrasterias rotata*.

1.2 Výzkum integrace a modularity v morfologických datech

Ke studiu MI a modularity se používá široká škála morfometrických metod. Integrace může být kvantifikována pomocí stupně odchylky vlastních hodnot (Gómez a kol., 2014; Young, 2006), vzory kovariance mezi znaky mohou být zkoumány analýzou dílčích nejmenších čtverců (Klingenberg & Zaklan, 2000). Nejrozšířenějším přístupem v současné morfometrii je zobrazení tvarů organismů pomocí landmarků, jejichž pozice je standardizována pomocí zobecněné Prokrustovské analýzy (generalized Procrustes analysis - GPA). Landmarky jsou specifické, přesně umístěné body, které si jednoznačně odpovídají u všech jedinců zahrnutých ve studii. Například to může být špička nosu či koutky úst u lidského obličeje, špička zubu myši nebo výběžky terminálních laloků krásivek (Bastir a kol., 2006, Neustupa, 2017, Workman, 2002). Metody geometrické morfometrie nabízejí pro takovéto studie mnoho výhod, protože mohou charakterizovat vzory morfologické variability ve velkém detailu a zachovat anatomický kontext studovaných struktur (Klingenberg, 2014).

1.2.1 Geometrická morfometrie

Obecně řečeno, geometrická morfometrie (GM) se zabývá studiem tvaru biologických objektů, aplikací statistických metod na porovnání morfologické variability, čímž mimo jiné přispívá k širšímu pochopení vývojových procesů a evolučních změn (Adams a kol., 2004, Klingenberg, 2008). Analyzují se data naměřené délky, poloha morfologických landmarků nebo celé "outliny" či povrch objektu (Renaud, 2010; Langlade, 2005). Výhodou GM je, že většina výsledků analýz může být vizualizovaná, jako změna tvaru a anatomicky interpretována. Všechny tvary odpovídají bodům v tvaroprostoru a zároveň změny tvaru mohou být graficky znázorněny jako relativní posun landmarků (Klingenberg, 2010). Tradičně byla morfometrie aplikací vícerozměrných statistických analýz na množiny kvantitativních proměnných, jako je délka, šířka a výška (Rohlf & Marcus, 1993). Mnoho morfologických znaků lze efektivně kvantifikovat měřením velikosti jednotlivých částí, například průměr ok na motýlích křídlech nebo délka končetiny, ale podstatně složitější tvary, jaké můžeme pozorovat u řady krásivek, nelze charakterizovat pouze měřením velikosti (Beldade a kol., 2002; Neustupa a kol., 2008; Young a kol., 2010). Pro zachycení geometrie původního objektu, je ovšem soubor lineárních vzdáleností obvykle nedostatečný. Stejně tak nebylo možné pomocí těchto tradičních metod dobře odlišit vliv variability ve tvaru a velikosti studovaných struktur. Tyto metody tak nebyly zcela vyhovující, jelikož se v průběhu

analýzy ztrácela informace o původním tvaru. Koncem 20. století byly vyvinuty citlivější metody, které zachycovaly geometrii a strukturu objektu a tyto informace uchovaly v průběhu analýz, lze hovořit o "revoluci v morfometrii" (Rohlf & Marcus, 1993). Pozornost byla zaměřena na souřadnice landmarků a geometrickou informaci o jejich relativní pozici (Adams a kol., 2004). Pro analýzu tvaru je třeba vzít v úvahu informace o rozměrech a vzájemné poloze částí struktury. Tvar je matematicky definován, zahrnuje všechny geometrické vlastnosti objektu, kromě velikosti, polohy a orientace. Pro grafické znázornění tvaru uplatňuje GM celou řadu metod. Variabilitu ve tvaru lze znázornit pomocí transformačních mřížek nebo vektorů směru změny (Zelditch a kol., 2004). Pro eliminaci "netvarové" variance v konfiguraci landmarků se využívá metoda Prokrustovské superimpozice (GPA). Principem této metody je minimalizace vzdáleností homologních landmarků standardizací polohy a orientace objektů v prostoru a sjednocení jejich velikosti, přičemž původní informace o tvaru zůstává zachována. Tvarové odchylky pak mohou být popsány rozdíly v souřadnicích landmarků mezi objekty. Tato data lze dále použít pro multivariační analýzu. (Bookstein, 1996; Adams a kol., 2004). V návaznosti na GPA může být tvar vizualizován pomocí interpolační funkce "thin-plate spline", jež umožňuje zkonstruování obdoby Thompsonových (1917) transformačních mřížek. Rozdíl ve tvaru mezi objekty pak lze odvodit porovnáním či kvantifikací odchylek deformačních mřížek (Bookstein, 1989). Parametry popisující tyto deformace mohou být použity jako tvarové proměnné pro statistické porovnání variace tvaru uvnitř a mezi populacemi. Výchozí "parciální warpy" pak mohou být podstoupeny další mnohorozměrné analýze, například PCA, analýze hlavních komponent (Adams a kol., 2004). Metody GM se využívají v řadě biologických studií, například ve studii fenotypové plasticity krásivky druhu *Pediastrum duplex* (Neustupa & Hodač, 2005) či pro morfologickou komparaci druhů v rámci rodu *Micrasterias* (Neustupa & Škaloud, 2007) a v neposlední řadě je nedílnou součástí studií morfologické integrace a modularity (Klingenberg, 2009).

1.2.2 Kvantifikace integrace a modularity

Morfometrické analýzy odhalují, že vývoj zprostředkovává komplexní interakce mezi genetickými a environmentálními faktory ovlivňujícími tvar. Evoluce je důsledkem změn těchto interakcí, neboť selekce upřednostňuje tvary s větší funkční účinností, zvyšující *fitness* jedince. Kvantitativní studie tvaru mohou charakterizovat vývojové a genetické účinky a objasnit jejich relativní význam. MI lze definovat jako kovarianci morfologických struktur v organismu nebo části struktury, reflektující vývojové či funkční interakce mezi znaky (Klingenberg, 2010). To, jak vývoj vytváří kovarianci mezi znaky, přispívá k pochopení

genetických variací a potenciální evoluční změny. Pro kvantifikaci integrace a modularity v morfologických datech je k dispozici řada metod a pro porovnání různých kontextů lze použít řadu srovnávacích a experimentálních designů (Klingenberg, 2008). Vzorům integrace je věnována zvýšená pozornost, zejména v kontextu častého využívání nástrojů GM. Jsou-li znaky navzájem integrovány, jejich morfologická variabilita je vzájemně koordinována. Pro zobrazení vzorů koordinace v morfometrických datech se využívá řada různých analýz (Bastir & Rosas, 2005; Bookstein a kol., 2003; Klingenberg a kol., 2003). Vzory integrace v rámci celé struktury jsou obvykle analyzovány metodou PCA, zatímco kovariance mezi různými částmi struktury je často studována metodami, jako je parciální analýza nejmenších čtverců (PLS; Bastir a kol., 2005; Klingenberg a kol., 2001). Všechny tyto analýzy považují landmarky za vzájemně integrované, jestliže jsou jejich odchylky korelovány (Klingenberg, 2008). Hypotézy integrace a modularity jednotlivých struktur se studují pomocí kovariance mezi bloky landmarků. Nejprve je objekt rozdělen na předem stanovené části, potenciálně představující moduly. Poté je metodou PLS analyzována kovariance mezi všemi dvojicemi hypotetických modulů a testována signifikance korelace (Klingenberg, 2009). Vhodným modelovým druhem pro studium MI na úrovni jednobuněčného organismu se ukázala být krásivka *Micrasterias compereana* (Neustupa, 2017). Krásivky (Desmidiaceae, Zygnematophyceae) byly uznány jako modelová skupina pro studium morfologické symetrie na buněčné úrovni a matematických modelů buněčného růstu a vývoje (Holloway a kol., 2008; Savriama a kol., 2010).

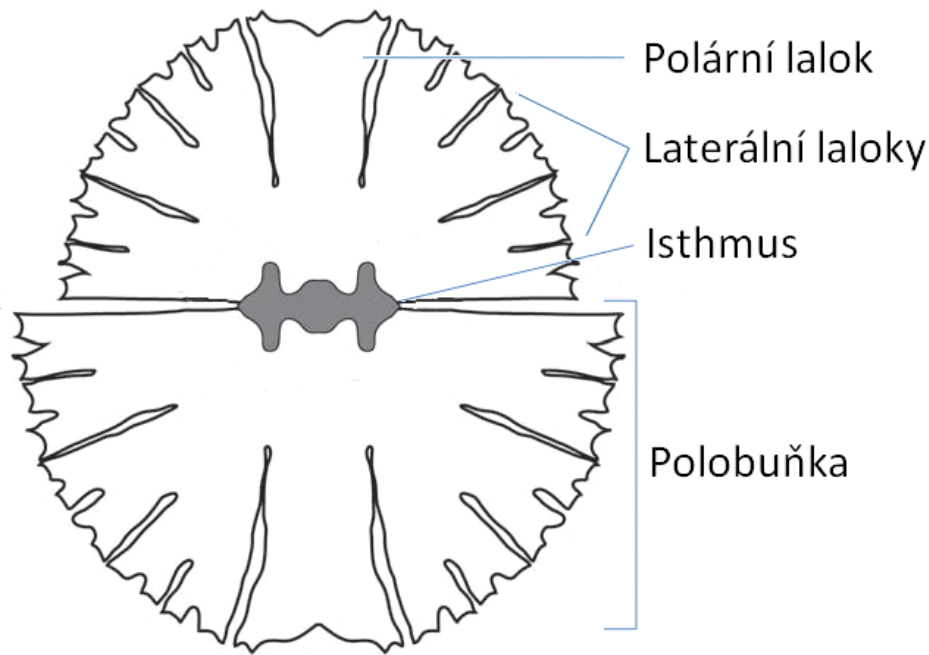
1.3 Krásivky jako modelová skupina pro výzkum kvantitativní morfologie

Obzvláště vhodné modelové organismy pro výzkum kvantitativní morfologie a buněčné morfogeneze u protist představují členové skupiny zelených řas krásivky (Desmidiaceae, Zygnematophyceae). Druhy krásivek rodu *Micrasterias* jsou dobře známy svou složitou, avšak krásnou morfologií, *Micrasterias* znamená ostatně z řečtiny odvozené "malá hvězda". Jejich elegantně utvořené, symetrické buňky inspirovaly mnoho badatelů a velikost jejich buněk usnadňuje pozorování i při jednodušším mikroskopickém vybavení. Krásivky se vyskytují v mnoha biotopech po celém světě, preferují mírně kyselé oligotrofní habitaty. Existují druhy, vyskytující se v arktických oblastech, jiné žijí v tropech, uplatňují se tedy v širokém latitudinálním i altitudinálním rozmezí (Coesel, 1996; Lenzenweger & Lütz, 2006). Krásivky, jako je *Micrasterias*, jsou tak dobře adaptovány na široké rozmezí teploty (Brook, 1981). V Evropě typicky obývají fyto-bentos mírně kyselých sladkovodních mokřadů. Pro své ekologické nároky je řada krásivek využívána jako bioindikátor kvality dané lokality

(Šťastný, 2010). U krásivek se vyskytuje zvláštní typ pohlavního rozmnožování, tzv. spájení (konjugace), typický pro všechny spájivé řasy, vegetativně se pak rozmnožují dělením. Morfologie krásivek může být ovlivněna lokálními podmínkami prostředí a jejich velká morfologická plasticita vede k řadě ektomorf či variet, jež mohou ve skutečnosti představovat pseudokryptické druhy. Nástroje GM tak mohou být také velkým přínosem pro výzkum diverzity těchto krásných mikrořas (Neustupa a kol., 2008; 2010).

1.3.1 Rod *Micrasterias*

Systematické zařazení krásivek je stabilní a v minulosti se příliš neměnilo. Původní rozdělení krásivek do čtyř čeledí na základě morfologie, posléze potvrdila i fylogenetika (McCourt a kol., 2000). Bylo popsáno zhruba 6000 morfologicky definovaných taxonů, avšak reálný počet druhů může být ještě větší. Krásivky (Desmiales) náleží do monofyletické třídy Zygnematophyceae (Streptophyta), obsahující dva řády, Zygnematales a monofyletické Desmiales. Desmidiaceae, je jednou ze čtyř čeledí, v rámci řádu Desmiales, do níž náleží i mnou studovaný druh *Micrasterias rotata* (Brook, 1981; Coesel & Meesters, 2007). Ploché buňky *Micrasterias rotata* jsou typicky složeny ze dvou zrcadlově symetrických polovin (semicel) odlišného stáří, které jsou spojeny úzkým středním můstkem (isthmem), obsahujícím jádro v interfázi. V oblasti isthmu probíhá buněčné dělení a z oddělené polobuňky se pak vyvíjí "dceřiná" polobuňka. Zralé buňky jsou obklopeny sekundární celulózní buněčnou stěnou, která fixuje buněčný tvar. Polobuňky jsou členěny na tři strukturální a vývojové komponenty: polární lalok a dva laterální laloky, které se větví v další podlaloky (Obr. 2; Brook, 1981). Experimentální studie naznačují, že tyto buněčné části mají specifické evoluční vzory a vyvíjejí se za standardních podmínek relativně samostatně, tedy s minimální vzájemnou integrací (Neustupa, 2017).



Obr. 2: Schéma buňky *Micrasterias rotata* (upraveno podle Savriama a kol., 2010).

1.3.2 *Micrasterias* jako model pro výzkum buněčné morfogeneze

Jednobuněčné zelené řasy rodu *Micrasterias* (Desmidiáles) mají komplexní, členité buňky, a proto jsou považovány za modelové organismy pro výzkum variací a rostlinné buněčné morfogeneze. Buňky rodu *Micrasterias* setvávají ze čtyř biradiálně symetrických kvadrantů (Savriama & Klingenberg 2011). Dva kvadranty, tvořící jednu polobuňku, se vyvíjejí současně, morfogeneze protilehlých kvadrantů může proběhnout o několik generací dříve. Přítomnost polárního laloku je zásadní pro morfogenezi vyvíjejících se polobuněk. Naopak, vývoj postranních laloků může být experimentálně blokován, bez okamžitého účinku na životaschopnost buněk (Waris & Kallio, 1964). V mnoha případech pak takovéto teratogenní polobuňky produkují svůj vlastní "zrcadlový obraz", což má za následek klonální populaci uniradiálních buněk, kterým chybí jeden postranní lalok, nebo aradiální klony, pouze s polárním lalokem (Kallio & Lehtonen, 1973; 1981). Existuje zřejmě alespoň jedna linie *Micrasterias*, která se skládá z druhů postrádajících oba laterální laloky, dříve známých jako tradičně definovaný rod *Triploceras* (Hall a kol., 2008; Škaloud a kol., 2011). Bylo spekulováno, že tato linie mohla vzniknout trvalým zablokováním morfogeneze obou laterálních laloků (Škaloud a kol., 2011). Naopak, zdá se, že neexistuje jediný druh v rámci linie *Micrasterias*, který má pouze jeden laterální lalok. Vzájemné propojení vývojových procesů mezi oběma laterálními laloky, jak je doloženo studii MI a dalšími

experimentálními pozorováními (Gärtner & Meindl, 1991), tak může zabránit evoluční radiaci založené na uniradiální změně. Podle Warise a Kallia (1964) je počet laloků řízen primárně cytoplazmatickou dědičností mezi starší a nově vyvíjející se polobunčkou. Nicméně, tato cytoplazmatická dědičnost teratogenní morfologie je zřejmě omezena na několik asexuálních generací. Experimentální pokusy s uniradiální populací *Micrasterias thomasi* ukázaly, že se teratogenní buňky po sérii mitotických buněčných dělení postupně vrací ke svému standardnímu typu biradiální morfologie (Gärtner & Meindl, 1991). V další studii Kallio a Lehtonen (1981) zkoumali vliv UV záření na výslednou morfogenezi buněk. I když u buněk působením UV záření došlo k enukleaci těsně před vegetativním dělením výsledné polobunčky, vyvinuly se alespoň tři rudimentální laloky, reprezentující základ polárního laloku a dvou bočních laloků. Nicméně, druhově specifické morfologie koncových laloků nebylo dosaženo, protože vývoj buněk po enukleaci dále nepokračoval. Na základě mikroskopického pozorování přírodních populací krásivek bylo navrženo, že morfologie neteratogenních polobuněk, tj. majících jak polární, tak i oba postranní laloky, může souviset s jejich starší polobunčkou, což ale nebylo experimentálně potvrzeno (Brook, 1981; Rosenberg, 1944). Tyto výsledky naznačují, že "cytoplazmatická dědičnost", pozorovaná u mutantních buněk *Micrasterias* na úrovni všech buněčných laloků, má vliv na morfogenezi jednotlivých koncových laloků (Waris & Kallio, 1964; Kallio & Lehtonen, 1981). Výchozí vzor tvaru tří-laločnatých polobuněk se projevuje již v počáteční fázi buněčného dělení v septu membrány, oddělující nedávno rozdělené polobunčky. Počáteční vzor lze vizualizovat za sníženého turgoru, když je materiál primární buněčné stěny uložen v určitých oblastech septa membrány, ale nemůže být správně inkorporován do vyvíjející se primární buněčné stěny (Kiermayer, 1970; 1981). Za těchto podmínek je materiál buněčné stěny ukládán dle vzoru, který se vyznačuje minimem zón, jež odpovídají pozdějším zářezům mezi hlavními laloky polobuněk (Meindl, 1993). Stejně tak plochy odpovídající lalokům, byly charakterizovány zvýšenou depozicí materiálu buněčné stěny. Kiermayer (1970) předpokládá, že septum plazmatické membrány nese specifické receptory, které slouží jako rozpoznávací místa pro vezikulární transport materiálu buněčné stěny v aktivně rostoucích oblastech vyvíjejících se polobuněk. Tento typ přepravy probíhá pomocí aktinových mikrofilament cytoskeletu (Holzinger a kol., 2002; Pflügl-Haill a kol., 2000), spíše než přes mikrotubuly (Kiermayer, 1981; Meindl, 1993). Nedávná studie ukázala, že vezikulární transport během morfogeneze polobuněk je regulován MdRABE1, proteinem, patřícím do Rab rodiny, které mohou mít potenciální roli v signálních procesech spojených s formováním tvaru buňky (Vannerum a kol., 2012). Formování vzoru v aktivně rostoucích oblastech je také doprovázeno lokáním

influxem Ca^{2+} iontů (Eder & Lütz-Meindl, 2008; Meindl, 1993). Během morfogeneze tento vápníkový influx odráží vzor větvení vyvíjejících se laloků a lalůčků. I když přesná role Ca^{2+} v morfogenetických procesech není zcela vysvětlena, předpokládá se, že je důležitý pro fúzi sekrečních váčků v aktivně rostoucích centrech, jakož i pro regulaci flexibility primární buněčné stěny. Buněčná stěna je v průběhu svého vývoje schopna vázat poměrně velké množství vápníku, což vede k jejímu ztuhnutí a ukončení lokálního buněčného růstu (Lütz-Meindl, 2016). Také experimentální studie, kde byly různé oblasti membrány vyvíjející se polobuňky poškozeny laserem, potvrzují, že v plazmatické membráně jsou lokalizovány specifické oblasti, mající klíčový význam pro morfogenezi jednotlivých laloků nebo lalůčků (Lacalli, 1975; 1976). Aplikace laseru v počátečním stádiu vývoje laterálního laloku zastaví morfogenezi na konkrétním místě tak, že je více pravděpodobná možnost opravy v pozdějších fázích, což vede k neteratogenní morfogenezi polobuněk se standardní morfologií. Naopak, působení laseru na membránu v pozdějších vývojových stádiích, má typicky za následek poškození morfogeneze konkrétního terminálního lalůčku. Pokud je laserem zasažena střední část vyvíjející se polobuňky, nevznikne polární lalok, ale postranní laloky zůstanou nedotčeny. Poškození vyvíjejících se polobuněk *Micrasterias* laserem, bylo zřetelně lokalizováno v jednotlivých lalocích, což svědčí o jejich relativně nezávislém vývoji (Harrison, 2001; Lacalli, 1976). Tedy k rozdílnému vytváření vzorů povrchu buněk v pozdějších fázích morfogeneze, dochází v několika aktivních vývojových centrech s minimální vzájemnou koordinací (Holloway, 2012). Takovýto morfogenetický vzor odpovídá několika slabě integrovaným vývojovým modulům v rámci jedné polobuňky *Micrasterias*. Analýzy geometrické morfometrie rodu *Micrasterias*, potvrzují, že krásivky mají vegetativní buňky s komplikovanou symetrickou morfologií, s různými stupni a vzory integrace mezi jednotlivými buněčnými částmi (Neustupa 2013; Savriama a kol., 2010). Kompartmentalizace vyvíjejících se polobuněk *Micrasterias*, do relativně samostatných laloků a lalůčků je nedílnou součástí jejich matematického modelu (Holloway, 2012).

1.3.3 *Micrasterias* jako model pro výzkum kvantitativní morfologie

Micrasterias je dobře morfologicky determinovaným rodem, popsáným na začátku devatenáctého století (Agardh, 1827). Existuje řada studií blíže zaměřených na jejich tvarovou variabilitu či adaptivní plasticitu, vztaženou k abiotickým podmínkám nebo fylogenetickému zařazení druhu (Černá & Neustupa, 2010; Neustupa & Škaloud, 2007). Zejména studie symetrie a asymetrické morfologické variace využívají nástrojů GM pro kvantifikaci tvaru a rozklad variability buněk *Micrasterias* (Neustupa, 2013; Savriama a kol.,

2010). Poslední vývoj kvantitativní morfologické analýzy umožnil vyhodnotit mnohé z pozorovaných jevů v experimentálních studiích a testování hypotéz, které vysvětlují pozorované morfogenetické vzory. Rozložení asymetrie buněčného tvaru na základě paralelní analýzy GM u všech symetrických transformací jedné symetrické grupy vede ke kvantifikaci různých vzorů asymetrické variace v rámci zkoumaných populací (Klingenberg, 2015; Savriama & Klingenberg, 2011). Matematické modely morfogeneze *Micrasterias* obecně popisují symetrické větvení rostoucích laloků. Takový vzor by měl odpovídat náhodnému rozložení asymetrických odchylek tvaru lalůček v rámci jednoho laloku buňky. Výrazná vnitřní asymetrie laloků mezi terminálními lalůčky naznačuje, že procesy větvení během růstu koncových částí vyvíjející se polobuňky nemusí vést ke shodným tvarům terminálních lalůček, což je v rozporu s klasickými popisy buněčné morfologie a teoretických modelů (Holloway, 2012; Růžička, 1981). Bylo zjištěno, že buňky *Micrasterias* jsou složeny ze dvou víceméně nezávislých morfogenetických polovin. Tvarové vzdálenosti kvadrantů protilehlých polobuněk v rámci jedné buňky se statisticky neliší od kvadrantů odebraných z různých buněk jedné klonální populace. Tomu odpovídají i výsledky jiných studií, kde je většina asymetrické morfologické variace buněk *Micrasterias* připisována rozdílu mezi polobuňkami, přičemž sousední kvadranty jedné polobuňky mají shodný tvar, ale liší se od kvadrantů protilehlé polobuňky (Neustupa, 2013; Savriama a kol., 2010). Tento dominantní vzor tvarové asymetrie buněk *Micrasterias* lze vysvětlit, jako přímý efekt působení vnějších faktorů, jako je teplota (Meindl, 1990; Neustupa a kol., 2008) nebo prostřednictvím alometrického účinku na základě rozdílu velikosti mezi polobuňkami jednoho druhu. Nicméně, čistě geometrický popis morfologie buněk *Micrasterias* jako disymetrické struktury s dvojnásobnou symetrií objektu není zcela přesný, v rámci polobuněk se uplňuje i symetrie mezi jednotlivými kvadranty a terminálními laloky (Klingenberg, 2015; Neustupa, 2016). V tomto kontextu byly zkoumány komplexní vzory symetrie mezi terminálními laloky buněk *Micrasterias*. Tyto lalůčky mohou reflektovat více symetrických os, což představuje jedinečný modelový systém pro zkoumání jejich shodné symetrie. Ve stejné studii byla analyzována morfologická integrace. Byl patrný značně odlišný stupeň integrace mezi lalůčky ze dvou podlaloků každého laterálního laloku. Polární laloky jsou slabě integrovány s přilehlými postranními laloky. Vyšší stupeň kovariance mezi dvěma postranními laloky stejné polobuňky dokládá vzájemné propojení a silnou integraci mezi těmito částmi. Analýzy ukázaly, že existují dva dominantní typy morfologické asymetrie mezi koncovými lalůčky buněk. Významným vzorem v asymetrii je rozdíl mezi sousedními laloky v rámci kvadrantu (Neustupa, 2017). Také v dřívější studii Škalouda a kolegů (2011), bylo pozorováno, že buňky *Micrasterias*

rotata mají typicky asymetrické boční laloky, zatímco buňka jako celek stále udržuje biradiálně symetrickou strukturu. Nejvýraznější je však asymetrie mezi polobuňkami napříč osou isthmu (tj. mezi starými a dceřinými polobuňkami), u buněk *Micrasterias rotata*, tvoří téměř dvě třetiny asymetrické variace (Savriama a kol., 2010). Tento vzor je patrně důsledkem rozdílného stupně integrace vývojových procesů v ontogenezi buněk. Opačné polobuňky jsou na sobě navzájem zcela nezávislé, což potvrdila analýza MI ve studii Neustupy (2017), na níž tato diplomová práce navazuje.

1.4 Cíle práce

Existují-li v rámci kontinentálně rozšířeného druhu teplotně korelované lokální adaptace, měly by být detekovatelné jako posuny v optimech a limitech růstu na teplotním gradientu, ale také by mohly být patrné v odlišné dynamice morfologické integrace buněčných morfogenetických modulů reagujících na stresové teplotní podmínky vnějšího prostředí. Alternativně je možné předpokládat, že teplotní optima závisí na funkčních znacích konkrétních buněk či jsou na všech jmenovaných faktorech zcela nezávislá (Savriama, 2010; Lütz-Meindl, 2016; Neustupa a kol., 2008).

Tato diplomová práce se zabývá otázkou, zda ovlivňují teplotní optima klonálních populací *Micrasterias rotata* strukturu morfologické integrace buněk. Cílem je analyzovat strukturu morfologické integrace buněčných laloků u populací *Micrasterias rotata* rostoucích v odlišných úrovních teploty a izolovaných z teplotně odlišných lokalit. Doplňující otázka pak řeší, jestli odlišná teplotní optima kmenů ovlivňují také velikost buněk.

2 Materiál a metody

2.1 Odběr vzorků

Modelovým druhem pro tuto diplomovou práci byla krásivka *Micrasterias rotata*. Vzorky byly odebrány ze dvou evropských lokalit, vybraných tak, aby zachycovaly co největší teplotní rozdíl klimatických podmínek. Prvním odběrovým místem byl nížinný rašelinný mokřad v České Republice, v nadmořské výšce zhruba 300 m n. m., známý jako Mariánský rybník. Druhým odběrovým místem bylo jezero Goldbachsee, nacházející se ve výšce 2000 m n. m. v rakouských štyrských Alpách. Odhadovaná roční průměrná teplota v české nížině je 8 °C a v Alpách okolo 3 °C (Norwegian Meteorological Institute). Do odběrové lahvičky byly vzorky odebrány ždímáním litorální vegetace, zejména bublinek (*Utricularia spp.*). Během několika dnů pak byly tyto vzorky izolovány ke kultivaci.

2.2 Kultivace

Pro kultivaci vzorků bylo použito pufované-MES DY IV médium. Při jeho přípravě se vychází z 950 ml destilované vody, do níž jsou postupně přimíchány složky uvedené v tabulce 1. Na závěr je médium doplněno do 1000 ml destilovanou vodou. Po sterilizaci média v autoklávu (Tuttnauer) byl dodatečně přidán vitamínový roztok (Tab. 1.; Andersen a kol., 1997).

Složení	Zásobní roztok (g / 100ml H ₂ O)	Množství (ml)
MgSO ₄ . 7H ₂ O	5	1
KCl	0.3	1
NH ₄ Cl	0.268	1
NaNO ₃	2	1
β - glycerolphosphate	0.216	1
H ₃ BO ₃	0.08	1
Na ₂ EDTA	0.7	1
Na ₂ SiO ₃	0.6	1
FeCl ₃ .6 H ₂ O	0.166	1
CaCl ₂	7.5	1
MES	---	200 g
Roztok mikroprvků		
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	31.4 mg	
MnSO ₄ . H ₂ O	4.5 mg	
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	1.46 mg	
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	2.35 mg	
NH ₄ VO ₃	0.13 mg	
Na ₂ SeO ₃	0.27 mg	
Rozpuštěné ve 1000ml destilované H ₂ O		
Roztok vitamínů		
vitamin B12	0.005 g	
Thiamin HCl	10 mg	
Rozpuštěné ve 1000ml destilované H ₂ O		

Tab. 1.: Tabulka uvádí složení a množství látek, pro získání zásobních roztoků. Ty jsou poté po 1 ml přidávány do DY IV média. Dále je uvedeno složení a množství mikroprvků a vitamínů, které jsou do média přidány na závěr.

Z odebraného přírodního vzorku byla izolována jedna buňka pro klonální kultivaci, postupným vyředěním médiem, pomocí upravených sterilizovaných pasteurových pipet zakončených úzkou kapilárou. Z kapky vzorku na podložním sklíčku byla vybrána jedna buňka, která byla opakovaně přečišťována postupným přemísťováním, pokaždé novou sterilní pipetou, do kapiček sterilního média. Izolovaná buňka pak byla přemístěna do 250 ml

erlenmeyerovy baňky, naplněné do 1/3 sterilizovaným médiem DY IV. Veškeré použité laboratorní sklo bylo předem sterilizováno v sušárně (Memmert) po dobu 90 minut za teploty dosahující 180 °C.

2.3 Experiment na teplotním gradientu a analýza růstové rychlosti

Když bylo množství biomasy z klonální populace dostatečné, mohlo se přejít k experimentu na zkříženém gradientovém přístroji (RT 04 Labio). Pro každý pokus bylo použito 5 kultivačních destiček po 2x3 růstových komůrkách, do nichž bylo ob jednu umístěno cca. 30 buněk. Tím bylo získáno osm teplotních úrovní, přičemž pro každý teplotní stupeň byly kultivovány dvě nezávislé populace. Růstové komůrky s buňkami byly naplněny ze 2/3 připraveným médiem DY IV a prázdné komůrky destilovanou vodou (pro omezení výparu pod víčkem růstových komůrek). Posléze byly kultivační destičky umístěny na zkřížený gradientový přístroj s rozsahem hraničních teplot 9 °C – 30 °C. Osvětlení bylo nastaveno na cyklus 17 hodin světla a 7 hodin tmy. Poté byla změřena teplota pro každé dvě komůrky a počítána růstová rychlost.

Růstová rychlost buněk byla počítána na základě přímého počítání buněk v komůrkách pozorováním pod stereolupou dvakrát týdně, po dobu jednoho měsíce v případě kultury z Mariánského rybníku. Kultura z Alp byla na teplotním gradientu ponechána o týden déle. U kultury z Mariánského rybníka byla doba kratší, jelikož u předposledního měření byla zjištěna kontaminace v jedné z teplotních úrovní. Buňky v kontaminovaných růstových komůrkách byly téhož dne nafixovány Lugolovým roztokem (Křisa & Prášil, 1994) a po dalším měření byl pokus na teplotním gradientu ukončen. Tato doba byla ovšem dostatečná na to, aby kultivovaná populace obsahovala pouze buňky vyvinuté za podmínek na teplotním gradientu. Počet buněk byl pro každou kultivační komůrku zaznamenán zvlášť do tabulky, spolu s příslušným teplotním stupněm. Pro grafické znázornění byla růstová rychlost vypočítána podle vzorečku specifické růstové rychlosti (μ):
$$\mu = \frac{\ln(x) - \ln(x_0)}{\Delta t}$$
 (kde x je počet buněk pro 5. měření kultury z Mariánského rybníku a 4. měření kultury z Alp; x_0 je počet buněk pro 6. měření kultury z Mariánského rybníku a 5. měření kultury z Alp; Δt je doba uplynulá mezi pozorováními; Karálek, 2000). Specifická růstová rychlost byla vizualizována v programu PAST 2.17 (Hammer a kol., 2001). Po ukončení pokusu na teplotním gradientu byly buňky v růstových komůrkách nafixovány Lugolovým roztokem (Křisa & Prášil, 1994) a připraveny pro fotografování.

2.4 Digitalizace landmarků

Z každé teplotní úrovně bylo náhodně vybráno 50 dospělých buněk ze směsi obou populací rostoucích v rámci stejného teplotního stupně. V případě vzorku z Mariánského rybníku, byly tři nejnižší teplotní stupně z dalšího mikroskopického zpracování zcela vyloučeny, jelikož neobsahovaly dostatečný počet buněk pro náhodný výběr padesáti nepoškozených a plně vyvinutých buněk, jež vyrostly v komůrce v příslušné teplotní úrovni. Buňky s teratogenní malformací byly z výběru vyloučeny. Digitální fotografie buněk byly pořízeny při 200x zvětšení na světelném mikroskopu Bresser BioScience Trino s digitálním fotoaparátem. Pro morfometrickou analýzu byl kontrast fotografií buněk upraven v programu Gimp 2.8.2. (Kimball a kol., 2012).

V této práci byla zvolena GM analýza tvaru buněk pomocí landmarků. V programu TpsDig 2.15 (Rohlf, 2015) bylo na snímek, zobrazující buňku z frontálního pohledu, umístěno 208 homologních landmarků (Obr. 6a). K vyhodnocení chyby měření na výsledky analýz byly všechny landmarky digitalizovány dvakrát. Při první digitalizaci byly landmarky zaznamenány ve směru hodinových ručiček od levého okraje buněčného isthmu. Druhá digitalizace pak byla zaznamenána proti směru hodinových ručiček od stejného počátečního bodu a označení landmarků bylo přepsáno tak, aby odpovídalo značení v první digitalizaci (Neustupa, 2017).

2.5 Analýza tvaru a velikosti buněk

Nejprve byla provedena konfigurace landmarků zobecněnou Prokrustovskou superimpozicí (GPA), a to k odstranění "netvarové složky" tvarové variability (Zelditch a kol., 2004). Tato široce používaná metoda GM standardizuje velikost objektu a optimalizuje pozici, rotaci a velikost tak, aby vzdálenost mezi odpovídajícími si landmarky byla minimalizovaná a reprezentovala pouze tvarové rozdíly (Zelditch a kol., 2004). Konfigurace landmarků byly podstoupeny čtyřem symetrickým transformacím, transformaci identity, reflexe přes vertikální a horizontální osu a reflexi napříč oběma osami. Současně byly příslušné landmarky jednotlivých reflexí přejmenovány, aby bylo zachováno jejich konzistentní pořadí. Vzhledem k tomu, že jsou polobuňky *Micrasterias* vzájemně symetrické a z přední a zadní strany se neliší, mohly být buňky před analýzou symetrizovány podle standardního vzorce Klingenberg a kol., (2002). To zahrnuje reflexi buněk, vynásobením x-ových souřadnic pro všechny landmarky (-1). Dále pak opětovné označení párových landmarků v reflexní kopii konfigurací orientačních bodů a zprůměrování původních a zrcadlových konfigurací v GPA. Průměry původních a zrcadlově překlopených buněk reprezentují ideální symetrické tvary,

přičemž každá polovina spolu s orientačními body, ležícími na střední ose, nese všechny informace o tvaru symetrického objektu, zprůměrované z jeho polovin. Asymetrická složka tak mohla být vynechána a další analýzy byly provedeny pomocí symetrických konfigurací (Klingenberg a kol., 2002).

2.5.1 Analýza morfologické variability

GPA byla následována analýzou hlavních komponent (PCA) Prokrustovských souřadnic, v balíčku pro GM analýzu 1.1-11 (Dryden, 2016) v programu R 3.2.3 (R Development Core Team, 2016). PCA umožňuje transformaci dat morfologické variability znaků, do vzájemně nekorelovaných lineárních proměnných – hlavních komponent (PC), udávajících rozptyl. První PC osy vysvětlují největší procento variability, u dalších PC os podíl vysvětlené variability postupně klesá. Tím je možné zredukovat dimenzi dat s minimální ztrátou původních informací, což napomáhá odhalit skrytou variabilitu (Zelditch a kol., 2004). Každá buňka je reprezentována čtyřmi konfiguracemi, které se liší vzájemnou polohou jednotlivých kvadrantů. Podle vzoru objektové symetrie a asymetrie, jenž jednotlivé PC osy popisují, je lze rozdělit do čtyř následujících kategorií, jedné symetrické a tří asymetrických. Úplně symetrická variabilita se všemi čtyřmi kvadranty identického tvaru, dále asymetrická variabilita napříč osou istmus, která rozlišuje mezi tvarovými znaky obou polobuněk. Variabilita vertikální osy rozlišuje kvadranty polobuněk, přičemž zachovává shodnost tvarových znaků sousedních kvadrantů napříč osou isthmus. Vlivem asymetrické variability napříč oběma osami jsou transverzálně umístěné kvadranty identické. PC skóre jednotlivých buněk, byly použity pro jejich formální srovnání. Vzory variace podél dvou nejvýznamějších os byly znázorněny pomocí metody "thin-plate spline" v programu TpsRelw. 1.49 (Rohlf, 2015). Tvarová podobnost jednotlivých objektů příslušné teplotní skupiny, byla ilustrována v ordinačním diagramu.

2.5.2 Hodnocení velikosti buněk a hlavní trendy morfologické variability

Tvary marginálních konfigurací u jednotlivých hlavních komponent, byly vizualizovány pomocí metody "thin-plate spline" z celkové konsenzuální konfigurace a vztaheny k údajům o teplotě. Centroidová velikost (CS) jednotlivých buněk příslušných teplotních úrovní, byla změřena v programu TpsRelw. 1.49 (Rohlf, 2015). CS je nejběžnějším měřítkem velikosti v GM a je definována jako odmocnina sumy druhých mocnin vzdáleností od landmarků k jejich centroidu (Bookstein, 1991; Zelditch a kol., 2004).

2.6 Analýza morfologické integrace

K vyhodnocení stupně integrace mezi polárním lalokem a oběma laterálními laloky byla použita dvojbloková analýza dílčích nejmenších čtverců (PLS). V GM je tato metoda známá také jako analýza singulárních warpů (Bookstein a kol., 2003). Popisuje kovarianci mezi dvěma morfometrickými datovými sadami extrahováním tzv. singulárních os, popisujících jejich vzájemné vzory kovariance ve tvaru (Zelditch a kol., 2012). Singulární warpy (SW) jsou tedy osy, vycházející ze singulární hodnoty rozkladu matice kovariance mezi dvěma morfometrickými datovými soubory. Analogicky k PCA, první singulární warp (SW1) popisuje nejvyšší podíl kovariance mezi oběma strukturami. Následné singulární warpy pak postupně pokrývají zbývající části kovariance. Jinými slovy, SW1 popisuje variaci v první množině dat, která maximálně vysvětluje odchylku druhého souboru dat (Kane & Higham, 2015). Spojení mezi oběma osami SW1 lze posoudit lineární korelační analýzou, čímž se dosáhne PLS korelačních hodnot (Bookstein a kol., 2003). Pozorovaná PLS korelace může být porovnána s distribucí korelačních hodnot získaných náhodnou permutací objektů v jednom souboru dat ve vztahu k druhému. Signifikance PLS korelace znamená, že korelační koeficient mezi původními singulárními osami byl vyšší než 95% percentil distribuce získané permutačním postupem (Klingenberg, 2009).

Analýza zahrnovala 10 buněčných konfigurací landmarků, reprezentujících spodní a horní laterální laloky (označené indexem 1 a 2; Obr. 6b) a oba polární laloky. Konfigurace landmarků sestávaly z patnácti landmarků u každého spodního laloku, jednatřiceti landmarků u horních laloků a sedmi landmarků u polárních laloků. Vzhledem k tomu, že identitu jednotlivých kvadrantů nelze u buněk rodu *Micrasterias* (ani u ostatních krásivek) jednoznačně určit, hodnoty PLS korelace, mezi vzájemně si odpovídajícími páry, byly zprůměrovány. Například to znamená, že PLS korelace mezi spodním laterálním lalokem a horním laterálním lalokem stejného kvadrantu byla zprůměrována ze čtyř hodnot získaných ze čtyř samostatných cyklů analýzy singulárních warpů $A1 \times A2$, $B1 \times B2$, $C1 \times C2$, $D1 \times D2$ (Obr. 6b). Tento postup byl pro každou teplotní skupinu opakován zvlášť.

Analýzy morfologické integrace byly implementovány pomocí funkce *integration.test* v balíčku GM analýzu 1.1-11 (Dryden, 2016) v programu R 3.2.3 (R Development Core Team, 2016). Výsledky integrace a p-hodnoty všech dvojic byly zaznamenány do tabulky pro každou teplotní úroveň a graficky znázorněny v programu PAST 2.17 (Obr. 7; Hammer a kol., 2001).

2.6.1 Vztah integrace k teplotě a růstové rychlosti

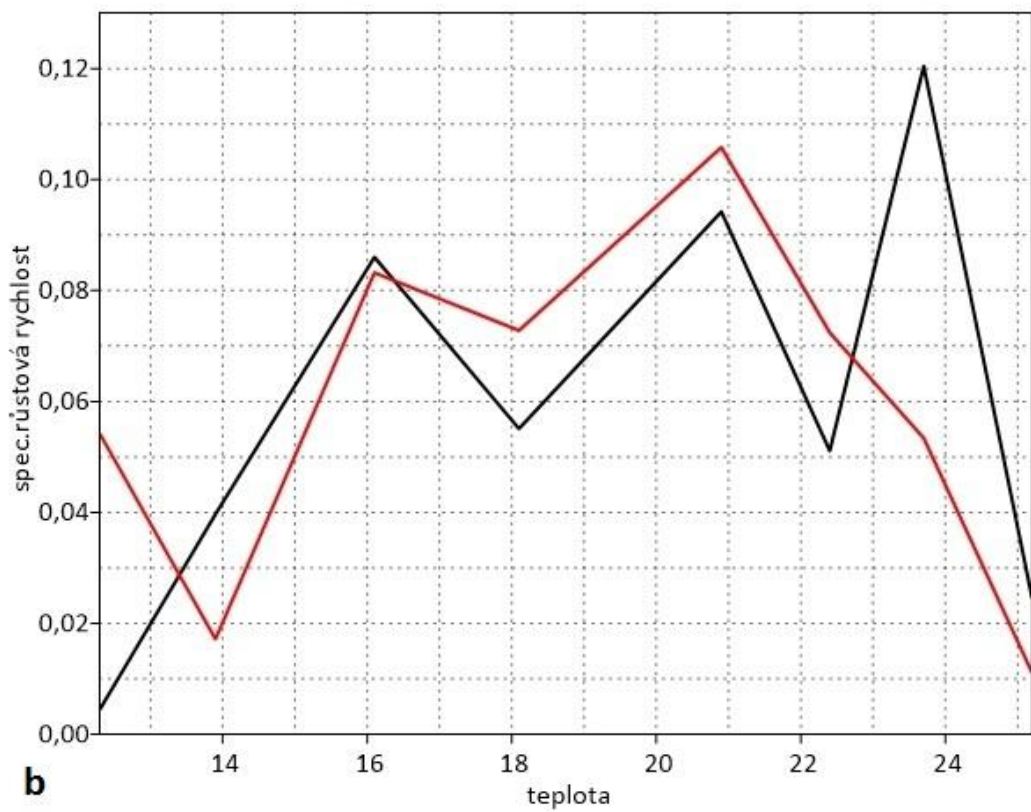
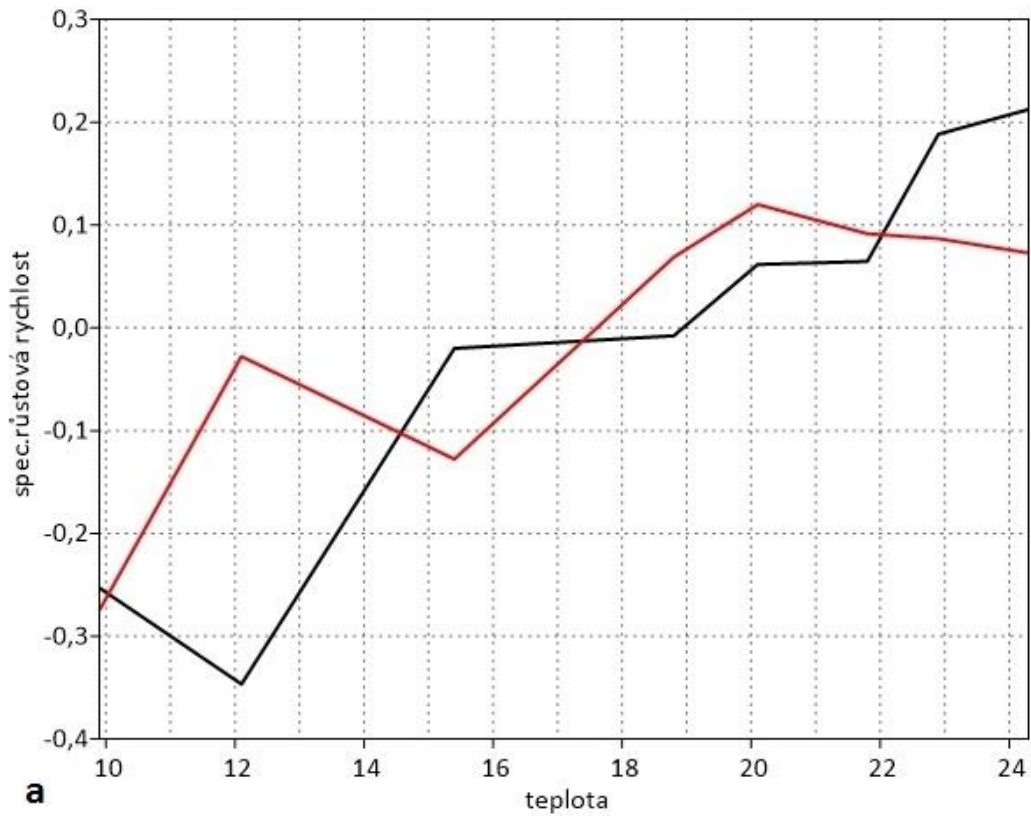
Pro vyhodnocení integrace mezi hypotetickými moduly a teplotou, byly vybrány ze všech teplotních úrovní pro každou dvojici laloků hodnoty integrace a zjišťován nenáhodný lineární trend mezi těmito veličinami (Obr. 8; 9). Vztah integrace a teploty byl vyhodnocen pomocí lineární korelační analýzy a vybrané signifikantní korelace byly graficky vizualizovány v programu PAST 2.17 (Hammer a kol., 2001). Stejný postup byl uplatněn pro vyhodnocení vztahu mezi hodnotami integrace a specifické růstové rychlosti, jejíž hodnoty pro každý teplotní stupeň byly zprůměrovány.

3 Výsledky

3.1 Růst kmenů na gradientu teploty

Růstová rychlost na zkříženém teplotním gradientu byla pro každou kulturu měřena v osmi teplotních úrovních. Pro grafické znázornění růstové rychlosti v jednotlivých teplotních stupních byla vypočítána specifická růstová rychlost. (Obr. 3). Přesné hodnoty specifické růstové rychlosti jsou přiloženy v tabulce v příloze, spolu s tabulkou zaznamenaných hodnot přímého počítání buněk a teploty. Na teplotním gradientu rostly nejrychleji buňky u klonální populace z Mariánského rybníku při teplotě okolo 20 °C. Obdobně rostla i klonální populace z Alp, avšak růstová rychlost byla pomalejší. Gradient teplot, jehož rozmezí postihují krajní hodnoty grafu specifické růstové rychlosti, byl pro kmen z Mariánského rybníku 9,9 – 24,3 °C (Obr. 3a). Růstová rychlost v teplotách pod 15,4 °C byla záporná, buněčné populace v nízkých teplotách postupně odumíraly. Růstová stáze byla dosažena v jedné z populací teplotní úrovně 15,4 °C, ovšem druhá populace při stejné teplotě nerostla. Nejvyšší růstové rychlosti bylo dosaženo při 24,3 °C.

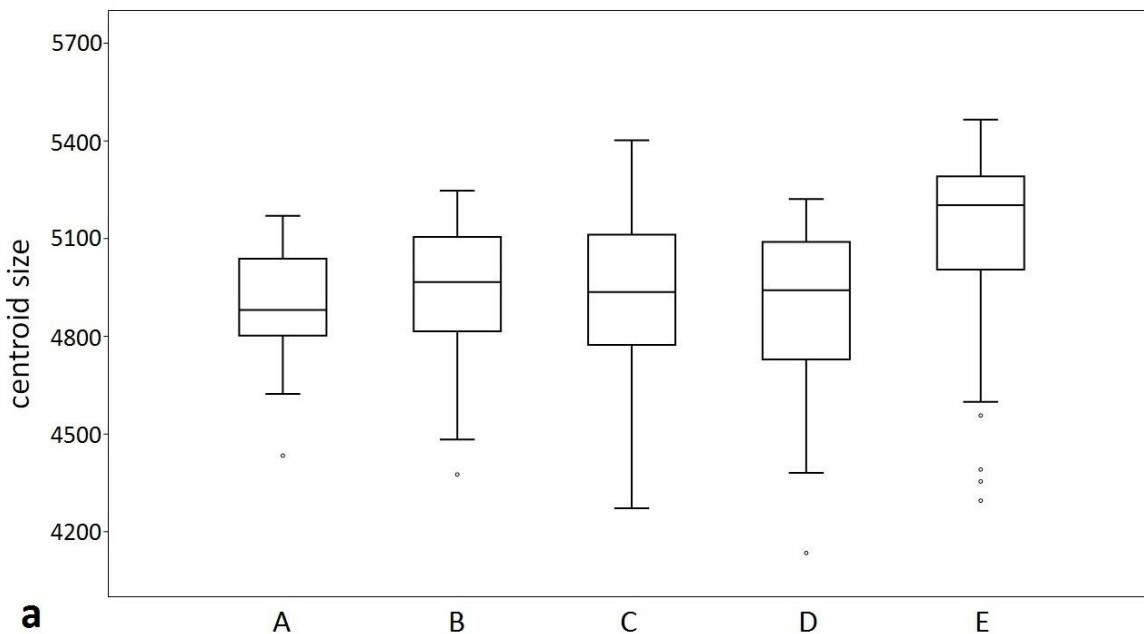
Krajní hodnoty grafu specifické růstové rychlosti pro kmen z Alp jsou 12,3 a 25,3 °C (Obr. 3b). V tomto teplotním gradientu byla růstová rychlost kladná, ovšem v jedné z populací nejnižšího teplotního stupně byla růstová rychlost blízká nule. Nejrychleji rostly buněčné populace při teplotě 20,9 °C, v nejteplejší úrovni pak rychlost růstu prudce klesla.

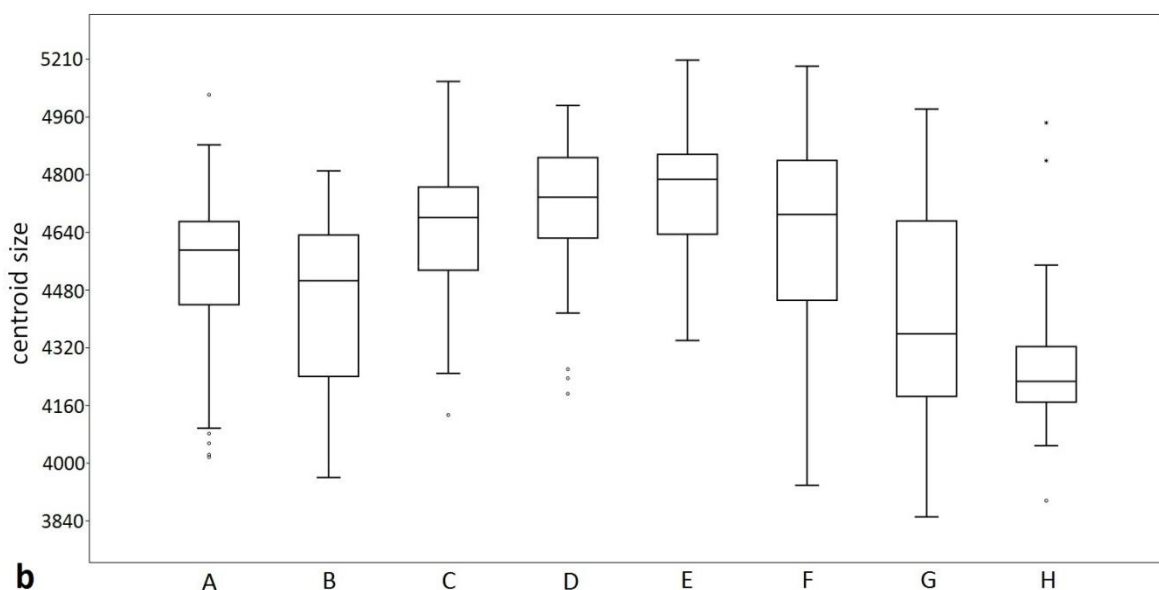


Obr. 3: Graf růstové rychlosti izolovaných kmenů, (x) teplota (°C), (y) specifická růstová rychlost. **a** Kmen z Mariánského rybníku (ČR), **b** kmen z Alp (Rakousko).

3.2 Vliv teploty na velikost buněk

Na základě konfigurace landmarků byla stanovena CS vybraných buněk pro analýzu morfologické integrace. Grafická komparace velikosti buněk jednotlivých teplotních úrovní, byla vizualizována v programu PAST 2.17 (Hammer a kol., 2001). Jednotlivé teplotní stupně jsou zastoupeny indexy A – E (23,3 – 18,8 °C) v případě kmene z Mariánského rybníka (Obr. 4a) a indexy A – H (25,2 – 12,3 °C) u kmene z Alp (Obr. 4b). Velikost buněk se s teplotou příliš neměnila, ovšem u nejnižších teplotních stupňů u kmene z Alp byla CS buněk zřetelně menší (Obr. 4). Změny velikostí byly u obou kmenů signifikantní s permutační p-hodnotou 0,0023 u kultury z Mariánského rybníka a p-hodnotou 0,0001 u kultury z Alp. Mezi oběma izoláty je patrný rozdíl v dynamice velikosti buněk, ale to může být dáno delším gradientem u kmene z Alp. Také CS buněk kultury z Mariánského rybníka je v porovnání s kmenem z Alp větší. U kmene z Mariánského rybníka měly největší velikost buňky v 18,8 °C, teploty 15,4 °C a nižší, vedly k inhibici růstu, a proto nemohly být zaznamenány.



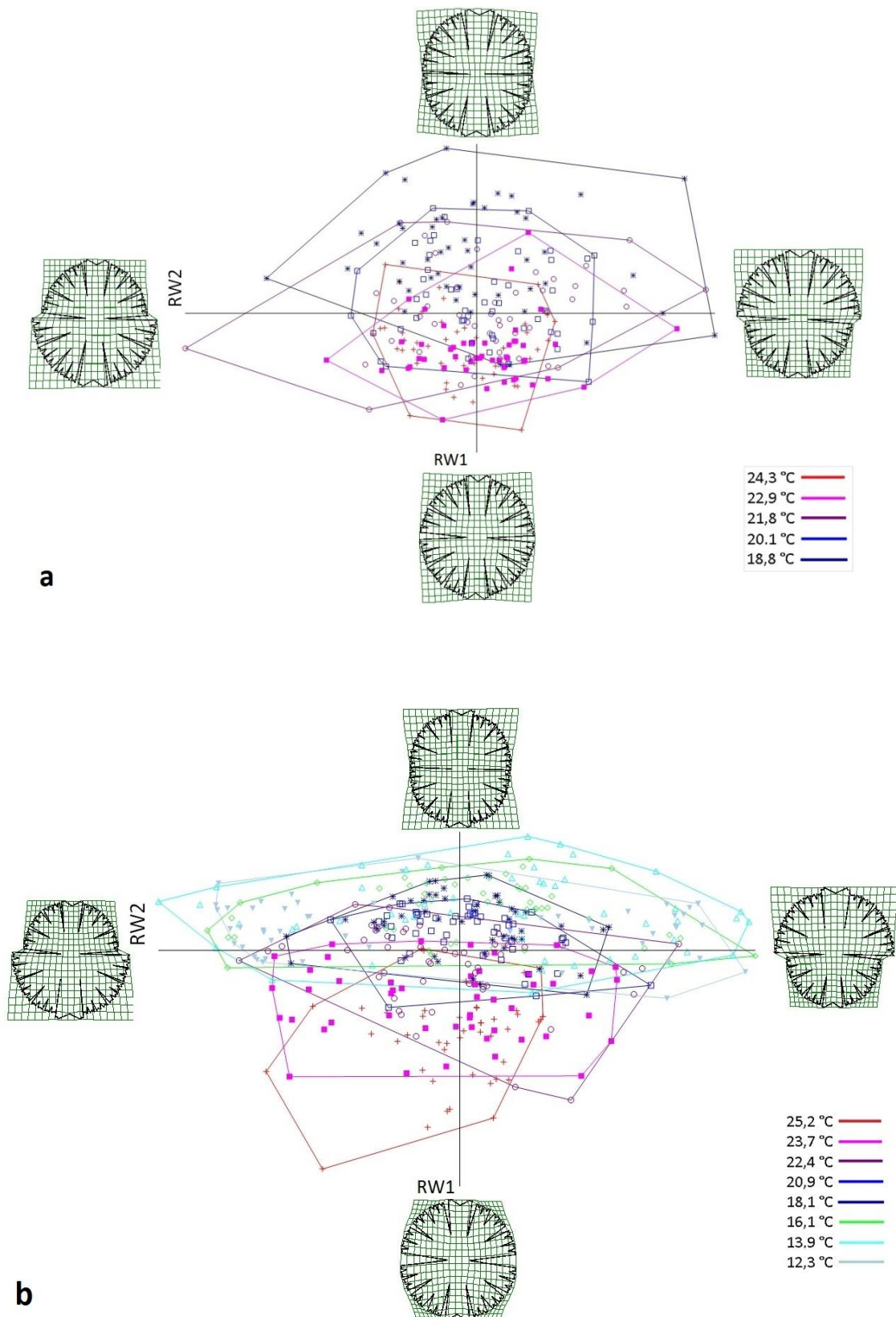


Obr. 4.: Velikost buněk. **a** Kultura z Mariánského rybníku ($r: 0,19552$; $r^2: 0,038113$; $p: 0,0023$), **b** kultura ze štýrských Alp ($r: 0,21388$; $r^2: 0,045745$; $p: 0,0001$). Jednotlivé teplotní úrovně jsou zastoupeny indexy A – H (**a**: A- 24,3 °C; B- 22,9 °C; C- 21,8 °C; D- 20,1 °C; E- 18,8 °C; **b**: A- 25,2 °C; B- 23,7 °C; C- 22,4 °C; D- 20,9 °C; E- 18,1 °C; F- 16,1 °C G- 13,9 °C; H- 12,3 °C).

3.3 Vliv teploty na morfologickou variabilitu

K znázornění tvarových změn byla využita metoda "thin-plate spline", jež je založena na projekci souřadnicové sítě referenčních bodů na deformační mřížku. Projekcí objektu na tzv. hlavní warpy získané rozložením matice deformační energie, dostáváme parciální warpy. Matice skóre parciálních warpů jsou vstupními daty pro PCA (za předpokladu, že faktor $\alpha = 0$). Z PCA byl vizualizován ordinační diagram, jehož první dvě osy popisují hlavní odchylky morfologické variability. Ilustrace marginální konfigurace hlavních komponent byla vztažena k údajům o teplotě, znázorněných ordinačním diagramem.

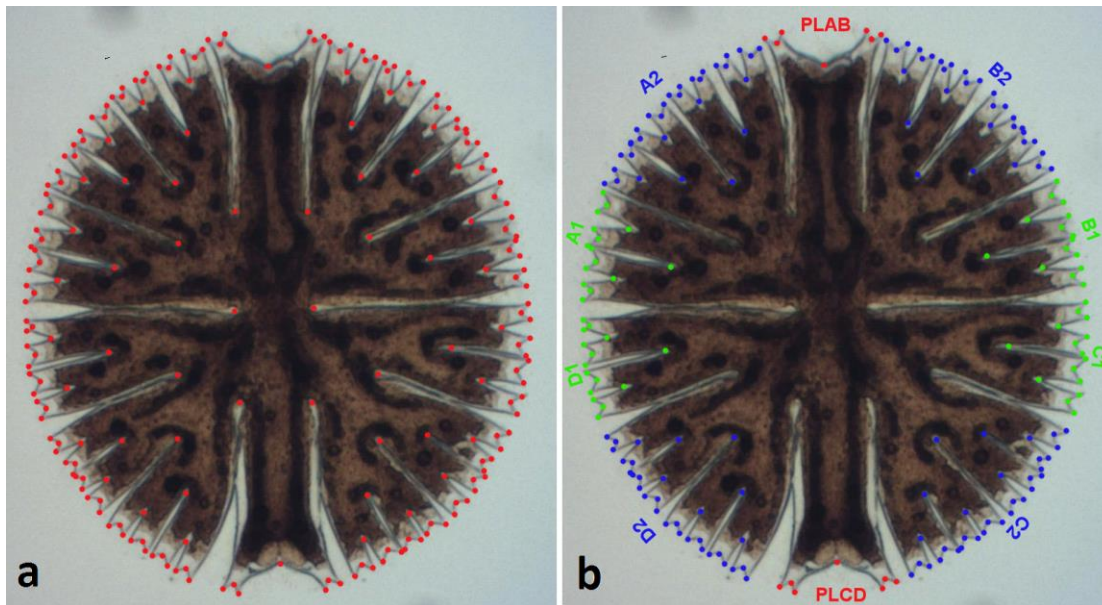
Tvaroprostorová analýza obou populací kultivovaných na teplotním gradientu ukázala sdílenou strukturu morfologické reakce na teplotní změny (Obr. 5). V obou případech je teplotní gradient postižen druhou hlavní komponentou z PCA landmarkových dat, ta u kmene z Mariánského rybníka popisuje 19,4% z celkové variability a u kmene z Alp 12,7%. Naopak první osa v obou případech reflektovala odlišnou velikost polobuněk a popisovala 28,7% variability u kultury z Mariánského rybníka a 51,1% u kultury z Alp.



Obr. 5.: Rozlišení různých tvarů podle teplotní úrovně. Ordinační diagram tvaru buněk podle teplotní skupiny. Tvary marginálních konfigurací, rekonstruovaných podle regresního modelu na základě údajů o tvaru buněk a teplotě. **a** Mariánský rybník (ČR). **b** Alpy (Rakousko).

3.4 Morfologická integrace - konfigurace landmarků

Pro analýzu GM byly koncové výběžky terminálních laloků a zářezy mezi nimi označeny celkem 208 landmarky a to ve směru (CW) i protisměru (CCW) hodinových ručiček, tím byly získány dva vstupní datové soubory pro PLS analýzu. Pro analýzu morfologické integrace byla buňka rozdělena na tři hypotetické moduly představující polární lalok a laterální laloky každé polobuňky (Obr. 6).

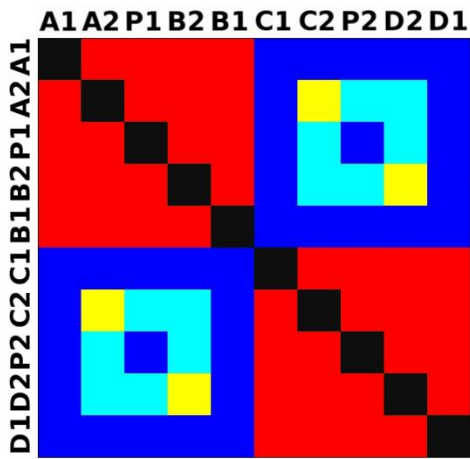
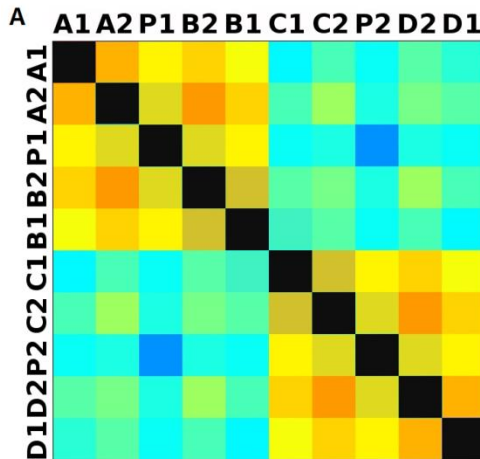
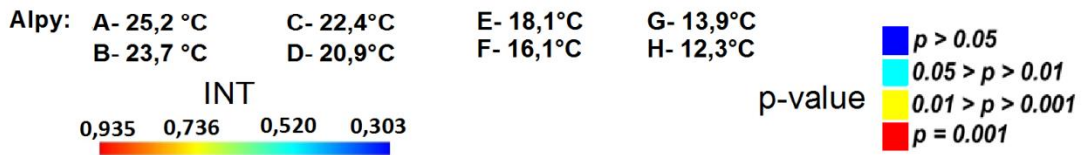
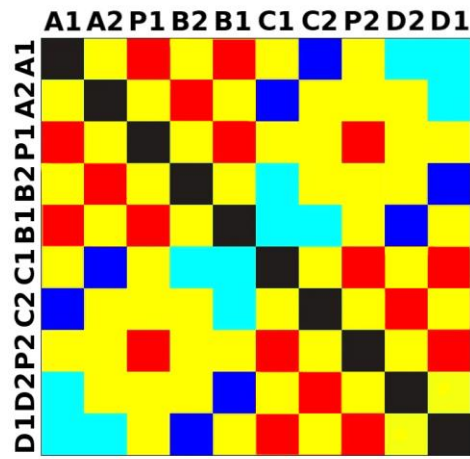
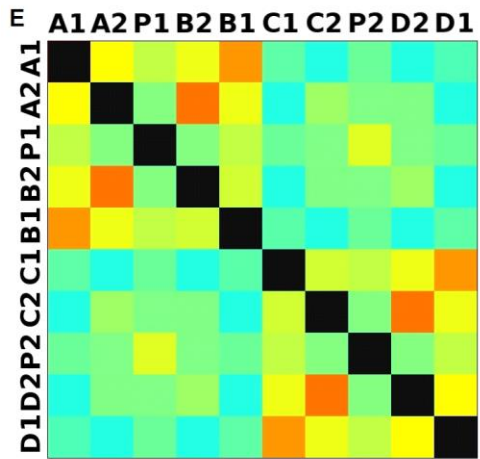
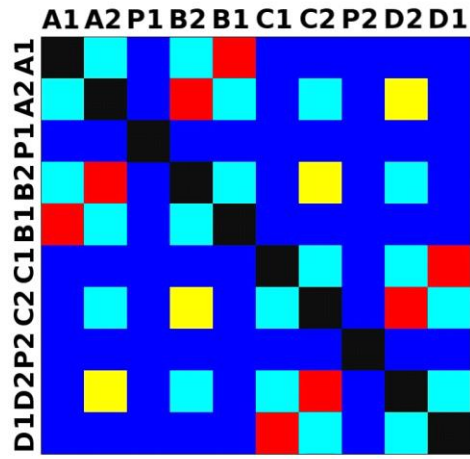
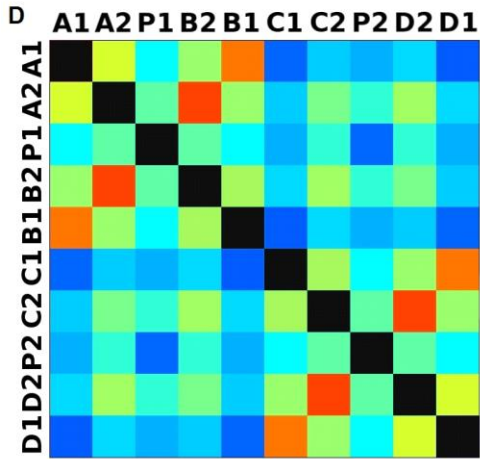


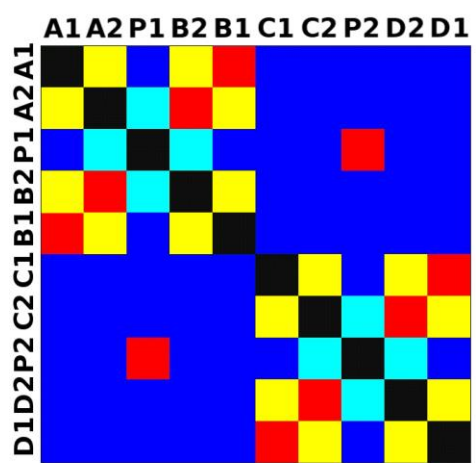
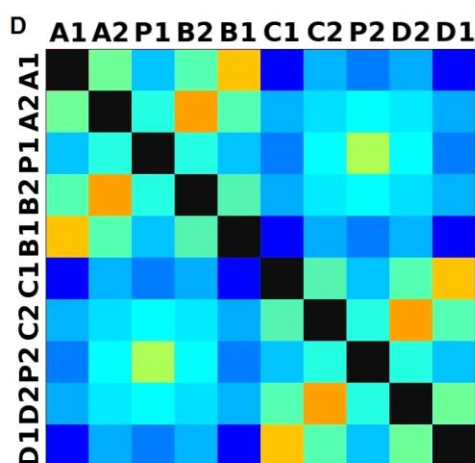
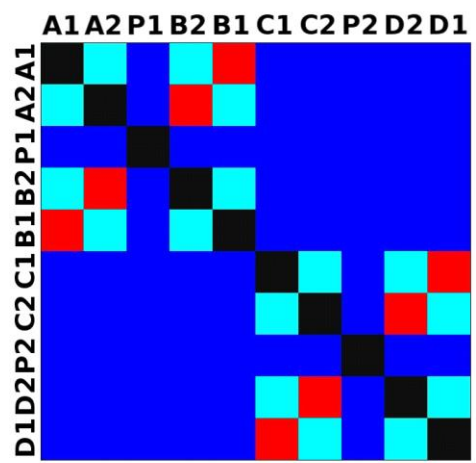
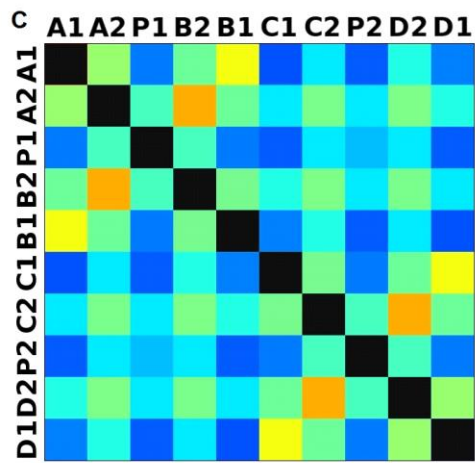
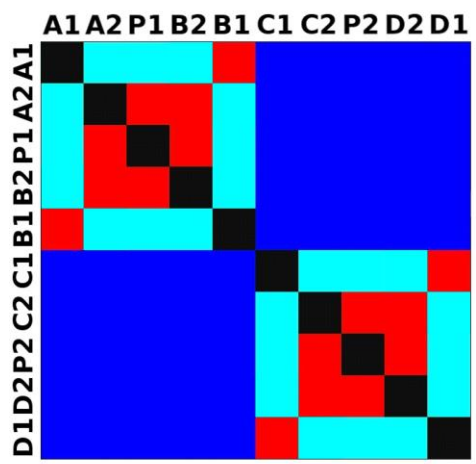
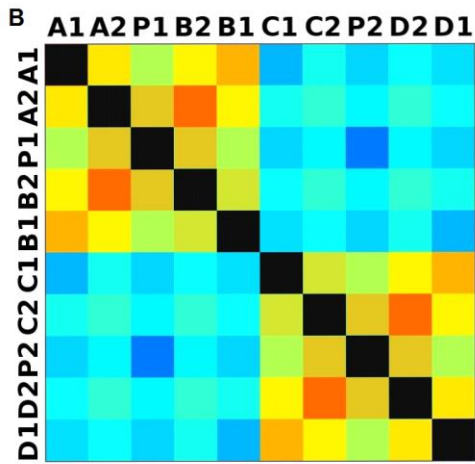
Obr. 6.: **a** Pozice 208 landmarků na buňce *Micrasterias rotata*. **b** Umístění landmarků na terminálním zakončení podlaloků znázorněné jako jednotky pro srovnávací analýzu a morfologickou integraci.

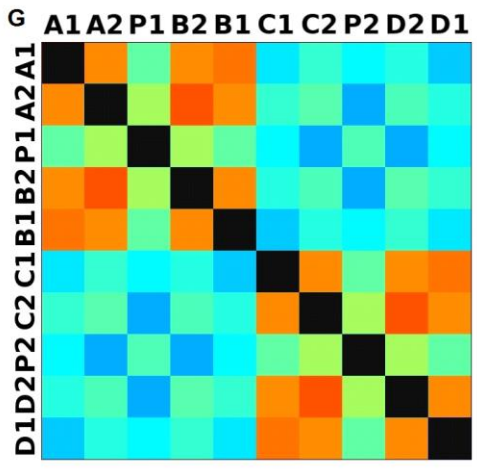
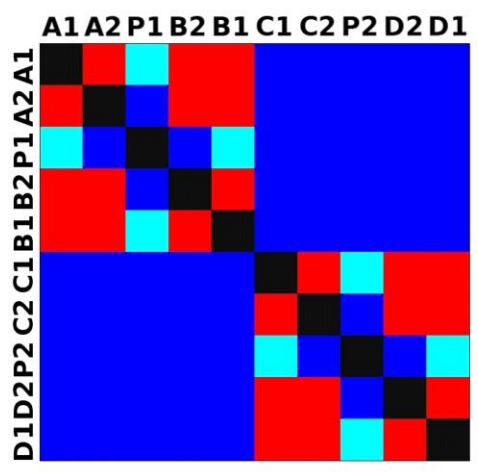
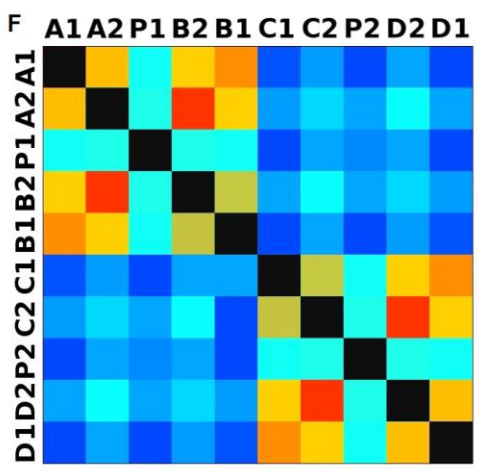
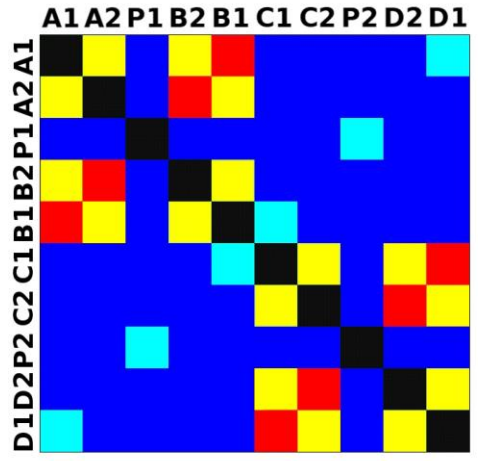
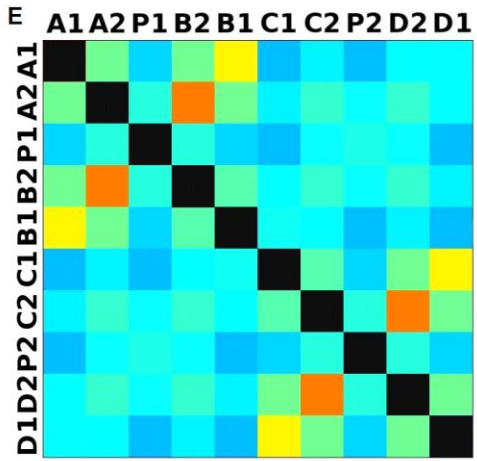
3.4.1 Morfologická integrace buněčných laloků

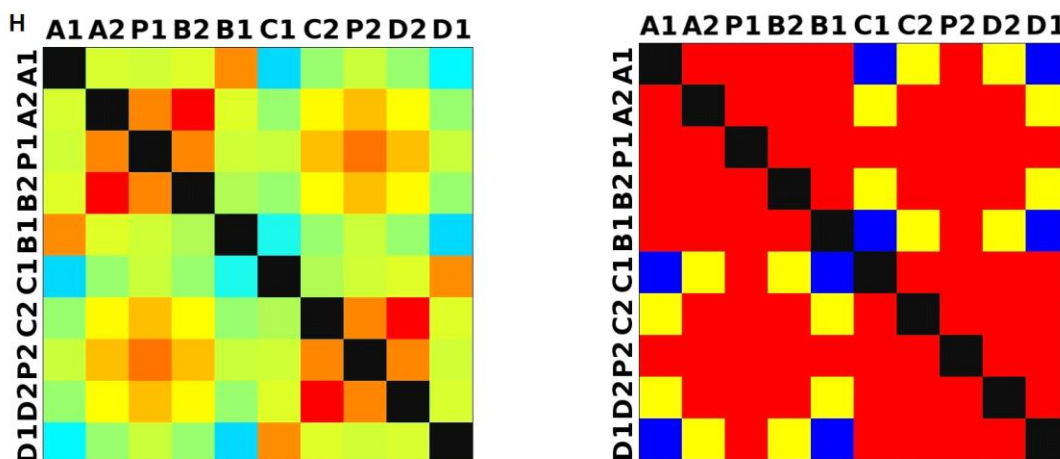
PLS analýza pro každou teplotní úroveň u obou kmenů zahrnovala 10 buněčných konfigurací landmarků reprezentujících jednotlivé laloky (A1 – D1). Laterální laloky jsou zastoupeny indexy A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1, D2 a polární laloky indexy P1 a P2 (Obr. 7). Protože u biradiálně symetrických buněk rodu *Micrasterias* nelze rozlišit pravou a levou, horní a spodní část, byly z frontálního pohledu hodnoty každého páru zprůměrovány, tedy například hodnota vztahu A1 – B1 je ekvivalentní k C1 – D1. Hodnoty signifikance znázorňuje schéma p-hodnot. Pro lepší přehlednost jsou p-hodnoty zastoupeny čtyřmi intervaly, přesné hodnoty pro každou analýzu jsou uvedeny v tabulce přílohy.

Hodnoty korelace u kultury z Mariánského rybníku vykazují obdobný vzor, jako je tomu u kultury z Alp, tedy signifikantní korelaci protilehlých laterálních laloků ze stejné polobuňky (Obr. 7).









Obr. 7.: Vyhodnocení morfologické integrace, výsledky PLS analýz mezi polárními a laterálními laloky buněk. INT - Hodnoty korelace mezi první dvojicí singulárních warpů každé PLS analýzy. P-hodnoty vyplývající z permutačních testů PLS korelací.

U kultury z Mariánského rybníku byly v nejteplejší úrovni A (24,3 °C) nejsilněji signifikantní hodnoty integrace protilehlých laloků v rámci jedné polobuňky (A1 – B1, A2 – B2). Nižší signifikance a slabá korelace je mezi polárními laloky protilehlých polobuněk (P1 – P2). Slabě signifikantní hodnoty korelace jsou také mezi sousedními laloky v rámci jedné polobuňky (A1 – A2). Ostatní vztahy nejsou signifikantně korelované.

V teplotní úrovni B (22,9 °C) je signifikantní a silná korelace mezi protilehlými laloky (A2 – B2) a sousedními laloky (A1 – A2) jedné polobuňky. Slabě signifikantní je vztah polárního laloku s laloky s ním sousedícími (P1 – A2) a protilehlými laloky (A1 – B2) v rámci polobuňky. Korelace mezi polárními laloky je nesignifikantní, stejně jako ostatní vztahy mezi protilehlými polobuňkami.

U populace buněk rostoucí v teplotní úrovni C (21,8 °C) jsou nejsilněji signifikantně korelovány protilehlé polární laloky (A2 – B2). Slabší korelace je mezi sousedními laloky (A1 – A2) a protilehlými laloky (A1 – B2). Mezi protilehlými laloky (A1 – B1) je také signifikantní, ale no něco slabší korelace. Vtahy mezi protilehlými polobuňkami jsou nesignifikantní.

V teplotní úrovni D (20,1 °C) jsou silně korelované a signifikantní vztahy mezi protilehlými laloky (A1 – B1, A2 – B2). Slabě signifikantní vztah je mezi laterálními laloky protilehlých polobuněk (A2 – D2). Velmi slabá korelace je mezi sousedními laloky (A1 – A2) a spodním a horním protilehlým lalokem (A1 – B2) stejné polobuňky. Ostatní vztahy nejsou signifikantní.

Při teplotě v úrovni E (18,8 °C) jsou nejvyšší hodnoty integrace mezi protilehlými laterálními laloky (A1 – B1, A2 – B2). Slabší avšak signifikantní korelace je mezi polárními laloky

protilehlých polobuněk (P1 – P2). O něco slabší, ale jednoznačně signifikantní korelace je mezi spodním laterálním lalokem a polárním lalokem (A1 – P1). Méně signifikantní hodnoty jsou mezi sousedními laterálními laloky v rámci polobuňky (A1 – A2). Nesignifikantní je pak vztah mezi laterálními laloky protilehlých polobuněk (A1 – C2).

U kultury z Alp lze v nejvyšší teplotní úrovni A (25,2 °C) pozorovat vysoce signifikantní hodnoty korelace v rámci polobuňky, naproti tomu vztahy mezi protilehlými polobuňkami jsou velmi slabě korelovány. Nejslabší vztah je mezi polárními laloky (P1 – P2).

Při teplotě v úrovni B (23,7 °C) je vyšší míra integrace v rámci polobuňky. Nejsilněji signifikantní korelace je mezi protilehlými laloky (A1 – B1, A2 – B2) a mezi polárním lalokem s jeho sousedními laloky (P1 – A2). Zvýšenou míru korelace pak vykazují sousední laloky (A1 – A2) a také polární lalok s laterálním lalokem (P1 – A1). Ostatní hodnoty korelace jsou velmi nízké.

V teplotní úrovni C (22,4 °C) jsou vyšší hodnoty integrace mezi protilehlými laloky (A1 – B1, A2 – B2). Ostatní vztahy mezi laloky vykazují nízkou korelaci s velmi slabou signifikancí. Vztahy s polárními laloky a v rámci protilehlých polobuněk nebyly signifikantní. Buňky rostoucí v teplotní úrovni D (20,9 °C) vykazují signifikantní korelaci mezi protilehlými laterálními laloky (A1 – B1, A2 – B2). Ostatní vztahy mezi laloky nejsou signifikantně korelovány, vyjma polárních laloků (P1 – P2), mezi nimiž je patrná zvýšená, ovšem signifikantní, hodnota integrace.

V 18,1 °C, teplotní úrovni E, je patrná zvýšená a signifikantní hodnota integrace mezi protilehlými laloky (A1 – B1, A2 – B2) jedné polobuňky. Slabě signifikantní vztah je mezi sousedními laloky (A1 – A2). Ostatní konfigurace nebyly signifikantně korelovány

Populace rostoucí v úrovni F, při teplotě 16,1 °C, vykazuje opět signifikantní korelaci protilehlých laloků (A1 – B1, A2 – B2) a také sousedních laterálních laloků (A1 – A2) v rámci polobuňky. Polární laloky ani vztahy mezi protilehlými polobuňkami nejsou signifikantně korelovány.

V teplotní úrovni G (13,9 °C) lze také pozorovat zvýšenou signifikantní integraci mezi protilehlými laloky (A1 – B1, A2 – B2) a sousedními laloky (A1 – A2) stejné polobuňky. Ovšem polární laloky integrovány nejsou. Také v rámci protilehlých polobuněk jsou hodnoty korelace velmi nízké a signifikantní jsou pouze vztahy mezi polárními laloky protilehlých polobuněk (P1 – P2).

U populace rostoucí v nejnižší teplotní úrovni (12,3 °C) označené indexem H jsou nejvyšší signifikantní hodnoty integrace mezi protilehlými laloky (A1 – B1, A2 – B2) a zároveň také mezi polárním lalokem se sousedními laterálními laloky (P1 – A2) téže polobuňky. Je zde

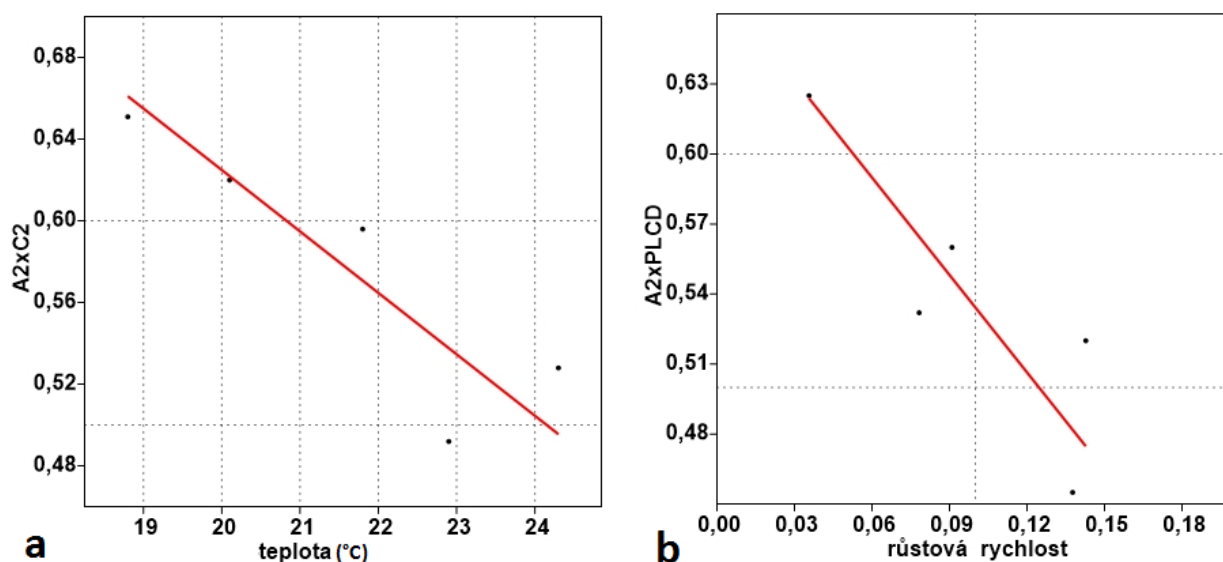
také patrná vyšší hodnota integrace mezi polárními laloky (P1 – P2). Naproti tomu velmi slabě jsou korelovány sousední laloky protilehlých polobuněk (A1 – D1). Slabší, ovšem signifikantní korelace je mezi horními laterální laloky protilehlých polobuněk (A2 – C2).

3.4.2 Závislost morfologické integrace na teplotě a rychlosti růstu

Z lineární korelační analýzy vyplývá, že je možné pozorovat nenáhodný lineární trend ve vztahu integrace a teploty a také integrace a rychlosti růstu.

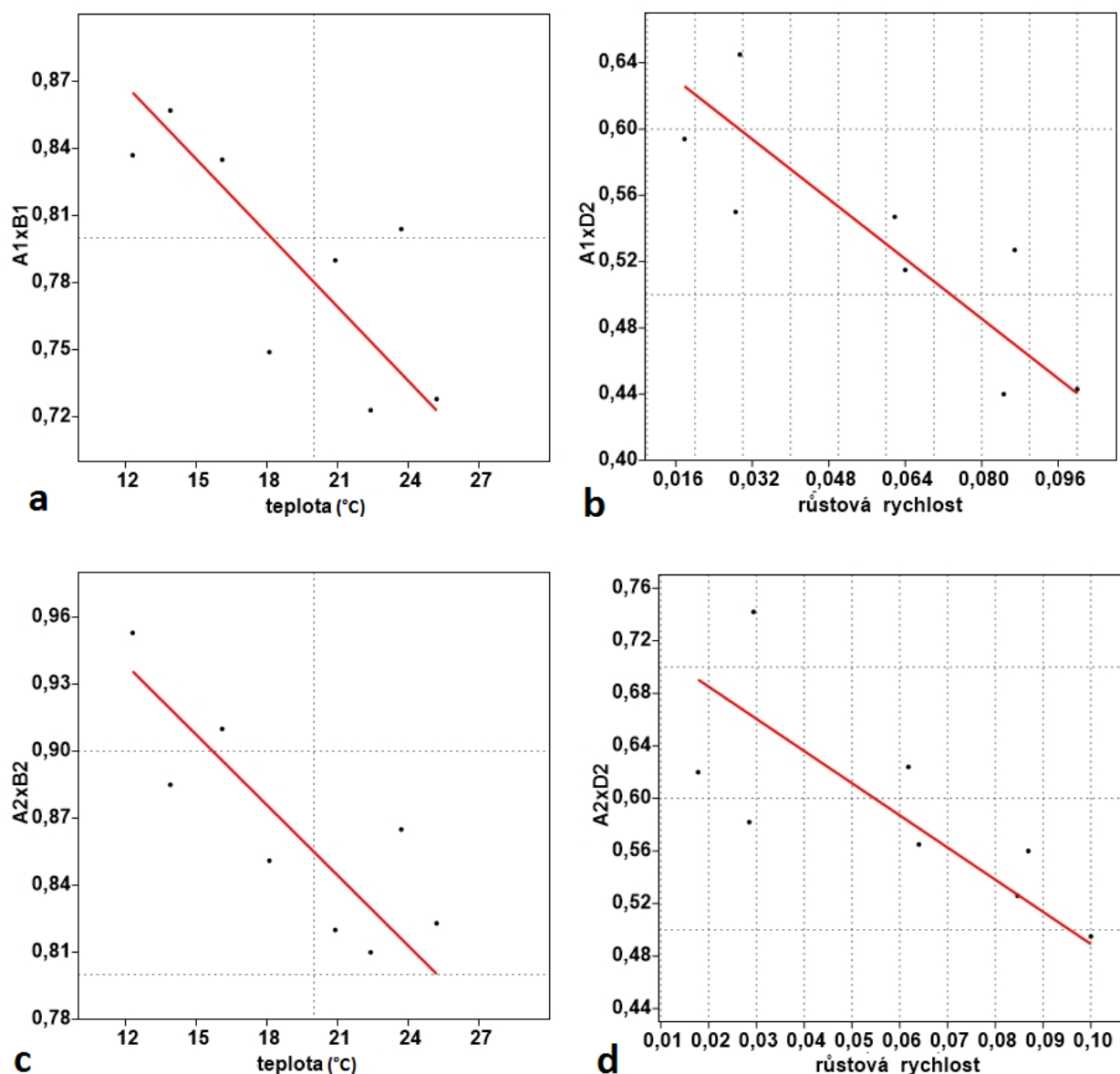
U kultury z Mariánského rybníku byl vztah v obou případech méně prokazatelný než u kultury z Alp (Obr. 8; 9).

U kultury z Mariánského rybníku byl slabě signifikantní vztah teploty a integrace horních laloků protilehlých polobuněk, s narůstající teplotou klesala míra integrace mezi dvojicí laloků (Obr. 8a). S rostoucí rychlostí růstu také klesala míra integrace mezi horním laterálním lalokem a polárním lalokem protilehlé polobuňky (Obr. 8b).



Obr. 8. Model lineární regrese. **a** Závislost integrace mezi horními laterálními laloky protilehlých polobuněk (A2 – C2) a teplotou (p: 0,0658). **b** Závislost integrace mezi horním laterálním lalokem a polárním lalokem protilehlé polobuňky (A2 – PLCD) a specifickou růstovou rychlostí (p: 0,0764).

U kultury z Alp byl signifikantní vztah integrace mezi laterálními laloky a teploty. Se zvyšující se teplotou, klesala míra integrace mezi protějšími laterálními laloky (Obr. 9a, c). S rostoucí rychlostí růstu, klesala míra integrace mezi spodním laterálním a horním laterálním lalokem protilehlé polobuňky a také integrace mezi horními laterálními laloky protilehlé polobuňky (Obr. 9b, d).



Obr. 9.: Model lineární regrese. **a, c** Závislost integrace mezi protilehlými laterálními laloky (A1 – B1, A2 – B2) a teplotou (p : 0,0384; p : 0,0145). **b, d** Závislost integrace mezi spodním laterálním lalokem a horním laterálním lalokem protilehlé polobuňky (A1 – D2) a specifickou růstovou rychlostí (p : 0,0079), závislost integrace mezi laterálními laloky protilehlých polobuněk (A2 – D2) a specifickou růstovou rychlostí (p : 0,03).

4 Diskuze

4.1 Optima a limity růstu krásivek

Některé mikroorganismy mají široké až ubikvitní rozšíření (Fenchel & Finlay, 2004). Nicméně výskyt mnoha endemických taxonů v mikroskopických skupinách, jako jsou obrněnky, rozsivky nebo krásivky, ukazuje nedostatečnost ubikvitní teorie (Coleman, 2001; Foissner, 2006). Krásivky jsou také známé svou preferencí specifických stanovišť a klimatických oblastí (Coesel, 1996). Klimatická charakteristika zdrojové lokality organismu

ovlivňuje teplotní optimum, to potvrzuje například recentní studie vybraných kmenů rodu *Cosmarium* izolovaných z altitudinálně i latitudinálně zcela odlišných lokalit. Populace izolované z chladnějších oblastí tolerují nižší teploty než populace z teplejších lokalit (Stamenković & Hanelt, 2011). Existují-li tedy v rámci kontinentálně relativně široce rozšířeného, fylogeneticky definovaného druhu teplotně korelované lokální adaptace, měly by být detekovatelné jako posuny v optimech a limitech růstu na teplotním gradientu (De Boer a kol., 2005; Stamenković & Hanelt, 2013). Ve studii posuzující limity geografické distribuce krásivek, byly testovány známé a široce rozšířené druhy krásivek (*Micrasterias fimbriata* a *Micrasterias rotata*) na jejich fylogenetickou a morfologickou homogenitu a geografické rozšíření (Neustupa a kol., 2011). Potvrdilo se, že *Micrasterias rotata* je fylogeneticky homogenní v celé Evropě, tudíž je vhodným modelovým druhem pro studium lokálních adaptací a fenotypové plasticity v kontextu odlišné teploty zdrojových lokalit (Neustupa a kol., 2011).

Prvním krokem v této diplomové práci byla analýza růstových rychlostí na gradientu teploty u klonálních kmenů izolovaných ze dvou evropských lokalit studovaného druhu *Micrasterias rotata* a vztah k jejich altitudinálně podmíněným teplotním klimatickým faktorům. Klonální populace buněk z Mariánského rybníku byla pěstována v teplotách od 9,9 °C do 24,3 °C. Suboptimální teplotou pro růst klonální populace z Mariánského rybníku bylo 15,4 °C, při nižších teplotách již populace nerostla, od 20,1 °C se pak růstová rychlost zvyšovala (Obr. 4a). Nejrychlejší růst byl zaznamenán v posledních dvou nejvyšších teplotních úrovních (22,9 °C a 23,4 °C). V případě kultury z Mariánského rybníka nebylo tedy dosaženo teplotního optima, kde by se rychlost růstu ustálila a s dalším zvyšováním teploty pak již začala klesat. Klonální populace z Alp rostly oproti kultuře z Mariánského rybníka pomaleji, ale nebylo dosaženo teplotního minima. Populace buněk z této kultury byly vystaveny teplotám od 12,3 °C do 25,3 °C. Růstová rychlost v nízkých teplotách byla vyšší než v případě buněčné populace kultury z Mariánského rybníka rostoucí ve stejném teplotním rozsahu. Nejrychleji ovšem rostly buňky v rozmezí teploty od 16,1 °C do 22,4 °C (Obr. 4b). V posledních dvou nejteplejších úrovních, tedy 23,7 °C – 25,3 °C již buňky rostly pomaleji. Tato pozorování naznačují, že teplotní optimum v případě vzorku z Alp, je blízké hodnotě 20,9 °C, teplotní optimum populace z nížinného mokřadu bude zřejmě ovšem vyšší než 24,3 °C. Vztáhneme-li tato pozorování k teplotním podmínkám odběrových lokalit, kde se průměrné letní teploty nížinné oblasti v České Republice pohybují kolem 17 °C a průměrné letní teploty v Alpách okolo 11 °C (Norwegian Meteorological Institute), růst buněk klonální populace z Alp i v nejnižších teplotních úrovních ukazuje na lokální adaptaci na nízké teploty.

Ovšem teplotní optimum bylo mnohem vyšší (20,9 °C), což svědčí o vnitrodruhové evoluční adaptaci. Adaptaci na teplejší klima indikuje dosažená sub-optimální teplota u populace z nížinného mokřadu v České Republice a také předpokládané optimum nad 24,3 °C.

U krásivek je adaptace na lokální podmínky zdrojových lokalit zřejmě typická, to potvrzují experimentální studie na šesti kmenech rodu *Cosmarium* (Stamenković & Hanelt, 2011). Nicméně u některých taxonů je možné pozorovat, že tato adaptace je sekundární, například u arktického taxonu *Cosmarium crenatum* var. *boldtianum*. Optimální růstová teplota tohoto taxonu byla 21 °C, což je zřetelně vyšší než u většiny arktických mikrořas, u nichž je optimum v rozmezí cca 6 - 8 °C (Fiala & Oriol, 1990; Stamenković & Hanelt, 2013). Výrazně vyšší teplotní optimum 38 °C bylo zaznamenáno pro *Cosmarium* izolované z tropického regionu a pro druhy z temperátního regionu v rozmezí 25 – 30 °C (Stamenković & Hanelt 2013). Krásivky z temperátních oblastí mají také typicky vyšší teplotní optima, než jiné fytoplanktonní řasy z téže lokality (Coesel & Wardenaar, 1990; Bouterfas a kol., 2002). Tato zjištění podporují teorii, že se krásivky rozšířily původně z tropů (Coesel, 1996).

4.2 Teplotně podmíněná velikost mikrořas

Fenotypová plasticita umožňuje krásivkám optimalizaci relativního povrchu v závislosti na teplotě. Krásivky s malými buňkami vykazují širší potenciál pro aklimatizaci jak na relativně nízké, tak na vysoké teploty, oproti taxonům se střední velikostí buněk (Stamenković & Hanelt, 2013). Malé mikroorganismy mají zároveň tendenci mít širší distribuci než větší mikroorganismy (Fenchel & Finlay, 2004). V teplotním optimu jsou buňky mikrořas zpravidla menší, v nízkých teplotách se buňky s rostoucí teplotou zvětšují, změna velikosti buněk při vysokých teplotách je druhově specifická (Atkinson a kol., 2003). Snížení velikosti v závislosti na teplotě může být také důsledkem adaptivní plasticity spojené se zrychlením populačního růstu ve vyšších teplotách, v teplotním rozmezí, v němž se organismus běžně vyskytuje. Tato hypotéza předpokládá v rychle rostoucích populacích selekci na malou velikost dospělých buněk, v důsledku facilitace rychlejšího dokončení buněčného cyklu a dřívější reprodukce. V rychleji rostoucích populacích je tak velikost buněk menší (Atkinson 1994, Atkinson a kol., 2003). Nicméně v mojí práci se vztah velikosti a teploty příliš nepotvrdil. Naopak, v případě kultury z Alp byly nejmenší buňky v nejnižší teplotní úrovni spojené s nízkou růstovou rychlostí (Obr. 4.).

Tzv. Atkinsonovo pravidlo (Atkinson a kol., 2003) bylo ovšem potvrzeno ve studii fenotypové plasticity v reakci na teplotní stres u krásivek rodu *Micrasterias* (Neustupa a kol., 2008). Velikost buněk *Micrasterias rotata* kultivovaných při různých teplotách, se s rostoucí

teplotou od 15 °C do 30 °C konzistentně snižovala. Velikost buněk se zvyšuje při velmi nízkých teplotách pod rozmezí, ve kterém platí pravidlo pro snížení velikosti v závislosti na teplotě. Touto hraniční teplotou bylo pro studovaný kmen *Micrasterias rotata* 10 °C; buňky v této teplotní úrovni byly výrazně menší než u skupiny rostoucí v 15 °C a současně vykazovaly nižší variabilitu tvaru než buňky rostoucí ve vyšších teplotách (Atkinson a kol., 2003; Neustupa a kol., 2008). Naproti tomu v mé práci byl tento trend spíše opačný, u populace kmene z Alp, se s rostoucí teplotou velikost buněk zvyšovala, až při teplotě 20,9 °C byl zaznamenán lehký pokles velikosti. U kultury z Mariánského rybníku nelze vztah velikosti k teplotě jednoznačně prokázat, ovšem buňky rostoucí při teplotě 18,8 °C jsou výrazně větší, než buňky rostoucí ve vyšších teplotních úrovních. Stabilní teplota nižší než 15,4 °C byla pro populace kmene z Mariánského rybníku letální.

4.3 Vliv teploty na fenotypovou plasticitu

Extrémně nízké (pod 10 °C) nebo velmi vysoké teploty (nad 30 °C) působí na populace krásivek jako stresový faktor, projevující se teratogenní morfogenezí (Meindl, 1990). Nízké teploty vedou ke zjednodušení buněčného tvaru, nicméně základní buněčná symetrie zůstává zachována. Dlouhodobá kultivace při 30 °C vede ovšem k narušení mitotického procesu v haploidních vegetativních buňkách, mající za následek výraznou tvarovou asymetrii. (Neustupa a kol., 2008). Ideální struktura pozorovaných buněk *Micrasterias* je symetrická, výrazná asymetrie je proto považována za odchylku od základních ontogenetických drah (Brook, 1981; Neustupa, 2013).

Změny buněčných tvarů odpovídající teplotním úrovním byly ilustrovány v ordinačním diagramu (Obr. 5.). Tvarová variabilita marginálních konfigurací byla vizualizována pomocí deformační mřížky. Závislost tvaru na teplotě přitom u obou kmenů popisuje druhá hlavní komponenta. V obou vzorcích je tedy možné pozorovat v zásadě identický společný tvarový trend. Buňky v nižších teplotách jsou kompaktní a zářezy mezi laloky jsou velmi úzké, oproti tomu ve vyšších teplotách jsou zářezy mezi laloky široce rozevřené. První PC osa pak u obou kmenů popisuje rozdíl ve velikosti starších a mladších polobuněk.

4.4 Integrace buněčných laloků v závislosti na teplotě a růstové rychlosti

V této práci ukázala analýza MI překvapivou a poměrně komplexní environmentálně podmíněnou variabilitu v integraci mezi laloky, což dokládá, že teplota ovlivňuje u buněk nejen velikost (Atkinson a kol., 2003), ale i tvar (Neustupa a kol., 2008). Vztah velikosti a teploty se příliš nepotvrdil, naproti tomu byl pozorován vliv na integraci mezi různými částmi buňky.

Výsledky analýzy MI buněk *Micrasterias rotata* rostoucí na gradientu teploty v zásadě potvrzují výsledky studie asymetrie a integrace buněčné morfologie u krásivky druhu *Micrasterias compereana* (Neustupa, 2017). V této studii byla pozorována relativní morfogenetická nezávislost terminálních laloků protilehlých polobuněk, která dokládá, že buňky *Micrasterias* jsou složeny ze dvou víceméně nezávislých částí, bez signifikantní kovariance mezi jejich laloky. Modely morfologické integrace v rámci polobuňky také naznačují, že polární laloky tvoří víceméně nezávislé morfogenetické jednotky, tj. buněčné moduly (Neustupa, 2017). Tato zjištění korespondují s dřívějšími pozorováními, například vývoj laterálních laloků může být narušen bez vlivu na morfogenezi polárních laloků (Kallio & Lehtonen, 1981). Bylo také pozorováno, že u vyvíjejících se polobuněk morfogeneze polárního laloku mírně zaostává za oběma laterálními laloky (Lütz-Meindl, 2016). Naopak u protilehlých laterálních laloků jedné polobuňky byla prokázána poměrně těsná integrace (Neustupa, 2017). Možná vazba mezi oběma laterálními laloky byla již dříve ilustrována ve studii Gärtnera a Meindla (Gärtner & Meindl, 1991), kde ukázali, že buňky postrádající jeden laterální lalok v každé polobuňce mají tendenci se postupně vracet k původní morfologii buňky se dvěma laterálními laloky přiléhajícími k centrálně umístěnému polárnímu laloku. Modulární uspořádání buněk *Micrasterias* vychází zřejmě z postupné morfogenetické diferenciaci do laloků na základě uspořádání morfologického signálu v plasmatické membráně (Holloway, 2012; Neustupa, 2017). K rozdílu v konečné morfologii buněk vede nerovnoměrné rozdělení Ca^{2+} kanálů a dalších membránových proteinů, jako jsou receptory pro membrány vezikul, které jsou odpovědné za tvorbu vzoru během morfogeneze (Lacalli, 1976; Meindl, 1993). Mechanismy případné modulární architektury buněk jiných typů u jednobuněčných organismů zatím nebyly studovány. Nicméně vývojová modularita byla prokázána například u buněk savčí spermie, ovšem zde vypovídá o uspořádání cytoskeletální kostry pod plasmatickou membránou (Medarde a kol., 2013).

4.4.1 Teplota jako stresový faktor

U organismů obývajících vodní ekosystémy bylo zjištěno, že zvýšená vývojová nestabilita silně koreluje s působením stresových environmentálních faktorů (Savriama a kol., 2015; Trono a kol., 2015). Zvýšený morfogenetický stres ve vysokých teplotách byl pozorován u krásivek, byť nikoli pomocí analýzy MI, ale pouze jako změny ve tvaru polobuněk a jejich variability (Meindl, 1990; Neustupa a kol., 2008).

Výsledky analýzy MI naznačily, že integrace mezi polobuňkami souvisí spíše s růstovou rychlostí, než s teplotou. Například u kmene z Alp byla u buněk rostoucích v nejvyšší a

nejnižší teplotě, které byly obě spojené s nízkou růstovou rychlostí, signifikantně zvýšená integrace mezi protilehlými laterálními laloky, a naopak při rychlém růstu laloky z protilehlých polobuněk vykazují vzájemnou vývojovou nezávislost. Laloky z protilehlých polobuněk se tedy při pomalých růstových rychlostech nechovají jako zcela nezávislé vývojové jednotky, jak bylo zjištěno a konstatováno v předchozích studiích morfologické variability Neustupy (2013; 2017). Nicméně cytoplasmatická dědičnost morfogenetických vzorů pro vývoj velkých buněčných celků (laloků) byla pozorována také v klasické studii buněčné morfogeneze krásivek rodu *Micrasterias* (Kallio & Lehtonen, 1973). Zvýšená integrace mezi laloky polobuněk tak u pomalu rostoucích populací v okrajových teplotách gradientu mohla odrážet podobný fenomén.

Sousedící či protilehlé laloky z týchž polobuněk naopak vykazovaly vztah k teplotě a nikoli k růstové rychlosti. S rostoucí teplotou míra integrace signifikantně klesala, jak ukazuje model lineární regrese závislosti integrace mezi protilehlými laloky a teplotou (Obr. 9a, c). To by zřejmě mohlo souviset se zvyšujícím se vývojovým 'šumem', tedy zvyšujícím se vývojovým stresem při morfogenezi, a to v důsledku synchronního vývoje laterálních laloků v rámci polobuňky (Lütz-Meindl, 2016). Tento závěr by mohl otevřít cestu k budoucím výzkumům, jež by integraci v rámci polobuněk používaly jako indikátor vývojového stresu, minimálně ve vztahu k teplotě. Nabízí se nejrůznější otázky, například, zda existují podobné rozdíly v integraci uvnitř polobuněk i u přírodních populací? Nebo jestli lze pozorovat odlišné vzory MI mezi buňkami rostoucími v létě při vysokých teplotách a těmi z nižších teplot?

5 Závěr

V této práci bylo pozorováno, že optima a limity růstu vybraných kmenů *Micrasterias rotata* reflektují klimatické podmínky domovských lokalit, ovšem v souladu s hypotézou společného evolučního původu krásivek v tropech (Coesel, 1996). Současně byl potvrzen předpoklad, že buňky *Micrasterias* jsou složeny z částí s velmi různými stupni MI. Tyto rozdíly v integraci mezi buněčnými oblastmi hrají klíčovou roli ve vývoji jejich tvaru, zejména s ohledem na relativní nezávislost polárního laloku a dvojici laterálních laloků v rámci jedné polobuňky. Vzory integrace byly také odrazem odlišných růstových rychlostí na teplotním gradientu a ukazují, že při nízké rychlosti růstu se vzor integrace dramaticky mění, vztahy mezi jinak nezávislými laloky protilehlých polobuněk se jeví jako silně integrované. Tento trend MI se může uplatnit v modelech buněčné morfogeneze. Dále je možné jej zkoumat v budoucích studiích zaměřených jak na evoluční strukturu celé linie *Micrasterias*, tak na environmentální stresové faktory, které mohou destabilizovat buněčný vývoj.

6 Literatura

Adams, D. C., Rohlf, F. J., Slice, D. E. (2004): Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology*, 71: 5-16.

Agardh, C. A. (1827): Neue Gattungen und Arten von Algen. *Flora*, 41: 641 – 646.

Allen, C. E., Beldade, P., Zwaan, B. J., Brakefield, P. M. (2008): Differences in the selection response of serially repeated color pattern characters: standing variation, development, and evolution. *BMC Evolutionary Biology*, 11: 8, 94.

Andersen, R. A., Morton, S. L., Sexton, J. P. (1997): Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton 1997 List of strains. *Journal of Phycology*, 33 : 1–75.

Atkinson, D. (1994): Temperature and organism size - a biological law for ectotherms? *Advances in Ecological Research*, 25: 1–58.

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: 2605–2611.

Bastir, M., Rosas, A. (2005): Hierarchical nature of morphological integration and modularity in the human posterior face. *American Journal of Physical Anthropology*, 128: 26–34.

Bastir, M., Rosas, A., Sheets, H.D. (2005): The morphological integration of the hominoid skull: A partial least squares and PC analysis with implications for European middle pleistocene mandibular variation. In *Modern Morphometrics in Physical Anthropology*, ed. DE Slice, 265–84.

Beldade, P., Koops, K., Brakefield, P. M. (2002): Developmental constraints versus flexibility in morphological evolution. *Nature*, 416: 844–847.

Bookstein, F. L. (1991): *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge University Press, Cambridge.

Bookstein, F. L. (1996): Combining the tools of geometric morphometrics. In: L. F. Marcus, M. Corti, A. Loy, G. Naylor & D. Slice, Advances in morphometrics. *Plenum Press*, 131-151.

Bookstein, F. L. (1998): A hundred years of morphometrics. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 44: 7-59.

Bookstein, F. L., Gunz, P., Mitteroecker, P., Prossinger, H., Schaefer, K., Seidler, H. (2003): Cranial integration in *Homo*: singular warps analysis of the midsagittal plane in ontogeny and evolution. *Journal of Human Evolution*, 44: 167–87.

Bouterfas, R., Belkoura, M., Dauta, A. (2002): Light and temperature effects on the growth rate of three freshwater algae isolated from a eutrophic lake. *Hydrobiologia*, 489: 207–217.

- Brock, M. T., Weinig, C. (2007): Plasticity and environment-specific covariances: an investigation of floral-vegetative and within flower correlations. *Evolution*, 61: 12.
- Brook, A. J. (1981). *The Biology of Desmids*. University of California Press.
- Coesel, P. F. M. (1996): Biogeography of desmids. *Hydrobiologia*, 336 (1-3): 41–53.
- Coesel, P. F. M., Meesters, K. (2007): *Desmids of the Lowlands: Mesotaeniaceae and Desmidiaceae of the European Lowlands*. KNNV Publishing, The Netherlands.
- Coesel, P. F. M., Wardenaar, K. (1990): Growth responses of planktonic desmid species in a temperature–light gradient. *Freshwater Biology*, 23: 551–560.
- Coleman, A. W. (2001). Biogeography and speciation in the Pandorina/Volvulina (Chlorophyta) superclade. *Journal of Phycology*, 37, 836–851.
- Černá, K., & Neustupa, J. (2010): The pH-related morphological variations of two acidophilic species of Desmidiaceae (Viridiplantae) isolated from a lowland peat bog, Czech Republic. *Aquatic Ecology*, 44(2): 409–419.
- Debat, V., David, P. (2001): Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. *Trends in Ecology & Evolution*, 16: 555–561.
- Debat, V., Debelle, A., Dworkin, I. (2009): Plasticity, canalization, and developmental stability of the Drosophila wing: joint effects of mutations and developmental temperature. *Evolution*, 63: 2864–2876.
- De Boer M. K., Koolmees E. M., Vrieling E. G., Breeman A. M.; Van Rijssel, M. (2005): Temperature responses of three *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae) from different climate regions. *Journal of Plankton Research*, 27: 47–60.
- Dryden, I. L. (2016): Package shapes. R Foundation for Statistical Computing. Contributed package. Version 1.1-13. 2016. <https://cran.r-project.org/web/packages/shapes/index.html>.
- Fenchel, T., Finlay, B. J. (2004): The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity. *Biological Science*, 54: 777–784.
- Fiala, M., Oriol, L. (1990): Light–temperature interactions on the growth of Antarctic diatoms. *Polar Biology*, 10: 629–636.
- Foisner, W. (2006): Biogeography and dispersal of micro-organisms: a review emphasizing protists. *Acta Protozoologica*, 45: 111–136.
- Gärtner, M., Meindl, U. (1991): Untersuchungen zur Kultivierung und Formvariabilität von *Micrasterias thomasi* f. *uniradiata*. *Phyton*, 31: 157–69.
- Gilbert, S. F., Opitz, J. M., Raff, R. A. (1996): Resynthesizing evolutionary and developmental biology. *Developmental Biology*, 173: 357–72.

- Glenk, H. - O. (1994): Interspecific morphs between *Pediastrum tetras* (Ehrenberg) Ralfsand *Pediastrum biradiatum* Meyen Hydrodictyaceae, Chlorococcales. *Lauterbornia*, 15: 115-123.
- Gómez, J. M., Perfectti, F., Klingenberg, C. P. (2014): The role of pollinator diversity in the evolution of corolla-shape integration in a pollination-generalist plant clade. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369: 20130257.
- Goswami, A. (2006): Cranial modularity shifts during mammalian evolution *American Naturalist*, 168: 270–280.
- Goswami, A., Polly, P. D. (2010): The influence of modularity on cranial morphological disparity in Carnivora and Primates (Mammalia). *PLoS One*, 5: 9517.
- Gould, S. J. (1966): Allometry and size in ontogeny and phylogeny. *Biological Reviews*, 41, 587–640.
- Graham, J. H., Whitesell, M. J., Fleming, II. M., Hel-Or, H., Nevo, E., Raz, S. (2015): Fluctuating asymmetry of plant leaves: batch processing with LAMINA and continuous symmetry measures. *Symmetry*. 7: 255–68.
- Hall, J. D., Karol, K. G., McCourt, R. M., & Delwiche, C. F. (2008): Phylogeny of the conjugating green algae based on chloroplast and mitochondrial nucleotide sequence data. *Journal of Phycology*, 44 (2): 467–477.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., Ryan, P. D. (2001): PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeont Electron*, 4: 1–9.
- Harrison, L. G. (2001): *The shaping of life: the generation of biological pattern*. Cambridge University Press.
- Holloway, D. M. (2012): The chemical kinetics of shape determination in plants. *InTech Press*, 203–26.
- Holloway, D. M., Harrison, L. G. (2008): Pattern selection in plants: coupling chemical dynamics to surface growth in three dimensions. *Annals of Botany*, 101: 361–74.
- Holzinger, A., Lütz-Meindl, U. (2001): Chondramides, novel cyclodepsipeptides from myxobacteria, influence cell development and induce actin filament polymerization in the green alga *Micrasterias*. *Cell Mot Cytoskeleton*, 48: 87–95.
- Holzinger, A., Monajembashi, S., Greulich, K. O., Lütz-Meindl, U. (2002): Impairment of cytoskeleton-dependent vesicle and organelle translocation in green algae: combined use of a microfocused infrared laser as microbeam and optical tweezers. *Journal of Clinical Microbiology*, 208: 77–83.
- Huxley, J. S. (1932): *Problems of Relative Growth*. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press.

- Cheverud, J. M. (1982): Phenotypic, genetic, and environmental morphological integration in the cranium. *Evolution*, 36: 499–516.
- Cheverud, J. M., Rutledge, J. J., Atchley, W. R. (1983): Quantitative genetics of development: genetic correlations among age-specific trait values and the evolution of ontogeny. *Evolution*, 37: 895–905.
- Kallio, P., Lehtonen, J. (1973): On the plasmatic template system in *Micrasterias* morphogenesis. *Annales Academiae Scientiarum Fennicae A Biologia*, 199: 1–6.
- Kallio, P., Lehtonen, J. (1981): Nuclear control of morphogenesis in *Micrasterias*. *Cytomorphogenesis in plants*. Vienna: Springer Verlag, 191–213.
- Kane, E. A., Higham, T. E. (2015): Complex systems are more than the sum of their parts: using integration to understand performance, biomechanics, and diversity. *Integrative and Comparative Biology*, 55: 146–65.
- Kaprálék, F. (2000): *Základy bakteriologie*. Praha: Karolinum. 80-7184-811-5.
- Kendall, D. (1977): The diffusion of shape. *Advances in Applied Probability*, 9: 428-430.
- Kiermayer, O. (1970): Causal aspects of cytomorphogenesis in *Micrasterias*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 175: 686–701.
- Kiermayer, O. (1981): Cytoplasmic basis of morphogenesis in *Micrasterias*. *Cytomorphogenesis in plants*. Vienna: Springer Verlag, 147–89.
- Klingenberg, C. P. (2008): Morphological integration and developmental modularity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39: 115–32.
- Klingenberg, C. P. (2009): Morphometric integration and modularity in configurations of landmarks: Tools for evaluating a-priori hypotheses. *Evolution & development*, 11: 405–421.
- Klingenberg, C. P. (2010): Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches Nature Reviews. Genetics; *London*, 11.9: 623-35.
- Klingenberg, C. P. (2014): Studying morphological integration and modularity at multiple levels: concepts and analysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 369: 20130249.
- Klingenberg, C. P. (2015): Analyzing fluctuating asymmetry with geometric morphometrics: concepts, methods, and applications. *Symmetry*, 7: 843–934.
- Klingenberg, C. P., Badyaev, A. V., Sowry, S. M., Beckwith, N. J. (2001): Inferring developmental modularity from morphological integration: analysis of individual variation and asymmetry in bumblebee wings. *The American Naturalist*, 157: 11–23.
- Klingenberg, C. P., Barluenga, M., Meyer, A. (2002): Shape analysis of symmetric structures: Quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution*, 56: 1909-1920.

- Klingenberg, C. P., Debat, V., Roff, D. A. (2010): Quantitative genetics of shape in cricket wings: developmental integration in a functional structure. *Evolution*, 64: 10.
- Klingenberg, C. P., Duttke, S., Whelan, S., Kim, M. (2012): Developmental plasticity, morphological variation and evolvability: a multilevel analysis of morphometric integration in the shape of compound leaves. *Journal of Evolution Biology*, 25: 115–129.
- Klingenberg, C. P., Leamy, L. J., Cheverud, J. M. (2004): Integration and modularity of quantitative trait locus effects on geometric shape in the mouse mandible. *Genetics*, 166: 1909–1921.
- Klingenberg, C. P., Mebus, K., Auffray, J. - C. (2003): Developmental integration in a complex morphological structure: how distinct are the modules in the mouse mandible? *Evolution & development*, 5: 522–531.
- Klingenberg, C.P., Zaklan, S. D. (2000): Morphological integration between developmental compartments in the Drosophila wing. *Evolution*, 54: 1273–1285.
- Klingenberg, C. P., Zimmermann, M. (1992): Static, ontogenetic, and evolutionary allometry: a multivariate comparison in nine species of water striders. *The American Naturalist*, 140: 601–620.
- Kimball, S., Mattis, P., vývojový tým GIMP (2012): <http://www.gimp.org/>
- Křísa, B., Prášil, K. (1994): *Sběr, preparace a konzervace rostlinného materiálu*. Přírodovědecká fakulta UK.
- Lacalli, T. C. (1975): Morphogenesis in *Micrasterias*. II patterns of morphogenesis. *Journal of embryology and experimental morphology*, 33: 117–26.
- Lacalli, T. C. (1976): Morphogenesis in *Micrasterias*. III. The morphogenetic template. *Protoplasma*, 88: 133–46.
- Langlade, N. B., Feng, X., Dransfield, T., Copsey, L., Hanna, A. I., Thébaud, C., Bangham, A., Hudson A, Coen, E. (2005): Evolution through genetically controlled allometry space. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 10221–10226.
- Lenzenweger, R., Lütz, C. (2006): Beitrag zur Kenntnis der Zieralgenflora (Desmidiaceae, Zygnema-tophyceae) Spitzbergens. *Archiv für Hydrobiologie-Supplementband Only*, 162: 79-90.
- Lütz-Meindl, U. (2016): *Micrasterias* as a model system in plant cell biology. *Frontiers in Plant Science*, 7: 999.
- Mayr, E. (1982): *The growth of biological thought: diversity, evolution, and inheritance*. Cambridge, MA: Harvard University Press.

- McCourt, R. M., Karol, K. G., Bell, J., Helm-Bychowski, K. M., Grajewska, A., Wojciechowski, M. F., Hoshaw, R. W. (2000): Phylogeny of the conjugating green algae (Zygnematophyceae) based on rbcL sequences. *Journal of Phycology*, 758: 747–758.
- Medarde, N., Muñoz-Muñoz, F., López-Fuster, M. J., Ventura, J. (2013): Variational modularity at the cell level: insights from the sperm head of the house mouse. *BMC Evolutionary Biology*, 13: 179.
- Meindl, U. (1990): Effects of temperature on cytomorphogenesis and ultrastructure of *Micrasterias*. *Protoplasma*, 157: 3–18.
- Meindl, U. (1993): *Micrasterias* cells as a model system for research on morphogenesis. *Microbiologi Revue*, 57: 415–33.
- Mitteroecker, P., Bookstein, F. L. (2007): The conceptual and statistical relationship between modularity and morphological integration. *Systemetic Bioogy*, 56: 818–836.
- Neustupa, J. (2013): Patterns of symmetric and asymmetric morphological variation in unicellular green microalgae of the genus *Micrasterias* (Desmidiiales, Viridiplantae). *Fottea*, 13: 53-63.
- Neustupa, J. (2016): Static allometry of unicellular green algae: scaling of cellular surface area and volume in the genus *Micrasterias* (Desmidiiales). *Journal of Evol. Biology*, 29: 292–305.
- Neustupa, J. (2017): Asymmetry and integration of cellular morphology in *Micrasterias compereana*. *BMC Evolutionary Biology*, 17: 1.
- 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 pH. *Preslia*, 77: 439–452.
- Neustupa, J., Škaloud, P. (2007): Geometric morphometrics and qualitative patterns in the morphological variation of five species of *Micrasterias* (Zygnemophyceae, Viridiplantae). *Preslia*, 79: 401-417.
- Neustupa, J., Škaloud, P., & Šťastný, J. (2010): The molecular phylogenetic and geometric morphometric evaluation of *Micrasterias crux-melitensis*/*M. radians* species complex. *Journal of Phycology*, 46 (4): 703–714.
- Neustupa, J., Šťastný, J., Hodač, L. (2008): Temperature-related phenotypic plasticity in the green microalga *Micrasterias rotata*. *Aquatic Microbial Ecology*, 51: 77–86.
- Norwegian Meteorological Institute and the Norwegian Broadcasting Corp. 2007 – 2017. (<https://www.yr.no/>).
- Olson, E. C., Miller, R. L. (1958): *Morphological Integration*. Chicago: University of Chicago Press.

- Pélabon, C., Osler, N. C., Diekmann, M., Graae, B. J. (2013): Decoupled phenotypic variation between floral and vegetative traits: distinguishing between developmental and environmental correlations. *Annals of Botany*, 111: 935–944.
- Pflügl-Haill, M., Vidali, L., Vos, J. W., Hepler, P. K., Lütz-Meindl, U. (2000): Changes of the actin filament system in the green alga *Micrasterias denticulata* induced by different cytoskeleton inhibitors. *Protoplasma*, 212: 206–16.
- Pigliucci, M., Preston, K. (2004): *Phenotypic Integration: Studying the Ecology and Evolution of Complex Phenotypes*. New York: Oxford Univ. Press.
- R Development Core Team. R (2016): A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. 2013. <https://www.r-project.org/>.
- Renaud, S., Auffray, J.-C., de la Porte, S. (2010): Epigenetic effects on the mouse mandible: common features and discrepancies in remodeling due to muscular dystrophy and response to food consistency. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 28.
- Rohlf, F. J. (2006): *Tps series*. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York
- Rohlf, F. J. (2015): The tps series of software. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 26: 9–12.
- Rohlf, F. J., Marcus, L. F. (1993): A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution*, 8: 129-132.
- Rosenberg, M. (1944): On the variability of the desmid *Xanthidium subhastiferum*. *West. New Phytology*, 43: 15–22.
- Růžička, J. (1981): *Die Desmidiaceen Mitteleuropas. Band 1(2)*. Lieferung. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- Savriama, Y., Klingenberg, C. P. (2011): Beyond Bilateral Symmetry: Geometric Morphometric Methods for any type of Symmetry. *BMC Evolutionary Biology*, 11: 280-304.
- Savriama, Y., Neustupa J., Klingenberg, C. P. (2010): Geometric morphometrics of symmetry and allometry in *Micrasterias rotata* (Zygnematophyceae, Viridiplantae). *Nova Hedwigia*, 136: 43-54.
- Savriama, Y., Stige, L. C., Gerber, S., Pérez, T., Alibert, P., David, B. (2015): Impact of sewage pollution on two species of sea urchins in the Mediterranean Sea (Cortiou, France): Radial asymmetry as a bioindicator of stress. *Ecological Indicators*, 54: 39–47.
- Savriama, Y., Vitulo, M., Gerber, S., Debat, V., Fusco, G. (2016): Modularity and developmental stability in segmented animals: variation in translational asymmetry in geophilomorph centipedes. *Development Genes and Evolution*, 226: 187–96.

- Schluter, D. (1996): Adaptive radiation along genetic lines of least resistance. *Evolution*, 50: 1766–74.
- Stamenković, M.; Hanelt, D. (2011): Growth and photosynthetic characteristics of several *Cosmarium* strains (Zygnematophyceae, Streptophyta) isolated from various geographic regions under a constant light–temperature regime. *Aquatic Ecology*, 45: 455–472.
- Stamenković, M.; Hanelt, D. (2013): Adaptation of growth and photosynthesis to certain temperature regimes is an indicator for the geographical distribution of *Cosmarium* strains (Zygnematophyceae, Streptophyta), *European Journal of Phycology*, 48: 116–127.
- Škaloud, P., Nemjová, K., Veselá, J., Černá, K., & Neustupa, J. (2011): A multilocus phylogeny of the desmid genus *Micrasterias* (Streptophyta): evidence for the accelerated rate of morphological evolution in protists. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61 (3): 933–943.
- Šťastný, J. (2010): Desmids (Conjugatophyceae, Viridiplantae) from the Czech Republic; new and rare taxa, distribution, ecology. *Fottea*, 10 (1): 1–74.
- Thompson, D. W. (1917): *On growth and form*. Cambridge University Press, London.
- Trono, D. J. V., Dacar, R., Quinones, L., Tabugo, S. R. M. (2015): Fluctuating asymmetry and developmental instability in *Protoreaster nodosus* (Chocolate Chip Sea Star) as a biomarker for environmental stress. *Computation Ecology and Software*, 5: 119–29.
- Vannerum, K., De Rycke, R., Pollier, J., Goossens, A., Inzé, D., Vyverman, W. (2012): Characterization of a RABE (Ras gene from rat brain E) GTPase expressed during morphogenesis in the unicellular green alga *Micrasterias denticulata* (Zygnematophyceae, Streptophyta). *Journal of Phycology*, 48: 682–92.
- Viscosi, V., Cardini, A. (2011): Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics: a simplified protocol for beginners. *PLoS ONE*, 6: e25630.
- Waris, H., Kallio, P. (1964): Morphogenesis in *Micrasterias*. *Advanced Morphology*, 4: 45–80.
- Wagner, G. P. (1990): A comparative study of morphological integration in *Apis mellifera* (Insecta, Hymenoptera). *Z. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 28: 48–61.
- Wagner, G. P. (1996): Homologues, natural kinds and the evolution of modularity. *American Zoologist*, 36: 36–43.
- Wagner, G. P., Altenberg, L. (1996): Complex adaptations and the evolution of evolvability. *Evolution*, 50: 967 – 76.
- Weiss, D., Lütz-Meindl, U. (1999): Heat response in the green alga *Micrasterias denticulata* (Desmidiaceae): immunodetection and localization of BiP and heat shock protein 70. *Nova Hedwiga*, 69: 217–228.

- Weiss, D., Lütz, C., Lütz-Meindl, U. (1999): Photosynthesis and heat response of the green alga *Micrasterias denticulata* (Desmidiaceae). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 54: 508–516.
- Willmore, K. E., Klingenberg, C. P., Hallgrímsson, B. (2005): The relationship between fluctuating asymmetry and environmental variance in rhesus macaque skulls. *Evolution*, 59: 898–909.
- Willmore, K. E., Leamy, L., Hallgrímsson, B. (2006): Effects of developmental and functional interactions on mouse cranial variability through late ontogeny. *Evolution & development*, 8: 550–567.
- Workman, M. S., Leamy, L. J., Routman, E. J., Cheverud, J. M. (2002): Analysis of quantitative trait locus effects on the size and shape of mandibular molars in mice. *Genetics*, 160: 1573–86.
- Young, N. M. (2006): Function, ontogeny and canalization of shape variance in the primate scapula. *Journal of Anatomy*, 209: 623–636.
- Young, R. L. & Badyaev, A. V. (2007): Evolution of ontogeny: linking epigenetic remodeling and genetic adaptation in skeletal structures. *Integrative and Comparative Biology*, 47: 234–244.
- Young, N. M., Wagner, G. P., Hallgrímsson, B. (2010): Development and the evolvability of human limbs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 3400–3405.
- Zelditch, M. L., Mezey, J. G., Sheets, H. D., Lundrigan, B. L., Garland, Jr. T. (2006): Developmental regulation of skull morphology II: ontogenetic dynamics of covariance. *Evolution & development*, 8: 46–60.
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, H. D. (2004): *Geometric Morphometrics For Biologists*. Elsevier Academic Press.
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, D. H. (2012): *Geometric morphometrics for biologists: a primer. 2nd edition*, London: Academic.

7 Příloha

Příloha 1: **a** Výsledky přímého počítání buněk a naměřené hodnoty teploty. **b** Specifická růstová rychlost.

Příloha 2: **a** Hodnoty integrace a hodnoty signifikance korelace. **b** Hodnoty pro model lineární regrese (udané hodnoty specifické růstové rychlosti jsou zprůměrovány z dvou hodnot pro každou teplotní úroveň).

Příloha 1: a Výsledky přímého počítání buněk a naměřené hodnoty teploty.

Kmen *Micrasterias rotata* – Mariánský rybník

teplotní skupina	teplota (°C)	doba pozorování				
		25.3.2016	29.3.2016	31.3.2016	4.4.2016	7.4.2016
A	24,3					
A1		43	28	38	56	50
A2		27	30	37	88	142
B	22,9					
B1		27	25	21	23	40
B2		35	38	37	67	130
C	21,8					
C1		41	41	42	45	44
C2		41	47	49	56	61
D	20,1					
D1		28	25	33	31	25
D2		44	43	43	46	73
E	18,8					
E1		41	40	26	37	33
E2		42	39	33	40	41
F	15,4					
F1		27	36	25	25	26
F2		28	35	27	24	20
G	12,1					
G1		34	33	24	23	8
G2		39	50	27	25	19
H	9,9					
H1		40	31	32	29	11
H2		37	25	25	20	9

teplotní skupina	teplota (°C)	doba pozorování			
		11.4.2016	14.4.2016	18.4.2016	21.4.2016
A	24,3				
A1		117	197	300	540
A2		190	352	478	765
B	22,9				
B1		85	108	136	390
B2		184	234	430	520
C	21,8				
C1		57	64	57x	
C2		88	107	129x	
D	20,1				
D1		32	35	66	95
D2		118	147	216	280
E	18,8				
E1		32	35	51	87
E2		54	56	92	135
F	15,4				
F1		24	25	25	30
F2		12	12	11	9
G	12,1				
G1		2	3	3	2
G2		17	20	15	13
H	9,9				
H1		4	3	2	2
H2		3	2	2	1

Kmen *Micrasterias rotata* – Alpy

teplotní skupina	teplota (°C)	doba pozorování					
		11.10.2016	14.10.2016	20.10.2016	24.10.2016	27.10.2016	31.10.2016
A	25,2						
A1		30	106	204	225	249	265
A2		31	57	110	115	130	123
B	23,7						
B1		30	75	105	170	190	204
B2		33	62	112	139	140	138
C	22,4						
C1		34	52	110	135	147	152
C2		40	81	131	175	205	230
D	20,9						
D1		33	56	83	121	131	226
D2		32	52	74	113	135	167
E	18,1						
E1		39	61	77	96	154	184
E2		30	43	71	95	143	182
F	16,1						
F1		36	50	56	79	95	116
F2		35	38	43	60	83	92
G	13,9						
G1		30	30	29	34	33	51
G2		37	43	42	45	42	53
H	12,3						
H1		39	47	55	56	57	55
H2		32	29	33	41	40	41

teplotní skupina	teplota (°C)	doba pozorování				
		3.11.2016	7.11.2016	10.11.2016	14.11.2016	17.11.2016
A	25,2					
A1		256	274	272	273	250
A2		103	97	98	97	80
B	23,7					
B1		215	230	195	190	180
B2		133	103	110	103	107
C	22,4					
C1		174	168	188	200	190
C2		227	201	210	250	290
D	20,9					
D1		218	233	218	250	265
D2		212	234	237	230	242
E	18,1					
E1		212	215	228	280	290
E2		200	208	202	250	248
F	16,1					
F1		97	134	135	137	138
F2		107	121	120	145	146
G	13,9					
G1		54	56	57	48	47
G2		64	65	62	51	49
H	12,3					
H1		57	57	55	48	54
H2		37	38	37	30	32

Příloha 1 b: Specifická růstová rychlost.

Kmen *Micrasterias rotata* – Mariánský rybník

teplotní skupina	teplota (°C)	spec.růst. rychlost	teplotní skupina	teplota (°C)	spec.růst. rychlost
A1	24,3	0,2125	A2	24,3	0,0728
B1	22,9	0,1884	B2	22,9	0,0868
C1	21,8	0,0647	C2	21,8	0,0916
D1	20,1	0,0617	D2	20,1	0,1200
E1	18,8	-0,0077	E2	18,8	0,0688
F1	15,4	-0,0200	F2	15,4	-0,1277
G1	12,1	-0,3465	G2	12,1	-0,0278
H1	9,9	-0,2529	H2	9,9	-0,2746

Kmen *Micrasterias rotata* – Alpy

teplotní skupina	teplota (°C)	spec.růst. rychlost	teplotní skupina	teplota (°C)	spec.růst. rychlost
A1	25,2	0,0245	A2	25,2	0,0111
B1	23,7	0,1204	B2	23,7	0,0534
D1	22,4	0,0511	C2	22,4	0,0724
C1	20,9	0,0942	D2	20,9	0,1058
E1	18,1	0,0551	E2	18,1	0,0728
F1	16,1	0,0860	F2	16,1	0,0832
G1	13,9	0,0397	G2	13,9	0,0172
H1	12,3	0,0045	H2	12,3	0,0542

Příloha 2: a Hodnoty integrace a hodnoty signifikance korelace.

Kmen *Micrasterias rotata* – Mariánský rybník

Mariánský rybník

A; INT	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	1	0,742	0,573	0,68	0,761	0,44	0,532	0,503	0,488	0,478
A2	0,742	1	0,527	0,763	0,68	0,532	0,528	0,52	0,579	0,488
PLAB	0,573	0,527	1	0,527	0,573	0,503	0,52	0,649	0,52	0,503
B2	0,68	0,763	0,527	1	0,742	0,488	0,579	0,52	0,528	0,532
B1	0,761	0,68	0,573	0,742	1	0,478	0,488	0,503	0,532	0,44
C1	0,44	0,532	0,503	0,488	0,478	1	0,742	0,573	0,68	0,761
C2	0,532	0,528	0,52	0,579	0,488	0,742	1	0,527	0,763	0,68
PLCD	0,503	0,52	0,649	0,52	0,503	0,573	0,527	1	0,527	0,573
D2	0,488	0,579	0,52	0,528	0,532	0,68	0,763	0,527	1	0,742
D1	0,478	0,488	0,503	0,532	0,44	0,761	0,68	0,573	0,742	1

P-hodnoty	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	0	0,023	0,022	0,022	0,001	0,443	0,142	0,168	0,341	0,316
A2	0,023	0	0,101	0,001	0,022	0,142	0,186	0,137	0,079	0,341
PLAB	0,022	0,101	0	0,101	0,022	0,168	0,137	0,002	0,137	0,168
B2	0,022	0,001	0,101	0	0,023	0,341	0,079	0,137	0,186	0,142
B1	0,001	0,022	0,022	0,023	0	0,316	0,341	0,168	0,142	0,443
C1	0,443	0,142	0,168	0,341	0,316	0	0,023	0,022	0,022	0,001
C2	0,142	0,186	0,137	0,079	0,341	0,023	0	0,101	0,001	0,022
PLCD	0,168	0,137	0,002	0,137	0,168	0,022	0,101	0	0,101	0,022
D2	0,341	0,079	0,137	0,186	0,142	0,022	0,001	0,101	0	0,023
D1	0,316	0,341	0,168	0,142	0,443	0,001	0,022	0,022	0,023	0

B; INT	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	1	0,83	0,599	0,749	0,702	0,513	0,48	0,507	0,515	0,568
A2	0,83	1	0,69	0,851	0,749	0,48	0,492	0,455	0,496	0,515
PLAB	0,599	0,69	1	0,69	0,599	0,507	0,455	0,428	0,455	0,507
B2	0,749	0,851	0,69	1	0,83	0,515	0,496	0,455	0,492	0,48
B1	0,702	0,749	0,599	0,83	1	0,568	0,515	0,507	0,48	0,513
C1	0,513	0,48	0,507	0,515	0,568	1	0,83	0,599	0,749	0,702
C2	0,48	0,492	0,455	0,496	0,515	0,83	1	0,69	0,851	0,749
PLCD	0,507	0,455	0,428	0,455	0,507	0,599	0,69	1	0,69	0,599
D2	0,515	0,496	0,455	0,492	0,48	0,749	0,851	0,69	1	0,83
D1	0,568	0,515	0,507	0,48	0,513	0,702	0,749	0,599	0,83	1

P-hodnoty	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	0	0,001	0,059	0,005	0,019	0,245	0,374	0,173	0,187	0,071
A2	0,001	0	0,003	0,001	0,005	0,374	0,284	0,306	0,228	0,187
PLAB	0,059	0,003	0	0,003	0,059	0,173	0,306	0,311	0,306	0,173
B2	0,005	0,001	0,003	0	0,001	0,187	0,228	0,306	0,284	0,374
B1	0,019	0,005	0,059	0,001	0	0,071	0,187	0,173	0,374	0,245
C1	0,245	0,374	0,173	0,187	0,071	0	0,001	0,059	0,005	0,019
C2	0,374	0,284	0,306	0,228	0,187	0,001	0	0,003	0,001	0,005
PLCD	0,173	0,306	0,311	0,306	0,173	0,059	0,003	0	0,003	0,059
D2	0,187	0,228	0,306	0,284	0,374	0,005	0,001	0,003	0	0,001
D1	0,071	0,187	0,173	0,374	0,245	0,019	0,005	0,059	0,001	0

C; INT	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	1	0,749	0,518	0,733	0,658	0,404	0,481	0,427	0,511	0,426
A2	0,749	1	0,666	0,891	0,733	0,481	0,596	0,532	0,5	0,511
PLAB	0,518	0,666	1	0,666	0,518	0,427	0,532	0,522	0,532	0,427
B2	0,733	0,891	0,666	1	0,749	0,511	0,5	0,532	0,596	0,481
B1	0,658	0,733	0,518	0,749	1	0,426	0,511	0,427	0,481	0,404
C1	0,404	0,481	0,427	0,511	0,426	1	0,749	0,518	0,733	0,658
C2	0,481	0,596	0,532	0,5	0,511	0,749	1	0,666	0,891	0,733
PLCD	0,427	0,532	0,522	0,532	0,427	0,518	0,666	1	0,666	0,518
D2	0,511	0,5	0,532	0,596	0,481	0,733	0,891	0,666	1	0,749
D1	0,426	0,511	0,427	0,481	0,404	0,658	0,733	0,518	0,749	1

P-hodnoty	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	0	0,004	0,17	0,007	0,008	0,515	0,422	0,435	0,295	0,423
A2	0,004	0	0,04	0,001	0,007	0,422	0,232	0,274	0,174	0,295
PLAB	0,17	0,04	0	0,04	0,17	0,435	0,274	0,194	0,274	0,435
B2	0,007	0,001	0,04	0	0,004	0,295	0,174	0,274	0,232	0,422
B1	0,008	0,007	0,17	0,004	0	0,423	0,295	0,435	0,422	0,515
C1	0,515	0,422	0,435	0,295	0,423	0	0,004	0,17	0,007	0,008
C2	0,422	0,232	0,274	0,174	0,295	0,004	0	0,04	0,001	0,007
PLCD	0,435	0,274	0,194	0,274	0,435	0,17	0,04	0	0,04	0,17
D2	0,295	0,174	0,274	0,232	0,422	0,007	0,001	0,04	0	0,004
D1	0,423	0,295	0,435	0,422	0,515	0,008	0,007	0,17	0,004	0

D; INT	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	1	0,697	0,513	0,647	0,855	0,387	0,473	0,449	0,484	0,38
A2	0,697	1	0,603	0,898	0,647	0,473	0,62	0,56	0,654	0,484
PLAB	0,513	0,603	1	0,603	0,513	0,449	0,56	0,389	0,56	0,449
B2	0,647	0,898	0,603	1	0,697	0,484	0,654	0,56	0,62	0,473
B1	0,855	0,647	0,513	0,697	1	0,38	0,484	0,449	0,473	0,387
C1	0,387	0,473	0,449	0,484	0,38	1	0,697	0,513	0,647	0,855
C2	0,473	0,62	0,56	0,654	0,484	0,697	1	0,603	0,898	0,647
PLCD	0,449	0,56	0,389	0,56	0,449	0,513	0,603	1	0,603	0,513
D2	0,484	0,654	0,56	0,62	0,473	0,647	0,898	0,603	1	0,697
D1	0,38	0,484	0,449	0,473	0,387	0,855	0,647	0,513	0,697	1

P-hodnoty	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	0	0,012	0,228	0,022	0,001	0,538	0,232	0,337	0,192	0,556
A2	0,012	0	0,127	0,001	0,022	0,232	0,012	0,216	0,004	0,192
PLAB	0,228	0,127	0	0,127	0,228	0,337	0,216	0,685	0,216	0,337
B2	0,022	0,001	0,127	0	0,012	0,192	0,004	0,216	0,012	0,232
B1	0,001	0,022	0,228	0,012	0	0,556	0,192	0,337	0,232	0,538
C1	0,538	0,232	0,337	0,192	0,556	0	0,012	0,228	0,022	0,001
C2	0,232	0,012	0,216	0,004	0,192	0,012	0	0,127	0,001	0,022
PLCD	0,337	0,216	0,685	0,216	0,337	0,228	0,127	0	0,127	0,228
D2	0,192	0,004	0,216	0,012	0,232	0,022	0,001	0,127	0	0,012
D1	0,556	0,192	0,337	0,232	0,538	0,001	0,022	0,228	0,012	0

E; INT	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	1	0,74	0,679	0,717	0,828	0,598	0,548	0,608	0,549	0,584
A2	0,74	1	0,639	0,857	0,717	0,548	0,651	0,625	0,626	0,549
PLAB	0,679	0,639	1	0,639	0,679	0,608	0,625	0,706	0,625	0,608
B2	0,717	0,857	0,639	1	0,74	0,549	0,626	0,625	0,651	0,548
B1	0,828	0,717	0,679	0,74	1	0,584	0,549	0,608	0,548	0,598
C1	0,598	0,548	0,608	0,549	0,584	1	0,74	0,679	0,717	0,828
C2	0,548	0,651	0,625	0,626	0,549	0,74	1	0,639	0,857	0,717
PLCD	0,608	0,625	0,706	0,625	0,608	0,679	0,639	1	0,639	0,679
D2	0,549	0,626	0,625	0,651	0,548	0,717	0,857	0,639	1	0,74
D1	0,584	0,549	0,608	0,548	0,598	0,828	0,717	0,679	0,74	1

P-hodnoty	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	0	0,006	0,001	0,003	0,001	0,008	0,087	0,008	0,05	0,019
A2	0,006	0	0,003	0,001	0,003	0,087	0,003	0,004	0,008	0,05
PLAB	0,001	0,003	0	0,003	0,001	0,008	0,004	0,001	0,004	0,008
B2	0,003	0,001	0,003	0	0,006	0,05	0,008	0,004	0,003	0,087
B1	0,001	0,003	0,001	0,006	0	0,019	0,05	0,008	0,087	0,008
C1	0,008	0,087	0,008	0,05	0,019	0	0,006	0,001	0,003	0,001
C2	0,087	0,003	0,004	0,008	0,05	0,006	0	0,003	0,001	0,003
PLCD	0,008	0,004	0,001	0,004	0,008	0,001	0,003	0	0,003	0,001
D2	0,05	0,008	0,004	0,003	0,087	0,003	0,001	0,003	0	0,006
D1	0,019	0,05	0,008	0,087	0,008	0,001	0,003	0,001	0,006	0

Kmen *Micrasterias rotata* – Alpy

Alpy

A; INT	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	1	0,801	0,745	0,774	0,728	0,515	0,581	0,527	0,594	0,554
A2	0,801	1	0,769	0,823	0,774	0,581	0,654	0,543	0,62	0,594
PLAB	0,745	0,769	1	0,769	0,745	0,527	0,543	0,428	0,543	0,527
B2	0,774	0,823	0,769	1	0,801	0,594	0,62	0,543	0,654	0,581
B1	0,728	0,774	0,745	0,801	1	0,554	0,594	0,527	0,581	0,515
C1	0,515	0,581	0,527	0,594	0,554	1	0,801	0,745	0,774	0,728
C2	0,581	0,654	0,543	0,62	0,594	0,801	1	0,769	0,823	0,774
PLCD	0,527	0,543	0,428	0,543	0,527	0,745	0,769	1	0,769	0,745
D2	0,594	0,62	0,543	0,654	0,581	0,774	0,823	0,769	1	0,801
D1	0,554	0,594	0,527	0,581	0,515	0,728	0,774	0,745	0,801	1

p-hodnoty	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	0	0,001	0,001	0,001	0,001	0,12	0,1	0,119	0,062	0,155
A2	0,001	0	0,001	0,001	0,001	0,1	0,005	0,039	0,019	0,062
PLAB	0,001	0,001	0	0,001	0,001	0,119	0,039	0,1	0,039	0,119
B2	0,001	0,001	0,001	0	0,001	0,062	0,019	0,039	0,005	0,1
B1	0,001	0,001	0,001	0,001	0	0,155	0,062	0,119	0,1	0,12
C1	0,12	0,1	0,119	0,062	0,155	0	0,001	0,001	0,001	0,001
C2	0,1	0,005	0,039	0,019	0,062	0,001	0	0,001	0,001	0,001
PLCD	0,119	0,039	0,1	0,039	0,119	0,001	0,001	0	0,001	0,001
D2	0,062	0,019	0,039	0,005	0,1	0,001	0,001	0,001	0	0,001
D1	0,155	0,062	0,119	0,1	0,12	0,001	0,001	0,001	0,001	0

B; INT	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	1	0,761	0,668	0,75	0,804	0,455	0,537	0,48	0,527	0,489
A2	0,761	1	0,795	0,865	0,75	0,537	0,561	0,51	0,56	0,527
PLAB	0,668	0,795	1	0,795	0,668	0,48	0,51	0,405	0,51	0,48
B2	0,75	0,865	0,795	1	0,761	0,527	0,56	0,51	0,561	0,537
B1	0,804	0,75	0,668	0,761	1	0,489	0,527	0,48	0,537	0,455
C1	0,455	0,537	0,48	0,527	0,489	1	0,761	0,668	0,75	0,804
C2	0,537	0,561	0,51	0,56	0,527	0,761	1	0,795	0,865	0,75
PLCD	0,48	0,51	0,405	0,51	0,48	0,668	0,795	1	0,795	0,668
D2	0,527	0,56	0,51	0,561	0,537	0,75	0,865	0,795	1	0,761
D1	0,489	0,527	0,48	0,537	0,455	0,804	0,75	0,668	0,761	1

p-hodnoty	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	0	0,007	0,002	0,003	0,001	0,337	0,118	0,213	0,132	0,14
A2	0,007	0	0,001	0,001	0,003	0,118	0,155	0,11	0,136	0,132
PLAB	0,002	0,001	0	0,001	0,002	0,213	0,11	0,16	0,11	0,213
B2	0,003	0,001	0,001	0	0,007	0,132	0,136	0,11	0,155	0,118
B1	0,001	0,003	0,002	0,007	0	0,14	0,132	0,213	0,118	0,337
C1	0,337	0,118	0,213	0,132	0,14	0	0,007	0,002	0,003	0,001
C2	0,118	0,155	0,11	0,136	0,132	0,007	0	0,001	0,001	0,003
PLCD	0,213	0,11	0,16	0,11	0,213	0,002	0,001	0	0,001	0,002
D2	0,132	0,136	0,11	0,155	0,118	0,003	0,001	0,001	0	0,007
D1	0,14	0,132	0,213	0,118	0,337	0,001	0,003	0,002	0,007	0

C; INT	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	1	0,645	0,405	0,609	0,723	0,371	0,497	0,38	0,547	0,409
A2	0,645	1	0,583	0,81	0,609	0,497	0,62	0,497	0,624	0,547
PLAB	0,405	0,583	1	0,583	0,405	0,38	0,497	0,46	0,497	0,38
B2	0,609	0,81	0,583	1	0,645	0,547	0,624	0,497	0,62	0,497
B1	0,723	0,609	0,405	0,645	1	0,409	0,547	0,38	0,497	0,371
C1	0,371	0,497	0,38	0,547	0,409	1	0,645	0,405	0,609	0,723
C2	0,497	0,62	0,497	0,624	0,547	0,645	1	0,583	0,81	0,609
PLCD	0,38	0,497	0,46	0,497	0,38	0,405	0,583	1	0,583	0,405
D2	0,547	0,624	0,497	0,62	0,497	0,609	0,81	0,583	1	0,645
D1	0,409	0,547	0,38	0,497	0,371	0,723	0,609	0,405	0,645	1

p-hodnoty	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	0	0,016	0,25	0,031	0,001	0,337	0,219	0,457	0,143	0,267
A2	0,016	0	0,053	0,001	0,031	0,219	0,108	0,331	0,091	0,143
PLAB	0,25	0,053	0	0,053	0,25	0,457	0,331	0,195	0,331	0,457
B2	0,031	0,001	0,053	0	0,016	0,143	0,091	0,331	0,108	0,219
B1	0,001	0,031	0,25	0,016	0	0,267	0,143	0,457	0,219	0,337
C1	0,337	0,219	0,457	0,143	0,267	0	0,016	0,25	0,031	0,001
C2	0,219	0,108	0,331	0,091	0,143	0,016	0	0,053	0,001	0,031
PLCD	0,457	0,331	0,195	0,331	0,457	0,25	0,053	0	0,053	0,25
D2	0,143	0,091	0,331	0,108	0,219	0,031	0,001	0,053	0	0,016
D1	0,267	0,143	0,457	0,219	0,337	0,001	0,031	0,25	0,016	0

D ; INT	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	1	0,61	0,463	0,589	0,79	0,3	0,45	0,405	0,443	0,303
A2	0,61	1	0,548	0,82	0,589	0,45	0,486	0,511	0,495	0,443
PLAB	0,463	0,548	1	0,548	0,463	0,405	0,511	0,663	0,511	0,405
B2	0,589	0,82	0,548	1	0,61	0,443	0,495	0,511	0,486	0,45
B1	0,79	0,589	0,463	0,61	1	0,303	0,443	0,405	0,45	0,3
C1	0,3	0,45	0,405	0,443	0,303	1	0,61	0,463	0,589	0,79
C2	0,45	0,486	0,511	0,495	0,443	0,61	1	0,548	0,82	0,589
PLCD	0,405	0,511	0,663	0,511	0,405	0,463	0,548	1	0,548	0,463
D2	0,443	0,495	0,511	0,486	0,45	0,589	0,82	0,548	1	0,61
D1	0,303	0,443	0,405	0,45	0,3	0,79	0,589	0,463	0,61	1

p-hodnoty	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	0	0,005	0,061	0,01	0,001	0,418	0,293	0,108	0,28	0,513
A2	0,005	0	0,021	0,001	0,01	0,293	0,178	0,073	0,274	0,28
PLAB	0,061	0,021	0	0,021	0,061	0,108	0,073	0,001	0,073	0,108
B2	0,01	0,001	0,021	0	0,005	0,28	0,274	0,073	0,178	0,293
B1	0,001	0,01	0,061	0,005	0	0,513	0,28	0,108	0,293	0,418
C1	0,418	0,293	0,108	0,28	0,513	0	0,005	0,061	0,01	0,001
C2	0,293	0,178	0,073	0,274	0,28	0,005	0	0,021	0,001	0,01
PLCD	0,108	0,073	0,001	0,073	0,108	0,061	0,021	0	0,021	0,061
D2	0,28	0,274	0,073	0,178	0,293	0,01	0,001	0,021	0	0,005
D1	0,513	0,28	0,108	0,293	0,418	0,001	0,01	0,061	0,005	0

E; INT	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	1	0,613	0,481	0,614	0,749	0,461	0,505	0,461	0,515	0,523
A2	0,613	1	0,551	0,851	0,614	0,505	0,564	0,527	0,565	0,515
PLAB	0,481	0,551	1	0,551	0,481	0,461	0,527	0,544	0,527	0,461
B2	0,614	0,851	0,551	1	0,613	0,515	0,565	0,527	0,564	0,505
B1	0,749	0,614	0,481	0,613	1	0,523	0,515	0,461	0,505	0,461
C1	0,461	0,505	0,461	0,515	0,523	1	0,613	0,481	0,614	0,749
C2	0,505	0,564	0,527	0,565	0,515	0,613	1	0,551	0,851	0,614
PLCD	0,461	0,527	0,544	0,527	0,461	0,481	0,551	1	0,551	0,481
D2	0,515	0,565	0,527	0,564	0,505	0,614	0,851	0,551	1	0,613
D1	0,523	0,515	0,461	0,505	0,461	0,749	0,614	0,481	0,613	1

p-hodnoty	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	0	0,01	0,081	0,004	0,001	0,071	0,1	0,093	0,103	0,024
A2	0,01	0	0,055	0,001	0,004	0,1	0,094	0,115	0,123	0,103
PLAB	0,081	0,055	0	0,055	0,081	0,093	0,115	0,015	0,115	0,093
B2	0,004	0,001	0,055	0	0,01	0,103	0,123	0,115	0,094	0,1
B1	0,001	0,004	0,081	0,01	0	0,024	0,103	0,093	0,1	0,071
C1	0,071	0,1	0,093	0,103	0,024	0	0,01	0,081	0,004	0,001
C2	0,1	0,094	0,115	0,123	0,103	0,01	0	0,055	0,001	0,004
PLCD	0,093	0,115	0,015	0,115	0,093	0,081	0,055	0	0,055	0,081
D2	0,103	0,123	0,115	0,094	0,1	0,004	0,001	0,055	0	0,01
D1	0,024	0,103	0,093	0,1	0,071	0,001	0,004	0,081	0,01	0

F; INT	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	1	0,795	0,533	0,781	0,835	0,373	0,433	0,363	0,44	0,363
A2	0,795	1	0,533	0,91	0,781	0,433	0,482	0,44	0,526	0,44
PLAB	0,533	0,533	1	0,533	0,533	0,363	0,44	0,417	0,44	0,363
B2	0,781	0,91	0,533	1	0,795	0,44	0,526	0,44	0,482	0,433
B1	0,835	0,781	0,533	0,795	1	0,363	0,44	0,363	0,433	0,373
C1	0,373	0,433	0,363	0,44	0,44	1	0,795	0,533	0,781	0,835
C2	0,433	0,482	0,44	0,526	0,363	0,795	1	0,533	0,91	0,781
PLCD	0,363	0,44	0,417	0,44	0,363	0,533	0,533	1	0,533	0,533
D2	0,44	0,526	0,44	0,482	0,433	0,781	0,91	0,533	1	0,795
D1	0,363	0,44	0,363	0,433	0,373	0,835	0,781	0,533	0,795	1

p-hodnoty	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	0	0,001	0,034	0,001	0,001	0,477	0,431	0,446	0,439	0,557
A2	0,001	0	0,064	0,001	0,001	0,431	0,414	0,38	0,162	0,439
PLAB	0,034	0,064	0	0,064	0,034	0,446	0,38	0,118	0,38	0,446
B2	0,001	0,001	0,064	0	0,001	0,439	0,162	0,38	0,414	0,431
B1	0,001	0,001	0,034	0,001	0	0,557	0,439	0,446	0,431	0,477
C1	0,477	0,431	0,446	0,439	0,557	0	0,001	0,034	0,001	0,001
C2	0,431	0,414	0,38	0,162	0,439	0,001	0	0,064	0,001	0,001
PLCD	0,446	0,38	0,118	0,38	0,446	0,034	0,064	0	0,064	0,034
D2	0,439	0,162	0,38	0,414	0,431	0,001	0,001	0,064	0	0,001
D1	0,557	0,439	0,446	0,431	0,477	0,001	0,001	0,034	0,001	0

G; INT	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	1	0,839	0,6	0,837	0,857	0,496	0,563	0,511	0,55	0,47
A2	0,839	1	0,673	0,885	0,837	0,563	0,593	0,446	0,582	0,55
PLAB	0,6	0,673	1	0,673	0,6	0,511	0,446	0,584	0,446	0,511
B2	0,837	0,885	0,673	1	0,839	0,55	0,582	0,446	0,593	0,563
B1	0,857	0,837	0,6	0,839	1	0,47	0,55	0,511	0,563	0,496
C1	0,496	0,563	0,511	0,55	0,47	1	0,839	0,6	0,837	0,857
C2	0,563	0,593	0,446	0,582	0,55	0,839	1	0,673	0,885	0,837
PLCD	0,511	0,446	0,584	0,446	0,511	0,6	0,673	1	0,673	0,6
D2	0,55	0,582	0,446	0,593	0,563	0,837	0,885	0,673	1	0,839
D1	0,47	0,55	0,511	0,563	0,496	0,857	0,837	0,6	0,839	1

p-hodnoty	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	0	0,001	0,021	0,001	0,001	0,077	0,097	0,064	0,091	0,173
A2	0,001	0	0,003	0,001	0,001	0,097	0,041	0,269	0,12	0,091
PLAB	0,021	0,003	0	0,003	0,021	0,064	0,269	0,001	0,269	0,064
B2	0,001	0,001	0,003	0	0,001	0,091	0,12	0,269	0,041	0,097
B1	0,001	0,001	0,021	0,001	0	0,173	0,091	0,064	0,097	0,077
C1	0,077	0,097	0,064	0,091	0,173	0	0,001	0,021	0,001	0,001
C2	0,097	0,041	0,269	0,12	0,091	0,001	0	0,003	0,001	0,001
PLCD	0,064	0,269	0,001	0,269	0,064	0,021	0,003	0	0,003	0,021
D2	0,091	0,12	0,269	0,041	0,097	0,001	0,001	0,003	0	0,001
D1	0,173	0,091	0,064	0,097	0,077	0,001	0,001	0,021	0,001	0

H; INT	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	1	0,698	0,691	0,704	0,837	0,483	0,645	0,687	0,645	0,509
A2	0,698	1	0,842	0,953	0,704	0,645	0,746	0,796	0,742	0,645
PLAB	0,691	0,842	1	0,842	0,691	0,687	0,796	0,858	0,796	0,687
B2	0,704	0,953	0,842	1	0,698	0,645	0,742	0,796	0,746	0,645
B1	0,837	0,704	0,691	0,698	1	0,509	0,645	0,687	0,645	0,483
C1	0,483	0,645	0,687	0,645	0,509	1	0,698	0,691	0,704	0,837
C2	0,645	0,746	0,796	0,742	0,645	0,698	1	0,842	0,953	0,704
PLCD	0,687	0,796	0,858	0,796	0,687	0,691	0,842	1	0,842	0,691
D2	0,645	0,742	0,796	0,746	0,645	0,704	0,953	0,842	1	0,698
D1	0,509	0,645	0,687	0,645	0,483	0,837	0,704	0,691	0,698	1

p-hodnoty	A1	A2	PLAB	B2	B1	C1	C2	PLCD	D2	D1
A1	0	0,001	0,001	0,001	0,001	0,184	0,002	0,001	0,003	0,166
A2	0,001	0	0,001	0,001	0,001	0,002	0,001	0,001	0,001	0,003
PLAB	0,001	0,001	0	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
B2	0,001	0,001	0,001	0	0,001	0,003	0,001	0,001	0,001	0,002
B1	0,001	0,001	0,001	0,001	0	0,166	0,003	0,001	0,002	0,184
C1	0,184	0,002	0,001	0,003	0,166	0	0,001	0,001	0,001	0,001
C2	0,002	0,001	0,001	0,001	0,003	0,001	0	0,001	0,001	0,001
PLCD	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0	0,001	0,001
D2	0,003	0,001	0,001	0,001	0,002	0,001	0,001	0,001	0	0,001
D1	0,166	0,003	0,001	0,002	0,184	0,001	0,001	0,001	0,001	0

Příloha 2: **b** Hodnoty pro model lineární regrese (udané hodnoty specifické růstové rychlosti jsou zprůměrovány z dvou hodnot pro každou teplotní úroveň), *označené vybrané hodnoty pro model lineární regrese.

Kmen *Micrasterias rotata* – Mariánský rybník

Mariánský rybník

teplota (°C)	růst.rychlost	A1xA2	A1xPLAB	A1xB2	A1xB1	A1xC1	A1xC2	A1xPLCD	A1xD2
24,3	0,1427	0,742	0,573	0,68	0,761	0,44	0,532	0,503	0,488
22,9	0,1376	0,83	0,599	0,749	0,702	0,513	0,48	0,507	0,515
21,8	0,0782	0,749	0,518	0,733	0,658	0,404	0,481	0,427	0,511
20,1	0,0909	0,697	0,513	0,647	0,855	0,387	0,473	0,449	0,484
18,8	0,0356	0,74	0,679	0,717	0,828	0,598	0,548	0,608	0,549

teplota (°C)	růst.rychlost	A1xD1	A2xPLAB	A2xB2	A2xC2	A2xPLCD	A2xD2	PLABxPLCD
24,3	0,1427	0,478	0,527	0,763*	0,528*	0,52	0,579	0,649
22,9	0,1376	0,568	0,69	0,851	0,492	0,455	0,496	0,428
21,8	0,0782	0,426	0,666	0,891	0,596	0,532	0,5	0,522
20,1	0,0909	0,38	0,603	0,898	0,62	0,56	0,654	0,389
18,8	0,0356	0,584	0,639	0,857	0,651	0,625	0,626	0,706

Kmen *Micrasterias rotata* – Alpy

Alpy

teplota (°C)	růst.rychlost	A1xA2	A1xPLAB	A1xB2	A1xB1	A1xC1	A1xC2	A1xPLCD	A1xD2
25,2	0,0178	0,801	0,745	0,774*	0,728	0,515	0,581	0,527*	0,594
23,7	0,0869	0,761	0,668	0,75	0,804	0,455	0,537	0,48	0,527
22,4	0,0618	0,645	0,405	0,609	0,723	0,371	0,497	0,38	0,547
20,9	0,1000	0,61	0,463	0,589	0,79	0,3	0,45	0,405	0,443
18,1	0,0640	0,613	0,481	0,614	0,749	0,461	0,505	0,461	0,515
16,1	0,0846	0,795	0,533	0,781	0,835	0,373	0,433	0,363	0,44
13,9	0,0285	0,839	0,6	0,837	0,857	0,496	0,563	0,511	0,55
12,3	0,0294	0,698	0,691	0,704	0,837	0,483	0,645	0,687	0,645

teplota (°C)	růst.rychlost	A1xD1	A2xPLAB	A2xB2	A2xC2	A2xPLCD	A2xD2	PLABxPLCD
25,2	0,0178	0,554	0,769*	0,823	0,654	0,543*	0,62	0,428
23,7	0,0869	0,489	0,795	0,865	0,561	0,51	0,56	0,405
22,4	0,0618	0,409	0,583	0,81	0,62	0,497	0,624	0,46
20,9	0,1000	0,303	0,548	0,82	0,486	0,511	0,495	0,663
18,1	0,0640	0,523	0,551	0,851	0,564	0,527	0,565	0,544
16,1	0,0846	0,363	0,533	0,91	0,482	0,44	0,526	0,417
13,9	0,0285	0,47	0,673	0,885	0,593	0,446	0,582	0,584
12,3	0,0294	0,509	0,842	0,953	0,746	0,796	0,742	0,858