

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra botaniky  
Obor: Algologie a ekologie řas



Diplomová práce

# **Tvarová dynamika křemičitých struktur u modelových populací chrysomonád (Synurophyceae)**

Bc. Martina Pichrtová

Praha 2009

Školitelka: RNDr. Yvonne Němcová, PhD.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně, s použitím citované literatury.

.....

Martina Pichrtová



*Synura petersenii*

# Summary

## Shape dynamics of silicate structures in experimental populations of chrysophytes (Synurophyceae)

The aim of the proposed diploma thesis was to analyze temperature and pH related shape variation in synurophyte silica scales. Four species were investigated – *Synura petersenii*, *S. echinulata*, *S. sphagnicola* and *Mallomonas tonsurata*. The strains were cultivated in 5 different temperature levels. Moreover, *S. petersenii* and *M. tonsurata* were grown in 4 (resp. 5) different pH levels, too.

The shape dynamics of the scales was investigated with application of landmark based geometric morphometric methods. The relative warps analysis described the overall shape and the main trends in morphological variation were depicted as deformation grids.

The effects of both cultivation temperature and pH on the scale shape were significant, although only a small proportion of the overall variation was explained by the particular regression models.

Moreover, the scale size of the investigated species decreased with increasing temperature (with the exception of *Synura echinulata*). These results are in agreement with the Atkinson's temperature rule which was formulated for the body size of ectotherms. The relationship between the size and pH was not explicit - the size of the scales decreased with increasing pH in *S. petersenii*, but increased in *M. tonsurata*.

Furthermore, the scale shape was also found to be related to the scale size. However, there was still a significant impact of temperature (or pH) on scale shape after separation of an allometric component of scale shape variation.

Finally, morphological disparity (=the extent of morf. variation) in different treatments was studied. The scales from the highest (or sometimes even the lowest) levels of experimental temperature were the most variable in their shapes. Similarly, high levels of disparity occurred also in suboptimal pH levels. These results suggest that prolonged exposition to extreme conditions may be interpreted as a consequence of environmental stress.

# Obsah

1.	<b>Předmluva</b> .....	1
2.	<b>Úvod</b> .....	3
2.1.	<b>Chrysomonády s křemičitými šupinami</b> .....	3
2.1.1.	Obecná charakteristika.....	3
2.1.2.	Ekologie a rozšíření.....	6
2.1.3.	Stručná charakteristika studovaných druhů.....	7
2.1.4.	Tvarová variabilita šupin.....	8
2.2.	<b>Teplota</b> .....	9
2.2.1.	Vliv teploty na velikost organismů.....	10
2.2.2.	Teplota jako stresový faktor.....	11
2.2.3.	Vliv teploty na výskyt a růst chrysomonád.....	12
2.2.4.	Vliv teploty na morfologii křemičitých struktur.....	13
2.3.	<b>pH</b> .....	14
2.3.1.	Vliv pH na chrysomonády.....	15
3.	<b>Materiál a metody</b> .....	18
3.1.	<b>Kultivační experimenty</b> .....	18
3.1.1.	Použité kultury.....	18
3.1.2.	Průběh experimentů.....	18
3.1.3.	Transmisní elektronová mikroskopie.....	20
3.2.	<b>Metody analýzy dat</b> .....	20
3.2.1.	Geometrická morfometrika.....	20
3.2.2.	Statistické analýzy.....	24
3.2.3.	Oddělení alometrické a nealometrické složky variability.....	25
3.2.4.	Míra tvarové variability (morfologická disparita).....	26
3.3.	<b>Velikost buněk</b> .....	26
4.	<b>Výsledky</b> .....	27
4.1.	<b>Teplotní pokusy</b> .....	27
4.1.1.	<i>Synura petersenii</i> .....	27
4.1.2.	<i>Synura echinulata</i> .....	33
4.1.3.	<i>Synura sphagnicola</i> .....	38
4.1.4.	<i>Mallomonas tonsurata</i> .....	43
4.2.	<b>pH pokusy</b> .....	48
4.2.1.	<i>Synura petersenii</i> .....	48
4.2.2.	<i>Mallomonas tonsurata</i> .....	53
4.3.	<b>Velikost buněk <i>Synura petersenii</i> v různých teplotách</b> .....	58
5.	<b>Diskuse</b> .....	59
5.1.	<b>Shrnutí a porovnání výsledků</b> .....	59
5.2.	<b>Morfologické trendy spojené se zkoumanými parametry</b> .....	59
5.3.	<b>Změna velikosti v závislosti na sledovaných parametrech</b> .....	63
5.4.	<b>Alometrická a nealometrická složka tvarové variability</b> .....	64
5.5.	<b>Morfologická disparita a stres</b> .....	66
5.6.	<b>Vliv symetrizace dat na proporci vysvětlené variability</b> .....	68
6.	<b>Shrnutí</b> .....	69
7.	<b>Použitá literatura</b> .....	70

# 1. Předmluva

Studium chrysomonád s křemičitými šupinami má u nás poměrně dlouhou tradici. Jedny z vůbec prvních fotografií šupin pozorovaných v transmisním elektronovém mikroskopu byly publikovány právě českým algologem profesorem Bohuslavem Fottem již v roce 1955. Řada rodů i druhů chrysomonád byla sice popsána již mnohem dříve, a to pomocí světelné mikroskopie, avšak právě elektronový mikroskop přinesl možnost výzkumů spojených s ultrastrukturou křemičitých šupin a ostnů, a tudíž se pozornost zájmu výzkumníků upřela především na šupinaté zástupce chrysomonád.

Od 50. let 20. století byly právě na základě morfologie šupin popsány desítky až stovky druhů a variet. Na taxonomické práce navázaly studie ekologické, jejichž autoři si všímali, v jakých podmínkách prostředí jsou jednotlivé druhy obvykle nacházeny. Ukázalo se, že některé druhy jsou hojné a časté, zatímco jiné mají poměrně úzká optima podmínek, ve kterých se vyskytují. V souvislosti s tím bylo diskutováno i možné využití těchto organismů jako bioindikátorů, dokonce i v rámci paleoekologických studií, neboť jejich křemičité struktury mají schopnost zachovat se v sedimentech jezer. Navíc, nashromážděné nálezy takřka z celého světa umožnily vynést hypotézy ohledně biogeografie jednotlivých druhů.

Stranou však nezůstaly ani experimentální obory – studie na modelových populacích chrysomonád přinesly cenné poznatky ohledně tvorby šupin a cyst, mechanismu příjmu oxidu uhličitého, růstu v různých pokusných podmínkách apod. Provedeny byly též první molekulárně fylogenetické studie, jejichž výsledky naznačují, že klasický systém založený výhradně na morfologii zcela neodpovídá skutečným příbuzenským vztahům.

Zároveň se objevují stále nové a nové otázky ohledně biologie chrysomonád a také nové metodické přístupy, které pomáhají na tyto otázky nacházet odpovědi. Přestože podle nalezené šupiny lze obvykle daný druh poměrně snadno určit, existuje v rámci šupin jednoho druhu poměrně značná tvarová variabilita. V posledních letech pronikají do výzkumů chrysomonád metody geometrické morfometrie, které umožňují studovat právě tvar vybraných struktur a jeho proměnlivost. Potenciál jejich využití je veliký, jak pro taxonomii, tak ekologii.

V této studii jsem se zaměřila na čtyři zástupce třídy Synurophyceae. Vybrala jsem kmeny tří druhů rodu *Synura* a jeden druh rodu *Mallomonas* a sledovala jsem, jak na tvar jejich šupin působí různá experimentální teplota a hodnota pH. Tyto dva faktory jsem zvolila proto, že se ukazují jako nejdůležitější pro výskyt a rozšíření jednotlivých druhů v přírodě.

Hlavní cíle mé diplomové práce lze tedy shrnout do několika bodů:

- popsat základní trendy morfologické variability šupin různých druhů chrysomonád
- zjistit, zda ekologické faktory prostředí (konkrétně teplota a pH) mají vliv na tvar šupin a pokud ano, tak příslušné morfologické trendy popsat
- zjistit, zda se v závislosti na studovaných parametrech mění také velikost šupin
- určit, zda je tvar šupin signifikantně ovlivněn danými faktory i po odstranění vlivu případného alometrického efektu
- na základě tvarové dynamiky šupin diskutovat ekologické preference studovaných druhů.

Na tomto místě bych ráda poděkovala především své školitelce Yvonne Němcové za vedení celé práce a za ochotu kdykoliv poradit a konzultovat nejrůznější nejasnosti. Moc si této pomoci vážím a uvědomuji si, že není zcela samozřejmá.

Dále mé veliké poděkování patří mým kolegům a kamarádům nejen z algologické laboratoře, ale i jiných pracovišť PřF UK. Díky za cenné rady, za pomoc při řešení nejrůznějších potíží, za podporu v boji s počítači i jinou technikou, za inspirativní nápady, povzbuzování, dlouhé debaty u piva i čaje, za skvělé exkurze a terénní cvičení a vůbec za spoustu legrace a nezapomenutelných zážitků.

Můj největší dík patří mé rodině, především mamince a babičce, za všestrannou podporu, nesmírnou obětavost, láskyplnou péči a vytvoření skvělého zázemí pro studium.

Děkuji také Vojtovi za jeho pochopení a trpělivost.

Díky všem, co si tuto práci přečetli, za jejich poznámky a připomínky.

Tato diplomová práce byla zpracovávána v souvislosti se dvěma projekty řešenými na algologickém pracovišti katedry botaniky PřF UK a z jejich prostředků byla také financována. Jednalo se o granty GAUK B BIO 137/2006 a grant GAČR 206/08/P281.

## 2. Úvod

### 2.1. Chrysomonády s křemičitými šupinami

#### 2.1.1. Obecná charakteristika

Chrysomonády jsou jednotlivě žijící či koloniální bičíkovci patřící do dvou tříd oddělení Heterokontophyta – Chrysophyceae a Synurophyceae (ANDERSEN 1987). Podobně jako ostatní zástupci tohoto oddělení mají dva nestejně bičíky – delší pětý a kratší hladký. Chloroplast získaly sekundární endosymbiózou - má čtyři obalné membrány, tylakoidy tvoří skupinky po třech a hlavním zásobním produktem je chrysolaminaran. Rovněž složení pigmentů je charakteristické - chlorofyl a, c,  $\beta$ -karoten, xantofyly a dominantní fukoxanthin, který u zástupců tříd Chrysophyceae a Synurophyceae způsobuje jejich typickou zlatavou barvu. Proto se o nich v česky psané literatuře obvykle hovoří jako o zlativkách (KALINA & VAŇA 2005).

Jedním z charakteristických znaků chrysomonád je přítomnost struktur tvořených polymery oxidu křemičitého. Chrysomonády mají schopnost endogenně vytvářet silifikovaná odpočívající stadia – stomatocysty. Navíc, někteří zástupci třídy Chrysophyceae (konkrétně se jedná o čeleď Paraphysomonadaceae) a všichni Synurophyceae mají povrch buňky pokrytý šupinami a ostny, rovněž endogenního původu. Křemičité struktury jsou klíčové pro druhovou determinaci, ke které se vzhledem k jejich malým rozměrům standardně používá elektronový mikroskop. Také se dobře zachovávají, a tudíž je možné je využít např. pro paleoekologické studie (SMOL 1995).

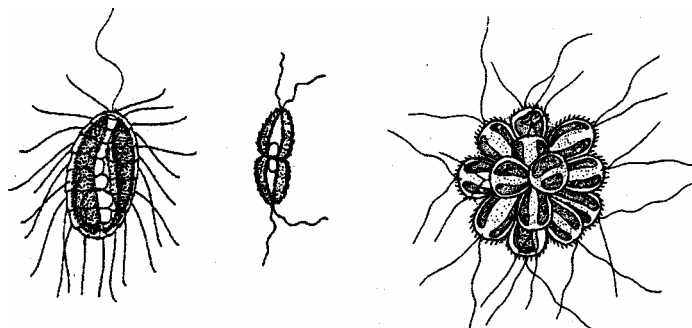
Křemičité struktury vznikají ve váčku SDV („silicon deposition vesicle“), který je u třídy Synurophyceae asociovaný s periplastidiálním endoplasmatickým retikulem. Formování šupiny se kromě PER účastní také cytoskelet. Hotové šupiny jsou poté vyloučeny na povrch buňky buď exocytózou a nebo tak, že se okolní protoplast stáhne z povrchu hotové šupiny (LEADBEATER & BARKER 1995). Co se týče tvorby zapojené schránky, existují dvě hypotézy, které se jí pokoušejí vysvětlit. Buď jsou hotové šupiny ještě uvnitř buňky nasměrovány na přesné místo a tam vyloučeny, nebo se nejprve dostávají ven a poté jsou posunovány po vnějším povrchu (SIVER & GLEW 1990).

Třída Synurophyceae byla od Chrysophyceae oddělena na základě některých biochemických a ultrastrukturálních znaků (ANDERSEN 1987). Později provedené molekulární

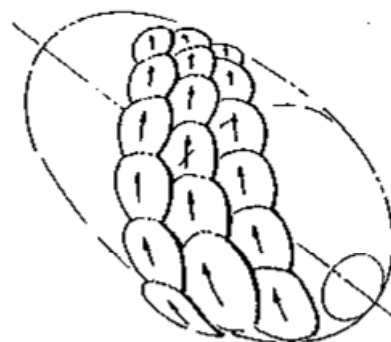


analýzy však nepřinesly jednoznačné výsledky ohledně oprávněnosti oddělení těchto skupin - kombinovaná analýza dvou genů tyto třídy sice oddělila, avšak se slabou podporou a otázka skutečných příbuzenských vztahů v rámci zlativek zůstává nadále nevyřešena (ANDERSEN 2007).

**Obr. 2.1:** Schematické vyobrazení zástupců tří rodů třídy Synurophyceae. Zleva: *Mallomonas*, *Chrysodidymus*, *Synura*. Převzato z KRISTIANSEN & PREISIG (2007).



Třída Synurophyceae zahrnuje čtyři rody šupinatých bičíkvců – po jednom druhu mají rody *Tessellaria* a *Chrysodidymus*, druhově mnohem početnější jsou rody *Mallomonas* a *Synura*, na které se tato práce zaměřuje (obr. 2.1). Jejich šupiny jsou obvykle heteropolární, uspořádané na buňce ve spirálních řadách a překrývají se jako tašky na střeše (Obr. 2.2) (SIVER & GLEW 1990, LEADBEATER & BARKER 1995). V místě, kde je šupina překryta šupinou sousední, se v její proximální části vytváří přehnutý okraj pokrytý adhezivní látkou, která šupiny drží pohromadě (SIVER & GLEW 1990, LEADBEATER & BARKER 1995, WETHERBEE et al. 1995). Překrytá bývá poměrně velká část povrchu šupiny (40-60 %), překryv může jít až přes V-žebro a část centrálního štítu (SIVER & GLEW 1990).



**Obr. 2.2:** Schematické znázornění uspořádání šupin na buňce *Mallomonas*. Každá šupina je překryta šupinou následující a také šupinami z vedlejší spirální řady (SIVER 1991).

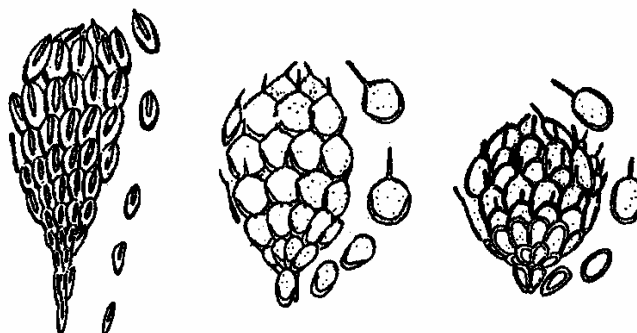
Průměrný počet šupin na buňku je druhově charakteristický (SIVER 1991). Každá šupina je tvořena bazální deskou, na jejímž vnějším povrchu se někdy vytváří sekundární vrstva (WEE 1997). Protože jsou chrysonomády planktonní organismy, jsou jejich šupiny konstruovány tak, aby byly co nejpevnější při co nejmenším obsahu křemíku a jejich přítomnost tak příliš nezvyšovala celkovou hustotu buňky. Proto je bazální deska často

perforovaná a nebo se (jako např. u *S. petersenii*) vytváří žebra, která zpevňují celkovou konstrukci a relativně tenká destička zůstane plochá (LEADBEATER & BARKER 1995).

*Mallomonas* je rod zahrnující jednotlivě žijící bičíkovce. Kromě šupin mívají zástupci tohoto rodu ještě křemičité ostny, které se však vytvářejí nezávisle a k šupinám jsou připojeny až v extracelulárním prostředí (BEECH et al. 1990). Ostny vznikají nejprve jako ploché útvary a později jsou srolovány do trubičky. Typické šupiny druhů ze sekce *Mallomonas* jsou tripartitní – rozdělené do tří částí – kromě dómu, na který nasedá osten, mají ještě centrální štít a okraj, které jsou od sebe odděleny tzv. V-žebrem (KRISTIANSEN 2002).

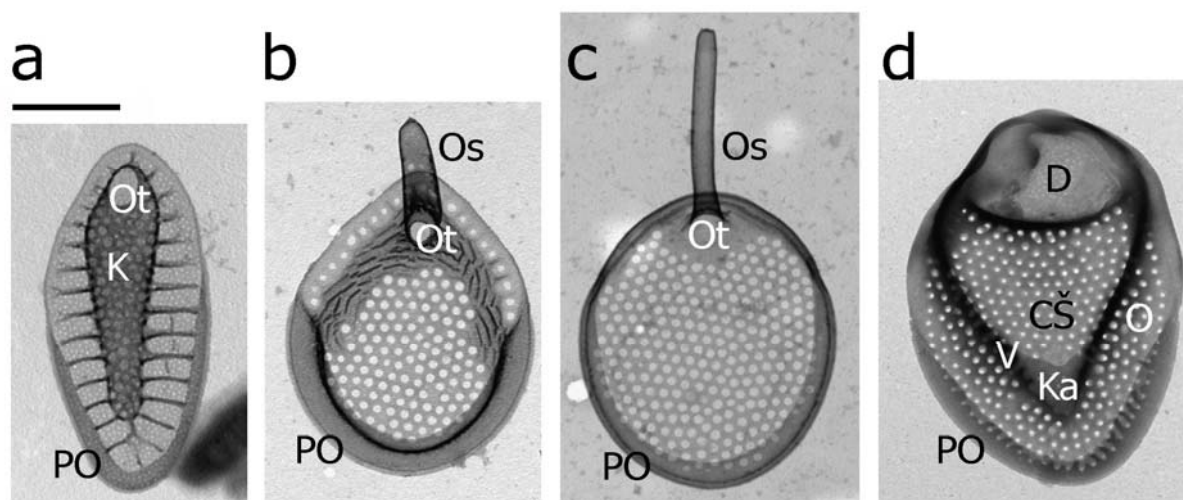
Do rodu *Synura* patří koloniální bičíkovci, jejichž buňky jsou spojeny svými posteriorními konci – buňka je v tomto místě kapkovitě protažená (obr. 2.3). Téměř všechny druhy mají na šupinách ostének, který u *S. petersenii* vytváří dorzální záhyb – kýl. Ostének je dutý a tak je na spodní straně šupiny v jeho místě otvor (KRISTIANSEN 2005).

Fotografie šupin studovaných druhů včetně vyznačených morfologických struktur, které jsou popisované v textu, jsou na obr. 2.4.



**Obr. 2.3:** Uspořádání šupin na buňkách tří druhů rodu *Synura*. Zleva: *S. petersenii*, *S. echinulata*, *S. sphagnicola*. Převzato z KRISTIANSEN & PREISIG (2007).

Obecně jsou šupiny chrysomonád považované za bilaterálně symetrické struktury, výjimečně mají některé druhy šupiny biradiální (*Tesselaria volvocina*, *Synura lapponica*). Navíc, na fotografiích z transmisního elektronového mikroskopu jsou šupiny zcela prozářené, takže není možné zjistit, zda se na ně díváme shora či zespoda, a tudíž nelze ani rozlišit levou a pravou stranu. Nicméně, u některých konkrétních typů šupin lze dvě odlišné strany přeci jen rozpoznat. Např. šupiny druhu *Synura petersenii* mívají asymetrický kýl a na obou stranách různě dlouhý okraj (obr. 2.4a). Typické tripartitní šupiny rodu *Mallomonas* jsou asymetrické díky přítomnosti asymetrického dómu. Zřetelně asymetrické bývají často apikální šupiny či například tzv. límcové šupiny u sekce *Torquatae* (KRISTIANSEN 2002).



**Obr. 2.4:** Šupiny zkoumaných druhů chrysomonád s vyznačenými základními morfologickými strukturami. a – *Synura petersenii*, tělová šupina; b – *Synura echinulata*, tělová šupina; c – *Synura sphagnicola*, tělová šupina; d – *Mallomonas tonsurata*, šupina s dómem. CŠ: centrální štít, D: dóm, K: kýl, Ka: kápě, O: okraj, Os: ostének, Ot: otvor v bazální desce, PO: přehnutý okraj, V: V-žebro. Dolní část šupin (lemovaná přehnutým okrajem) se nazývá proximální, opačný konec (s osténkem či dómem) je distální. Poměry velikostí jsou zachovány – měřítko odpovídá 1  $\mu\text{m}$ . Terminologie podle WEE (1997) a KRISTIANSEN (2002), české názvy dle NĚMCOVÁ (2000).

### 2.1.2. Ekologie a rozšíření

Obecně lze říci, že lokality s nejbohatší flórou chrysomonád bývají neutrální až mírně kyselé, s nízkou konduktivitou, alkalinitou a obsahem živin a s mírným množstvím rozpuštěných huminových kyselin (SIVER 1995). Nejdůležitějším parametrem určujícím rozšíření chrysomonád se ukazuje být pH (ROJACKERS & KESSELS 1986, SIVER & HAMER 1989). Důležitá je i teplota vody, která však na rozdíl od pH není klíčová pro globální rozšíření, ale spíše hraje roli v sezónním rozvoji. Neurčuje, zda se organismus bude v daném prostředí vyskytovat, ale v jakém množství (ROJACKERS & KESSELS 1986). Dalšími určujícími faktory jsou konduktivita a obsah živin (SIVER 1995). Co do počtu druhů i do biomasy jsou hojnější v oligotrofních nádržích (SIVER 1995), nicméně je možné je nalézt i ve vodách eutrofních (KRISTIANSEN 1988). Kromě základních živin, jako je dusík a fosfor, které bývají obvykle limitující, přichází u chrysomonád v úvahu ještě křemík. Avšak přestože právě křemík je podstatný pro tvorbu šupin a ostnů, bylo prokázáno, že chrysomonády dokáží přežít a růst i při jeho úplném nedostatku (KLAVENESS & GUILLARD 1975). Důležité jsou zřejmě i biotické faktory prostředí – SANDGREN & WALTON (1995) považují predční tlak ze strany zooplanktonu za zcela klíčový pro distribuci a vůbec biogeografii chrysomonád.

Jednotlivé druhy se liší svým výskytem – některé jsou kosmopolitní či široce rozšířené, jiné vázané na určité kontinenty či klimatické zóny. Kromě toho je známá i celá řada endemitů (KRISTIANSEN 2001, KRISTIANSEN & LIND 2005). Pravděpodobnost ubikvitního rozšíření vybraných chrysomonád diskutovali ŘEZÁČOVÁ & NEUSTUPA (2007).

### 2.1.3. Stručná charakteristika studovaných druhů

#### *Synura petersenii* (Obr. 2.4a)

Tělové šupiny druhu *S. petersenii* jsou obvykle protáhlé a v jejich prostřední části se podélně rozkládá dorsální hřeben, tzv. kýl, který může být zakončen drobným osténkem. Kýl je s okrajem šupiny spojen příčnými žebry, v proximální části šupiny se vytváří přehnutý okraj. Na posteriorní (kaudální) části buňky, kde se buňky protahují do stopečky, se nacházejí zadní šupiny, které jsou úzké a mají redukovanou strukturu (KRISTIANSEN & PREISIG 2007).

*Synura petersenii* se vyskytuje velmi hojně a kosmopolitně a navíc má širokou ekologickou valenci. Zároveň jsou její šupiny morfologicky značně variabilní. Proto bylo v rámci druhu popsáno již několik forem a variet (KRISTIANSEN & PREISIG 2007). Jejich taxonomické postavení je však zatím nejasné, pravděpodobně se jedná o druhový komplex (KYNČLOVÁ et al. subm.).

#### *Synura echinulata* (Obr. 2.4b)

Tělové šupiny koloniálního bičíkovce *Synura echinulata* jsou víceméně kulaté a obvykle nesou krátký silný zašpičatělý ostének. Proximální část šupiny je lemována přehnutým okrajem, distální část je pokryta labyrintózním vzorem. Dále je možné pozorovat tubulární apikální šupiny, protažené kaudální šupiny bez osténku a zcela zadní šupiny bez ornamentace (KRISTIANSEN & PREISIG 2007).

*S. echinulata* je široce rozšířená, téměř kosmopolitní (KRISTIANSEN & PREISIG 2007). Maximální frekvenci výskytu má sice v kyselých a chladných vodách (SIVER 1995), ale byla nalezena např. i v tropech (CRONBERG 1989) a eutrofních lokalitách (NĚMCOVÁ et al. 2003).

#### *Synura sphagnicola* (Obr. 2.4c)

*S. sphagnicola* má protáhle oválné šupiny s osténkem. Bazální deska je lemovaná nepřerušným přehnutým okrajem a jedinou ornamentací na povrchu šupiny jsou pravidelně

rozmístěné póry. Kromě tohoto převažujícího typu se na buňce vyskytují i kaudální šupiny (bez ostének) a tubulární apikální šupiny.

Jedná se o široce rozšířený druh vázaný na kyselé prostředí, typicky rašeliniště (KRISTIANSEN & PREISIG 2007). Navíc, preferuje teplejší vodu (SIVER 1995).

### *Mallomonas tonsurata* (Obr. 2.4d)

Vejčité buňky druhu *Mallomonas tonsurata* jsou pokryté třemi typy šupin. Zaprvé se jedná o šupiny s dómem, které jsou trochu asymetrické a nacházejí se pouze v přední části buňky. Šupiny z úplně první řady (přímo okolo bičíku) se nazývají apikální. Nesou jiný typ ostnů než ostatní šupiny s dómem (viz dále) a určité rozdíly se projevují i na morfologii dómu. Druhým typem jsou šupiny tělové, bez dómu. Třetím typem jsou malé zadní šupiny s drobným osténkem. Šupiny tohoto druhu mají bazální desku a sekundární vrstvu, která chybí na bázi V-žebra, kde se vytváří tzv. okénko. V obou vrstvách jsou navíc patrné póry (SIVER 1991, KRISTIANSEN 2002).

*Mallomonas tonsurata* vytváří 2 typy ostnů: apikální šupiny nesou krátké zoubkované ostny a tělové šupiny dlouhé hladké a bifurkální (SIVER 1991, KRISTIANSEN 2002).

Jedná se o druh kosmopolitní (KRISTIANSEN 2002), nacházený v širokém rozmezí teplot (SIVER 1991). Zároveň však preferuje lokality s vyšším pH (nad 7) (SIVER 1995).

### **2.1.4. Tvarová variabilita šupin**

Křemičité šupiny určitého druhu vykazují velikou morfologickou variabilitu v podstatě na všech úrovních – v rámci jedné buňky, v průběhu sezóny i mezi jednotlivými lokalitami (KRISTIANSEN 1979). Žádné 2 šupiny nikdy nevypadají úplně stejně. Zároveň však platí, že tvarová plasticita šupin je konstrukčně omezena – šupiny mají sice různý tvar a velikost, musí si ale zachovat svoji pevnost a musí být přesně včleněny mezi ostatní šupiny tvořící schránku (NĚMCOVÁ et al. in press).

Jen na jedné buňce může být přítomno několik typů šupin, které mohou být zřetelně odlišné. Avšak také šupiny jednoho typu mění svoji morfologii postupně vzhledem k pozici na buňce (SIVER 1991, KRISTIANSEN 2002). Právě variabilita šupin v závislosti na jejich umístění byla studována u druhu *Mallomonas kalinae* (NEUSTUPA et al. in press). Autoři zjistili, že hlavní tvarový trend souboru šupin je spojený jak s velikostí, tak s polohou. Nicméně, vztah mezi polohou a velikostí není lineární - největší šupiny se nacházejí

v prostřední části buňky. Navíc, poloha má vliv na tvar šupin i po odstranění vlivu velikosti (NEUSTUPA et al. in press). Také u druhu *Synura curtispina* je hlavní tvarová variabilita spojena s pozicí šupin na buňce (ŘEZÁČOVÁ-ŠKALOUDOVÁ et al. in press).

Co se týče mezipopulační variability, signifikantní rozdíl ve tvaru šupin *Mallomonas caudata* z různých lokalit potvrdili ŘEZÁČOVÁ & ŠKALOU (2005). NEUSTUPA & NĚMCOVÁ (2007) zkoumali tvarovou variabilitu přírodních populací *Mallomonas striata*. Míra variability byla větší v datovém souboru šupin z celého světa než v rámci jedné populace, což může znamenat, že na ní mají významný podíl různé hodnoty ekologických parametrů, které se v rámci celého světa odlišují více než v podmínkách jednoho rybníka. Vliv dvou klíčových faktorů vodního prostředí – teploty a pH na variabilitu šupin jsem se rozhodla podrobně studovat ve své diplomové práci.

### 2.2. Teplota

Teplota vody je důležitým ekologickým faktorem, který působí na živé organismy a určuje a ovlivňuje jejich rozšíření, chování a metabolismus. Různé organismy mívají různá teplotní optima, v určitém rozsahu teplot jsou schopny růst a rozmnožovat se, v ještě širším pak mohou alespoň po omezenou dobu přežít. Většina řas má své teplotní optimum (vyjádřené maximální růstovou rychlostí) mezi 15 a 25 °C (BRÖNMARK & HANSSON 2005).

Voda představuje teplotně poměrně stabilní prostředí bez výrazného kolísání. Důvodem je (ve srovnání s jinými látkami) velká tepelná kapacita vody. Diurnální i sezónní teplotní výkyvy, které mohou být v okolním terestrickém prostředí velmi výrazné, jsou tak ve vodě podstatně sníženy, především tedy ve velkých a hlubokých vodních tělesech (BRÖNMARK & HANSSON 2005).

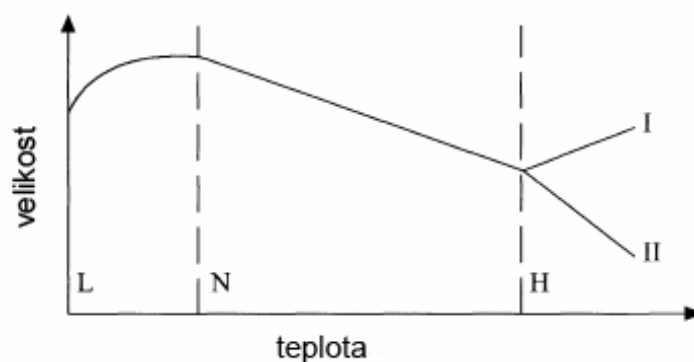
S teplotou jsou těsně spojeny i další vlastnosti vody a vodního prostředí. Například hustota vody závisí na teplotě, což je mimo jiné příčinou teplotní stratifikace, ke které dochází ve větších jezerech a nádržích. Tento jev má klíčový vliv na fungování celého ekosystému stojatých vod. Podobně i viskozita vody souvisí s teplotou. Voda má sice ve srovnání s jinými kapalinami relativně malou viskozitu, ale pro malé organismy jako je plankton představuje velmi viskózní prostředí. S rostoucí teplotou viskozita klesá, což na jednu stranu usnadňuje pohyb, avšak zároveň se zvyšuje rychlost klesání planktonu ve vodním sloupci (LAMPERT & SOMMER 1997).

Teplota vody rovněž ovlivňuje rozpustnost plynů (např. O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>), jejichž dostupnost je pro přežití vodních organismů klíčová. Platí, že chladná voda obsahuje více rozpuštěných plynů než teplá (LAMPERT & SOMMER 1997).

Schopnost organismu žít pouze v určitém teplotním rozmezí je daná vlivem teploty na jeho metabolismus. Příliš vysoká teplota narušuje membrány a stabilitu bílkovin, řada enzymů přestává fungovat. Reakční rychlost různých chemických, biochemických či fyziologických procesů s teplotou nejprve stoupá, až do dosažení optima (LAMPERT & SOMMER 1997). Se zvyšující se teplotou roste také specifická růstová rychlost populací, a to až do bodu, kdy je dosaženo maximum, poté rychlost opět klesá (REYNOLDS 2006).

### 2.2.1. Vliv teploty na velikost organismů

Významný vztah byl objeven také mezi teplotou a velikostí organismů. ATKINSON (1994) vysledoval u různých ektotermních organismů, že se zvyšující se teplotou dochází ke zmenšování jejich těl. Nicméně, v extrémně nízkých, subletálních teplotách vede další snížení teploty naopak ke zmenšení velikosti. Na druhou stranu v extrémně vysoké teplotě reagují organismy různě – zvětšením i zmenšením svého objemu (obr. 2.5). Toto pravidlo („temperature size rule“, „TSR“) bylo dále podrobněji prozkoumáno u protistních organismů (ATKINSON et al. 2003). Metaanalýzou publikovaných dat zjišťovali autoři závislost objemu buňky na teplotě (mimo teplotní extrém). Ukázalo se, že tento inverzní vztah je skutečně lineární a obecně platný, i když výjimky existují. Je nezávislý na taxonomické skupině, způsobu výživy i na typu habitatu (dle salinity). Autoři vypočítali, že průměrně na každý 1 °C změni protistní organismy svůj objem o cca 2,5 % objemu, jaký mají při 15 °C.



**Obr. 2.5:** Závislost maximální velikosti na kultivační teplotě u ektotermních organismů – obecný vztah. V extrémně nízkých teplotách (zóna L) velikost roste s teplotou. V běžném rozsahu teplot, se kterými se organismus setkává v přírodě (N), je vztah inverzní. V extrémně vysokých teplotách (H) je možné očekávat různé typy odpovědí (ATKINSON et al. 2003).

ATKINSON et al. (2003) navrhuji hned několik hypotéz, které by tento jev mohly vysvětlovat. Nabízí se například adaptace na klesání. Jak již bylo zmíněno, teplejší voda je méně viskózní, rychlost poklesu je tudíž větší a menší objem buňky klesání zpomalí. Zmíněná hypotéza by dobře vysvětlila adaptaci u planktonních organismů, ale Atkinsonovo pravidlo je mnohem obecnější, platí napříč různými ektotermními organismy a na ně toto vysvětlení už použít nelze (ATKINSON 1994).

Pravděpodobná je proto jedna z následujících dvou hypotéz. První souvisí s příjmem látek z okolí. V teplejší vodě je méně rozpuštěných plynů ( $O_2$ ,  $CO_2$ ), naproti tomu metabolické procesy jsou rychlejší a poptávka po nich větší. Malá buňka má relativně větší poměr povrchu ku objemu a také translokace živin uvnitř buňky je snazší, rychlejší (REYNOLDS 2006). Pro tuto hypotézu hovoří i výsledky jedné ze studií zahrnutých do analýz v práci ATKINSONA et al. (2003): THOMPSON et al. (1992) pozorovali opačnou závislost teploty a velikosti u rozsivky *Phaeodactylum tricornutum* – její objem rostl s teplotou. Tato studie se ale lišila od ostatních tím, že ve vyšších teplotách bylo médium probubláváno vzduchem, a tudíž zde vlastně chyběla zmíněná limitace nedostatkem  $CO_2$  (ATKINSON et al. 2003).

Druhá možnost vychází z evoluční teorie. Ve velké populaci existuje selekce na časnou reprodukci. Menší velikost by tedy odrážela časné dělení buněk jako adaptaci na zvyšující se růst populace (ATKINSON et al. 2003). Tuto hypotézu by podporovaly výsledky studie na řase *Micrasterias rotata* (NEUSTUPA et al. 2008), ve které se ukázalo, že zmiňovaná krásivka má ve vyšších teplotách mělčí zářezy. Tedy, při selekci na časnou reprodukci by se buňka dělila co nejdříve, a proto by morfogeneze nebyla zcela dokonalá a zářezy mezi laloky by tedy nebyly dostatečně hluboké (NEUSTUPA et al. 2008). Zároveň tyto výsledky popírají první hypotézu – mělčí laloky znamenají menší poměr povrchu ku objemu.

### 2.2.2. Teplota jako stresový faktor

Organismy vystavené podmínkám ležícím za hranicí pro ně běžných hodnot ekologických faktorů prostředí (environmentálnímu stresu) vykazují zvýšenou fenotypickou plasticitu. Ta může být způsobena zásadním poškozením fyziologických funkcí a narušením správného vývoje. Také se však může jednat o projev skryté genetické variability, která není za normálních podmínek exprimována. Tím se zvýší pravděpodobnost, že alespoň malá část jedinců, kteří vykazují právě fenotyp vhodný pro nové podmínky, přežije a bude se dále rozmnožovat (shrnutí v GHALAMBOR et al. 2007). Zvýšení fenotypické variability



v extrémních teplot (jak vysoké, tak nízké) jako důsledek působení stresu již bylo pozorováno např. u octomilek (IMASHEVA et al. 1997).

Na krásivce *Micrasterias rotata* se extrémně vysoká kultivační teplota (30 °C) projevila tvorbou aberantních buněk (vegetativních diploidů) se zmnoženými laterálními laloky. Vysoká teplota tedy zřejmě vedla k narušení procesu mitózy a ontogeneze. Normální (haploidní) buňky z této teploty byly také tvarově nejodlišnější od všech buněk v ostatních experimentálních teplotách (NEUSTUPA et al. 2008).

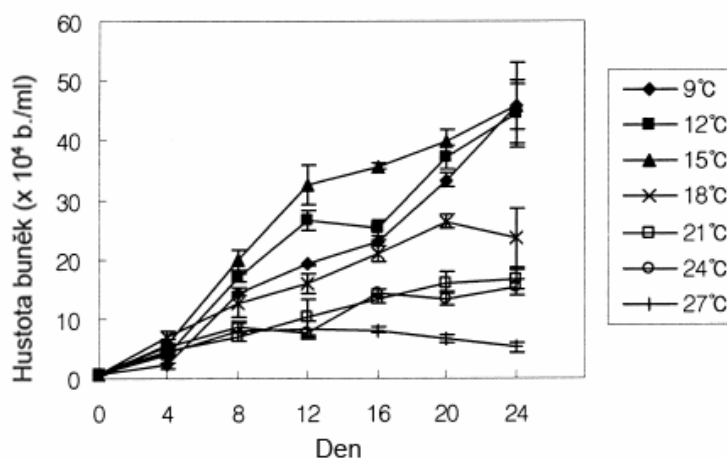
Abnormální morfologie byla též pozorována u antarktických makrořas *Geminocarpus geminatus* a *Cladophora repens* pěstovaných v 8, resp. 12 °C, což byly nejvyšší teploty, kdy tyto řasy vůbec mohly růst (MCKAMEY & AMSLER 2006).

### 2.2.3. Vliv teploty na výskyt a růst chrysomonád

Chrysomonády lze v přírodě nalézt v širokém rozmezí teplot. Např. SIVER (1991), který shrnul literární údaje o nálezích druhů rodu *Mallomonas*, uvádí jejich výskyt v teplotním rozmezí 0-31 °C. Často vykazují největší biomasu brzy na jaře po roztátí ledu, kdy jsou teploty hodně nízké. Tento jev lze vedle přímého vlivu teploty vysvětlit i zvýšeným osvětlením, koncentrací živin či malým predačním tlakem (SIVER 1995).

Řada laboratorních experimentů ukázala, že optimální teplota, při níž kultury dosahují nejvyšší růstové rychlosti, bývá obvykle vyšší než teplota, při které se hojně populace vyskytují běžně v přírodě. U *S. petersenii* byla nejvyšší růstová rychlost naměřena při teplotě 20 °C, při nižší i vyšší teplotě došlo k poklesu (MARTIN-WAGENMANN & GUTOWSKI 1995, SAXBY-ROUEN et al. 1997). Nicméně, v jiné studii 3 různé kmeny *S. petersenii* izolované z různě teplé vody dosahovaly největší růstové rychlosti shodně při 15 °C (KIM et al. 2008), obr. 2.6.

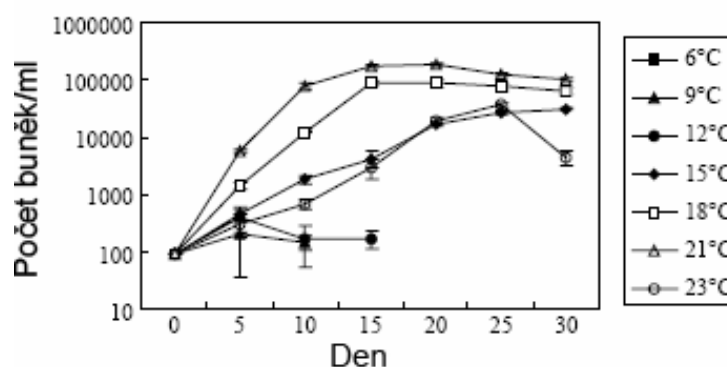
**Obr. 2.6:** Růstové křivky jednoho ze studovaných kmenů druhu *Synura petersenii* při různých teplotách. Podle KIM et al. (2008).



*Synura sphagnicola*, která byla izolována z vody teplé 7-8 °C, kde tvořila výrazný vegetační zákal, dosahovala maximální růstové rychlosti při malé ozářenosti v 10 °C a při velké v 17 °C (HEALEY 1983).

Studované druhy mallomonád také v kultuře vykazovaly vyšší teplotní optimum (18-21 °C) než by odpovídalo původním lokalitám, odkud byly izolovány (11,1-17,8 °C) (LEE & KIM 2007). (Obr. 2.7) K podobnému závěru u *Mallomonas tonsurata* dospěla i GUTOWSKI (1996) – jako optimální uvádí teplotu 20 °C.

**Obr. 2.7:** Růstové křivky druhu *Mallomonas tonsurata* při různých teplotách. Podle LEE et al. (2007).



#### 2.2.4. Vliv teploty na morfologii křemičitých struktur

Morfologie křemičitých šupin a ostnů je také prokazatelně ovlivněna teplotou. Například s ní souvisí typ ostnů u druhu *Mallomonas crassisquama*. Ve vodě chladnější než 12 °C lze najít zástupce se serátními ostny, naopak v teplotách nad 15 °C se vyskytují jedinci s ostny helmicovitými. Oba dva typy najednou můžeme nalézt v rozmezí teplot 9-20 °C. Možným vysvětlením může být přizpůsobení měnící se viskozitě vody, která klesá s rostoucí teplotou. Helmiovité ostny jsou totiž delší a strukturně složitější než serátní a mohou tak lépe zabránit klesání buňky ve vodním sloupci při nižších hodnotách viskozity (SIVER & SKOGSTAD 1988).

V laboratorních podmínkách bylo také zjištěno, že šupiny *Mallomonas tonsurata* se se vzrůstající teplotou zkracují, zatímco jejich šířka zůstává stejná. S teplotou se rovněž zvětšuje plocha dómu a při teplotě 20 °C má také největší počet šupin plně vyvinutou sekundární vrstvu (GUTOWSKI 1996).

Každý ze 3 kmenů *Synura petersenii* reagoval na změnu teploty odlišně (MARTIN-WAGENMANN & GUTOWSKI 1995). Pouze jeden ze tří studovaných kmenů měl ve vyšší teplotě signifikantně kratší šupiny. Jiný kmen (morfologií jako jediný odpovídající *Synura petersenii* f. *petersenii*) měnil obrys – ve vyšší teplotě byly šupiny zřetelně oválnější. Třetí

z kmenů naproti tomu vykazoval prodlužování přehnutého okraje (MARTIN-WAGENMANN & GUTOWSKI 1995).

Plasticita tvaru křemičitých šupin byla již studována také pomocí metod landmarkové geometrické morfometriky. NĚMCOVÁ et al. (in press) kultivovali druh *Synura echinulata* na zkříženém gradientu teploty a osvětlení. Všechny čtyři skupiny se od sebe signifikantně lišily, avšak skupina z nízké teploty i osvětlení byla tvarově zcela nejodlišnější, její šupiny byly také nejmenší a ještě vykazovaly největší morfologickou disparitu. Protože se v těchto kultivačních podmínkách objevily i cysty, dá se předpokládat působení environmentálního stresu (NĚMCOVÁ et al. in press).

ŘEZÁČOVÁ-ŠKALOUDOVÁ et al. (in press) studovali vliv teploty na morfologickou variabilitu šupin druhů *Mallomonas kalinae* a *Synura curtispina*. Šupiny *M. kalinae* byly v krajních teplotách (10, 25 a 30°C) tvarově podobné – kulatější, zatímco ve středních hodnotách pokusných teplot byly spíše protažené. Dóm byl v nejnižší teplotě zřetelně menší. U *S. curtispina* bylo se zvyšující se teplotou pozorované protažení šupin do oválného tvaru. Také se zkracoval přehnutý okraj, tudíž distální část šupiny pokrytá sekundární vrstvou zasahovala dále. U obou druhů bylo též prokázáno zmenšování šupin s rostoucí teplotou.

### 2.3. pH

Dalším významným faktorem prostředí, který působí na chemii vody a tím i na organismy v ní žijící, je pH. Navíc, toto ovlivňování je vzájemné – činnost organismů zároveň mění pH prostředí. Je však těžké odlišit od sebe přímý a nepřímý vliv pH (LAMPERT & SOMMER 1997).

Protože pH je definováno jako záporný dekadický logaritmus koncentrace iontu  $\text{H}_3\text{O}^+$ , je zřejmé, že jeho hodnota vyjadřuje přítomnost a poměry jednotlivých iontů, jejich dostupnost a reaktivitu. Pro správné fungování enzymů je důležitý určitý rozsah pH ve vnitrobuněčném prostředí, který buňka udržuje tím obtížněji, čím větší jsou výchylky v okolí. Typické acidofilní organismy mají mechanismy, jak udržet uvnitř buňky neutrální pH i v extrémně kyselém prostředí (RAI & GAUR 2001).

Nepřímý efekt změny pH se projevuje na dostupnosti živin nezbytných pro buňku. Především je zde silná vazba na dostupné formy anorganického uhlíku.  $\text{CO}_2$  se dobře rozpouští ve vodě, kde částečně zůstává volný a částečně tvoří kyselinu uhličitou. Oxidu uhličitého je díky této reakci ve vodě vlastně více než teoreticky dle Henryho zákona, který obecně určuje rozpustnost plynů (LAMPERT & SOMMER 1997). Se zvyšujícím se pH klesá

podíl volného  $\text{CO}_2$  (nebo  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) a přibývá podíl hydrogenuhličitanového aniontu. Při ještě vyšším pH se anorganický uhlík nachází ve formě uhličitanového aniontu. Tento systém je ovlivněn fotosyntézou a respirací. Jak je  $\text{CO}_2$  odebírán rostlinami pro fotosyntézu, rovnováha se posouvá směrem k hydrogenuhličitanům a uhličitanům a pH stoupá. Je-li i  $\text{HCO}_3^-$  zcela vyčerpán, může pH stoupnout dokonce až na stupeň 11 (REYNOLDS 2006).

V přírodě tak může během dne (spolu se změnou intenzity fotosyntézy) docházet k rozsáhlému kolísání pH. Tomuto nebezpečí jsou vystaveny především lokality s nízkou alkalinitou – kyselinovou neutralizační kapacitou. Naopak velkou alkalinitu vykazují typicky lokality na vápencovém podloží. Systém uhličitan-hydrogenuhličitan-kyselina uhličitá zde funguje jako pufr, který i přes změnu obsahu  $\text{H}^+$  udrží pH vody. Čím více je ve vodě vápníku, tím více zůstává  $\text{H}_2\text{CO}_3$  (LAMPERT & SOMMER 1997, BRÖNMARK & HANSSON 2005).

Hodnota pH je kromě fotosyntézy a respirace ovlivněna ještě dalším biologickým procesem – asimilací dusíku. Když řasy odebírají amonný kation, ekvivalentní množství protonů musí být uvolněno; když přijímají nitráty, protony musí být naopak odebrány. Při pH nad 10,5 ve vodě převažuje toxický amoniak nad neškodným amonným kationtem, což může vést až k hromadnému úhynu ryb. Podobný vztah mezi příjmem živin a pH platí i pro jiné ionty, nicméně tyto procesy jsou z kvantitativního hlediska zcela minoritní (LAMPERT & SOMMER 1997).

Dostupný fosfor se ve vodě vyskytuje v podobě tří forem kyseliny ortofosforečné, jejichž zastoupení je ovlivněno právě pH (REYNOLDS 2006). Kromě toho může fosfor tvořit sloučeniny s různými kovy. Při hodnotách pH nižších než 8 jsou fosfáty pevně vázány ve sloučeninách, avšak při vyšším pH jsou fosfáty nahrazeny hydroxidovými anionty a uvolněny do vody (BRÖNMARK & HANSSON 2005). Podobně kyselina monokřemičitá ( $\text{H}_4\text{SiO}_4$ ) čili rozpustný reaktivní křemík se vyskytuje pouze v pH pod 9 (REYNOLDS 2006).

Řada kovů může být v určitých formách dokonce toxická. Rozpustnost Fe, Cu, Zn, Ni, Pb a Cd stoupá s klesajícím pH, u Va a Hg platí vztah opačný. Hlavní problém způsobuje toxicita hliníku v kyselém prostředí, protože se jedná o poměrně častý prvek v zemské kůře. Nebezpečný je ve formě kationtu  $\text{Al}^{3+}$  (LAMPERT & SOMMER 1997).

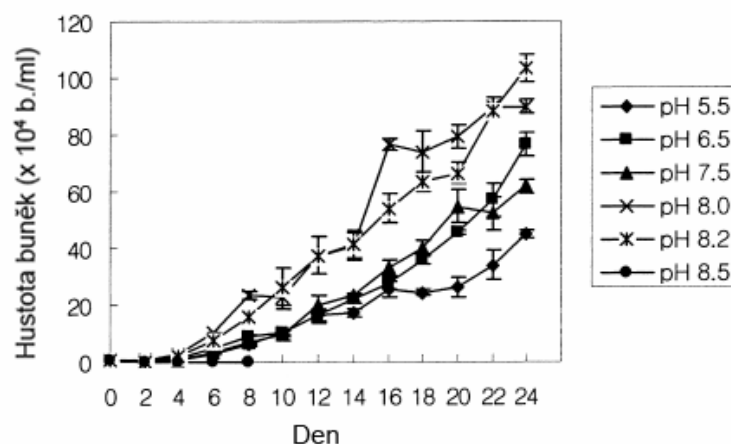
### 2.3.1. Vliv pH na chrysomonády

Jak již bylo zmíněno, pH je zásadním faktorem určujícím distribuci chrysomonád. Podstatou tohoto vlivu je zřejmě právě zastoupení jednotlivých forem uhlíku. SAXBY-ROUEN

et al. (1998) pomocí kultivačních experimentů dokázali, že inhibice růstu *Synura petersenii* ve vyšších hodnotách pH není způsobena pH jako takovým, nýbrž právě dostupností CO<sub>2</sub>. BHATTI & COLMAN (2005, 2008) důkladně prověřili fyziologické charakteristiky dalších druhů chrysomonád. Potvrdili, že vykazují vlastnosti řadící je mezi organismy s difuzním příjmem CO<sub>2</sub> na základě gradientu pH mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím. Naopak postrádají schopnost přímého příjmu hydrogenuhličitanů a nemají ani externí karbonickou anhydrázu, která by umožnila využití hydrogenuhličitanů v neutrálním pH (BHATTI & COLMAN 2005, 2008). Nicméně nadále zůstává otázka, zda významný vliv pH na chrysomonády souvisí pouze s dostupností uhlíku, nebo třeba i s dalšími metabolickými funkcemi, např. aktivitou enzymů či změnou vlastností membrán (SIVER 1995).

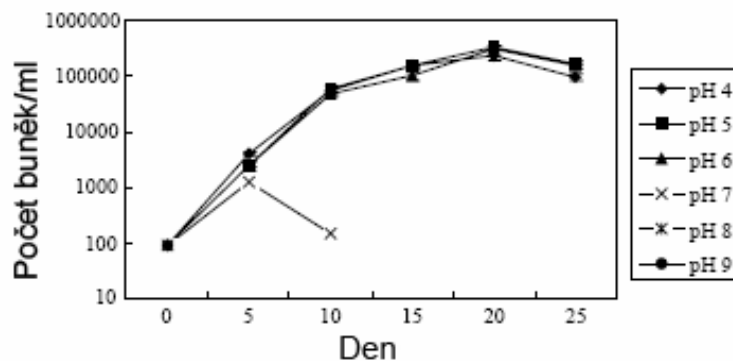
Podobně jako u teploty byl také vliv pH na růstovou rychlost studován v laboratorních podmínkách. Hned několik nezávislých experimentů bylo provedeno na druhu *Synura petersenii*. WEE et al. (1991) studovali morfologicky odlišné kmeny v pH od 5,5 do 8,5. Všechny kultury vykazovaly pozitivní růst, každý z kmenů však dosahoval nejvyšší růstové rychlosti v jiném pH (5,5; 6,5; 7,5). SAXBY-ROUEN et al. (1997) zjistili, že jimi vybraný kmen má růst ohraničený hodnotami 3,3-3,9 a 8-8,4. Růstová rychlost byla hodnotou pH značně ovlivněna – maxima dosahovala při hodnotách mezi 5,5 a 6,5. GAVRILOVA et al. (2005) uvádí inhibici růstu u *S. petersenii* při hodnotách 4,5 a 9,5. Další studie na jiných kmenech *S. petersenii* pak ukázala maximální růstové rychlosti při pH 7,5 až 8,2, v pH 8,5 již nebyl pozorován růst u žádného z pokusných kmenů (KIM et al. 2008), obr. 2.8.

**Obr. 2.8:** Růstové křivky jednoho ze studovaných kmenů druhu *Synura petersenii* v různém pH. Podle KIM et al. (2008).



LEE & KIM (2007) uvádějí růst kultur druhů *Mallomonas acaroides*, *M. caudata* a *M. areolata* mezi hodnotami pH 4 a 9. Maximální rychlosti bylo u prvních dvou uvedených dosaženo při pH 6, tři odlišné kmeny druhu *Mallomonas caudata* vykazovaly významné

rozdíly – největší růst byl pozorován v rozmezí hodnot pH 5-7. Druhy *M. elongata*, *M. crassisquama* a *M. tonsurata* ve studii LEE et al. (2007) vykazovaly nejvyšší růstovou rychlost a největší populační hustotu v pH 5-6 (Obr. 2.9).



**Obr. 2.9:** Růstové křivky druhu *Mallomonas tonsurata* v různém pH. Podle LEE et al. (2007).

Měřena byla také rychlost fotosyntézy. U druhů *Synura petersenii* a *S. uvella* byla nejvyšší mezi pH 5 a 6,5, ve vyšším pH značně poklesla (BHATTI & COLMAN 2008). *M. papillosa* má největší rychlost fotosyntézy při pH 6 (BHATTI & COLMAN 2005).

Hodnota pH však nemá vliv pouze na růstovou rychlost, ale i na morfologii šupin. GAVRILOVA (2005) provedla morfometrickou analýzu šupin řasy *S. petersenii*, která byla kultivována při různých pH. Stres způsobený extrémní kyselostí či zásaditostí média se projevil poškozením šupin, které byly slabě silifikované, nepravidelné, kým byl zkrácený, zmnožený či jinak deformovaný.

## 3. Materiál a metody

### 3.1. Kultivační experimenty

#### 3.1.1. Použité kultury

Pro experimenty jsem použila klonální kultury druhů *Synura petersenii*, *S. echinulata*, *S. sphagnicola* a *Mallomonas tonsurata*, které byly izolovány z přírodních vzorků. Detaily ohledně jejich izolace jsou uvedeny v tabulce 3.1. Izolace byla provedena pomocí tenké skleněné pipety pod světelným mikroskopem. Vždy jedna buňka (popř. kolonie) byla pročištěna v sérii kapek sterilního média a poté vstříknuta do komůrky sérologické destičky, kde se kultura nechala narůst a poté byla přenesena do Erlenmayerovy baňky o objemu 50 ml.

Druh	Datum	Popis lokality	Teplota	pH	Izolovala
<i>S. petersenii</i>	9.2.2007	lesní tůň u Mezní Louky	1,9 °C	4,2	M. Pichrtová
<i>S. echinulata</i>	9.2.2007	lesní tůň u Mezní Louky	1,9 °C	4,2	M. Pichrtová
<i>S. sphagnicola</i>	10.7.2006	Břehyně – odvodňovací kanál	-	3,6	Y. Němcová
<i>M. tonsurata</i>	16.11.2007	rybník Praha-Petrovice	-	7,4	M. Pichrtová

**Tab. 3.1:** Shrnutí údajů ohledně izolace použitých kultur z přírody. Při dvou z uvedených odběrů nebyla měřena teplota, ale petrovický rybník, odkud byl izolován *M. tonsurata*, byl v době odběru téměř zamrzlý.

Ke kultivaci bylo použito modifikované médium DY IV (ANDERSEN 1997, ŘEZÁČOVÁ 2003). Příprava tohoto média obnáší smíchání uvedeného množství látek (Tab. 3.2) v 950 ml destilované vody, následné doplnění objemu na 1 litr a sterilizaci v autoklávu. Pouze vitaminy se přidávají až úplně na konec, po sterilizaci. Rozpis přípravy zásobních roztoků stopových prvků a vitaminů je uveden v tabulkách 3.3 a 3.4.

#### 3.1.2. Průběh experimentů

Pro účely teplotního pokusu byly příslušné kultury naočkovány do sérologických destiček. Na počátku experimentu bylo v každé komůrce 3-5 kolonií, respektive cca 10 buněk v případě rodu *Mallomonas*. Jedna z pokusných destiček je zobrazena na obr. 3.1. Samotná

experimentální kultivace probíhala v lednici s termostatem, kde se nacházejí samostatně nastavitelné boxy. Prostor lednice je osvětlen zářivkou Osram Fluora L 18W/77. Zvolila jsem experimentální teploty 5, 10, 15, 20 a 25 °C a střídavý světelný cyklus: 16 hodin světla (ozáření 35  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a 8 hodin tmy. Pokusy byly ukončeny po 20-30 dnech, kdy byly populace dost husté a dobře narostlé. Před dalším zpracováním jsem obsah jednotlivých komůrek (mimo kontaminovaných a takových, kde populace viditelně nenarostla) slila do jedné zkumavky.

Množství	Chemikálie	Zásobní roztok
1,0 ml	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5,0 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O
1,0 ml	KCl	0,3 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O
1,0 ml	NH <sub>4</sub> Cl	0,268 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O
1,0 ml	NaNO <sub>3</sub>	2,0 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O
1,0 ml	$\beta$ -glycerolfosfát	0,216 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O
1,0 ml	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,08 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O
1,0 ml	Na <sub>2</sub> EDTA	0,7g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O
1,0 ml	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	0,6 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O
1,0 ml	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,166 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O
1,0 ml	CaCl <sub>2</sub>	7,5 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O
243 mg (200 mg)	HEPES (MES)	-
1,0 ml	stopové prvky	
1,0 ml	vitamínový roztok	

**Tab. 3.2:** Chemikálie na přípravu média DY IV. Nejprve se připraví zásobní roztoky a pak je přidán 1 ml každého roztoku do média o výsledném objemu 1 l (ŘEZÁČOVÁ 2003).

Množství	Chemikálie
31,4 mg	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O
4,5 mg	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O
1,46 mg	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O
2,35 mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O
0,13 mg	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>
0,27 mg	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>

**Tab. 3.3:** Návod na přípravu zásobního roztoku stopových prvků. Uvedené množství se rozpustí v 10 ml destilované vody. Nakonec se dílčí roztoky smíchají a doplní destilovanou vodou na konečný objem 100 ml (ŘEZÁČOVÁ 2003).

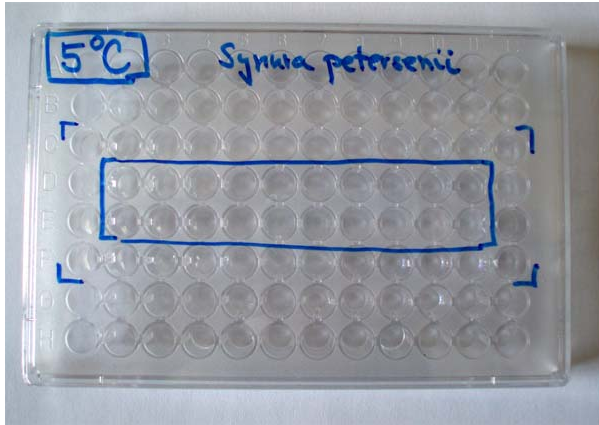
Množství	Chemikálie	Zásobní roztok
1,0 ml	B <sub>12</sub>	0,5 g/l dest. H <sub>2</sub> O
10,0 mg	Thiamin HCl	-

**Tab. 3.4:** Návod na přípravu vitamínového roztoku. Uvedené množství se přidá do 80 ml destilované vody a poté se doplní na konečný objem 100 ml (ŘEZÁČOVÁ 2003).

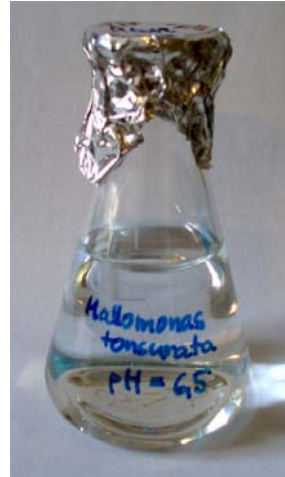
Kultivace v různém pH probíhala v Erlenmayerových baňkách o objemu 50 ml. Médium DY IV obsahovalo pufr HEPES (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S ½ Na) pro pH 7,5 a 8,5 nebo MES (C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>S H<sub>2</sub>O) pro 4,5; 5,5 a 6,5. Reakce média byla upravena přidáním 0,1M roztoku HCl či NaOH.



Rovněž během pokusu byla hodnota pH podle potřeby každé dva dny upravována. Počáteční kultura měla hustotu cca 200 buněk na 1 ml. Pokusy byly založeny ve dvou opakováních a probíhaly při konstantní teplotě 15 °C cca 3 týdny, kdy už byla populace natolik hustá, že byl patrný zákal. Příklad experimentální baňky je na obr. 3.2.



**Obr. 3.1:** Serologická destička s vyznačenými komůrkami, kam byla zaočkována iniciální kultura pro daný experiment. Kolem dokola těchto komůrek je jedna řada vyplněna destilovanou vodou, aby se zabránilo přílišnému vysychání.



**Obr. 3.2:** Příklad Erlenmayerovy baňky o objemu 50 ml pro experimenty s různým pH.

#### 3.1.3. Transmisní elektronová mikroskopie

Vzorky z jednotlivých pokusných teplot jsem nakapala na měděné síťky pokryté formvarovou blankou a po zaschnutí jsem v sérii kapek destilované vody vypláchla preparát od solí z média. K samotnému prohlížení vzorků a pořízení fotografií byl použit mikroskop JEOL 1011, pro každý druh a každou pokusnou skupinu jsem při stejném zvětšení vyfotografovala 50 náhodně vybraných šupin na 4-6 síťkách.

### 3.2. Metody analýzy dat

#### 3.2.1. Geometrická morfometrika

Geometrická morfometrika (GM) představuje soubor metod, které se zabývají analýzou tvaru. Tvar je chápán ve smyslu KENDALLA (1977), který ho definoval jako „veškerou geometrickou informaci, která zůstane po odfiltrování vlivu pozice, velikosti a rotace

objektu“. S pomocí GM lze popsat a statisticky zhodnotit tvar a jeho změny, které je posléze možné zobrazit rekonstrukcí na původních objektech a snadno biologicky interpretovat. V posledních letech se geometrická morfometrika stala užitečným nástrojem studia tvaru takřka ve všech biologických oborech (ADAMS et al. 2004). GM již také byla použita na řešení různých otázek ohledně morfologie křemičitých šupin chrysomonád (ŘEZÁČOVÁ & ŠKALOUĐ 2005, NEUSTUPA & NĚMCOVÁ 2007, PICHRTOVÁ & NĚMCOVÁ 2008, NĚMCOVÁ et al. in press, NEUSTUPA et al. in press, ŘEZÁČOVÁ-ŠKALOUĐOVÁ et al. in press). Pro účely této studie byly zvoleny landmarkové metody GM, které jsou založeny na definování homologických bodů – landmarků – na význačných místech studovaných struktur.

Součástí geometricko-morfometrických analýz je také tzv. Prokrustovská superimpozice, při které se jednotlivé objekty přes sebe přeloží tak, aby se eliminovala právě variabilita způsobená pozicí, rotací a velikostí a zůstaly pouze tvarové rozdíly. Při superimpozici získáme nové tvarové proměnné, tzv. Prokrustovské souřadnice (ZELDITCH et al. 2004). Součástí procesu superimpozice je výpočet průměrného referenčního objektu (tzv. konsenzu), od něhož mají všechny ostatní minimální vzdálenost a se kterým se jejich konfigurace porovnávají (ROHLF 2007).

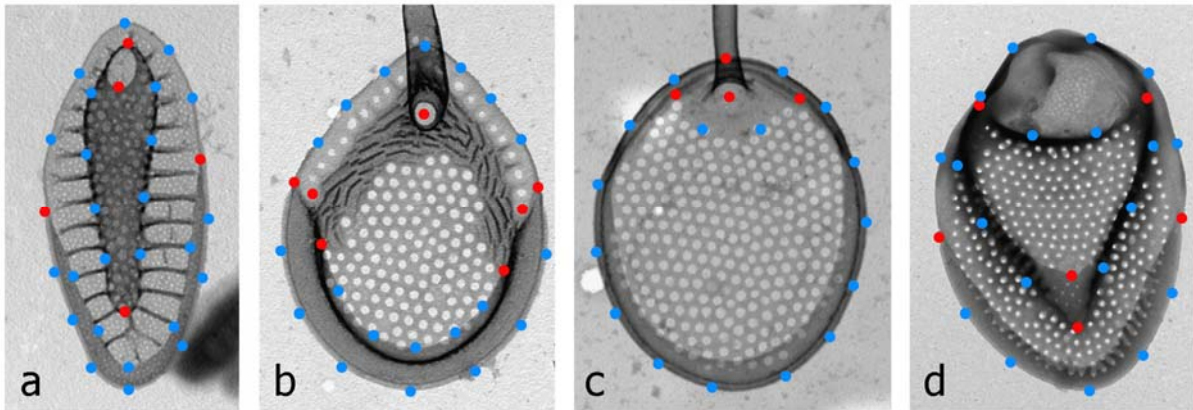
Důležitou součástí analýzy tvaru pomocí landmarkových metod je tzv. metoda ohebných pásek (thin-plate spline), která slouží k vizualizaci tvarových změn. Jedná se o interpolační funkci operující i se změnami, ke kterým dochází v oblastech mezi landmarky (ZELDITCH et al. 2004). Využívá představy projekce souřadnicové sítě s referenčním objektem na nekonečně velký a tenký kovový pásek, jenž musí být zprohýbán a natahován, aby z něho vznikl tvar cílový (MARHOLD & SUDA 2002).

#### Homologické body

Landmarky mohou být umístěné na konkrétním bodě, avšak některé mohou být definovány jako tzv. semilandmarky (BOOKSTEIN 1997) – jejich pozice není pevná, ale je dána dvěma sousedními body, mezi nimiž v průběhu procesu superimpozice „kloužou“. Semilandmarky tak mohou vyznačovat obrysy a tvary křivek.

Digitální fotografie šupin jsem nejprve převedla do formátu tps pomocí programu tpsUtil 1.38 (ROHLF 2006) a zvolené landmarky jsem poté definovala v programu tpsDig 2.12 (ROHLF 2008). Konkrétní umístění význačných bodů na šupinách studovaných druhů je zobrazeno na obr. 3.3. Celkově jsem u *Synura petersenii* vyznačila 30 homologických bodů, u *S. echinulata* 26, u *S. sphagnicola* 20 a u *Mallomonas tonsurata* 25. U všech druhů jsem

rozmístila landmarky a semilandmarky po obvodu, aby popsaly celkový obrys. Navíc, u *S. petersenii* jsem vyznačila rovněž přehnutý okraj, obrys kýlu a spodní bod otvoru v bazální desce. Do analýz jsem vybírala pouze tělové šupiny. U tělových šupin *S. echinulata* byl rovněž zkoumán přehnutý okraj a otvor, ale také poloha dvou posledních pórů distální části. *S. sphagnicola* bohužel postrádá složitou sekundární strukturu, která by umožňovala definovat větší množství bodů. Kromě celkového obrysu jsem tedy zkoumala už pouze střed otvoru pod osténkem a rozsah pole bez pórů. Fotografovala jsem opět pouze tělové šupiny. Nakonec, u *M. tonsurata* jsem se zaměřila na šupiny s dómem nacházející se v přední části buňky. Morfologické rozdíly mezi apikální řadou a tělovými šupinami s dómem nejsou zcela zřetelné, a tudíž jsem je v analýzách nerozlišovala. Podobně postupovali i GUTOWSKI (1996) a HAHN et al. (1996). Na šupinách jsem studovala kromě obrysu také tvar a šířku V-žebra a spodní okraj dómu.



**Obr. 3.3:** Rozmístění pevných landmarků (červeně) a semilandmarků (modře): a – *Synura petersenii*, b – *Synura echinulata*, c – *Synura sphagnicola*, d – *Mallomonas tonsurata*.

#### Symetrizace

Šupiny chrysomonád jsou v principu bilaterálně symetrické struktury. Nicméně, u dvou druhů, konkrétně u *Synura petersenii* a *Mallomonas tonsurata* bylo možné odlišit levou a pravou stranu. *M. tonsurata* má zřetelně asymetrický dóm (asymetrie domu je způsobena ukotvením výrazné bazální části ostnu) a rovněž u *S. petersenii* lze vyzorovat určité rozdíly, především na tvaru kýlu a nestejně délce přehnutého okraje (viz obr. 3.3a). U zbývajících dvou druhů však nebylo možné dvě strany jasně definovat, i když šupiny jsou vždy alespoň mírně asymetrické v důsledku jevu tzv. fluktuální asymetrie. Proto byla u *S. echinulata* a *S. sphagnicola* provedena symetrizace podle KLINGENBERGA et al. (2002).

Nejprve se zkopírují souřadnice všech landmarků a v nově vzniklém datovém souboru se x-ové souřadnice vynásobí číslem -1. Poté se přeznačí čísla landmarků tak, jak sobě navzájem odpovídají dvojice dle symetrie podle podélné osy šupiny. Landmarky ležící na této ose nemají zrcadlové protějšky, a tudíž si ponechají číslo původní. Následuje Prokrustovská superimpozice původních a nových (obrácených a přeznačených) objektů. Nakonec se z takto získaných Prokrustovských souřadnic vypočítá pro každou dvojici průměr, který odpovídá již zcela bilaterálně symetrickým šupinám (KLINGENBERG et al. 2002). Postup symetrizace byl zrealizován v několika krocích s použitím programů Microsoft Office Excel 2003, WordPad a PAST 1.56b (HAMMER et al. 2001).

Pro další analýzy byla tedy u obou zmíněných druhů použita pouze symetrická část variability. Ta u *S. echinulata* vysvětluje 61,1 % a *S. sphagnicola* 68,2 % celkové variability.

#### Superimpozice a analýza relativních warpů

Prvním krokem před dalšími analýzami morfometrických dat je kontrola, zda tvarová variabilita mezi objekty není příliš velká, neboť dochází k aproximaci Kendallova prostoru lineárním tangenciálním prostorem. Pokud by objekty v tvaroprostoru byly příliš vzdálené od referenčního, byl by tento převod velmi nepřesný. Kontrola se provádí pomocí programu tpsSmall 1.20 (ROHLF 2003).

Samotná Prokrustovská superimpozice byla provedena pomocí programu tpsRelw 1.45 (ROHLF 2007b). Tento program dále spočítá z matice deformační energie tzv. hlavní warpy, na které je pak každý objekt projektován, čímž se získají parciální warpy (ROHLF 2007b). Matice skóru na parciálních warpech představuje vstupní data pro analýzu relativních warpů (RWA), jež je vlastně obdobou analýzy hlavních komponent (PCA), avšak pouze pokud je faktor alfa nastaven na nulu. Při jiných hodnotách tohoto faktoru je umožněno dávat větší váhu deformacím lokálním ( $\alpha < 0$ ) či globálním ( $\alpha > 0$ ). Součástí výstupu RWA je stejně jako u PCA ordinační diagram, jehož první osa je vedena ve směru největší variability mezi objekty a každá další osa je nekorelovaná s předchozími. Tvarová variabilita souboru je tak nakonec shrnuta menším počtem proměnných (ZELDITCH et al. 2004, ROHLF 2007b).

Pro porovnání vzdáleností centroidů skupin v ordinačním prostoru jsem zaznamenávala též Prokrustovskou vzdálenost všech dvojic, což je vzdálenost objektů v Kendallově tvaroprostoru, v podstatě se jedná o odmocninu ze sumy čtverců vzdáleností mezi homologickými landmarky (ZELDITCH et al. 2004). Prokrustovskou vzdálenost lze spočítat v programu tpsSmall 1.20 (ROHLF 2003).

#### 3.2.2. Statistické analýzy

##### Diskriminace skupin

Skóry na několika prvních relativních warpech (tj. hlavních komponentách), které v sobě zahrnovaly téměř celou variabilitu v datech, sloužily jako vstupní data pro další statistické analýzy, které jsem provedla pomocí programu PAST 1.56b (HAMMER et al. 2001). Nejprve jsem pomocí analýzy MANOVA (mnohorozměrná analýza variance) testovala rovnost průměrů na základě statistik Wilksovo  $\lambda$  a Pillai trace. Následující párová srovnání teplotních skupin jsem provedla pomocí dvouskupinových mnohorozměrných permutačních testů (2000 permutací) na Mahalanobisově vzdálenosti mezi všemi dvojicemi. Diskriminace předem definovaných skupin byla dále testována diskriminační analýzou CVA (analýza kanonických variát). Výstupem CVA je opět ordinační diagram, tentokrát jsou však (na rozdíl od PCA) osy vedeny tak, aby maximalizovaly rozdíl mezi předdefinovanými skupinami, vedou tedy ve směru největší meziskupinové variability. Ordinační diagramy uvedené ve výsledcích jsou vytvořeny v programech MS Excel 2003 nebo Sigmaplot 9.01.

##### Korelace

Zajímala mě rovněž velikost šupin a její vztah k teplotě (pH) a hlavnímu morfologickému trendu v datech vyjádřenému prvním relativním warpem. V geometrické morfometrice se jako míra velikosti objektů standardně používá tzv. centroidová velikost (CS), která je definovaná jako odmocnina ze sumy čtverců vzdáleností landmarků od středu (ZELDITCH et al. 2004).

V programu PAST jsem zjišťovala korelaci teploty (pH) a velikosti šupin. Poté jsem pro jednotlivé dvojice skupin provedla testy shody průměru a rozptylu, aby bylo možné určit, zda se signifikantně liší svojí velikostí. Krabicové diagramy zobrazené ve výsledcích jsou vytvořeny na základě dat z PASTu v programu Sigmaplot 9.01.

Obdobně byla spočítána i korelace velikosti šupin s RW 1.

##### Mnohorozměrná regrese

Vztah mezi tvarem šupin a daným parametrem prostředí byl testován pomocí mnohorozměrné regrese v programu tpsRegr 1.34 (ROHLF 2007a). Součástí výstupu z této

analýzy je procento variability vysvětlené daným regresním modelem. Signifikance regresních modelů byla testována pomocí permutačních testů (1000 permutací) na hodnotách statistik Wilksovo  $\lambda$  a Goodalovo F. Jako závislá proměnná zde slouží Prokrustovské souřadnice.

Deformační mřížky zobrazující tvarové trendy spojené s deformací konsenzuálního tvaru (průměrný tvar všech šupin ze všech skupin) na průměrné tvary jednotlivých skupin jsem vytvořila pomocí programu tpsSplin 1.20 (ROHLF 2004).

Závislost tvaru a velikosti lze také testovat pomocí mnohorozměrné regrese v tpsRegr 1.34 (ROHLF 2007a). Touto analýzou jsem vlastně zjišťovala, do jaké míry se u šupin chrysomonád projevuje alometrie – jev, kdy se tvar struktury mění s její velikostí.

#### **3.2.3. Oddělení alometrické a nealometrické složky variability**

Může nastat situace, že část tvarové variability je spojena s velikostí šupin a zároveň existuje signifikantní korelace mezi velikostí a studovaným faktorem prostředí. To by ovšem mohlo znamenat, že daný faktor (teplota, pH) působí primárně na změnu velikosti šupin. Pozorovaný rozdíl ve tvaru by byl ve skutečnosti pouze projevem alometrie a my bychom ho mylně interpretovali jako přímý vliv teploty či pH. Aby bylo možné studovat a popsat čistě vliv faktorů prostředí, je zapotřebí oddělit alometrickou složku tvarové variability. To jsem provedla v souladu s postupem, který navrhuje DEBAT et al. (2003): Provedla jsem mnohorozměrnou regresi tvaru (tj. Prokrustovských souřadnic) na velikost (centroid size) v programu R 2.8.0 a jako vstupní data do dalších analýz jsem použila reziduály z této regrese. Na reziduálech jsem nejprve provedla analýzu PCA (analýzu hlavních komponent), abych snížila počet proměnných. Poté jsem vzala skóry ne několika prvních hlavních komponentách. Jejich počet jsem vybrala na základě referenční hodnoty Jolliffe cut-off value, kterou program PAST uvádí – komponenty, jejichž vlastní čísla jsou menší než tato hodnota, jsou považovány za nesignifikantní. Dále jsem postupovala stejně jako v předchozím případě – provedla jsem analýzu MANOVA, párové testy a analýzu CVA. Abych mohla tvarové trendy charakteristické pro jednotlivé skupiny zobrazit pomocí deformačních mřížek, přičetla jsem získané reziduály ke konsenzuálním konfiguracím. Také byla opět provedena mnohorozměrná regrese tvaru na teplotu (pH), aby se zjistilo, zda je tento vztah signifikantní i po odstranění vlivu velikosti.

#### 3.2.4. Míra tvarové variability (morfologická disparita)

Rozložení objektů v ordinačním prostoru RWA vypovídá také o variabilitě ve tvaru šupin. Čím je oblak kompaktnější a vzdálenosti mezi objekty kratší, tím jsou si podobnější tvarem. Tato variabilita byla také kvantifikována – v programu PAST jsem v rámci každé skupiny spočítala euklidovskou vzdálenost všech dvojic objektů v ordinačním prostoru definovaném relativními warpy a znázornila ji formou krabicového diagramu. Navíc jsem permutačně (10000 permutací) testovala rozdíly průměrů. Větší průměrná hodnota vzdálenosti objektů v oblaku odpovídá větší různorodosti (neboli také tzv. disparitě) v jejich tvaru.

#### 3.3. Velikost buněk

V rámci teplotního pokusu na druhu *Synura petersenii* jsem též měřila velikost buněk. Na konci pokusu jsem vzorky z jednotlivých pokusných teplot nafixovala Lugolovým roztokem a poté prudce zcentrifugovala a protřepala, aby došlo k dezintegraci kolonií. Buňky jsem fotografovala ve světelném mikroskopu Olympus BX51 s digitálním fotoaparátem Olympus Z5060 při použití imerzního objektivu 100. Samotné měření jsem prováděla pomocí programu tpsDig 2.12 (ROHLF 2008) – měřila jsem délku a šířku buněk. Z těchto údajů jsem spočítala přibližný objem – kapkovitý tvar buňky jsem aproximovala kuželem a polovinou koule. Tato aproximace sice není ideální a vzniká při ní určitá chyba v odhadu, ale přesto může výsledek sloužit k dobrému porovnání průměrného objemu v jednotlivých teplotních skupinách. Výsledky jsem poté znázornila pomocí krabicového diagramu v programu Sigmaplot 9.01. Průměrné tvary buněk jsem na základě znalosti jejich délky a šířky nakreslila v programu Adobe Illustrator CS3.

## 4. Výsledky

### 4.1. Teplotní pokusy

Všechny čtyři zkoumané druhy jsem pěstovala v pěti pokusných teplotách 5 – 25 °C. Ve většině komůrek se buňky dobře namnožily – populace málo narostlé (případně viditelně kontaminované) jsem z dalšího zpracování vynechala, abych snížila pravděpodobnost, že by vybrané šupiny pocházely z buněk inokula. Z každé pokusné skupiny jsem vyfotografovala 50 náhodně vybraných šupin, tyto fotografie pak tvořily vstupní datový soubor do geometricko-morfometrických analýz (celkem tedy 250 šupin pro každý druh).

#### 4.1.1. *Synura petersenii*

##### Celková tvarová variabilita

Analýza relativních warpů odhalila základní trendy v morfologické variabilitě celého souboru 250-ti šupin. První relativní warp (RW 1) popisuje 40,65 % celkové variability, další dva RW popisují po řadě 18,26 % a 13,17 % variability. Podrobný výpis podílu jednotlivých RW na celkové variabilitě se nachází v tabulce P7 v příloze (také další uvedené odkazy na tabulky označené písmenem P znamenají, že se příslušná tabulka nachází v příloze).

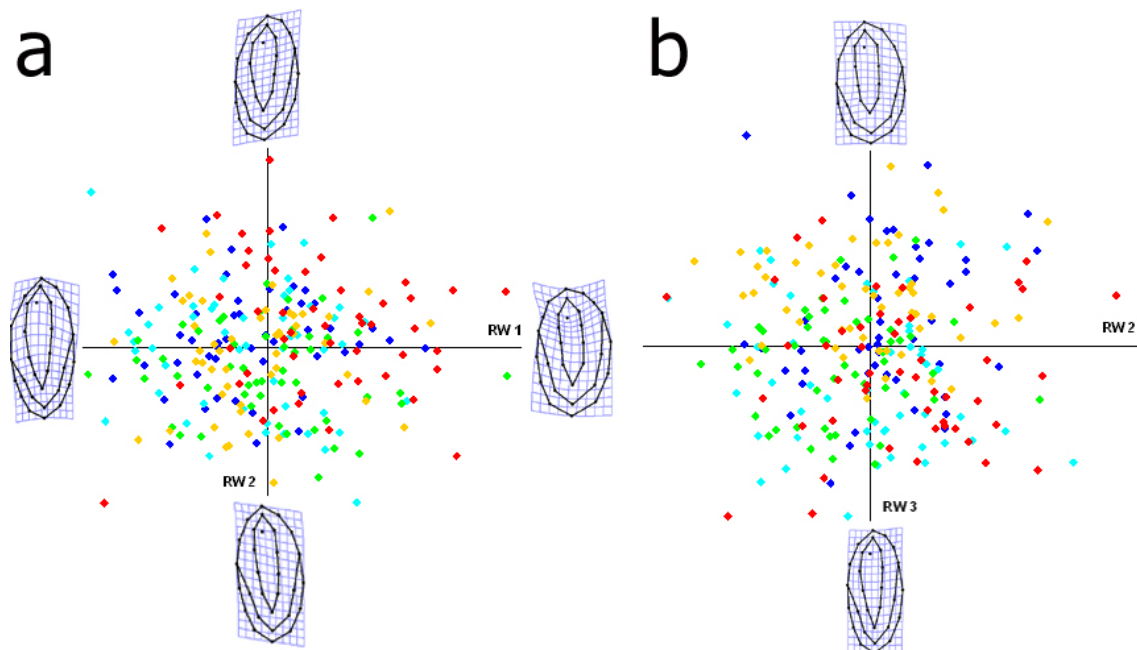
Rozložení všech objektů v ordinačním prostoru definovaném prvními, resp. druhými dvěma relativními warpy je na obr. 4.1. Přehledné zobrazení poloh centroidů jednotlivých teplotních skupin je zobrazeno dále na obr. 4.2.

Jak je patrné z deformačních mřížek, první osa je spojena především s délkou přehnutého okraje. Pokud je krátký, má šupina výraznější distální část se zřetelně rozšířeným kýlem. Pokud přehnutý okraj naopak lemují šupinu do více než poloviny, distální část se jeví jako zkrácená a zakulacená. Druhá osa popisuje globální trend změny celkového tvaru šupiny vzhledem k ose symetrie. Třetí relativní warp popisuje šířku šupiny a také délku a tvar kýlu – u dlouhých úzkých šupin se kýl postupně zužuje do špičky, u širších šupin končí poněkud náhle a dále od přehnutého okraje.

Poloha centroidů na ordinačním diagramu (obr. 4.2) ukazuje, jak se výrazně od ostatních odděluje skupina z 25 °C, a to již vzhledem k první ose. Největší Prokrustovská vzdálenost je



mezi konsenzuálními konfiguracemi skupin 5 a 25 °C, těsně následuje dvojice 20 a 25 °C. Naopak tvarově nejbližší jsou si skupiny 10 a 15 °C (tabulka P1a, příloha).

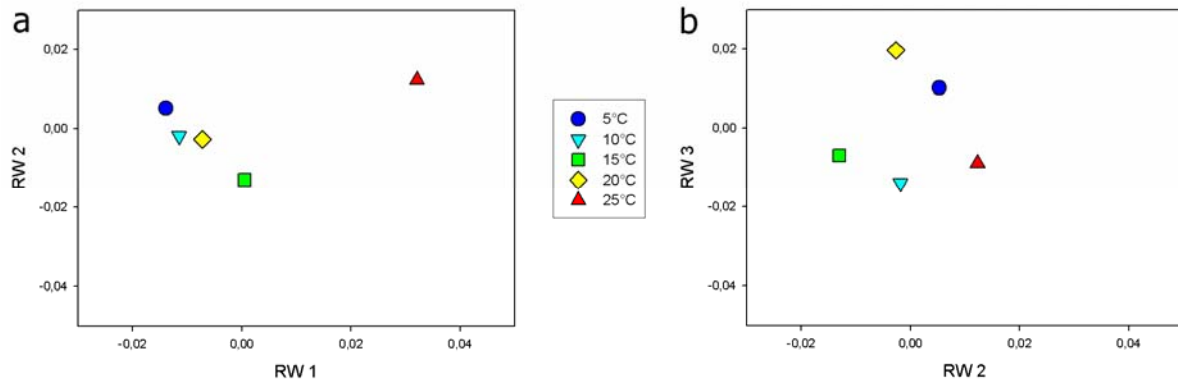


**Obr. 4.1:** Analýza relativních warpů. Ordinační diagram ukazuje hlavní trendy morfologické variability v souboru šupin druhu *S. petersenii* z různých pokusných teplot. Červená: 25 °C, žlutá: 20 °C, zelená: 15 °C, světle modrá: 10 °C, tmavě modrá: 5 °C. Deformační mřížky zobrazují příslušné trendy v extrémních hodnotách jednotlivých os; a: první a druhý relativní warp; b: druhý a třetí relativní warp, mřížky jsou zde znázorněné pouze pro 3. RW.

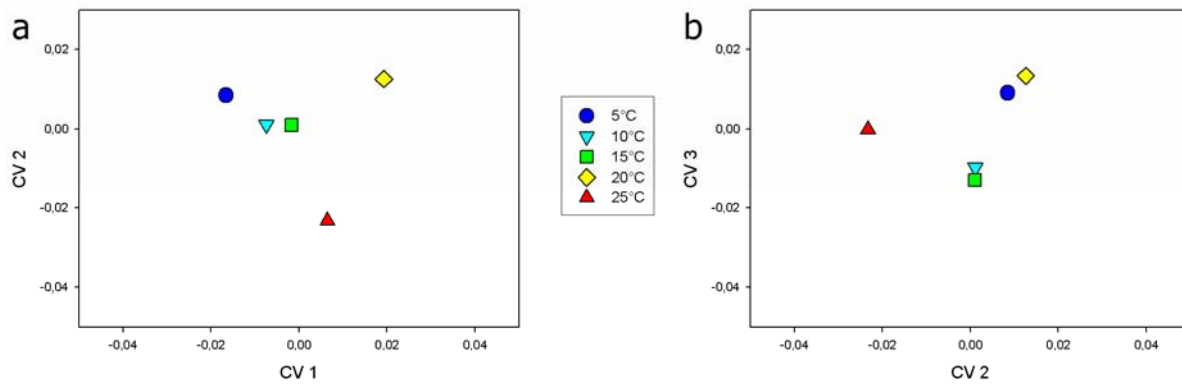
#### Vliv teploty na tvar šupin

Skóry na prvních 20-ti osách (dohromady vysvětlujících 98,45 % celkové variability) jsem použila jako výchozí data pro analýzu MANOVA a analýzu kanonických variát (CVA). MANOVA, čili test shody průměrů, vyšla signifikantní (Wilksovo  $\lambda$ : 0,1016;  $F = 8,775$ ;  $p < 0,001$ ). První kanonická osa (CV 1) popisuje 50,65 % meziskupinové variability, CV 2 38,1 %. Shoda polohy centroidů skupin byla testována pomocí permutačních testů na Mahalanobisově vzdálenosti mezi nimi, výsledky jsou uvedeny v tabulce P2a. Všechny dvojice se od sebe signifikantně odlišují.

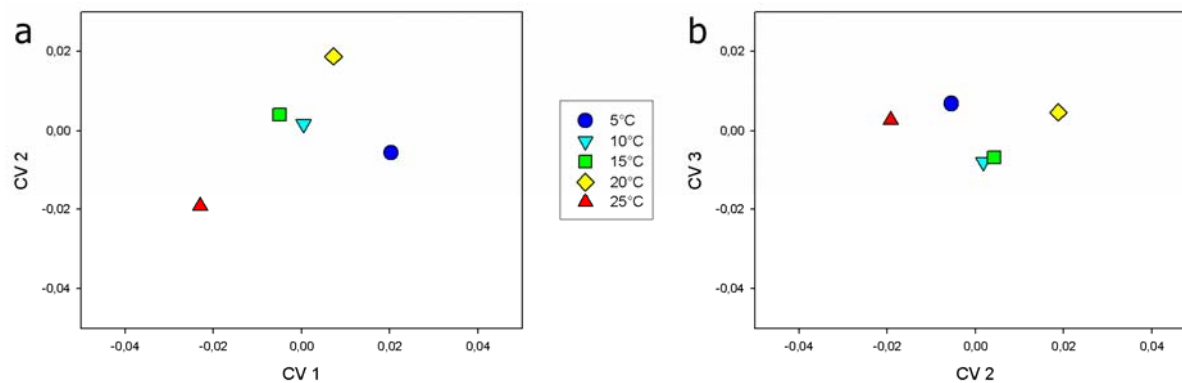
Poloha centroidů v ordinačním prostoru definovaném kanonickými osami je na obr 4.3. Jak je vidět na obrázku, nejseparovanější skupinou podél první osy je skupina z 20 °C, podél druhé osy se zřetelně odděluje 25 °C. Vzhledem k první ose lze rovněž vysledovat rozložení skupin víceméně podle teplotního gradientu.



**Obr. 4.2:** *Synura petersenii* – analýza relativních warpů. Poloha centroidů jednotlivých teplotních skupin v ordinačním prostoru definovaném prvními (a) a druhými (b) dvěma relativními warpů.



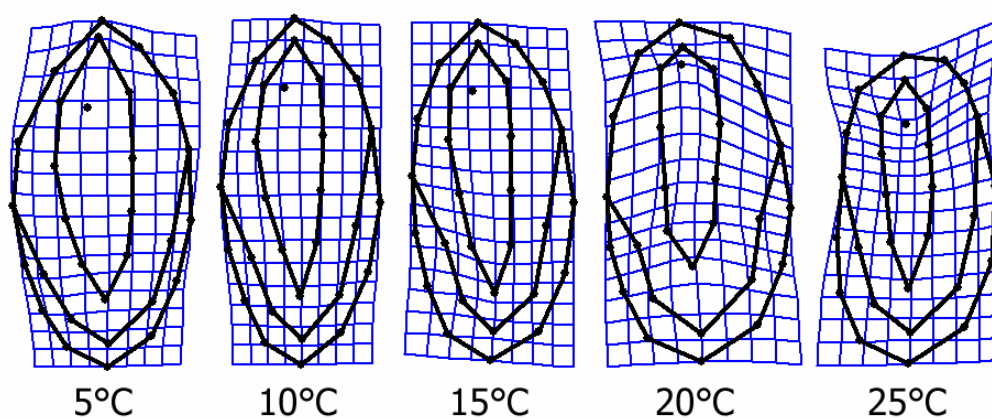
**Obr. 4.3:** *S. petersenii* – analýza kanonických variát. Poloha centroidů jednotlivých teplotních skupin v ordinačním prostoru definovaném prvními (a) a druhými (b) dvěma kanonickými osami.



**Obr. 4.4:** *S. petersenii* – nealometrická složka tvarové variability. Poloha centroidů jednotlivých teplotních skupin v ordinačním prostoru definovaném prvními (a) a druhými (b) dvěma kanonickými osami.

Závislost tvaru šupin na teplotě byla testována mnohorozměrnou regresí, která vysvětlila pouze 4,87 % veškeré variability (Wilksovo  $\lambda = 0,291$ , permutační  $p = 0,001$ ; Goodalovo  $F = 12,766$ , permutační  $p = 0,001$ ). Vliv teploty na tvar sice není silný, nicméně je signifikantní.

Deformační mřížky na obr. 4.5 zobrazují morfologické trendy spojené se změnou průměrné konsensuální konfigurace na dílčí průměrné tvary v jednotlivých teplotních skupinách. Je vidět, že se se zvyšující teplotou zužuje kýl. Výrazné změny se dějí také na přehnutém okraji, který ve vyšší teplotě zasahuje dále po obvodu šupiny a také se rozšiřuje. Odlišné trendy na morfologii kýlu jsou patrné u skupiny 20 °C, kýl je zde zkrácený ve své horní i dolní části a také zúžený, distální část těla šupiny se naopak rozšiřuje. Šupiny z 25 °C mají zřetelně zkrácenou distální část.



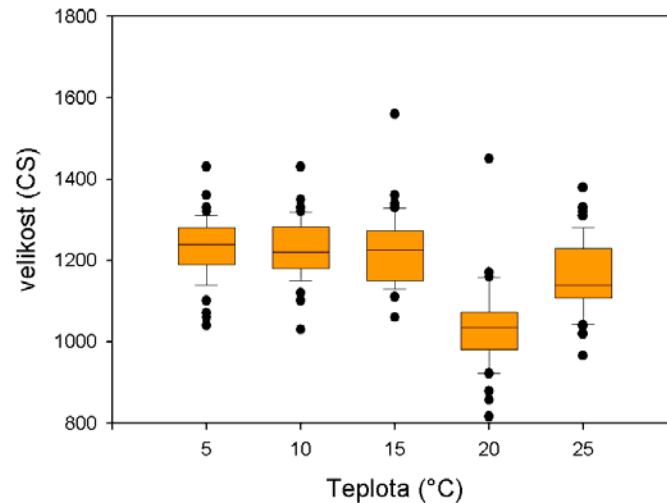
**Obr. 4.5:** *S. petersenii*: Deformační mřížky znázorňující trendy morfologické variability spojené s přechodem od průměrného (konsensuálního) tvaru na dílčí konsensus skupinový. Míra deformace je třikrát zvýrazněna oproti skutečnosti.

### Velikost šupin

Velikost šupin (vyjádřená jako centroidová velikost, CS) v jednotlivých teplotních skupinách je znázorněna na obr. 4.6. Šupiny se s teplotou signifikantně zmenšují ( $r_s = -0,44$ ;  $p < 0,001$ ), avšak přesto je patrný opětovný nárůst velikosti mezi teplotami 20 a 25 °C. V tabulce P3a jsou navíc uvedeny výsledky testů shody průměrů a rozptylů velikostí šupin mezi jednotlivými dvojicemi. Vyplývá z nich například, že nulová hypotéza rovnosti průměrů nebyla zamítnuta (na 5-ti procentní hladině pravděpodobnosti) u trojice 5, 10 a 15 °C.

Korelace velikosti šupin s RW 1 vyšla signifikantní, avšak ne příliš silná ( $r_s = -0,2$ ;  $p = 0,002$ ). Velikost je tedy alespoň částečně spojena s hlavním tvarovým trendem v datech.

Významná je také závislost tvaru šupin na velikosti – alometrie. Příslušný regresní model signifikantně vysvětluje 5,43 % variability v datech (Wilksovo  $\lambda = 0,3$ , permutační  $p = 0,001$ ; Goodalovo  $F = 14,575$ , permutační  $p = 0,001$ ).



**Obr. 4.6:** Centroidová velikost (centroid size) šupin *S. petersenii* v jednotlivých teplotách.

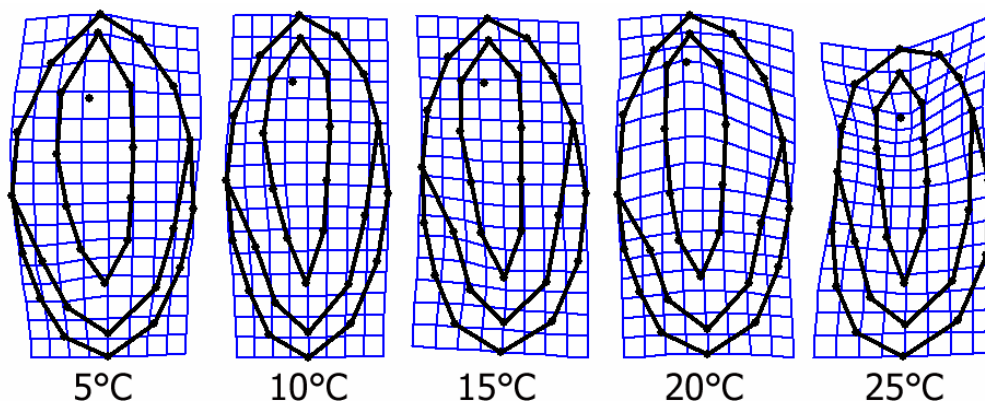
#### Nealometrická složka tvarové variability

Dále mě zajímalo, jaký je vliv teploty na tvar šupin v případě, že se odstraní vliv variability spojené s velikostí šupin (čili její alometrické složky). Na reziduálech z mnohorozměrné regrese Prokrustovských souřadnic na velikost jsem provedla analýzu PCA a pro následující diskriminační analýzu jsem použila skóry na prvních 9-ti hlavních komponentách (počet jsem určila dle Jolliffe cut-off hodnoty, dohromady popisují 92,02 % variability). Analýza MANOVA vyšla signifikantní (Wilk's  $\lambda = 0,4194$ ,  $F = 6,451$ ,  $p < 0,001$ ), první kanonická osa popisuje 51,17 % variability, druhá 35,86 %. Poloha centroidů jednotlivých teplotních skupin je na obr. 4.4. Hlavním rozdílem oproti stavu, kdy byl vliv velikosti zahrnut, je poloha centroidu skupiny z 20 °C. Již není oddělen nejvýrazněji ze všech. Naopak, první kanonická osa zřetelně odděluje 5 a 25 °C, skupina 20 °C se odděluje až podél druhé kanonické osy. Výsledky permutačních testů na Mahalanobisově vzdálenosti mezi centroidy skupin jsou v tabulce P4a – všechny dvojice se od sebe signifikantně odlišují.

Regresní model závislosti tvaru na teplotě vysvětlil už pouze 2,9 % variability (Wilksovo  $\lambda = 0,446$ , permutační  $p = 0,001$ ; Goodalovo  $F = 7,461$ , permutační  $p = 0,001$ ). Část původního podílu byla tedy spojena s velikostí šupin, avšak i tato zbylá část je signifikantní.

Mřížky na obr. 4.7 ukazují tvarové trendy spojené s deformací konsensuální konfigurace na šupiny z jednotlivých teplotních skupin po odstranění alometrické komponenty. Změny tvaru zůstaly v zásadě stejné, pouze u teploty 20 °C se projevují kvalitativně výrazně odlišné morfologické trendy než při analýze celkové variability (srov. obr. 4.5 a 4.7) – především kýl už není tak výrazně zkrácený. Zdá se také, že po odečtení vlivu velikosti jsou si tvary prvních

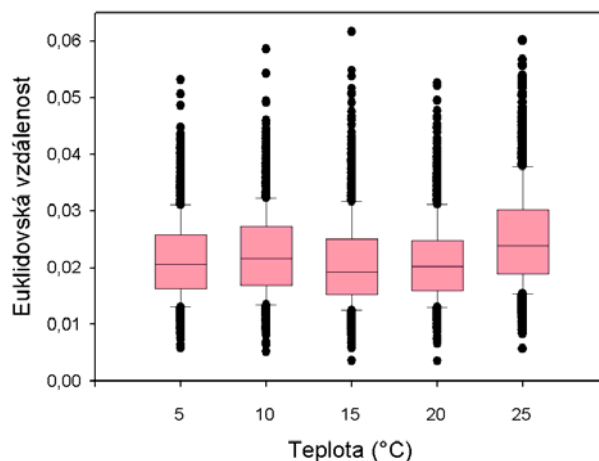
čtyř teplot navzájem podobnější a zároveň se ještě výrazněji liší od skupiny z 25 °C, skupina 20 °C se svým tvarem již tak výrazně neodlišuje. Tato změna rozložení centroidů skupin je patrná i z Mahalanobisových vzdáleností mezi nimi – po odstranění vlivu velikosti jsou nejvzdálenější (tvarově nejméně podobné) skupiny 5 a 15 °C (tab. P4a).



**Obr. 4.7:** *S. petersenii*, nealometrická tvarová komponenta. Deformační mřížky znázorňující trendy morfologické variability spojené s přechodem od průměrného (konsenzuálního) tvaru na dílčí konsensus skupinový. Míra deformace je třikrát zvýrazněna oproti skutečnosti.

#### Míra tvarové variability (morfologická disparita)

Významné je též srovnání míry morfologické variability v jednotlivých skupinách. Tu jsem vyjádřila jako Euklidovskou vzdálenost všech dvojic šupin v ordinačním prostoru RWA.



**Obr. 4.8:** Morfologická variabilita šupin *Synura petersenii* v různých teplotách. Je vyjádřena jako Euklidovská vzdálenost mezi objekty (šupinami) v ordinačním prostoru PCA (RWA).

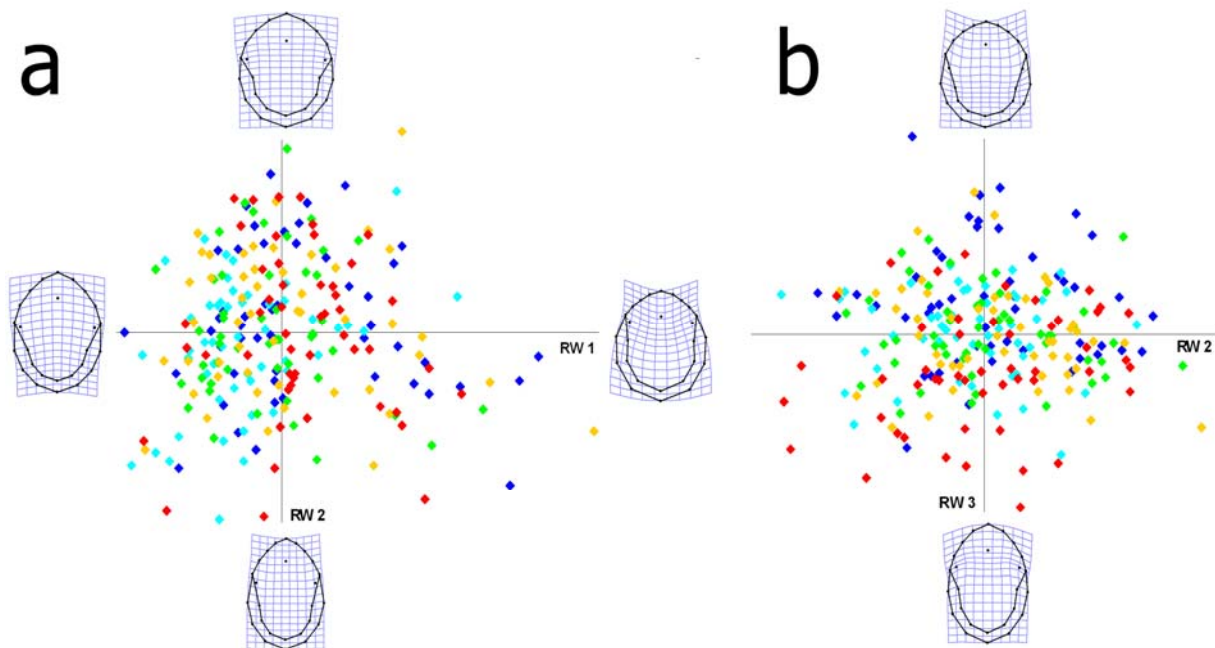
Výsledky jsou zobrazeny na grafu na obr. 4.8, výsledky testů shody průměrů jsou poté uvedeny v tabulce P5a. Je vidět, že průměrná vzdálenost objektů v nejvyšší teplotě je signifikantně největší. Nejmenší tvarovou variabilitu mají šupiny z teploty 15 °C (avšak

nebyla zamítnuta hypotéza o shodě průměrů skupin 15 °C a 20 °C tzn. že tyto dvě skupiny se mírou tvarové variability signifikantně neliší).

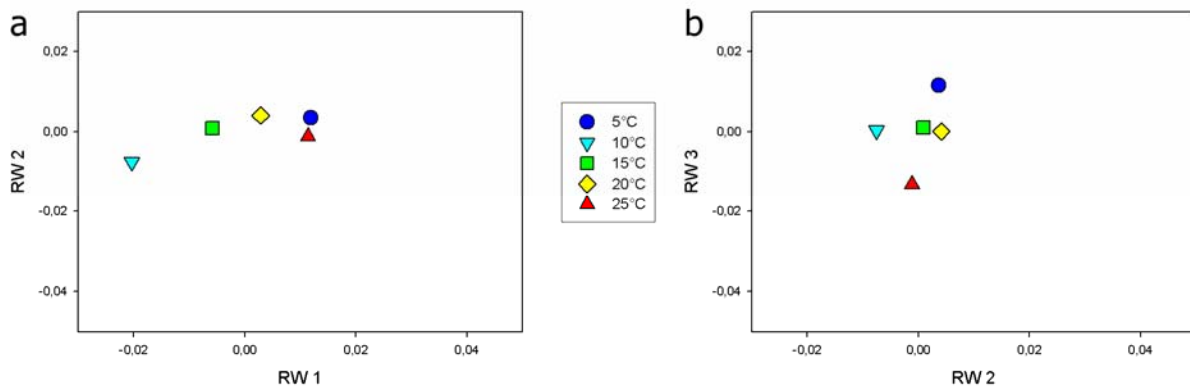
#### 4.1.2. *Synura echinulata*

##### Celková tvarová variabilita

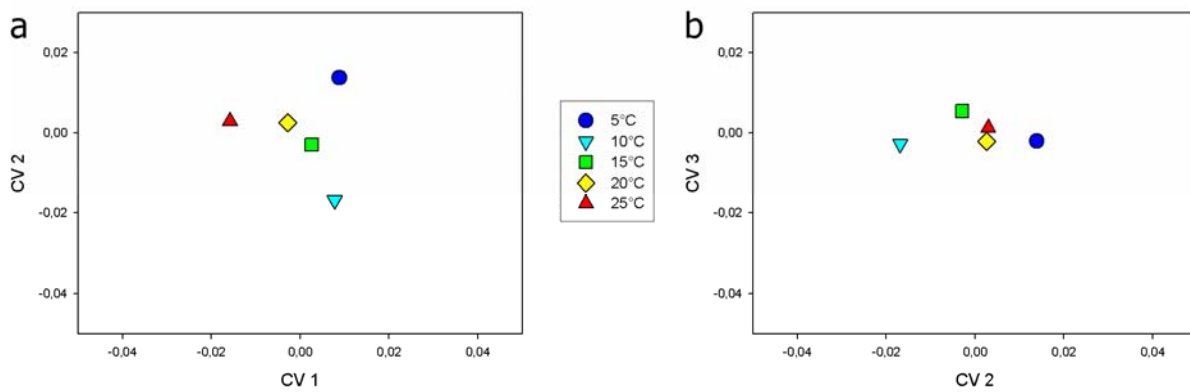
Celková tvarová variabilita byla opět nejprve popsána pomocí analýzy relativních warpů. První tři relativní warpy vysvětlily v tomto případě 81,66 % celkové variability. (RW 1 = 43,37 %, RW 2 = 27,78 %, RW 3 = 10,51 %) Veškerá variabilita byla zahrnuta 19-ti osami. Seznam všech os a příslušných procent se nachází v tabulce P7 v příloze. Na obr. 4.9 jsou ordinační diagramy z analýzy relativních warpů pro první tři RW a deformační mřížky zobrazující příslušné tvarové trendy v extrémních os. Samotná poloha centroidů skupin je posléze vyobrazena na obr. 4.10.



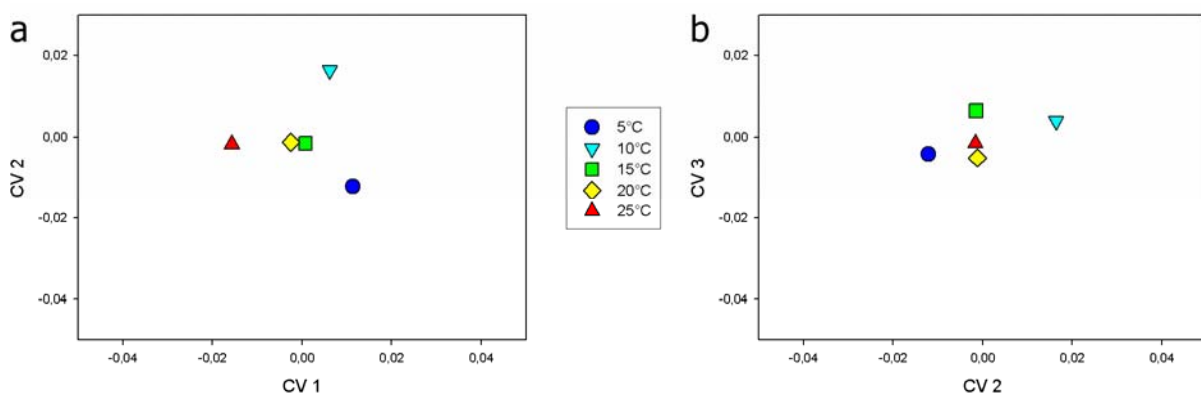
**Obr. 4.9:** Analýza relativních warpů. Ordinační diagram ukazuje hlavní trendy morfologické variability v souboru šupin druhu *S. echinulata* z různých pokusných teplot. Červená: 25 °C, žlutá: 20 °C, zelená: 15 °C, světle modrá: 10 °C, tmavě modrá: 5 °C. Deformační mřížky zobrazují příslušné trendy v extrémních hodnotách jednotlivých os; a: první a druhý relativní warp; b: druhý a třetí relativní warp, deformační mřížky jsou zde znázorněny pouze pro třetí RW.



**Obr. 4.10:** *S. echinulata* – analýza relativních warpů. Poloha centroidů jednotlivých teplotních skupin v ordinačním prostoru definovaném prvními (a) a druhými (b) dvěma relativními warpů.



**Obr. 4.11:** *S. echinulata* – analýza kanonických variát. Poloha centroidů jednotlivých teplotních skupin v ordinačním prostoru definovaném prvními (a) a druhými (b) dvěma kanonickými osami.



**Obr. 4.12:** *S. echinulata* – neolometrická složka tvarové variability. Poloha centroidů jednotlivých teplotních skupin v ordinačním prostoru definovaném prvními (a) a druhými (b) dvěma kanonickými osami.

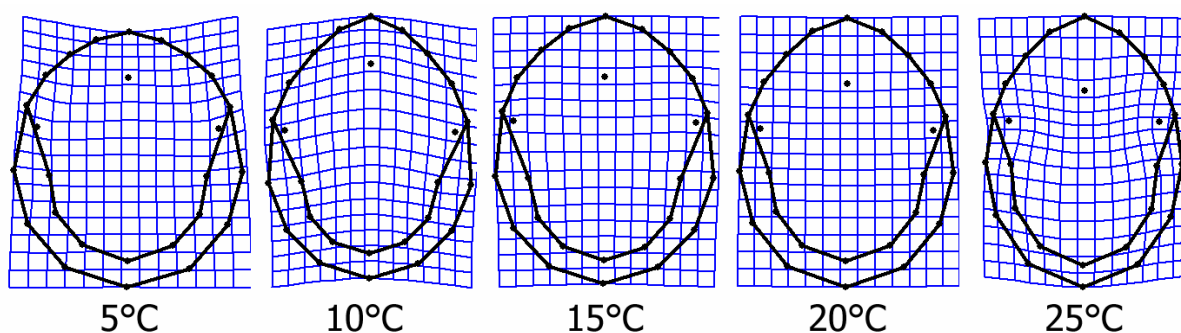
Hlavní trend morfologické variability, který je spojen s první osou, se týká délky přehnutého okraje. Druhá osa je spojena především s celkovou šířkou šupiny, hlavně s rozšířením (či zúžením) v distální části. Třetí relativní warp je také spojen s šířkou šupin, avšak výrazně se zde projevuje především poloha poslední dvojice pórů.

Již dle obr. 4.9 je patrná kumulace objektů ze skupiny 10 °C podél záporných hodnot první osy. Navíc, třetí relativní warp se podílí na odlišení skupin z obou extrémních teplot – 5 a 25 °C. To samé potvrzuje i poloha centroidů skupin (obr. 4.10) První osa nejvýrazněji odděluje 10 °C, v opačné části osy je význačná téměř totožná poloha skupin 5 °C a 25 °C. Obě extrémní polohy jsou si tedy zdánlivě tvarově velmi podobné. Vidíme však, že jsou dobře separovány pomocí osy třetí. Tento závěr potvrzují i Prokrustovské vzdálenosti konsensuálních konfigurací – 5 a 25 °C jsou třetí nejodlišnější dvojicí, nejpodobnější jsou si naopak 15 a 20 °C (tabulka P1b).

#### Vliv teploty na tvar šupin

Pro analýzu kanonických variát byly použity všechny osy (celkem 19) zahrnující veškerou variabilitu souboru. Analýza MANOVA přinesla následující výsledky: Wilksovo  $\lambda = 0,4299$ ;  $F = 2,189$ ;  $p < 0,001$ . CV 1 zachycuje 67,9 % meziskupinové variability, CV 2 17,2 %. Výsledky permutačních testů porovnávajících průměry skupin jsou uvedeny v tabulce P2b. Na hladině  $\alpha = 0,05$  nebyla zamítnuta nulová hypotéza o shodě průměrů u dvojic 10 – 15 °C a 15 – 20 °C.

Poloha centroidů v ordinačním prostoru definovaném kanonickými osami je znázorněna na obr. 4.11. Na rozdíl od RWA, CVA výrazně diskriminuje podél první osy 25 °C na jedné straně, na opačné se potom nacházejí obě nejchladnější skupiny (5 °C a 10 °C), které jsou dále výrazně odlišeny pomocí osy druhé.



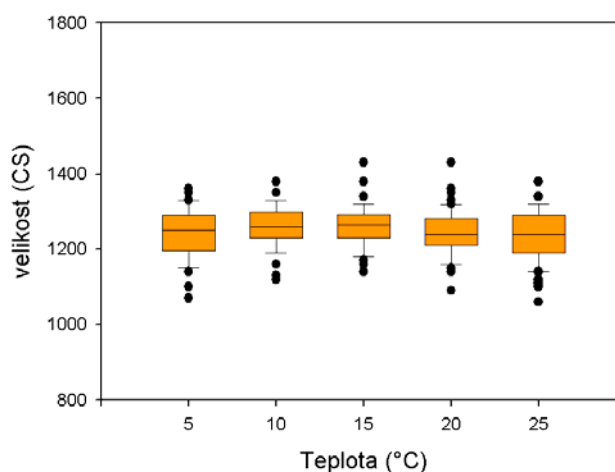
**Obr. 4.13:** *S. echinulata*: Deformační mřížky znázorňující trendy morfologické variability spojené s přechodem od průměrného (konsensuálního) tvaru na dílčí konsensus skupinový. Míra deformace je třikrát zvýrazněna oproti skutečnosti.



Regresní model závislosti tvaru šupin na teplotě signifikantně vysvětlil pouhých 2,36 % variability (Wilksovo  $\lambda = 0,533$ , permutační  $p = 0,001$ ; Goodalovo  $F = 6,004$ , permutační  $p = 0,001$ ). Mřížky na obr. 4.13 zobrazují morfologické trendy charakteristické pro jednotlivé teploty. Celkový trend morfologické změny s rostoucí teplotou ukazuje na prodlužování distální části šupiny. Poměrně úzkou a spíše zašpičatělou zadní část mají však také šupiny z teploty 10 °C. Dále, ve vyšší teplotě mají šupiny tendenci mít užší přehnutý okraj a poslední póry relativně posunuté směrem ke středu šupiny. Také báze osténku se posouvá dále od okraje.

### Velikost šupin

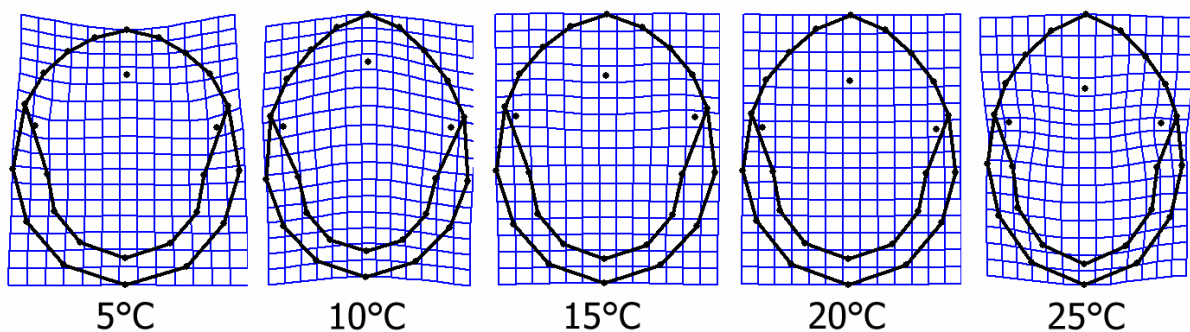
Krabicový diagram na obr. 4.14 ukazuje velikost šupin v různých teplotách, v tabulce P3b jsou uvedeny výsledky testů shody průměrů a rozptylů. Pouze ve dvou případech se podařilo zamítnout nulovou hypotézu o shodě průměrů – signifikantně (i když ne příliš silně) se liší skupina 25 °C od 10 °C a 15 °C. Zmenšování šupin spolu se zvyšující se teplotou nebylo prokázáno ( $r_s = -0,1$ ;  $p = 0,12$ ). Velikost šupin však koreluje s prvním relativním warpem ( $r_s = -0,39$ ,  $p < 0,001$ ). Naproti tomu byl odhalen poměrně silný vztah velikosti a tvaru šupiny – regresní model vysvětlil 10,37 % variability v datech (Wilksovo  $\lambda = 0,432$ , permutační  $p = 0,001$ ; Goodalovo  $F = 28,93$ , permutační  $p = 0,001$ ). Hlavní morfologický trend je tedy zjevně spojený s velikostí šupin.



**Obr. 4.14:** Centroidová velikost (centroid size) šupin *S. echinulata* v jednotlivých teplotách.

### Nealometrická složka tvarové variability

Pro analýzy MANOVA a CVA bylo použito celkem 7 os z PCA na reziduálech. Ty dohromady vysvětlují 96,89 % variability. Analýza MANOVA vyšla signifikantní (Wilksovo  $\lambda = 0,5446$ ;  $F = 5,66$ ;  $p < 0,001$ ). První kanonická osa zahrnuje 73,15 % variability, druhá 18,41 %. Poloha centroidů jednotlivých teplotních skupin je znázorněna na obr. 4.12. Je dobře vidět, že odstranění alometrického efektu změnilo vzájemné uspořádání centroidů skupin jen mírně. (Kladné a záporné znaménko na kanonických osách není rozhodující, rozdíl ve znaménku neznamená odlišný výsledek, zásadní je především vzájemná poloha bodů.) Jak vyplývá z tabulky P4b, jediná dvojice teplotních skupin, u které nelze zamítnout rovnost průměrů je 15 a 20 °C.

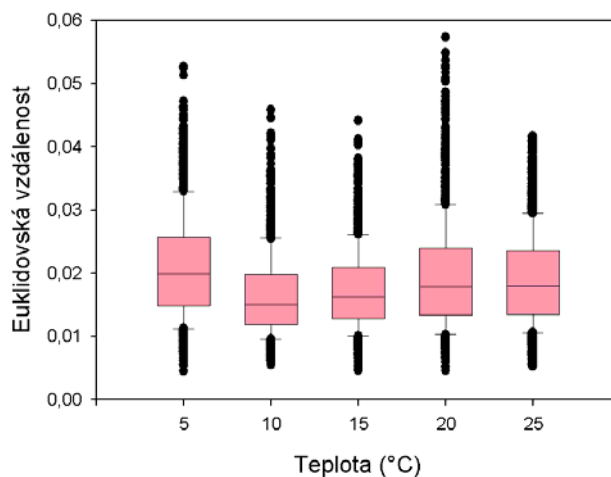


**Obr. 4.15:** *S. echinulata*, nealometrická tvarová komponenta. Deformační mřížky znázorňující trendy morfologické variability spojené s přechodem od průměrného (konsenzuálního) tvaru na dílčí konsensus skupinový. Míra deformace je třikrát zvýrazněna oproti skutečnosti.

Regresní model závislosti tvaru na teplotě vysvětlil 2,31 % variability (Wilksovo  $\lambda = 0,54$ , permutační  $p = 0,001$ ; Goodalovo  $F = 5,892$ , permutační  $p = 0,002$ ), což je téměř stejně tolik jako v případě, kdy byl vliv velikosti zachován. Také tvarové trendy charakteristické pro jednotlivé teploty (obr. 4.15) zůstávají naprosto totožné. Z výše uvedených výsledků tedy jasně vyplývá, že významná část tvarové variability je sice spojena s velikostí (šupiny mají alometrii), ale velikost šupin není ovlivněna teplotou.

### Míra tvarové variability (morfologická disparita)

Graf na obr. 4.16 ukazuje míru tvarové variability v jednotlivých skupinách, výsledky srovnání průměrných hodnot vzdáleností objektů jsou uvedeny v tabulce P5b. Signifikantně se odlišují všechny dvojice, tvarově nejméně variabilní jsou šupiny z teploty 10 °C, naopak největší disparitu mají šupiny z 5 °C.



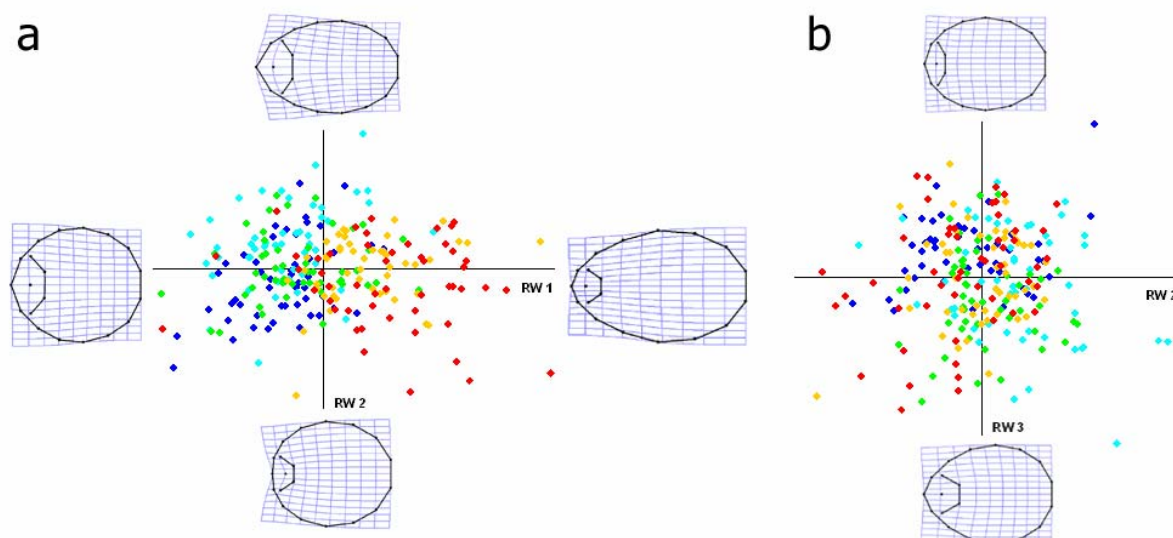
**Obr. 4.16:** Morfologická variabilita šupin *Synura echinulata* v různých teplotách. Je vyjádřena jako Euklidovská vzdálenost mezi objekty (šupinami) v ordinačním prostoru PCA (RWA).

### 4.1.3. *Synura sphagnicola*

#### Celková tvarová variabilita

Veškerá tvarová variabilita šupin druhu *Synura sphagnicola* je po provedení analýzy relativních warpů zahrnuta v 15-ti osách. První relativní warp vysvětluje 56,6 % variability, druhý 30,69 % a třetí 4,95 %. Údaje o ostatních osách se nacházejí v tabulce P7 v příloze. Ordinační diagramy k RWA a tvarové trendy pro první 3 relativní warpy, které dohromady vysvětlují 92,24 % variability jsou vyobrazeny na obr. 4.17. Poloha samotných centroidů skupin je na obr. 4.18. První RW popisuje zkracování (resp. prodlužování) distální části šupiny a s tím související rozšiřování (resp. zužování) pole okolo osténku v apikální části. Celkový obrys šupiny je tedy buď protáhle vejčitý či víceméně kruhovitý. Druhá osa je spojena s morfologií distální části – šupina zde buď vytváří vystupující až zašpičatělý apex a pole je poměrně široké nebo je pole spíše užší a apex se nevytváří (šupina je spíše kulatá). Třetí relativní warp popisuje, nakolik oblast bez pórů zasahuje směrem ke středu šupiny.

Již analýza RWA zřetelně odlišuje šupiny z nižších a vyšších teplot podél první osy. Vzájemná poloha centroidů odráží toto uspořádání zcela výrazně – v záporných hodnotách první osy nacházíme skupiny 5, 10 a 15 °C, v kladných 20 a 25 °C. Na základě trendu daného druhým RW se nejvíce odlišuje skupina z 10 °C. Největší Prokrustovská vzdálenost je mezi skupinami 10 a 25 °C, nejbližší si jsou dvojice 5 - 15 °C a 20 - 25 °C (tabulka P1c).

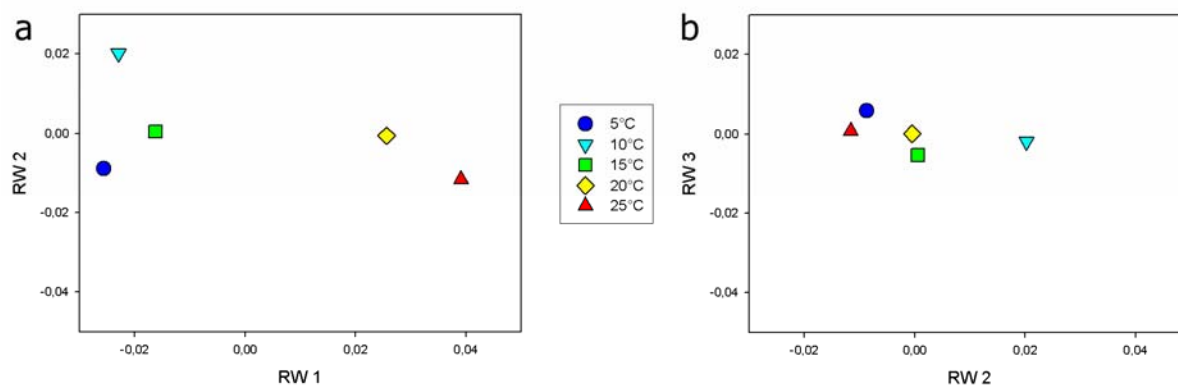


**Obr. 4.17:** Analýza relativních warpů. Ordinační diagram ukazuje hlavní trendy morfologické variability v souboru šupin druhu *S. sphagnicola* z různých pokusných teplot. Červená: 25 °C, žlutá: 20 °C, zelená: 15 °C, světle modrá: 10 °C, tmavě modrá: 5 °C. Deformační mřížky zobrazují příslušné trendy v extrémních hodnotách jednotlivých os; a: první a druhý relativní warp; b: druhý a třetí relativní warp, deformační mřížky jsou zde znázorněny pouze pro třetí RW.

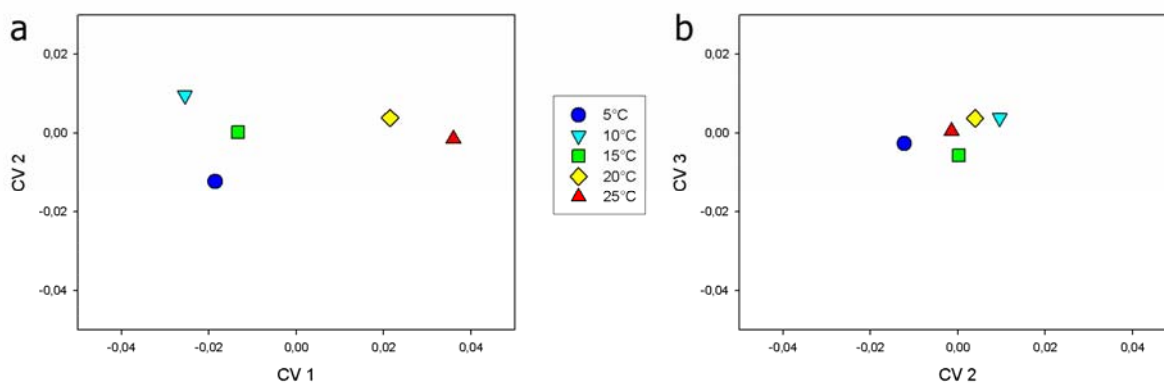
#### Vliv teploty na tvar šupin

Skóry na všech 15-ti osách, které dohromady popisují 100 % variability, byly použity pro další analýzy. Analýza MANOVA přinesla signifikantní výsledek (Wilksovo  $\lambda = 0,3012$ ;  $F = 5,422$ ;  $p < 0,001$ ). Dále byla provedena CVA. První dvě kanonické osy v sobě zahrnují 91,93 % meziskupinové variability (CV 1 = 71,25 %, CV 2 = 20,68 %). Výsledky permutačních testů na Mahalanobisově vzdálenosti mezi průměry skupin jsou uvedeny v tabulce P2c. Odlišnost byla prokázána u všech dvojic kromě dvojice obou nejvyšších teplot. Na obr. 4.19 je zobrazena poloha centroidů skupin v kanonickém ordinačním prostoru. Rozložení centroidů je do jisté míry podobné rozložení centroidů na RWA diagramu. Podél první osy se opět oddělují 2 shluky skupin. Druhá kanonická osa však nejlépe diskriminuje šupiny z 5 °C, i když ne příliš výrazně.

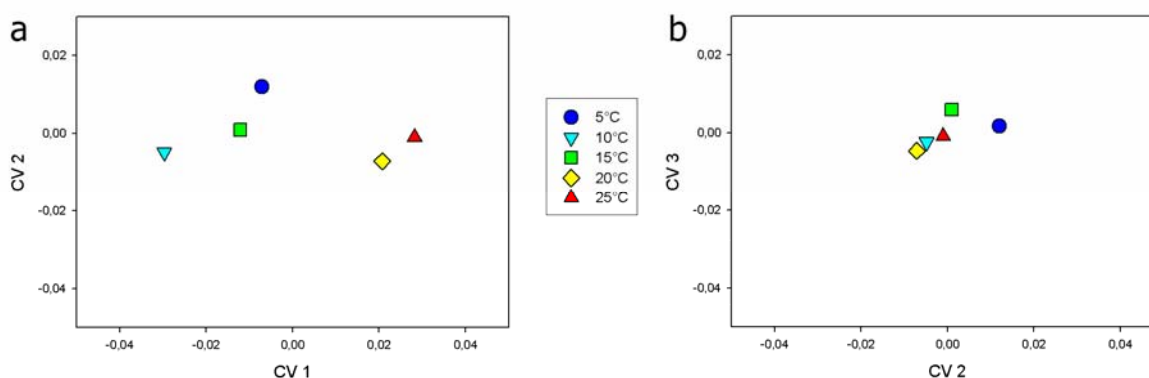
Velmi silný vztah mezi teplotou a tvarem ukázal také regresní model, který vysvětluje 20,85 % variability (Wilksovo  $\lambda = 0,454$ , permutační  $p = 0,001$ ; Goodalovo  $F = 65,575$ , permutační  $p = 0,001$ ). Na obr. 4.21 jsou vyobrazeny tvarové trendy spojené s příslušnými teplotami.



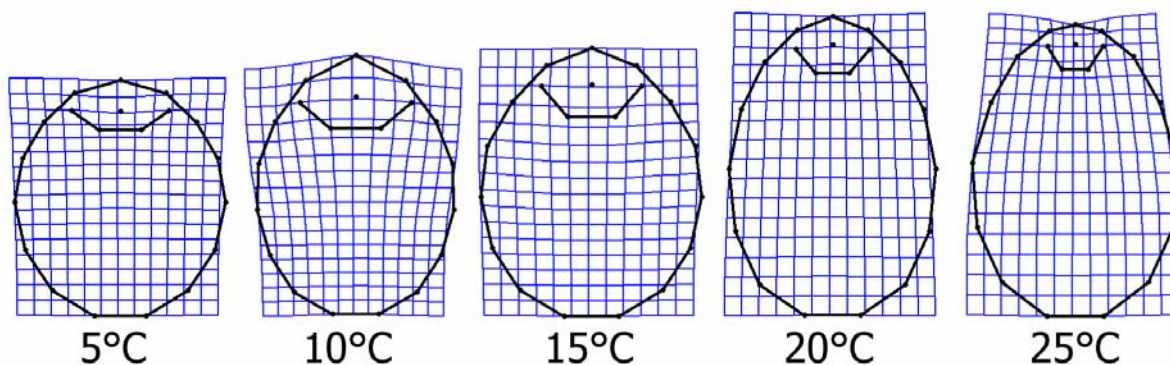
**Obr. 4.18:** *S. sphagnicola* – analýza relativních warpů. Poloha centroidů jednotlivých teplotních skupin v ordinačním prostoru definovaném prvními (a) a druhými (b) dvěma relativními warpů.



**Obr. 4.19:** *S. sphagnicola* – analýza kanonických variát. Poloha centroidů jednotlivých teplotních skupin v ordinačním prostoru definovaném prvními (a) a druhými (b) dvěma kanonickými osami.



**Obr. 4.20:** *S. sphagnicola* – nealometrická složka tvarové variability. Poloha centroidů jednotlivých teplotních skupin v ordinačním prostoru definovaném prvními (a) a druhými (b) dvěma kanonickými osami.

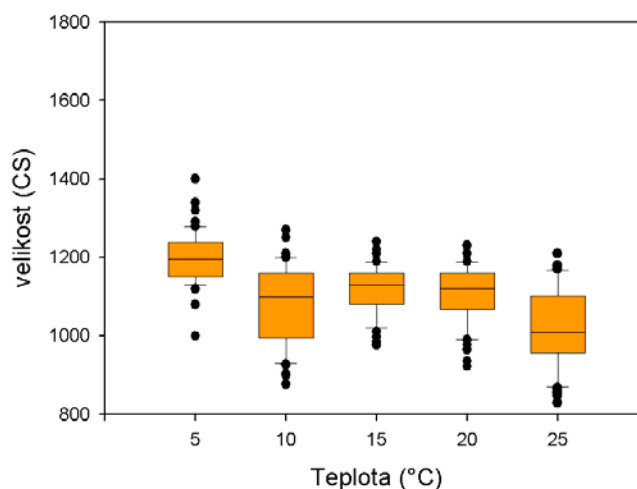


**Obr. 4.21:** *S. sphagnicola*: Deformační mřížky znázorňující trendy morfologické variability spojené s přechodem od průměrného (konsenzuálního) tvaru na dílčí konsensus skupinový. Míra deformace je třikrát zvýrazněna oproti skutečnosti.

V nízkých teplotách jsou šupiny spíše kulaté se širokým apikálním polem. S rostoucí teplotou má *S. sphagnicola* tendenci tvořit vejcovitě protažené šupiny s úzkým apikálním polem.

#### Velikost šupin

Rozložení velikosti šupin v jednotlivých teplotách je zobrazeno pomocí krabicového diagramu na obr. 4.22. Šupiny se s teplotou již na první pohled výrazně zmenšují, závislost je potvrzena i statisticky:  $r_s = -0,47$ ,  $p < 0,001$ .



**Obr. 4.22:** Centroidová velikost šupin *S. sphagnicola* v jednotlivých teplotách.

V tabulce P3c jsou uvedeny výsledky testů rozdílů v průměru a rozptylu velikosti šupin pro všechny dvojice teplot. Rozdíl ve velikosti šupin nebyl prokázán v rámci dvojic 10 – 20 °C a 15 – 20 °C.

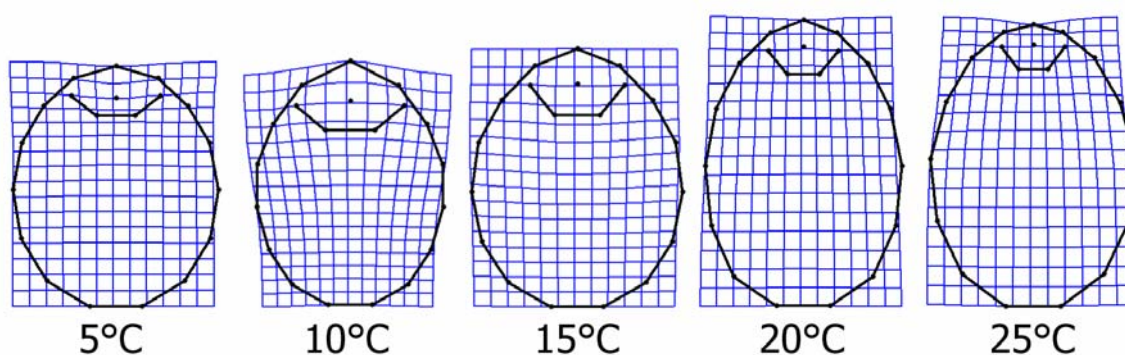
Regresní model závislosti tvaru šupiny na velikosti vysvětluje 4,46 % variability (Wilksovo  $\lambda = 0,642$ , permutační  $p = 0,001$ ; Goodalovo  $F = 11,648$ , permutační  $p = 0,001$ ), vliv velikosti je tedy výrazně nižší než vliv teploty. Velikost signifikantně koreluje s prvním relativním warpem ( $r_s = -0,25$ ;  $p < 0,001$ ).

#### Nealometrická složka tvarové variability

Pro diskriminační analýzu bylo použito prvních 10 os z PCA reziduálů, které dohromady vysvětlují 99,75 % variability. Analýza MANOVA vyšla signifikantní (Wilksovo  $\lambda = 0,3683$ ;  $F = 6,755$ ,  $p < 0,001$ ), první kanonická osa popisuje 66,89 % variability, druhá 20,59 %.

Na obr. 4.20 je vidět, jak se po odseparování části variability změnila poloha centroidů jednotlivých teplotních skupin. Stále zůstávají dobře oddělené trojice z chladnějších teplot a dvojice z vyšších, zřetelněji se odděluje teplota 10 °C. Permutační testy (tabulka P4c) potvrdily, že se od sebe všechny dvojice signifikantně liší.

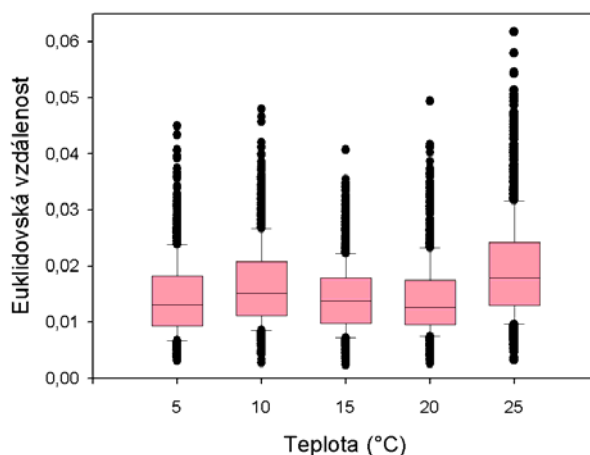
Regresní model závislosti tvaru na teplotě nyní signifikantně vysvětluje pouze 13,58 % variability (Wilksovo  $\lambda = 0,615$ , permutační  $p = 0,001$ ; Goodalovo  $F = 39,103$ , permutační  $p = 0,001$ ), je tedy vidět, že významná část tvarové variability byla spojena s alometrickým efektem. Mřížky na obr. 4.23 ukazují tvarové trendy charakteristické pro jednotlivé teploty. Zůstávají v zásadě stejné, jen zúžení apikální části v nejvyšší teplotě není tolik výrazné.



**Obr. 4.23:** *S. sphagnicola*, nealometrická tvarová komponenta. Deformační mřížky znázorňující trendy morfologické variability spojené s přechodem od průměrného (konsenzuálního) tvaru na dílčí konsensus skupinový. Míra deformace je třikrát zvýrazněna oproti skutečnosti.

### Míra tvarové variability (morfologická disparita)

Obr. 4.24 ukazuje srovnání Euklidovských vzdáleností všech dvojic šupin v jednotlivých teplotách, v tabulce P5c jsou uvedeny výsledky příslušných permutačních testů. Nejvyšší tvarová variabilita je v teplotě 25 °C, nejnižší ve 20 °C, průměrná variabilita trojice 5, 15 a 20 °C se však signifikantně neliší.



**Obr. 4.24:** Morfologická variabilita šupin *Synura sphagnicola* v různých teplotách. Je vyjádřena jako Euklidovská vzdálenost mezi objekty (šupinami) v ordinačním prostoru PCA (RWA).

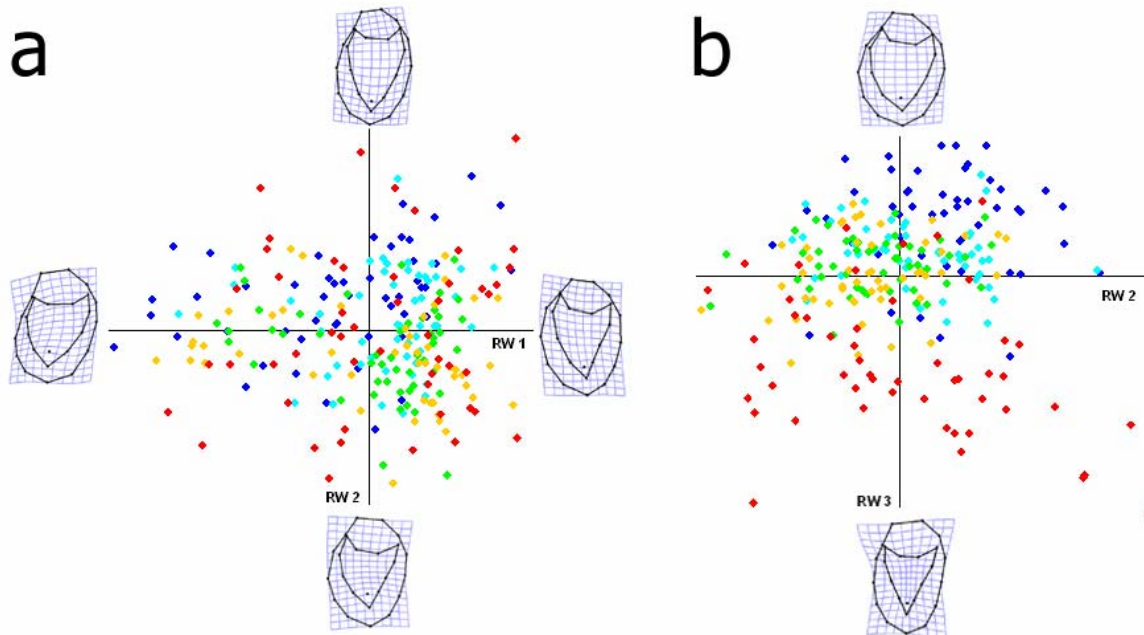
#### 4.1.4. *Mallomonas tonsurata*

##### Celková tvarová variabilita

Po provedení analýzy RWA je veškerá variabilita v souboru zahrnuta v 39-ti relativních warpech. První osa popisuje 31,68 %, druhá 16,79 % a třetí 12,21 % variability. Tabulka P7 s uvedeným podílem jednotlivých RW na celkové variabilitě se nachází v příloze. Na obr. 4.25 se nacházejí ordinační diagramy pro první tři relativní warpy a pomocí deformačních mřížek jsou zde znázorněny i tvarové trendy spojené s příslušnými osami. Poloha samotných centroidů je na obr. 4.26. První RW je spojen se zakřivením určitých částí šupiny, v podstatě náklonem V-žebra k jedné či druhé straně. Zároveň se projevuje tloušťka kápě a celková šířka V-žebra. Druhá osa je spojena s délkou šupiny a s ní související délkou V-žebra. Šířka šupiny a V-žebra je však vysvětlena především třetí osou. V-žebro širších šupin je široce rozevřené, jeho ramena svírají větší úhel, na opačné straně stojí V-žebra ostře zašpičatělá. Na obr. 4.25 a 4.26 je patrná i diskriminace teplotní skupiny 5 °C. Ve směru třetí osy dochází ke



zřetelnému rozložení teplotních skupin – nejnižší na jedné straně a nejvyšší na druhé. Úplně nejvíce se separují šupiny z 25 °C, což potvrzují i Prokrustovské vzdálenosti. Naopak nejpodobnější jsou si 15 a 20 °C (tabulka P1d).

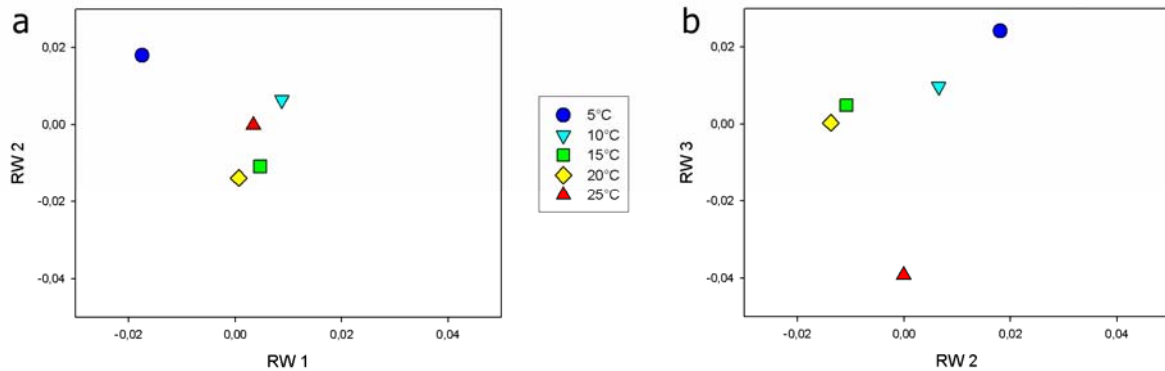


**Obr. 4.25:** Analýza relativních warpů. Ordinační diagram ukazuje hlavní trendy morfologické variability v souboru šupiny druhu *M. tonsurata* z různých pokusných teplot. Červená: 25 °C, žlutá: 20 °C, zelená: 15 °C, světle modrá: 10 °C, tmavě modrá: 5 °C. Deformační mřížky zobrazují příslušné trendy v extrémních hodnotách jednotlivých os; a: první a druhý relativní warp; b: druhý a třetí relativní warp, deformační mřížky jsou zde znázorněny pouze pro třetí RW.

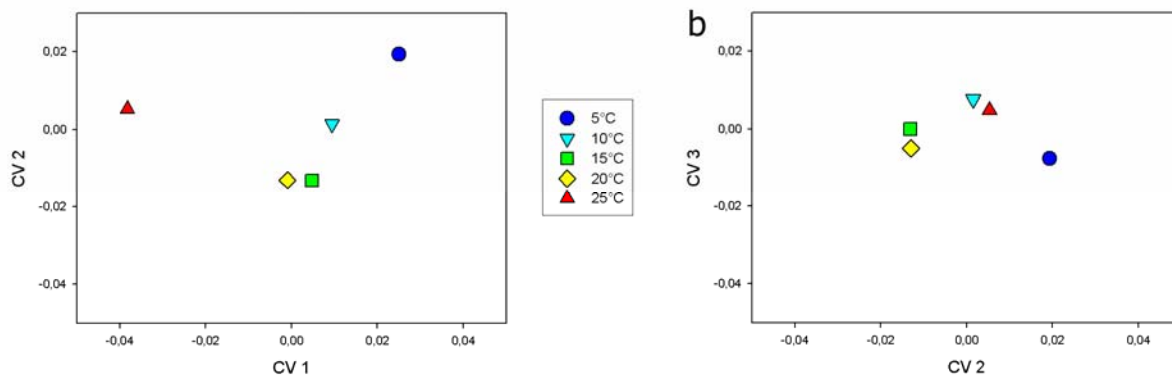
### Vliv teploty na tvar šupin

Pro diskriminační analýzu byly použity skóry na prvních 20-ti osách, které dohromady popisují 99 % veškeré variability. Zde jsou výsledky analýzy MANOVA: Wilksovo  $\lambda = 0,1507$ ;  $F = 6,881$ ;  $p < 0,001$ ). První kanonická osa popisuje 77,82 % variability, druhá 15,83 %. Jak vyplývá z výsledků permutačních testů (tabulka P2d), všechny skupiny se od sebe signifikantně odlišují.

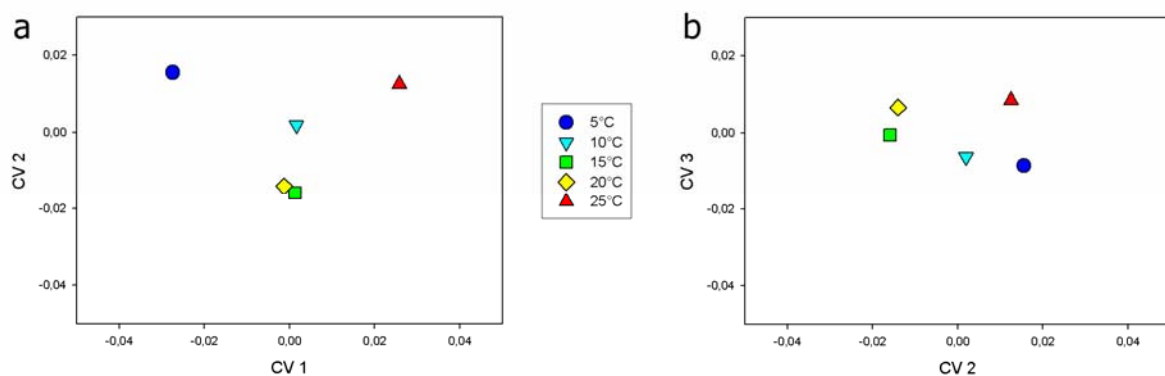
Poloha centroidů teplotních skupin v ordinačním prostoru definovaném kanonickými osami je na obr 4.27. Je patrné, že analýza kanonických variát zřetelně odlišila skupinu z 25 °C, v opačných hodnotách trendu spojeného s CV 1 se naopak nachází skupina 5 °C.



**Obr. 4.26:** *M. tonsurata* – analýza relativních warpů. Poloha centroidů jednotlivých teplotních skupin v ordinačním prostoru definovaném prvními (a) a druhými (b) dvěma relativními warpými.



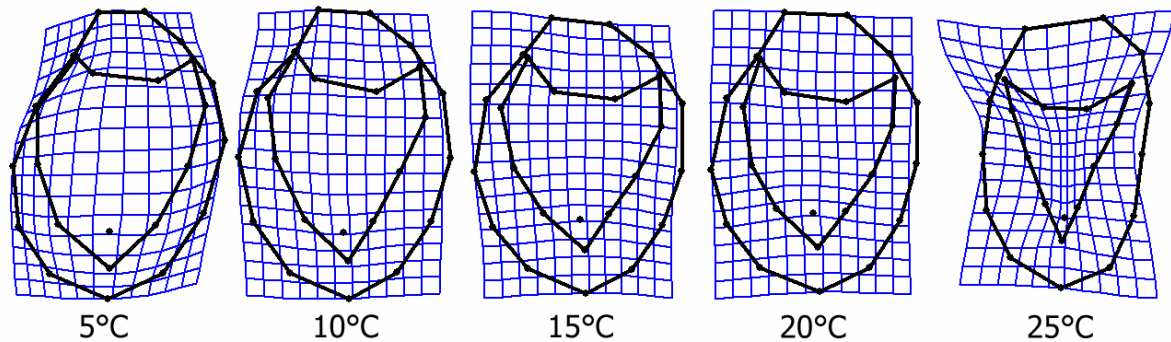
**Obr. 4.27:** *M. tonsurata* – analýza kanonických variát. Poloha centroidů jednotlivých teplotních skupin v ordinačním prostoru definovaném prvními (a) a druhými (b) dvěma kanonickými osami.



**Obr. 4.28:** *M. tonsurata* – nealometrická složka tvarové variability. Poloha centroidů jednotlivých teplotních skupin v ordinačním prostoru definovaném prvními (a) a druhými (b) dvěma kanonickými osami.

Ukázalo se, že změna teploty má signifikantní vliv na tvar – regresní model vysvětlil 7,06 % variability (Wilksovo  $\lambda = 0,287$ , permutační  $p = 0,001$ ; Goodalovo  $F = 18,686$ , permutační  $p = 0,001$ ). Tvarové trendy charakteristické pro dané teploty jsou znázorněny na obr. 4.29.

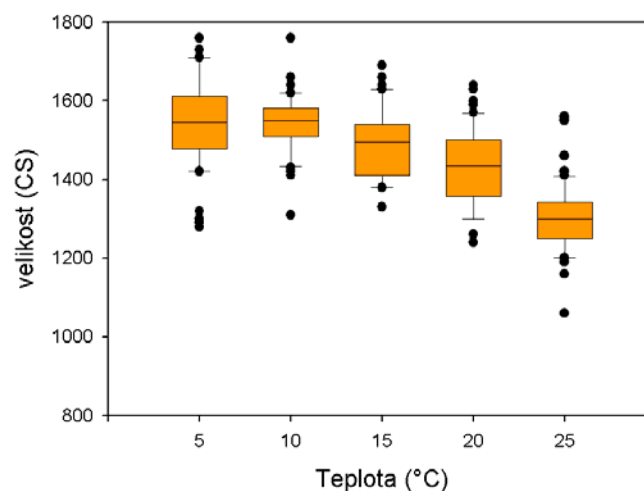
Je zde především patrný trend zvětšování plochy dómu relativně k velikosti šupiny. Velmi výrazná je odlišnost skupiny z 25 °C. Zde je tělo šupiny hodně deformované směrem ke středu a také V-žebro je hodně úzké, ostré.



**Obr. 4.29:** *M. tonsurata*: Deformační mřížky znázorňující trendy morfologické variability spojené s přechodem od průměrného (konsenzuálního) tvaru na dílčí konsensus skupinový. Míra deformace je třikrát zvýrazněna oproti skutečnosti.

### Velikost šupin

Velikost šupin je znázorněna na obr. 4.30. Šupiny se signifikantně zmenšují s rostoucí teplotou ( $r_s = -0,64$ ,  $p < 0,001$ ). Nejmenší jsou šupiny v 25 °C a největší naopak v 5 a 10 °C, kompletní výsledky testů rovnosti průměru a rozptylu jsou uvedeny v tabulce P3d.



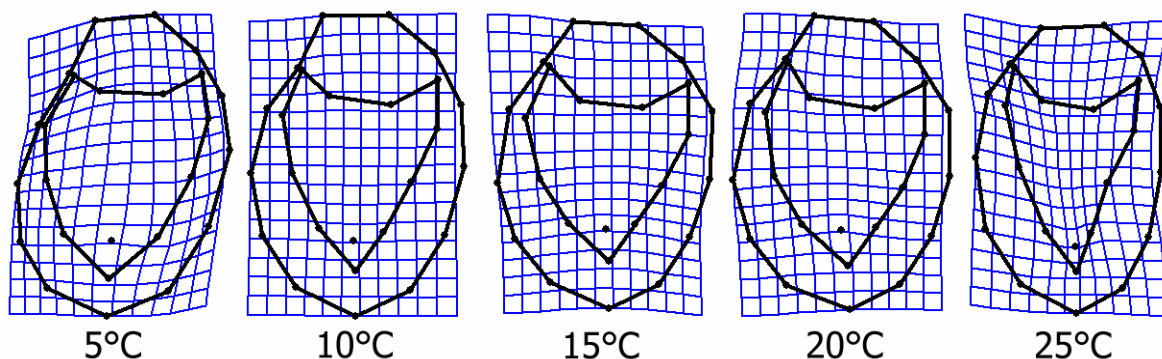
**Obr. 4.30:** Centroidová velikost šupin *M. tonsurata* v jednotlivých teplotách.

Velikost šupin je také částečně spojena s hlavním tvarovým trendem v souboru, který vyjadřuje RW 1 ( $r_s = 0,34$ ;  $p < 0,001$ ). Navíc, regresní model ukázal, že 12,18 % variability ve tvaru je spojeno právě s velikostí (Wilksovo  $\lambda = 0,14$ , permutační  $p = 0,001$ ; Goodalovo  $F = 33,997$  permutační  $p = 0,001$ ) – různá velikost má tedy na tvar větší vliv než teplota.

#### Nealometrická složka tvarové variability

Jako vstupní data do diskriminční analýzy sloužilo 11 PCA os z analýzy reziduálů, které dohromady vysvětlují 93,5 % variability. Analýza MANOVA vyšla signifikantní (Wilksovo  $\lambda = 0,4838$ ;  $F = 4,279$ ;  $p < 0,001$ ). První kanonická osa popisuje 46,24 % variability, druhá 37,72 %. Poloha centroidů jednotlivých teplotních skupin je na obr. 4.28. CV 1 nyní lépe diskriminuje obě extrémní teploty, nicméně právě ony vykazují společný trend ve směru CV 2. Všechny skupiny se signifikantně odlišují (viz tabulka P4d).

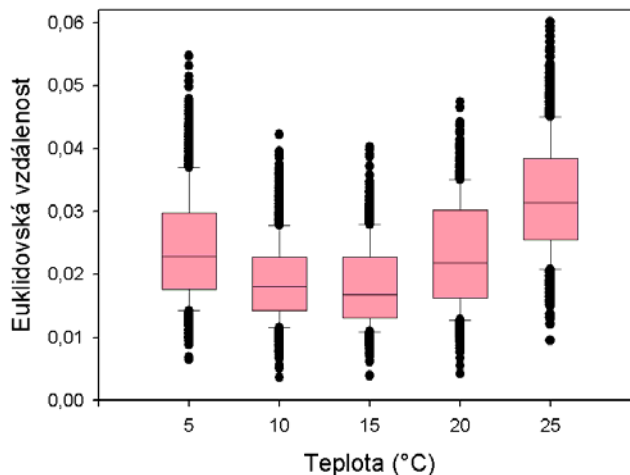
Regresní model závislosti tvaru na teplotě signifikantně vysvětluje 5,11 % variability (Wilksovo  $\lambda = 0,693$ , permutační  $p = 0,001$ ; Goodalovo  $F = 13,464$ , permutační  $p = 0,001$ ), čili o téměř 2 % méně než před odseparováním části variability. Obr. 4.31 ukazuje tvarové trendy charakteristické pro jednotlivé teploty. Již se neprojevuje výrazná změna relativní velikosti dómu – jedná se tedy o jev zapříčiněný rozdílnou velikostí šupin v daných teplotách. Morfologické trendy v teplotách 5 až 20 °C zůstaly v zásadě stejné. Šupiny z 25 °C ovšem vykazují morfologické trendy značně odlišné ve srovnání s analýzou celkové variability a již se tolik výrazně neodlišují od ostatních teplot. Největší Mahalanobisova vzdálenost je nyní mezi průměry skupin 5 a 15 °C (tab. P4d).



**Obr. 4.31:** *M. tonsurata*, nealometrická tvarová komponenta. Deformační mřížky znázorňující trendy morfologické variability spojené s přechodem od průměrného (konsenzuálního) tvaru na dílčí konsensus skupinový. Míra deformace je třikrát zvýrazněna oproti skutečnosti.

### Míra tvarové variability (morfologická disparita)

Nejméně tvarově variabilní jsou šupiny v 15 °C, zvýšení i snížení teploty přináší signifikantní nárůst průměrné vzdálenosti mezi objekty ve skupině (obr. 4.32, tab. P5d).



**Obr. 4.32:** Morfologická variabilita šupin *Mallomonas tonsurata* v různých teplotách. Je vyjádřena jako Euklidovská vzdálenost mezi objekty (šupinami) v ordinačním prostoru PCA (RWA).

## 4.2. pH pokusy

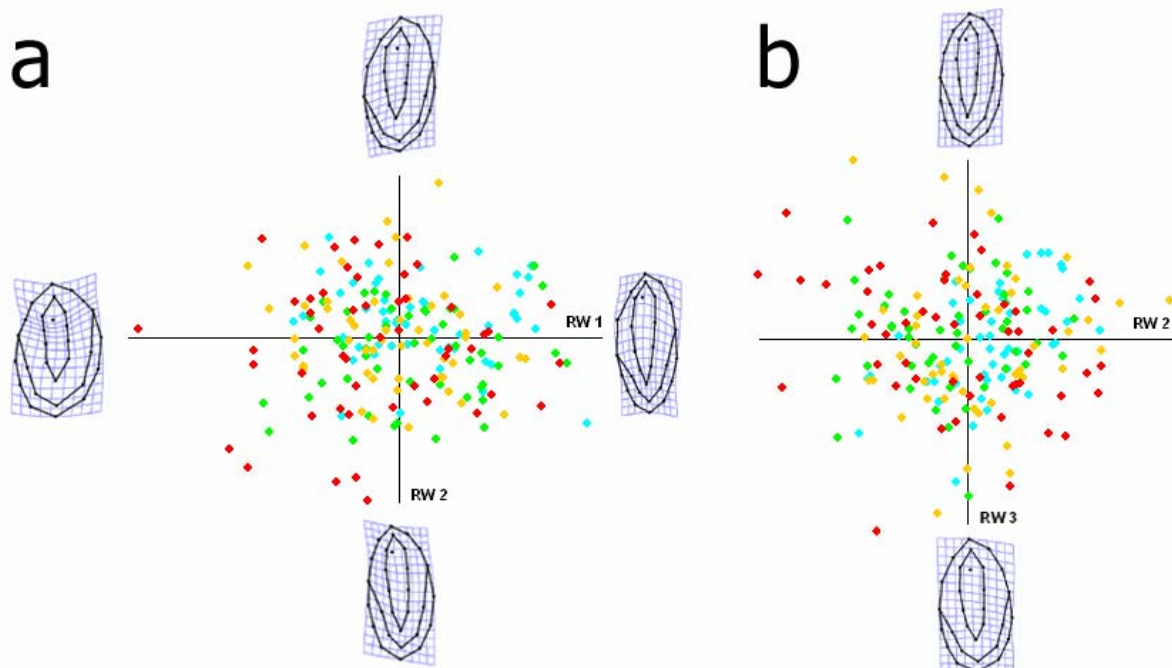
V různém pH jsem pěstovala 2 druhy chrysomonád – *S. petersenii* a *M. tonsurata*. Zatímco *S. petersenii* byla pěstována pouze ve 4 hodnotách (5,5; 6,5; 7,5 a 8,5), *M. tonsurata* ještě navíc v pH 4,5, nicméně populace v této nejnižší hodnotě rostla pomalu a ani ve chvíli ukončení pokusu nebyla příliš hustá. Navíc, nejvyšší hodnota pH musela být pravidelně upravována přidáním roztoku NaOH, neboť pH mělo tendenci zde poklesnout. Kultury ze dvou opakování jsem na konci pokusu smíchala a opět jsem náhodně vybrala 50 šupin z každé pH skupiny pro analýzu tvaru.

### 4.2.1. *Synura petersenii*

#### Celková tvarová variabilita

Celková tvarová variabilita šupin z pH pokusu byla také nejprve popsána analýzou relativních warpů. 100 % variability je obsaženo ve 46-ti relativních warpech. První 3 osy popisují po řadě 49,07 %, 17,52 % a 9,64 % variability. Zbylé hodnoty se opět nacházejí

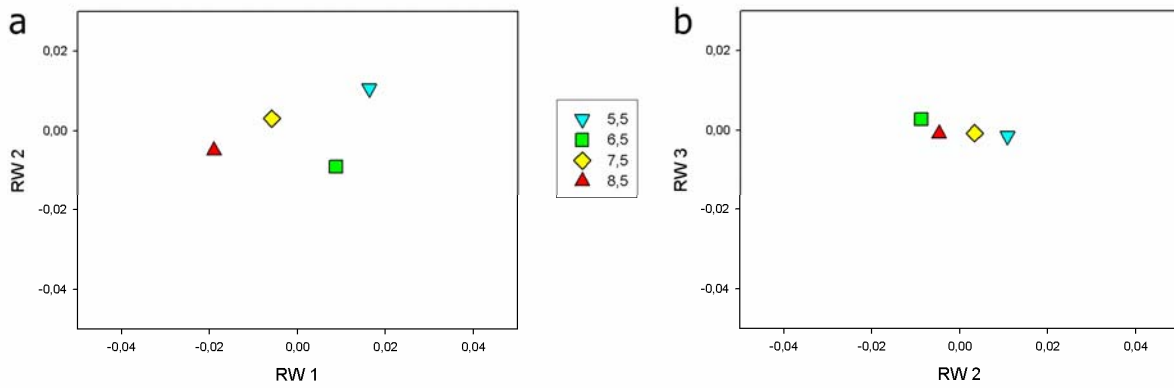
v tabulce P7 v příloze. Ordinační diagramy RWA analýzy jsou na obr. 4.33 a 4.34. Jak ukazují deformační mřížky na obr. 4.33, hlavní tvarový trend celého souboru se týká délky distální části šupiny. Máme tedy šupiny na jedné straně úzké, oválné, s krátkým přehnutým okrajem a na druhé straně širší, kulatější šupiny, u nichž přehnutý okraj dosahuje až za polovinu délky šupiny. Druhá osa popisuje především šířku přehnutého okraje a jeho relativní vzdálenost od kýlu. Třetí osa popisuje šířku šupin a také rozdíl v délce obou konců přehnutého okraje. První relativní warp je také spojen s pH – na jedné straně gradientu se nachází centroid skupiny 5,5, na druhé 8,5 (obr. 4.34). Tato dvojice má rovněž největší Prokrustovskou vzdálenost (tabulka P1e).



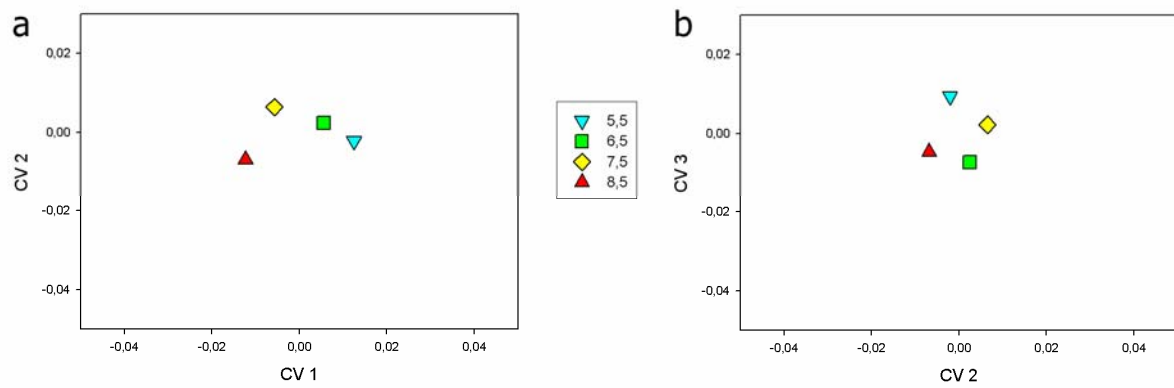
**Obr. 4.33:** Analýza relativních warpů. Ordinační diagram ukazuje hlavní trendy morfologické variability v souboru šupin druhu *S. petersenii* z různých pokusných hodnot pH. Červená: 8,5, žlutá: 7,5, zelená: 6,5, světle modrá: 5,5. Deformační mřížky zobrazují příslušné trendy v extrémních hodnotách jednotlivých os; a: první a druhý relativní warp; b: druhý a třetí relativní warp, deformační mřížky jsou zde znázorněné pouze pro třetí RW.

#### Vliv pH na tvar šupin

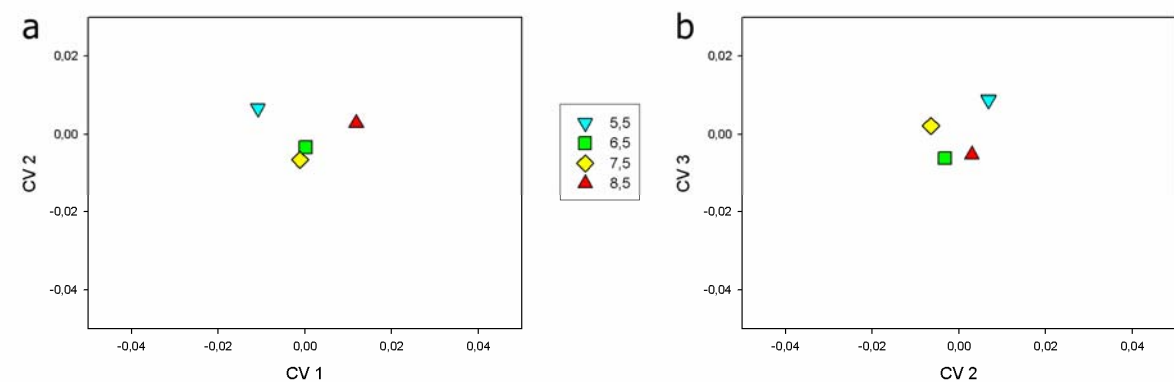
Pro diskriminační analýzu jsem použila skóry na prvních jednadvaceti relativních warpech, které zahrnují 98,83 % veškeré variability. MANOVA vyšla signifikantní (Wilksovo  $\lambda = 0,4236$ ;  $F = 2,941$ ;  $p < 0,001$ ). CV 1 popisuje 53,94 % variability, CV 2 pak 33,4 %. Všechny skupiny se od sebe signifikantně odlišují na hladině  $\alpha = 0,05$  (tabulka P2e). Podél první kanonické osy jsou navíc centroidy skupin uspořádány dle gradientu pH (obr. 4.35).



**Obr. 4.34:** *S. petersenii* – analýza relativních warpů. Poloha centroidů jednotlivých pH skupin v ordinačním prostoru definovaném prvními (a) a druhými (b) dvěma relativními warpů.

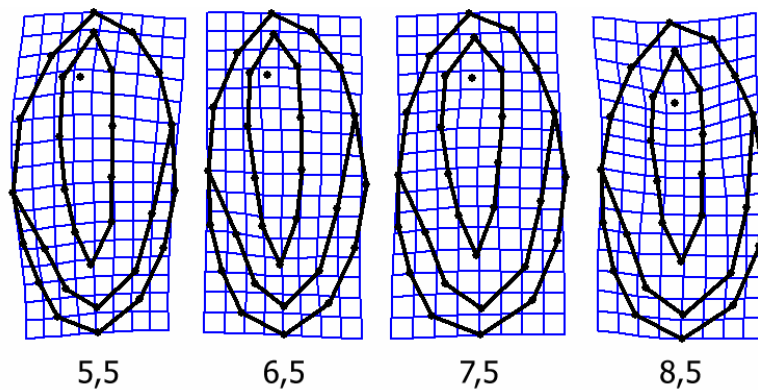


**Obr. 4.35:** *S. petersenii* – analýza relativních warpů. Poloha centroidů jednotlivých pH skupin v ordinačním prostoru definovaném prvními (a) a druhými (b) dvěma relativními warpů.



**Obr. 4.36:** *S. petersenii* – nealometrická složka tvarové variability. Poloha centroidů jednotlivých pH skupin v ordinačním prostoru definovaném prvními (a) a druhými (b) dvěma kanonickými osami.

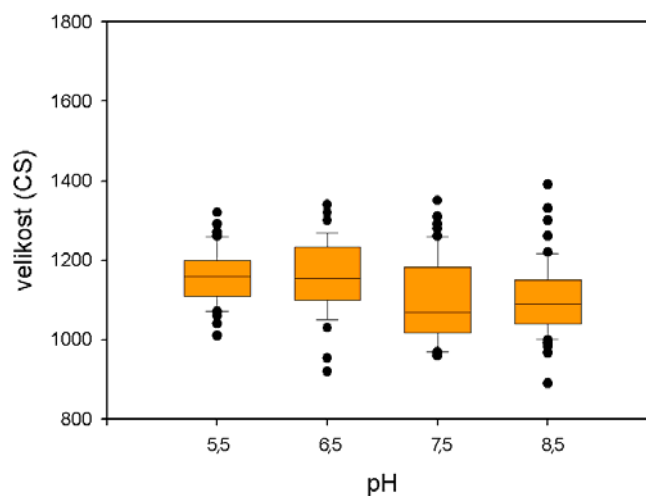
Regresní model vlivu pH na tvar šupin signifikantně vysvětlil 3,5 % variability (Wilksovo  $\lambda = 0,464$ , permutační  $p = 0,001$ ; Goodalovo  $F = 7,114$ , permutační  $p = 0,001$ ). Tvarové trendy charakteristické pro jednotlivá pH jsou znázorněny na obr. 4.37. Vliv na tvar není v tomto případě tolik výrazný jako vliv teploty, pozorovatelné je například zkrácení distální části šupiny v nejvyšších hodnotách pH nebo posun póru zleva doprostřed kýlu.



**Obr. 4.37:** *S. petersenii*: Deformační mřížky znázorňující trendy morfologické variability spojené s přechodem od průměrného (konsenzuálního) tvaru na dílčí konsensus skupinový. Míra deformace je třikrát zvýrazněna oproti skutečnosti.

### Velikost šupin

Velikost šupin ukazuje obr. 4.38. Dle výsledku regrese se šupiny signifikantně zmenšují s rostoucím pH ( $r_s = -0,32$ ;  $p < 0,001$ ), avšak shoda průměrů sousedních dvojic 5,5 - 6,5 a 7,5 - 8,5 nemohla být zamítnuta (tabulka P3e).



**Obr. 4.38:** Centroidová velikost šupin *S. petersenii* v jednotlivých pokusných pH.

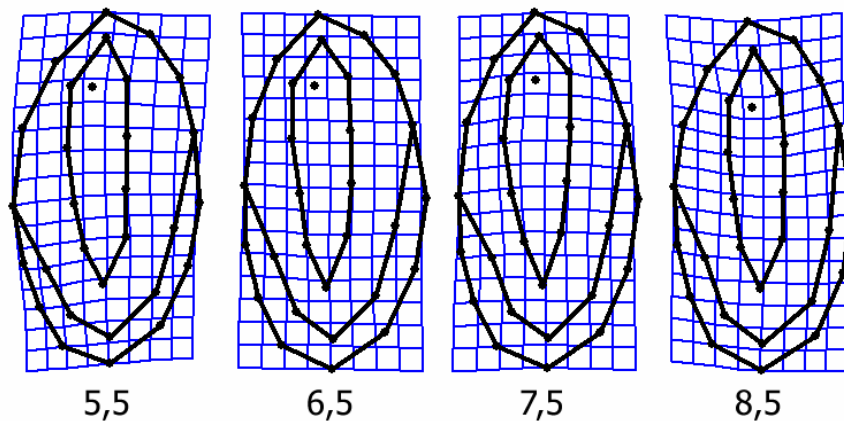


Velikost také koreluje s prvním relativním warpem ( $r_s = 0,54$ ;  $p < 0,001$ ) a vysvětluje dokonce 17,1 % variability v datech (dle regresního modelu: Wilksovo  $\lambda = 0,179$ , permutační  $p = 0,001$ ; Goodalovo  $F = 40,962$ , permutační  $p = 0,001$ ). Je patrné, že velikost má značný podíl na celkové variabilitě, ale s pH není příliš silně spojena.

#### Nealometrická složka tvarové variability

Do analýz MANOVA a CVA vstupovaly skóry na 9 PCA osách, které popisují 91,56 % variability. Analýza MANOVA vyšla signifikantní (Wilksovo  $\lambda = 0,6811$ ;  $F = 2,861$ ;  $p < 0,001$ ). První kanonická osa popisuje 57,84 % variability, druhá 31,36 %. Centroidy krajních hodnot pH se separují podél první kanonické osy (obr. 4.36). U dvojice 6,5 a 7,5 nemohla být zamítnuta shoda průměrů (tab. P4e). Jejich tvarová odlišnost byla tudíž dána jejich odlišnou velikostí.

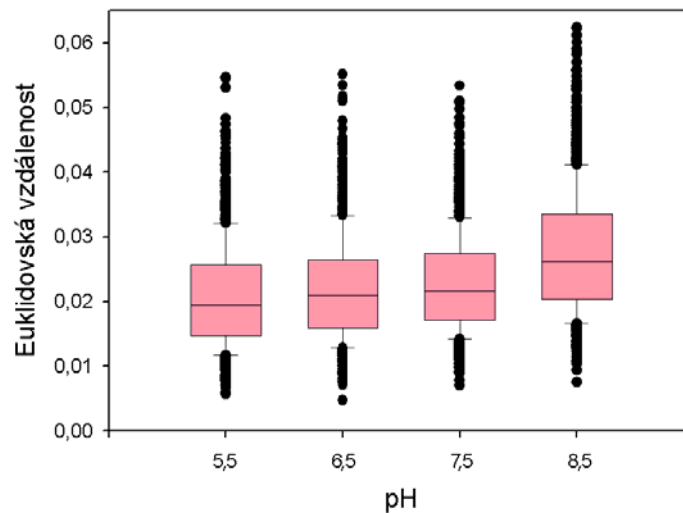
Regresní model závislosti tvaru na teplotě nyní signifikantně vysvětlil pouze 1,64 % variability (Wilksovo  $\lambda = 0,542$ , permutační  $p = 0,001$ ; Goodalovo  $F = 3,325$ , permutační  $p = 0,018$ ), z čehož vyplývá, že část tvarové variability vysvětlené různým pH byla spojena s velikostí šupin. Tvarové trendy charakteristické pro jednotlivé teploty se po odseparování části variability v zásadě nezměnily (obr. 4.39).



**Obr. 4.39:** *S. petersenii*, nealometrická tvarová komponenta. Deformační mřížky znázorňující trendy morfologické variability spojené s přechodem od průměrného (konsenzuálního) tvaru na dílčí konsensus skupinový. Míra deformace je třikrát zvýrazněna oproti skutečnosti.

#### Míra tvarové variability (morfologická disparita)

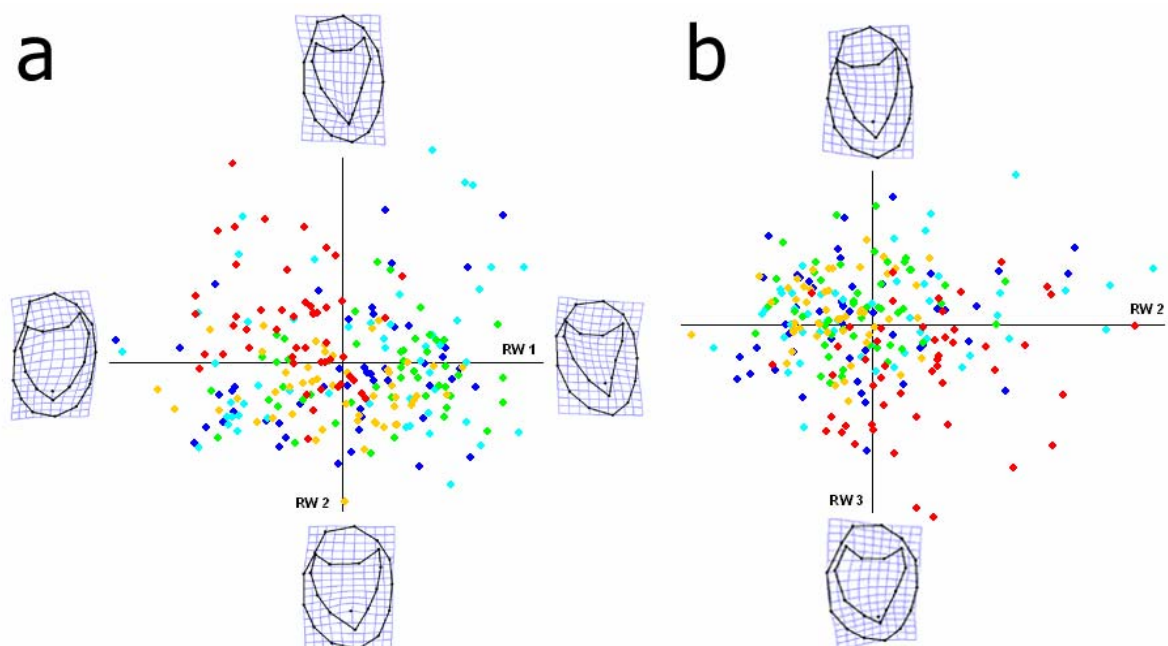
Nejvyšší tvarovou variabilitu mají šupiny z nejvyššího pH (8,5), nejnižší v 5,5 (obr. 4.40, tab. P5e).



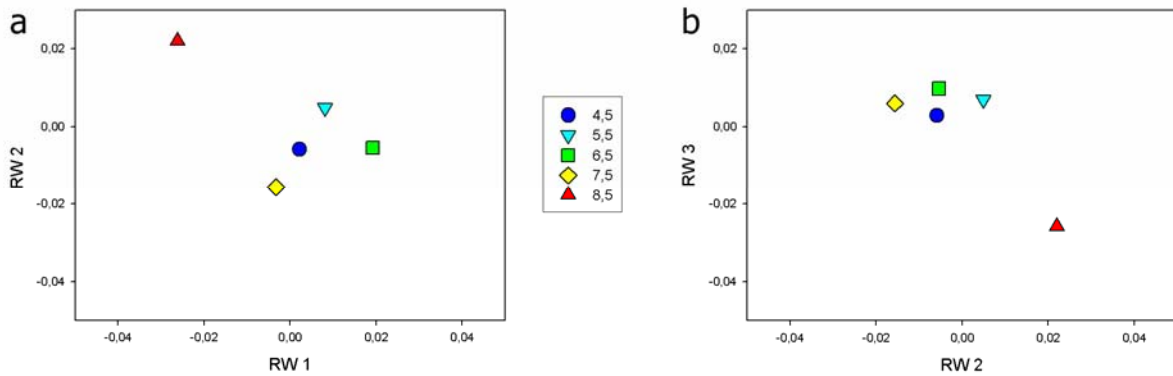
**Obr. 4.40:** Morfologická variabilita šupin *Synura petersenii* v různých hodnotách pH. Je vyjádřena jako Euklidovská vzdálenost mezi objekty (šupinami) v ordinačním prostoru PCA (RWA).

#### 4.2.2. *Mallomonas tonsurata*

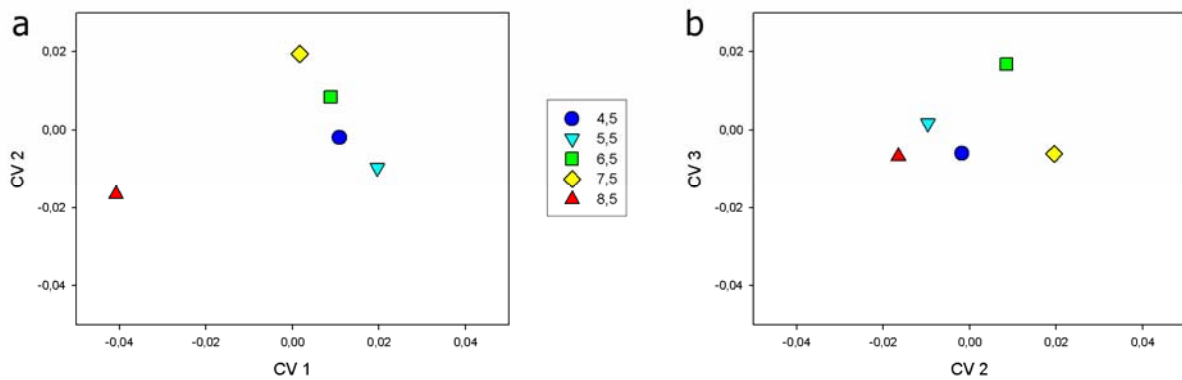
##### Celková tvarová variabilita



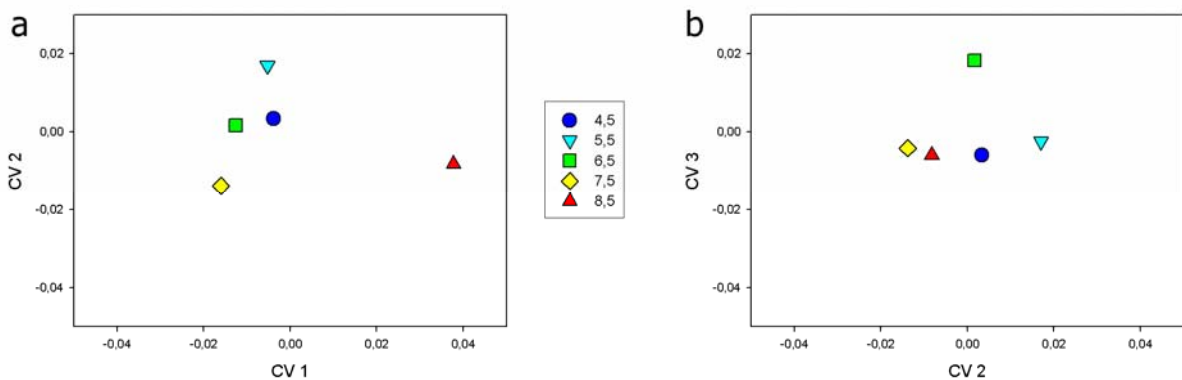
**Obr. 4.41:** Analýza relativních warpů. Ordinační diagram ukazuje hlavní trendy morfologické variability v souboru šupin druhu *M. tonsurata* z různých pokusných hodnot pH. Červená: 8,5, žlutá: 7,5, zelená: 6,5, světle modrá: 5,5, tmavě modrá: 4,5. Deformační mřížky zobrazují příslušné trendy v extrémních hodnotách jednotlivých os; a: první a druhý relativní warp; b: druhý a třetí relativní warp, deformační mřížky jsou zde znázorněny pouze pro třetí RW.



**Obr. 4.42:** *M. tonsurata* – analýza relativních warpů. Poloha centroidů jednotlivých pH skupin v ordinačním prostoru definovaném prvními (a) a druhými (b) dvěma relativními warpů.



**Obr. 4.43:** *M. tonsurata* – analýza relativních warpů. Poloha centroidů jednotlivých pH skupin v ordinačním prostoru definovaném prvními (a) a druhými (b) dvěma relativními warpů.



**Obr. 4.44:** *M. tonsurata* – nealometrická složka tvarové variability. Poloha centroidů jednotlivých pH skupin v ordinačním prostoru definovaném prvními (a) a druhými (b) dvěma kanonickými osami.

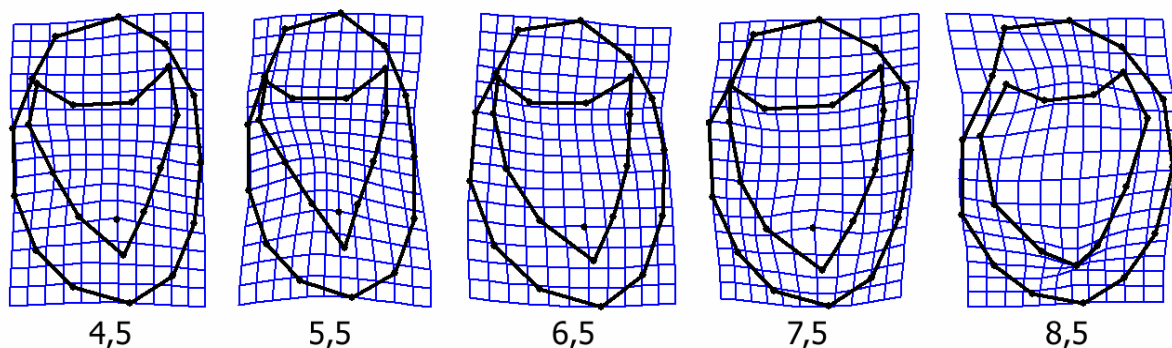
Ordinační diagram z analýzy relativních warpů spolu s deformačními mřížkami pro extrémní osy ukazuje základní trendy v morfologii celého souboru šupin. (obr. 4.41, 4.42). RW 1 vysvětluje 29,44 % variability, RW 2 16,35 % a RW 3 12,14 %. Hodnoty pro další relativní warpy se nacházejí v tabulce P7. Hlavní tvarový trend v souboru se týká zahnutí celého V-žebra nalevo či napravo, to je navíc široce rozevřené či ostře špičaté. Druhá osa je spojena především s šířkou kápě a třetí osa také popisuje tvar V-žebra a šířku kápě. Výrazně tvarově odlišné jsou šupiny z pH 8,5, oddělují se prakticky na všech třech vyobrazených osách a také jejich Prokrustovské vzdálenosti od všech ostatních jsou vysoké (tabulka P1f).

#### Vliv pH na tvar šupin

Analýzy MANOVA a CVA byly provedeny s použitím skóru na prvních 20-ti relativních warpech zahrnujících 98,69 % variability. Wilksovo  $\lambda = 0,09581$ ;  $F = 9,076$ ;  $p < 0,001$ .

CV 1 popisuje 71,25 % variability, CV 2 pak 19,76 %. Všechny skupiny se od sebe signifikantně odlišují na hladině  $\alpha = 0,05$  (tabulka P2f). Obr. 4.43 ukazuje polohu centroidů v kanonickém ordinačním prostoru, podél CV 1 se výrazně oddělují šupiny z pH 8,5.

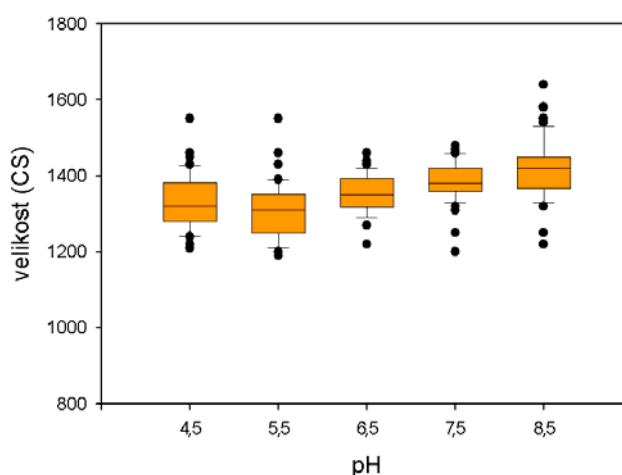
Regresní model vlivu pH na tvar šupin signifikantně vysvětlil 5,4 % variability (Wilksovo  $\lambda = 0,310$ , permutační  $p = 0,001$ ; Goodalovo  $F = 14,131$  permutační  $p = 0,001$ ). Tvarové trendy charakteristické pro jednotlivá pH jsou znázorněny na obr. 4.45. Výrazně se opět vyčleňuje nejvyšší pH. Také míra deformace je zde obrovská – morfologický trend je dobře pozorovatelný již při dvojnásobném zdůraznění, při trojitěm již dochází k biologicky neinterpretovatelnému přehnutí v oblasti kápě. Ta se totiž v nejvyšším pH v podstatě nevytváří, celé V-žebro bylo velmi tenké.



**Obr. 4.45:** *M. tonsurata*: Deformační mřížky znázorňující trendy morfologické variability spojené s přechodem od průměrného (konsenzuálního) tvaru na dílčí konsensus skupinový. Míra deformace je oproti skutečnosti třikrát zvýrazněna, u pH 8,5 pouze dvakrát.

Velikost šupin

Obrázek 4.46 znázorňuje velikost šupin v jednotlivých hodnotách pH. Šupiny se v tomto případě signifikantně zvětšovaly s rostoucím pH ( $r_s = 0,47$ ;  $p < 0,001$ ). Nejnižší průměrné velikosti dosahovaly šupiny v pH 5,5, avšak shoda průměrů skupin 4,5 a 5,5 nebyla zamítnuta (tab. P3f). Velikost šupin nekoreluje signifikantně s prvním relativním warpem ( $r_s = -0,02$ ;  $p = 0,44$ ), tudíž hlavní morfologický trend v datovém souboru není spojen s velikostí. Nicméně, dle regresního modelu vysvětluje velikost 4,14 % veškeré variability (Wilksovo  $\lambda = 0,387$ , permutační  $p = 0,001$ ; Goodalovo  $F = 10,773$ , permutační  $p = 0,001$ ).



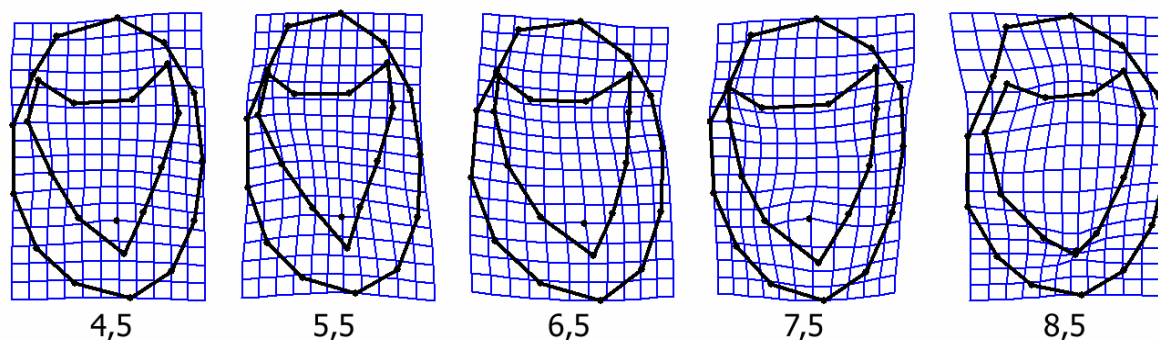
**Obr. 4.46:** Centroidová velikost šupin *M. tonsurata* v jednotlivých pokusných pH.

Nealometrická složka tvarové variability

Pro analýzy byly použity skóry na prvních 11-ti RWA osách vysvětlujících 92,74 % variability. Analýza MANOVA vyšla signifikantní (Wilksovo  $\lambda = 0,2471$ ;  $F = 9,034$ ;  $p < 0,001$ ). První kanonická osa popsala 60,39 % variability, druhá 26,4 %. Podél CV 1 dochází stále k výrazné separaci šupin z nejvyššího pH. Nicméně, ostatní skupiny již nejsou uspořádány podle gradientu pH. Třetí kanonická osa odděluje od ostatních pH 6,5 (obr. 4.44). Všechny dvojice se signifikantně liší (tab. P4f).

Regresní model závislosti tvaru na teplotě nyní signifikantně vysvětlil 2,88 % variability (Wilksovo  $\lambda = 0,515$ , permutační  $p = 0,001$ ; Goodalovo  $F = 7,418$ , permutační  $p = 0,001$ ). Tvarové trendy charakteristické pro jednotlivé teploty po odstranění alometrické komponenty tvaru jsou znázorněny mřížkami na obr. 4.47. Je patrné, že se v zásadě nezměnily.

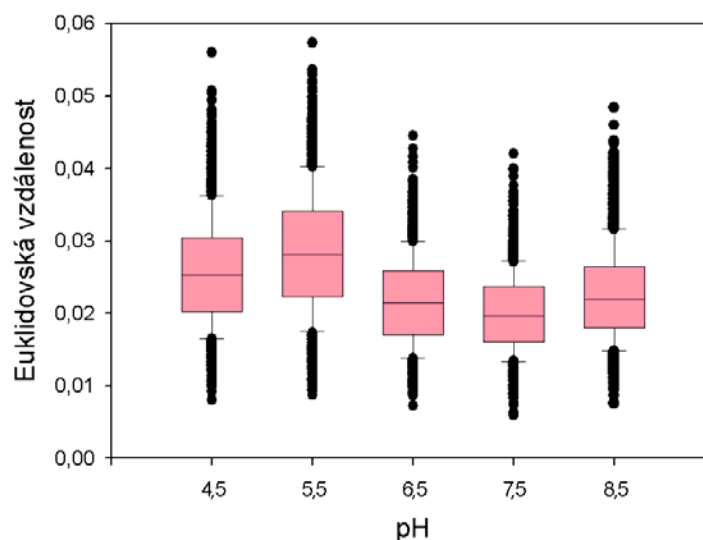
Šupiny buněk pěstovaných v nejvyšším pH (8,5) byly sice největší, ale i po odstranění alometrického efektu se od ostatních nejvíc lišily svým tvarem. Navíc byly jiné již na první pohled při pořizování fotografií na TEM - byly zřetelně málo silifikované.



**Obr. 4.47:** *M. tonsurata*, nealometrická tvarová komponenta. Deformační mřížky znázorňující trendy morfologické variability spojené s přechodem od průměrného (konsenzuálního) tvaru na dílčí konsensus skupinový. Míra deformace je oproti skutečnosti třikrát zvýrazněna, u pH 8,5 pouze dvakrát.

#### Míra tvarové variability (morfologická disparita)

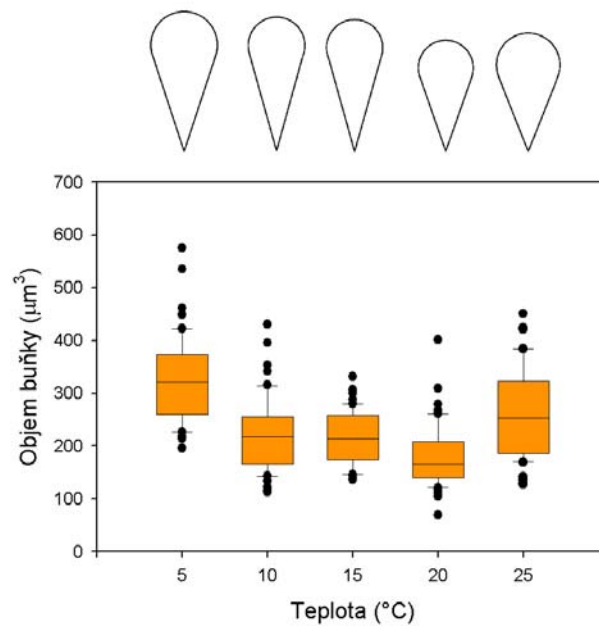
Variabilita ve tvaru je u *Mallomonas tonsurata* největší v pH 5,5, nejnižší v 7,5 (obr. 4.48, tab. P5f).



**Obr. 4.48:** Morfologická variabilita šupin *Mallomonas tonsurata* v různých hodnotách pH. Je vyjádřena jako Euklidovská vzdálenost mezi objekty (šupinami) v ordinačním prostoru PCA (RWA).

### 4.3. Velikost buněk *Synura petersenii* v různých teplotách

Pro ověření platnosti Atkinsonova pravidla (ATKINSON 1994, ATKINSON et al. 2003) u buněk chrysomád jsem v rámci teplotního pokusu na druhu *S. petersenii* počítala také objem buněk, výsledné hodnoty jsou znázorněné na obr. 4.49. Průměry všech skupin kromě dvojice 10 a 15 °C se od sebe signifikantně liší (tabulka P6 v příloze).



**Obr. 4.49:** Objem buněk *Synura petersenii* v různých pokusných teplotách. Součástí obrázku je také přibližná rekonstrukce obrysu průměrných buněk v dané teplotě.

## 5. Diskuse

### 5.1. Shrnutí a porovnání výsledků

U všech provedených teplotních pokusů byl prokázán signifikantní vliv teploty na tvar šupin, i když proporce celkové variability vysvětlené regresním modelem se mezi jednotlivými druhy značně lišila (nejméně 2,36 % u *S. echinulata* a nejvíce 20,85 % u *S. sphagnicola*). Již první relativní warp vyjadřující hlavní tvarový trend datového souboru je ve dvou případech (*S. petersenii*, *S. sphagnicola*) zjevně spojen s gradientem teploty. Jak je vidět na CVA ordinačních diagramech (cílem CVA je odlišit předem definované teplotní skupiny), u všech druhů se poměrně dobře odlišují jednotlivé teploty a diskriminace obou krajních teplot je vždy zcela zřetelná. Navíc, až na několik málo výjimek (dvojice 10-15 a 15-20 °C u *S. echinulata* a 20-25 °C u *S. sphagnicola*) se všechny dvojice centroidů skupin signifikantně odlišují (viz. tabulka P2, příloha), což znamená, že průměrný tvar šupin je v jednotlivých teplotách prokazatelně různý.

Kromě druhu *S. echinulata* bylo prokázáno zmenšování šupin spolu se zvyšující se teplotou. Velikost měla zároveň signifikantní vliv na tvar šupin – projevila se tak u šupin alometrie. Tento vztah byl rovněž testován regresním modelem, kde velikost vysvětlila od 4,46 (*S. sphagnicola*) do 12,18 % (*M. tonsurata*) variability v datech. U všech zkoumaných druhů se také prokázala různě silná korelace velikosti šupin s prvním relativním warpem (ten vyjadřuje hlavní morfologický trend v celém souboru 250-ti šupin ze všech teplotních skupin dohromady), což ukazuje na význam alometrie v celkové morfologické variabilitě datového souboru.

U obou provedených experimentů se pH projevilo jako důležitý faktor se signifikantním vlivem na tvar šupin. V obou pokusech se od sebe dokonce všechny dvojice definovaných pH skupin signifikantně odlišují tvarem. Pozoruhodná je také zjištěná souvislost mezi pH a velikostí – šupiny druhu *S. petersenii* se zmenšují se zvyšujícím se pH, zatímco šupiny *M. tonsurata* zvětšují. I zde velikost vysvětlila významnou část tvarové variability v datech, u *S. petersenii* koreluje s prvním relativním warpem, a to dokonce silněji než pH.

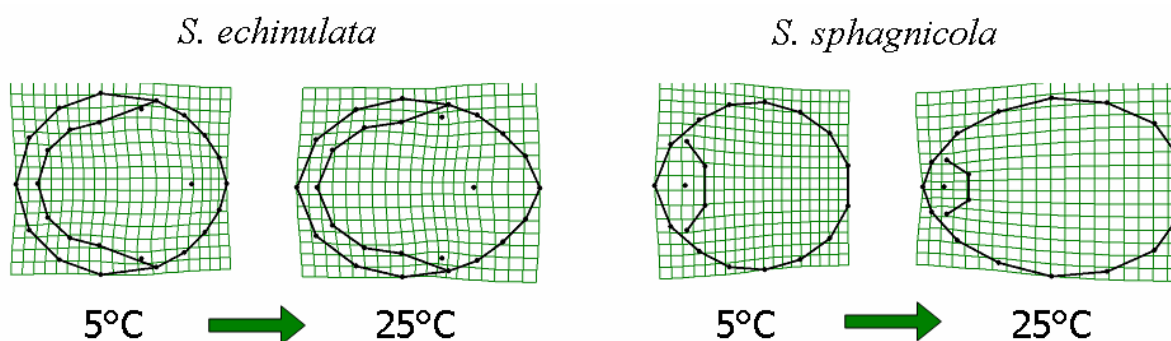
### 5.2. Morfologické trendy spojené se zkoumanými parametry

Teplota i pH obecně ovlivňují morfologii organismů, které jsou jejich různým hodnotám vystaveny. Konkrétně u řas se různá teplota projevila např. na morfologii krásivky



*Micrasterias rotata* (Zygnematophyceae), která vytváří mělčí zářezy, když roste v teplejším médiu (NEUSTUPA et al. 2008). Dále, teplotně závislé rozdíly v délce a šířce buněk, případně i v počtu buněk ve vlákně, byly popsány u dvou druhů rodu *Raphidonema* (STIBAL & ELSTER 2005). Co se týče pH, bylo například zjištěno, že v zásaditějším médiu mají laloky okrajových buněk coenobiální řasy *Pediastrum duplex* užší báze a svírají ostřejší úhel (NEUSTUPA & HODÁČ 2005). Také spájivka *Mougeotia* vykazuje signifikantní rozdíly v morfologii vláken v různém pH, navíc se projevují i ultrastrukturální změny na její buněčné stěně (ARANCIBIA-AVILA et al. 2000).

Konkrétní morfologické trendy v závislosti na teplotě či pH zjištěné v současné studii se napříč jednotlivými druhy obtížně porovnávají, neboť studované struktury na šupinách jednotlivých druhů nejsou zcela homologické, a tak byla v každém případě použita jiná sada homologních bodů (landmarků). Nicméně, alespoň na celkovém tvaru (obrysu) šupin bylo možné vypořádat obecný trend spojený s teplotou. U *S. echinulata* a *S. sphagnicola* šupiny se zvyšující se teplotou mění tvar od zakulacených po oválné (až vejčité), obr. 5.1.



**Obr. 5.1:** Deformační mřížky znázorňující tvarový trend spojený se změnou teploty – z regresního modelu. Míra deformace je třikrát zvýrazněna oproti skutečnosti.

Také u *S. petersenii* a *M. tonsurata* je dobře vidět, že v nejnižší teplotě máme šupiny nejširší a ve vyšší poněkud užší (obr. 4.7 a 4.31). Zmíněný trend navíc nebyl ovlivněn rozdílnou velikostí, jedná se čistě o vliv teploty. Tento výsledek je v souladu s variabilitou již pozorovanou u *S. petersenii*, jejíž šupiny byly s rostoucí teplotou oválnější a užší (MARTIN-WAGENMANN & GUTOWSKI 1995). Podobný trend se projevil i u *S. curtispina* (ŘEZÁČOVÁ-ŠKALOUDOVÁ et al. in press). Avšak u *Mallomonas kalinae*, který byl sledován v rámci téže studie, byly šupiny nejužší v prostřední pokusné teplotě (20 °C). Zřejmě se však přesto jedná o obecnější trend v rámci chrysomonád. Nicméně, teplota není jediným faktorem s prokazatelným vlivem na obrys šupin – také množství živin (fosforu, dusíku, křemíku) v médiu se významně podílí na jejich tvaru (HAHN et al. 1996).

Rovněž šířka přehnutého okraje byla sledována u dvou druhů – *S. petersenii* a *S. echinulata*. U *S. petersenii* je vidět, že se okraj s teplotou rozšiřuje. Naopak, u *S. echinulata* je přehnutý okraj nejužší právě v nejvyšší teplotě. V oblasti okraje je šupina překryta šupinou sousední (SIVER & GLEW 1990), jedná se tedy o strukturu důležitou pro udržení stability celé konstrukce šupinové schránky. Změna jeho morfologie pravděpodobně kompenzuje jiné změny tak, aby se zachovala pevnost šupiny a schopnost tvořit funkční schránku. Např. u *S. petersenii* se širší okraj objevuje v souvislosti s úzkým kýlem (viz obr. 4.5 a 4.7). V této práci nebyla šířka okraje sledována u *M. tonsurata*, ale GUTOWSKI (1996) uvádí, že přehnutý okraj je u tohoto druhu strukturou velmi variabilní, jeho morfologie je však nezávislá na teplotě.

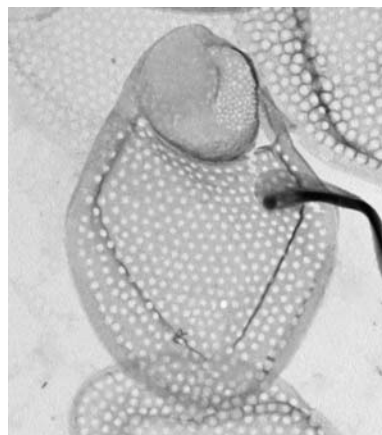
Také další poznatky o morfologii šupin v závislosti na ekologických faktorech lze srovnat s již publikovanými pracemi. GUTOWSKI (1996) již zkoumala přímo druh *M. tonsurata* a také v teplotě od 5 do 25 °C. Shodně se s rostoucí teplotou projevilo zmenšování (zkracování) šupin, současné zvětšování dómu a zmenšování úhlu V-žebra. Na druhou stranu, šupiny typické pro 5 °C by dle autorky měly být hodně dlouhé a úzké, což je trend, který v současné studii potvrzen nebyl. Avšak GUTOWSKI (1996) ve své práci zároveň uvádí, že populace v 5 °C vůbec nerostla. Nabízí se tak otázka, zda analyzované šupiny byly skutečně vytvořeny v pokusných podmínkách 5 °C či zda nepatřily pouze iniciálnímu inokulu.

Zmíněná změna proporce dómu se však projevila také u *Mallomonas kalinae* (ŘEZÁČOVÁ-ŠKALOUDOVÁ et al. in press), zřejmě se tedy opět jedná o obecnější trend v rámci rodu. Rozdílné (v podstatě zcela opačné) morfologické trendy na dómu a těle šupiny bývají vysvětlovány pravděpodobným nezávislým vznikem těchto dvou struktur – dle této hypotézy jsou dóm a anteriorní část šupiny tvořeny oddělenými konstrukčními mechanismy a k sobě připojeny až později během ontogeneze šupiny (GUTOWSKI 1996, HAHN et al. 1996).

V současné studii *S. petersenii* dobře rostla v celém gradientu pH 5,5 – 8,5 a ani v krajních hodnotách nebyly pozorované výrazně odlišné tvarové trendy či dokonce deformace. Použitá kultura byla izolovaná dokonce z pH 4,2 a v hodnotách 5,5 je dlouhodobě úspěšně kultivována. V tomto rozmezí pH *S. petersenii* rostla i v dalších experimentech (WEE et al. 1991, SAXBY-ROUEN et al. 1997). Naproti tomu KIM et al (2008) již nenaměřili pozitivní růst v pH 8,5 u žádného ze tří pokusných kmenů. Navíc, GAVRILOVA et al. (2005) uvádějí 5,5 a 8,5 jako extrémní a stresující hodnoty pro *S. petersenii*, při nichž se často vyskytovaly slabě silifikované a různě deformované šupiny. Kromě toho se ukázalo, že různé kmeny použité v rámci jedné ekofyziologické studie vykazují zřetelně odlišné vlastnosti (WEE et al. 1991, GAVRILOVA 2005, KIM et al. 2008). Mohlo by se jednat o projev různých lokálních adaptací.

Avšak zároveň se u šupin různých kmenů *S. petersenii* objevují morfologické rozdíly, které zůstávají zcela zřetelné i v různých experimentálních podmínkách (WEE et al. 1991, MARTIN-WAGENMANN & GUTOWSKI 1995). Navíc, KYNČLOVÁ et al. (subm.), zjistili, že tradičně pojímaný druh *S. petersenii* je vlastně komplex několika druhů – molekulárně určené nové druhy lze dokonce rozlišit i na základě morfologie šupin. Proto lze předpokládat, že kmeny použité v řadě ekofyziologických studií ve skutečnosti patřily geneticky velmi odlišným populacím. Není tedy překvapivé, že vykazují různé vlastnosti a je třeba opatrnosti při interpretaci a porovnávání výsledků těchto různých prací.

U *S. petersenii* a *M. tonsurata* lze též porovnat vlivy obou faktorů (jednalo se o tytéž kmeny) – teploty i pH. U *S. petersenii* byl vliv pH na tvar poměrně nevýrazný, alespoň ve srovnání s vlivem teploty. U *M. tonsurata* se šupiny s rostoucím pH rozšiřují a ramena V-žebra tudíž svírají větší úhel – nicméně nejužší šupiny s nejostřejším úhlem pocházejí z pH 5,5 (což byla druhá nejnižší studovaná hodnota). Na slabou silifikaci a celkovou výraznou tvarovou odlišnost skupiny 8,5 mohla mít vliv i snížená dostupnost rozpustné formy kyseliny monokřemičité, která je zcela nedostupná od pH 9 (REYNOLDS 2006). Buňka šetří křemíkem, a proto je např. V-žebro úplně tenké a nerozšiřuje se ani uprostřed, obr. 5.2. Produkce slabě silifikovaných šupin v médiu chudém na křemík byla pozorována u *S. petersenii* (SANDGREN & BARLOW 1989). Navíc, šupiny byly v pH 8,5 také nejširší, což by odpovídalo výsledkům HAHN et al. (1996), kteří pozorovali naopak užší šupiny v médiu se zvýšeným obsahem křemíku.



**Obr. 5.2:** příklad slabě silifikované šupiny z pH 8,5.

Hlavní morfologický trend v datech – vyjádřený prvním relativním warpem – bývá u chrysozomád spojován s polohou šupin na buňce (NEUSTUPA & NĚMCOVÁ 2007, NEUSTUPA et al. in press). Významné morfologické trendy, které se shodně projeví u teplotního i pH pokusu, by tedy mohly vyjadřovat právě tento typ variability. U *M. tonsurata* byla pravděpodobně variabilita na buňce značně eliminována výběrem šupin s dómem, tento typ šupin se nachází pouze v apikální části buňky. Na druhou stranu, tělové šupiny u druhu

*S. petersenii* jsou v podstatě jediného typu a změna jejich tvaru vzhledem k pozici na buňce je poměrně výrazná. Nicméně, obecně byl vliv pozice na buňce do jisté míry zmírněn větším počtem analyzovaných šupin z každé skupiny, navíc náhodně vybraných.

Studie morfologické variability na souboru šupin *Mallomonas* pocházejících z celého světa ukázaly významný obecný trend týkající se rozšiřování V-žebra (NEUSTUPA & NĚMCOVÁ 2007, PICHRTOVÁ & NĚMCOVÁ 2008). Na takovém datovém souboru lze předpokládat velkou variabilitu ekologických faktorů, jejichž vliv se na tvaru šupin zřejmě projevil. V současné studii byl tento trend nejvýrazněji pozorovaný v souvislosti s druhým relativním warpem v pH pokusu u *M. tonsurata*.

### 5.3. Změna velikosti v závislosti na sledovaných parametrech

U tří ze čtyř studovaných druhů byla prokázána souvislost mezi teplotou a velikostí šupin – šupiny chrysomonád pěstovaných v teplejším médiu jsou menší. Zmenšování spolu s teplotou uvádí ŘEZÁČOVÁ-ŠKALOUDOVÁ et al. (in press) také pro další druhy chrysomonád – *Mallomonas kalinae* a *Synura curtispina*. Nicméně, u obou zmiňovaných druhů došlo k mírnému zvětšení velikosti šupin v teplotě 30 °C, podobně jako nyní u *S. petersenii* ve 25 °C, což může být důsledek působení extrémních podmínek (ATKINSON et al. 2003).

Výsledek doprovodného pokusu s výpočtem objemu buněk u *S. petersenii* je v souladu s Atkinsonovým pravidlem (ATKINSON 1994, ATKINSON et al. 2003). Pravděpodobně tedy také pro chrysomonády platí, že se jejich buňky zmenšují s teplotou. Teplota 25 °C, kde objem výrazně narůstá, již zjevně leží mimo běžný rozsah teplot, se kterými se populace setkávají v přírodě (srov. obr. 2.5 a 4.49). Navíc je patrná změna tvaru buněk – v teplotě 25 °C mají nejmenší poměr délky a šířky, jinými slovy, zúžená část je poměrně krátká. To by mohlo mimo jiné odrážet menší počet buněk v kolonii – tento jev byl již pozorován na přírodních vzorcích (SIVER, pers. com.). Obdobně také šupiny tohoto druhu jsou větší v teplotě 25 °C.

Šupiny a buňky se tedy zřejmě chovají podobně – zjištěné výsledky podporují hypotézu, že menší buňky vytvářejí stále stejný počet (menších) šupin a ne méně šupin o původní velikosti. Pozoruhodná je však výjimka u *S. echinulata*, kde tato závislost nebyla prokázána. Rovněž ATKINSON et al. (2003) uvádějí existenci výjimek z pravidla. Protože však chybí data o velikosti celých buněk *S. echinulata*, není možné rozhodnout, jestli u tohoto kmene skutečně chybí závislost velikosti na teplotě a nebo zda se buňky sice zmenšují, ale šupiny zůstávají stejné.

Velikost šupin také signifikantně koreluje s pH – u *S. petersenii* pozitivně, u *M. tonsurata* negativně. GAVRILOVA et al. (2005) uvádí podobně rozdílnou reakci dokonce u dvou odlišných kmenů druhu *S. petersenii*. U jednoho z nich se šupiny zmenšovaly v nízkém pH, u druhého ve vysokém. Buňky zelené řasy *Pediastrum duplex* (Chlorophyceae) se spolu se zvyšujícím se pH zmenšovaly, avšak až od hodnoty 6,5 – mezi hodnotami 5,5 a 6,5 bylo nejprve patrné jejich zvětšování (NEUSTUPA & HODAČ 2005). Zřejmě tedy neexistuje podobně obecně platná podmíněná závislost velikosti a pH jako u teploty. Může zde hrát roli například rozdílné optimum výskytu v přírodě. Nicméně, v tomto případě je k dispozici příliš málo dat na vyvozování obecně platných závěrů.

#### 5.4. Alometrická a nealometrická složka tvarové variability

Alometrie je obecný fenomén vyskytující se u živých organismů. Tvar jejich těl (či jejich částí) se mění spolu s růstem, což primárně souvisí s měnícími se fyziologickými nároky v průběhu ontogeneze (ZELDITCH et al. 2004). Změna tvaru v závislosti na velikosti byla pozorována napříč celým spektrem organismů, např. na kostech obratlovců (ROSAS & BASTIR 2004), u křídel hmyzu (STERN & EMLÉN 1999, DEBAT et al. 2003), rostlin (NIKLAS 1994) a také u řas (RHODE et al. 2001, NEUSTUPA & HODAČ 2005). Obecně se ukazuje, že alometrie vysvětluje velmi významnou část celkové tvarové variability - např. studie teplotně závislé variability křídel octomilek ukázala dokonce 24%-ní podíl alometrického efektu (DEBAT et al. 2003), u okrajových buněk cenobia řasy *Pediastrum duplex* vysvětlil regresní model tvarových proměnných na velikosti 13,9 % variability (NEUSTUPA & HODAČ 2005).

Také u šupin chrysomonád se alometrická složka významně podílela na tvarové variabilitě a velikost kromě jednoho případu (*M. tonsurata*, pH pokus) vždy signifikantně korelovala s prvním relativním warpem. Vůbec největší podíl variability vysvětlené velikostí činil 17,1 % (*S. petersenii*, pH). Avšak šupiny jsou anorganické struktury, které po vytvoření a depozici na povrch buňky již nemění tvar ani velikost (WETHERBEE et al. 1995). Nepodléhají tedy růstu během ontogeneze, a proto se u nich alometrie neprojevuje tak výrazně jako u celých organismů. Rozdíl ve velikosti zde existuje, ale není spjat s ontogenezí, nýbrž mnohem spíše s polohou šupin na buňce (NEUSTUPA et al. in press, ŘEZÁČOVÁ-ŠKALOUDOVÁ et al. in press). Různě velké šupiny si však musí zachovat svoji pevnost a také schopnost tvořit schránku, a proto změně velikosti přizpůsobují i svoji morfologii (NĚMCOVÁ et al. in press).

Aby bylo možné zkoumat samotný vliv teploty, respektive pH, na tvar šupin, byla od celkové tvarové variability oddělena její alometrická složka. Jinými slovy, jestliže významný podíl na tvaru šupin má také velikost a zároveň velikost koreluje s teplotou (resp. pH), je třeba se ujistit, že interpretujeme opravdu přímý vliv teploty na tvar a ne jen alometrický efekt.

Regrese oddělené nealometrické složky na teplotě vysvětlila menší proporcii variability, konkrétně se hodnoty pohybovaly mezi 2,31-13,58 %. Z výsledků tedy vyplývá, že ve všech případech byla určitá část teplotně závislé variability spjatá s vlivem teploty na velikost šupin. Nicméně, u druhu *Synura echinulata*, kde je ze všech druhů nejmenší vliv teploty na tvar, byl zmiňovaný rozdíl velmi malý. Avšak i v tomto případě je alometrická složka variability významná, pouze není spojena s teplotou. Rovněž u experimentů s pH byla alometrická složka významná a její odstranění přineslo zřetelný pokles v proporcii variability vysvětlené regresí tvaru na pH.

Odstranění alometrické složky variability ale nepřineslo natolik výraznou změnu v rozložení centroidů skupin na CVA ordinačním diagramu, jako např. ve zmiňované studii křídel octomilek (DEBAT et al. 2003). Tehdy byl efekt nízké a vysoké teploty na nealometrickou komponentu dost podobný, což autoři vysvětlovali jako vliv stresu, jenž se projevuje shodně v obou teplotních extrémech.

Jak odstranění alometrické části variability u šupin ovlivnilo diskriminaci jednotlivých skupin, je patrné z porovnání tabulek P2 a P4 (v příloze). Ve dvou případech se míra diskriminace zlepšila: U *S. echinulata* se tvary z teploty 10 a 15 °C signifikantně liší teprve po odstranění alometrické složky, stejně jako skupiny 20 a 25 °C u *S. sphagnicola*. Naopak u *S. petersenii* se zjistilo, že původní průkazné rozlišení tvarů z pH 6,5 a 7,5 bylo způsobené pouze odlišnou velikostí šupin v těchto skupinách. Po odstranění jejího vlivu se tvary již signifikantně neliší. Rozdíl je patrný i na obr. 4.35a a 4.36a.

Výraznější rozdíl ve tvaru při porovnání obou analýz se projevil u druhu *S. petersenii* ve 20 °C (viz obr. 4.5 a 4.7) a u *M. tonsurata* v 25 °C (viz obr. 4.29 a 4.31). V obou případech se jednalo o skupiny s průměrně nejmenšími šupinami a díky odstranění alometrického efektu zanikla jejich výrazná tvarová odlišnost od ostatních skupin. Zmiňované náhlé zmenšení šupin *S. petersenii* ve 20° C lze srovnat s podobným jevem pozorovaným u *M. kalinae* a *S. curtispina* (ŘEZÁČOVÁ-ŠKALOUDOVÁ et al. in press). Výskyt výrazně malých šupin v 25 a jejich opětovné zvětšení v následující teplotě 30 °C vysvětlují autoři buď rychlým dělením buněk v optimální teplotě (25 °C) nebo působením teplotního stresu v teplotě vysoké 30 °C (ŘEZÁČOVÁ-ŠKALOUDOVÁ et al. in press).

Navíc se potvrdilo, že proporcionální zvětšování dómu u *M. tonsurata* spolu s teplotou není způsobeno teplotou jako takovou, nýbrž především alometrickým efektem. (Po jeho odstranění již výraznou změnu velikosti dómu s teplotou nepozorujeme (viz obr. 4.29 a 4.31). Zatímco se šupina ve vyšší teplotě zmenšuje, absolutní velikost dómu se výrazně nemění. Dóm je totiž důležitou strukturou, ke které jsou upevňovány ostny, a tudíž se dá předpokládat, že aby si uchoval svoji funkci, bude jen málo variabilní.

## 5.5. Morfologická disparita a stres

Nárůst morfologické variability bývá spojován s působením stresových podmínek (GHALAMBOR et al. 2007). V rámci provedených pokusů jsem zjišťovala též průměrnou vzájemnou vzdálenost bodů v rámci shluků na PCA (RWA), což vyjadřuje, jak moc jsou šupiny v jednotlivých teplotách tvarově rozrůzněné. Míru různorodosti ve tvaru lze též označit termínem „morfologická disparita“.

Obecně se projevil vzrůst tvarové variability ve vysoké teplotě. U *Mallomonas tonsurata*, *Synura sphagnicola* i *S. petersenii* byla úplně nejvyšší průměrná morfologická disparita šupin při 25 °C, čili v nejvyšší zkoumané teplotě. Navíc, u druhů *S. petersenii* a *M. tonsurata* se nejvyšší teplota projevila také odlišnými změnami tvaru než v teplotách nižších: u *S. petersenii* dochází k výraznému zkrácení distální části šupiny (viz obr 4.5), šupiny *M. tonsurata* mají v teplotě 25 °C ostře zašpičatělé V-žebro (viz obr 4.29). Podobný jev byl pozorován u buněk řasy *Micrasterias rotata* (Zygnematophyceae): tvarově byly buňky z nejvyšší experimentální teploty (30 °C) nejodlišnější od všech ostatních (NEUSTUPA et al. 2008). Rovněž opětovné zvětšení velikosti jak šupin, tak buněk *Synura petersenii* v 25 °C lze chápat jako důsledek působení stresu ve smyslu Atkinsonova pravidla (ATKINSON et al. 2003).

Vzrůst morfologické disparity zároveň ve vysoké i nízké teplotě byl zjištěn u *S. echinulata* a *M. tonsurata*. Naopak, nízké hodnoty morfologické disparity se objevují v 10-20 °C. Výrazný nárůst morfologické disparity se projevil také u šupin *Synura echinulata* pěstovaných v chladu při nízkém osvětlení a byl rovněž interpretován jako náznak stresových podmínek prostředí (NĚMCOVÁ et al. in press).

Zdá se, že vysoká (25 °C) či příliš nízká (5 °C) teplota působí na zkoumané populace jako stresový faktor. Naopak, hodnoty teplot okolo 15 °C zjevně představují pro studované chrysomonády optimální podmínky. Kultivované populace pocházejí z území České

republiky, kde sice teplota vody 25 °C není výjimečná, ale nikdy nepůsobí stále a dlouhodobě, jedná se spíše o denní maxima – průměrná denní teplota vzduchu naměřená v nejteplejším měsíci roku se u nás pohybuje mezi 11,3 (Lysá hora) a 19,4 °C (Velké Pavlovice), [www.chmu.cz](http://www.chmu.cz).

Pozoruhodné je, že k nárůstu disparity v nízkých teplotách nedochází právě u druhu *Synura sphagnicola* (nejmenší průměrnou variabilitu mají šupiny ve 20 °C, avšak nebyl zjištěn signifikantní rozdíl mezi 5, 15 a 20 °C). *S. sphagnicola* je totiž považována za druh preferující teplou vodu (SIVER 1995) a v současné studii se také jednalo o jediný kmen izolovaný v letním období.

Ostatní tři studované druhy byly izolovány z planktonu částečně zamrzlých lokalit, kde se vyskytovaly poměrně hojně. Přitom *S. echinulata* i *M. tonsurata* vykazují nárůst disparity – interpretovatelný jako důsledek stresu – již v pokusné teplotě 5 °C. Výsledky tak potvrzují již známý fenomén hojného výskytu chrysomonád v podmínkách, které pro ně nejsou zcela optimální, neboť maximálních hodnot růstové rychlosti v laboratoři dosahují při teplotách výrazně vyšších (HEALEY 1983, MARTIN-WAGENMANN & GUTOWSKI 1995, GUTOWSKI 1996, SAXBY-ROUEN et al. 1997, LEE & KIM 2007). Důvodem může být například malá konkurence ze strany ostatních řas či větší množství rozpuštěného CO<sub>2</sub>.

Co se týče vlivu pH, míra morfologické variability šupin *S. petersenii* v zásaditějším médiu stoupá (viz. obr. 4.40). Naopak, u *M. tonsurata* je disparita vysoká ve dvou nejnižších hodnotách pH a nízká ve zbývajících 3 měřených hodnotách (viz. obr. 4.48). *S. petersenii* je široce rozšířeným druhem, nicméně těžiště jejího výskytu leží v pH spíše neutrálním (SIVER 1995). Optimální pH pro růst se dost liší, jednotliví autoři uvádějí hodnoty od 5,5 do 8,2 (SAXBY-ROUEN et al. 1997, GAVRILOVA et al. 2005, KIM et al. 2008). Nejvyšší rychlost fotosyntézy byla pro druh *Synura petersenii* naměřena při pH 5-6. (BHATTI & COLMAN 2008). Na druhou stranu *M. tonsurata* patří k vyloženě alkalifilním druhům chrysomonád a v přírodě se s ním v kyselém pH téměř nesetkáme (SIVER 1991, SIVER 1995). Tedy, u obou studovaných druhů stoupá morfologická disparita v suboptimálních podmínkách pH, u *S. petersenii* ve vysokém a u *M. tonsurata* naopak v nízkém pH. Zároveň je poměrně význačné, že vztah pH a disparity je u obou druhů opačný než vztah mezi pH a velikostí šupin – jinými slovy, variabilnější jsou malé šupiny.

U šupin chrysomonád lze tedy pozorovat větší tvarovou disparitu ve stresových podmínkách, především ve vysoké teplotě či krajních hodnotách pH. Tato plasticita je pravděpodobně neadaptivním důsledkem narušení důležitých buněčných funkcí, které stojí za komplexním procesem biogeneze šupin.



## 5.6. Vliv symetrizace dat na proporci vysvětlené variability

U druhů *Synura echinulata* a *S. sphagnicola* byla provedena symetrizace, protože není možné na fotografiích z transmisního elektronového mikroskopu odlišit u jednotlivých šupin levou a pravou stranu. Asymetrická komponenta tvaru byla zcela zanedbána (KLINGENBERG 2002), analyzovala jsem tedy vlastně jen část celkové variability - 61,1 % u *S. echinulata* a 68,2 % u *S. sphagnicola*.

Tento rozdíl ve zpracování dat se projevil i ve výsledcích analýzy relativních warpů - konkrétně na procentech variability vysvětlené jednotlivými RW (tabulka P7, příloha). U symetrizovaných dat byla celková variabilita popsána výrazně menším počtem os než u dat nesymetrizovaných. Zároveň tak u symetrizovaných zahrnují první tři zobrazené osy větší procento celkové variability.

Nicméně, právě asymetrická složka tvarové variability bývá předmětem různých studií. U struktur, které jsou principiálně symetrické, jsou náhodné odchylky od této symetrie interpretovány také jako důsledek stresu (např. PARSONS 1992). Cílem budoucích studií šupin chrysomád by tedy mohla být právě fluktuační asymetrie a její proměny, ať už v souvislosti s velikostí šupin, polohou na buňce, či s faktory prostředí. Takové výzkumy by mohly přinést nové poznatky ohledně mezidruhových a vnitrodruhových rozdílů či doplnit právě v této práci diskutované hypotézy ohledně působení stresových podmínek.

## 6. Shrnutí

Ve své diplomové práci jsem se zabývala morfologickou variabilitou křemičitých šupin u čtyř vybraných druhů chrysomonád. Zkoumala jsem především vliv rozdílné kultivační teploty a hodnoty pH na jejich tvar. Hlavní závěry se v návaznosti na cíle práce uvedené v předmluvě dají shrnout do následujících bodů:

- veškerá morfologická variabilita každého datového souboru byla zhodnocena pomocí analýzy relativních warpů a hlavní trendy morfologické variability byly zobrazeny jako deformační mřížky. Zjištěná tvarová variabilita je sice velká, avšak stále v rámci tvarů běžně pozorovatelných v přírodních vzorcích a rovněž druhová příslušnost šupin zůstala za všech pokusných podmínek zcela zřetelná.
- oba ekologické faktory (teplota i pH) mají signifikantní, i když poměrně malý, vliv na tvar šupin studovaných druhů. Navíc, až na několik málo výjimek lze jednotlivé skupiny na základě tvaru šupin dobře diskriminovat. Tvarové trendy typické pro dané hodnoty parametrů jsem také zobrazila pomocí deformačních mřížek.
- u tří ze čtyř studovaných druhů bylo prokázáno signifikantní zmenšování šupin s teplotou. S rostoucí teplotou se zmenšují i studované buňky druhu *Synura petersenii*, v 25 °C však dochází k opětovnému vzrůstu objemu buněk. Tento výsledek je v souladu s Atkinsonovým pravidlem, které bylo definováno pro velikost těl ektotermních organismů. Vztah pH a velikosti není jednoznačný – šupiny druhu *S. petersenii* se s rostoucím pH zmenšují, *Mallomonas tonsurata* zvětšují.
- alometrie má signifikantní podíl na celkové tvarové variabilitě šupin chrysomonád, a tedy i část tvarové variability vysvětlené příslušnými ekologickými faktory byla ve skutečnosti spojena s velikostí šupin. Nicméně, i po odstranění alometrické složky variability má jak teplota, tak pH stále signifikantní vliv na tvar šupin.
- v nejvyšší studované teplotě (u některých druhů i v nejnižší) a také v suboptimálních hodnotách pH dochází k signifikantnímu nárůstu morfologické disparity. Ve dvou případech lze také v nejvyšší teplotě pozorovat kvalitativně odlišné morfologické trendy. Rovněž objem buněk *S. petersenii* vzrůstá v teplotě 25 °C. Tyto výsledky naznačují, že dlouhodobý růst v krajních hodnotách působí na buňky jako environmentální stres.

---

## 7. Použitá literatura

ADAMS, D.C., ROHLF, F.J. & SLICE, D.E. (2004): Geometric Morphometrics: Ten Years of Progress Following the 'Revolution'. – Ital. J. Zool. 71: 5-16.

ANDERSEN, R.A. (1987): Synurophyceae classis nov., a new class of algae. – Am. J. Bot. 74 (3): 337-353.

ANDERSEN, R.A., MORTON, S.L. & SEXTON, J.P. (1997): Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton 1997. List of strains. – J. Phycol. 33 (6) (suppl.): 1-75.

ANDERSEN, R.A. (2007): Molecular systematics of the Chrysophyceae and Synurophyceae – In: BRODIE, J. & LEWIS, J. (eds): Unravelling the algae – the past, present and future of algal systematics, pp. 285-313. CRC Press.

ARANCIBIA-AVILA, P., COLEMAN, J.R., RUSSIN, W.A., WILCOX, L.W., GRAHAM, J.M. & GRAHAM, L.E. (2000): Effects of pH on cell morphology and carbonic anhydrase activity and localization in bloom-forming *Mougeotia* (Chlorophyta, Charophyceae). – Can. J. Bot. 78(9): 1206-1214.

ATKINSON, D. (1994): Temperature and organism size – a biological law for ectotherms? – Adv. Ecol. Res. 25: 1-58.

ATKINSON, D., CIOTTI, B.J. & MONTAGNES, D.J.S. (2003): Protists decrease in size linearly with temperature: ca. 2.5 % °C<sup>-1</sup>. – Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 270(1533): 2605-2611.

BEECH, P.L., WETHERBEE, R. & PICKETT-HEAPS, J.D. (1990): Secretion and deployment of bristles in *Mallomonas splendens* (Synurophyceae). – J. Phycol. 26: 112-122.

BHATTI, S. & COLMAN, B. (2005): Inorganic carbon acquisition by the chrysophyte alga *Mallomonas papillosa*. – Can. J. Bot. 83: 891-897.

BHATTI, S. & COLMAN, B. (2008): Inorganic carbon acquisition in some synurophyte algae. – Physiologia Plantarum 133: 33-40.

BOOKSTEIN, F.L. (1997): Landmark methods for forms without landmarks: morphometrics of group differences in outline shape. – Medical Image Analysis 1: 225-243.

BRÖNMARK, C. & HANSSON, L.-A. (2005): The Biology of Lakes and Ponds, 285 pp. Oxford University Press, New York.

CRONBERG, G. (1989): Scaled chrysophytes from the tropics. – Nova Hedwigia Beih. 95: 191-232.

DEBAT, V., BÉGIN, M., LEGOUT, H. & DAVID, J.R. (2003): Allometric and nonallometric components of *Drosophila* wing shape respond differently to developmental temperature. – Evolution 57(12): 2773-2784.

GAVRILOVA, O.V., NOGINA, N.V. & VOLOSHKO, L.N. (2005): Scale structure and growth characteristics of *Synura petersenii* (Synurophyceae) under different pH conditions. – Nova Hedwigia Beih. 128: 249-256.

GHALAMBOR, C.K., MCKAY, J.K., CARROLL, S.P. & REZNICK, D.N. (2007): Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. – Functional Ecology 21: 394-407.

GUTOWSKI, A. (1996): Temperature dependent variability of scales and bristles of *Mallomonas tonsurata* TEILING emend. KRIEGER (Synurophyceae). – Nova Hedwigia Beih. 114: 125-146.

HAHN, A., GUTOWSKI, A. & GEISSLER, U. (1996): Scale and bristle morphology of *Mallomonas tonsurata* (Synurophyceae) in cultures with varied nutrient supply. – Acta Botanica 109: 239-247.

- HAMMER, O., HARPER, D.A.T. & RYAN, P.D.** (2001): PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. – *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9 pp. (<http://folk.uio.no/ohammer/past>)
- HEALEY, F.P.** (1983): Effects of temperature and light intensity on the growth rate of *Synura sphagnicola*. – *Journal of Plankton Research* 5: 767-774.
- IMASHEVA, A.G., LOESCHKE, V., ZHIVOTOVSKY, L.A. & LAZEBNY, O.E.** (1997): Effect of extreme temperatures on phenotypic variation and developmental stability in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila buzzatii*. – *Biological Journal of the Linnean Society* 61:117-126.
- KALINA, T. & VÁŇA, J.** (2005): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii, 606 pp. Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, Praha.
- KENDALL, D.** (1977): The diffusion of shape. – *Advances in Applied Probability* 9: 428-430.
- KIM, J.H., SHIN, M.O., LEE, K.L. & KIM, H.S.** (2008): Effect of environmental conditions on the growth of *Synura petersenii* (Synurophyceae) in vitro and two eutrophic water bodies in Korea. – *Nova Hedwigia* 86: 529-544.
- KLAVENESS, D. & GUILLARD, R.R.L.** (1975): The requirement for silicon in *Synura petersenii*. – *J. Phycol.* 11: 349-55.
- KLINGENBERG, C.P., BARLUENGA, M. & MEYER, A.** (2002): Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. – *Evolution* 56(10): 1909-1920.
- KRISTIANSEN, J.** (1979): Problems in classification and identification of Synuraceae (Chrysophyceae). – *Schweiz. Z. Hydrol.* 40: 310-319.
- KRISTIANSEN, J.** (1988): Seasonal occurrence of silica-scaled chrysophytes under eutrophic conditions. – *Hydrobiologia* 161: 171-184.
- KRISTIANSEN, J.** (2001): Biogeography of silica-scaled chrysophytes. – *Nova Hedwigia Beih.* 122: 23-39.
- KRISTIANSEN, J.** (2002): The genus *Mallomonas* (Synurophyceae) – A taxonomic surveybased on the ultrastructure of silica scales and bristles. – *Opera Botanica* 139: 5-128.
- KRISTIANSEN, J.** (2005): Golden algae, 167 pp. A. R. G. Gantner Verlag K. G.
- KRISTIANSEN, J. & LIND, J.F.** (2005): Endemicity in silica-scaled chrysophytes. – *Nova Hedwigia Beih.* 128: 65-83.
- KRISTIANSEN, J. & PREISIG, H.R.** (2007): Chrysophyte and Haptophyte Algae – Part 2: Synurophyceae, 252 pp. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- KYNČLOVÁ, A., ŠKALOUD, P. & ŠKALOUDOVÁ, M.** (submitted): Molecular diversity and species concept in *Synura petersenii* complex (Synurophyceae, Heterokontophyta). – *Nova Hedwigia Beiheft*.
- LAMPERT, W. & SOMMER, U.** (1997): Limnoecology, 382 pp. Oxford University Press, New York.
- LEADBEATER, B.S.C. & BARKER, D.A.N.** (1995): Biomineralization and scale production in the Chrysophyta. – In: SANDGREN, C.D., SMOL, J.P. & KRISTIANSEN, J. (eds): Chrysophyte algae, pp. 303-329. Cambridge University Press, Cambridge.
- LEE, K.L. & KIM, H.S.** (2007): Growth characteristics of three synurophytes (*Mallomonas* species) at different temperatures and pH. – *Nova Hedwigia* 84: 227-240.
- LEE, K.L., YOON, H.-S., KIM, Y.J. & KIM, H.S.** (2007): Growth characteristics of three *Mallomonas* species (silica-scaled chrysophytes) at different temperatures and pH. – *Nordic Journal of Botany* 25: 113-118.
- MARHOLD, K. & SUDA, J.** (2002): Statistické zpracování mnhorozměrných dat v taxonomii (Fenetické metody), 159 pp. Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, Praha.

- MARTIN-WAGENMANN, B. & GUTOWSKI, A. (1995): Scale morphology and growth characteristics of clones of *Synura petersenii* (Synurophyceae) at different temperatures. – In: SANDGREN, C. D., SMOL, J. P. & KRISTIANSEN, J. (eds): Chrysophyte algae, pp. 345-360. Cambridge University Press.
- MCKAMEY, K.A. & AMSLER, C.D. (2006): Effects of temperature and light on growth of the Antarctic algae *Geminocarpus geminatus* (Ectocarpales: Phaeophyceae) and *Cladophora repens* (Cladophorales: Cladophorophyceae) in culture. – *Phycologia* 45(2): 225-232.
- NĚMCOVÁ, Y., NEUSTUPA, J., KALINA, T. & NOVÁKOVÁ, S. (2003): Silica-scaled chrysophytes of the Czech Republic. – *Acta Universitatis Carolinae - Biologica* 47: 285-346.
- NĚMCOVÁ, Y., NEUSTUPA, J., KVÍDEROVÁ, J. & ŘEZÁČOVÁ-ŠKALOUDOVÁ, M. (in press): Morphological plasticity of silica scales of *Synura echinulata* (Synurophyceae) in crossed gradients of light and temperature - a geometric morphometric approach. – *Nova Hedwigia Beiheft*.
- NEUSTUPA, J. & HODAČ, L. (2005): Changes in shape of the coenobial cells of an experimental strain of *Pediastrum duplex* var. *duplex* (Chlorophyta) reared at different pHs. – *Preslia* 77: 439-452.
- NEUSTUPA, J. & NĚMCOVÁ, Y. (2007): A geometric morphometric study of the variation in scales of *Mallomonas striata* (Synurophyceae, Heterokontophyta). – *Phycologia* 46: 123-130.
- NEUSTUPA, J., ŘEZÁČOVÁ-ŠKALOUDOVÁ, M. & NĚMCOVÁ, Y. (in press): The shape variation of the silica scales of *Mallomonas kalinae* (Mallomonadales, Synurophyceae) in relation to their position on a cell body. – *Nova Hedwigia Beiheft*.
- NEUSTUPA, J., ŠTASTNÝ, J. & HODAČ, L. (2008): Temperature-related phenotypic plasticity in the green microalga *Micrasterias rotata*. – *Aquat. Microb. Ecol.* 51: 77-86.
- NIKLAS, K.J. (1994): Plant allometry – The scaling of form and process, 412 pp. The University of Chicago Press.
- PARSONS, P.A. (1992): Fluctuating asymmetry – a biological monitor of environmental and genomic stress. – *Heredity* 68: 361-364.
- PICHRTOVÁ, M. & NĚMCOVÁ, Y. (2008): Geometric morphometric analyses of silica-scale variation in four *Mallomonas* species (Synurophyceae, Stramenopiles). – *Nordic Journal of Botany* 26: 77-82.
- RAI, L.C. & GAUR, J.P. (eds.) (2001): Algal adaptation to environmental stresses: physiological, biochemical and molecular mechanisms, 421 pp. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- REYNOLDS, C.S. (2006): Ecology of phytoplankton, 535 pp. Cambridge University Press.
- RHODE, K.M., PAPPAS, J.L. & STOERMER, E.F. (2001): Quantitative analysis of shape variation in type and modern populations of *Meridion* (Bacillariophyceae). – *J. Phycol.* 37(1): 175-183.
- ROHLF, F.J. (2003): tpsSmall, Version 1.20. – Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook, New York. (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>)
- ROHLF, F.J. (2004): tpsSpln, Version 1.20. – Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook, New York. (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>)
- ROHLF, F.J. (2006): tpsUtil, Version 1.38. – Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook, New York. (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>)
- ROHLF, F.J. (2007a): tpsRegr, Version 1.34. – Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook, New York. (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>)
- ROHLF, F.J. (2007b): tpsRelw, Version 1.45. – Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook, New York. (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>)
- ROHLF, F.J. (2008): tpsDig, Version 2.12. – Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook, New York. (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>)

- ROJACKERS, R.M. & KESSELS, H.** (1986): Ecological characteristics of scale-bearing Chrysophyceae from the Netherlands. – Nord. J. Bot. 6: 373-383.
- ROSAS, A. & BASTIR, M.** (2004): Geometric morphometric analysis of allometric variation in the mandibular morphology of the hominids of Atapuerca, Sima de los Huesos Site. – Anat. Rec. Part A 278A:551–560.
- ŘEZÁČOVÁ, M.** (2003): Ekologie a rozšíření chrysomonád s křemičitými šupinami (Chrysophyceae, Synurophyceae), 59 pp. Bakalářská seminární práce.
- ŘEZÁČOVÁ, M. & NEUSTUPA, J.** (2007): Distribution of the genus *Mallomonas* (Synurophyceae) – Ubiquitous dispersal in microorganisms evaluated. – Protist 158: 29-37.
- ŘEZÁČOVÁ-ŠKALOUDOVÁ, M., NEUSTUPA, J. & NĚMCOVÁ, Y.** (in press): Effect of temperature on the variability of silicate structures in *Mallomonas kalinae* and *Synura curtispina* (Synurophyceae). – Nova Hedwigia Beiheft.
- ŘEZÁČOVÁ, M. & ŠKALOU, P.** (2005): Silica-scaled chrysophytes of Ireland. With an appendix: Geographic variation of scale shape of *Mallomonas caudata*. – Nova Hedwigia Beih. 128: 101-124.
- SANDGREN, C. D. & BARLOW, S. B.** (1989): Siliceous scale production in chrysophyte algae. II. SEM observations regarding the effects of metabolic inhibitors on scale regeneration in laboratory populations of scale-free *Synura petersenii* cell. – Nova Hedwigia Beih. 95: 27-44.
- SANDGREN, C.D. & WALTON, W.E.** (1995): The influence of zooplankton herbivory on the biogeography of chrysophyte algae. – In: SANDGREN, C.D., SMOL, J.P. & KRISTIANSEN, J. (eds): Chrysophyte algae, 232-268 pp. Cambridge University Press, Cambridge.
- SAXBY-ROUEN, K.J., LEADBEATER, B.S.C. & REYNOLDS, C.S.** (1997): The growth response of *Synura petersenii* (Synurophyceae) to photon flux density, temperature and pH. – Phycologia 36: 233-243.
- SAXBY-ROUEN, K. J., LEADBEATER, B. S. C. & REYNOLDS, C. S.** (1998): The relationship between the growth of *Synura petersenii* (Synurophyceae) and components of the dissolved inorganic carbon system. – Phycologia 37: 467-477.
- SIVER, P.A.** (1991): The biology of *Mallomonas* – morphology, taxonomy and ecology, 230 pp. Kluwer Acad. Publ., London.
- SIVER, P.A.** (1995): The distribution of chrysophytes along environmental gradients: their use as biological indicators. – In: SANDGREN, C.D., SMOL, J.P. & KRISTIANSEN, J. (eds): Chrysophyte algae, 232-268 pp. Cambridge University Press, Cambridge.
- SIVER, P.A. & GLEW, J.R.** (1990): The arrangement of scales and bristles on *Mallomonas* (Chrysophyceae): a proposed mechanism for the formation of the cell covering. – Can. J. Bot. 68: 374-380.
- SIVER, P.A. & HAMER, J.S.** (1989): Multivariate statistical analysis of the factors controlling the distribution of scaled chrysophytes. – Limnol. Oceanogr. 34(2): 368-381.
- SIVER, P.A. & SKOGSTAD, A.** (1988): Morphological variation and ecology of *Mallomonas crassisquama* (Chrysophyceae). – Nord. J. Bot. 8: 99-107.
- SMOL, J.P.** (1995): Application of chrysophytes to problems in paleoecology. – In: SANDGREN, C.D., SMOL, J.P. & KRISTIANSEN, J. (eds): Chrysophyte algae, pp. 303-329. Cambridge University Press, Cambridge.
- STERN, D.L. & EMLÉN, D.J.** (1999): The developmental basis for allometry in insects. – Development 126(6): 1091-1101.
- STIBAL, M. & ELSTER, J.** (2005): Growth and morphology variation as a response to changing environmental factors in two Arctic species of *Raphidonema* (Trebouxiophyceae) from snow and soil. – Polar Biology 28: 558-567.

**THOMPSON, P.A., GUO, M. & HARRISON, P.J.** (1992): Effects of variation in temperature. I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. – *J. Phycol.* 28: 481-488.

**WEE, J.L.** (1997): Scale biogenesis in Synurophycean protists: Phylogenetic implications. – *Crit. Rev. Plt. Sci.* 16: 497-534.

**WEE, J.L., MILLIE, D.F. & WALTON, S.P.** (1991): A statistical characterization of growth among clones of *Synura petersenii* (Synurophyceae). – *J. Phycol.* 27: 570-575.

**WETHERBEE, R., LUDWIG, M. & KOUTOULIS, A.** (1995): Immunological and ultrastructural studies of scale development and deployment in *Mallomonas* and *Apedinella*. – In: SANDGREN, C.D., SMOL, J.P. & KRISTIANSEN, J. (eds): *Chrysophyte algae*, 232-268 pp. Cambridge University Press, Cambridge.

**ZELDITCH, M. L., SWIDERSKI, D. L., SHEETS, H. D. & FINK, W. L.** (2004): *Geometric morphometrics for biologist: A primer*, 443 pp. Elsevier Academic Press, New York.

# Příloha



**Tabulky P1a-f:** Prokrustovské vzdálenosti konsenzuálních konfigurací jednotlivých teplotních (pH) skupin.

a: *Synura petersenii* – teplotní pokus

Teplota	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
5 °C	-				
10 °C	0,0301	-			
15 °C	0,0343	0,0205	-		
20 °C	0,0432	0,0425	0,0404	-	
25 °C	0,0574	0,0487	0,0436	0,0557	-

b: *Synura echinulata* – teplotní pokus

Teplota	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
5 °C	-				
10 °C	0,0365	-			
15 °C	0,0227	0,0200	-		
20 °C	0,0186	0,0278	0,0145	-	
25 °C	0,0305	0,0387	0,0264	0,0183	0,0000

c: *Synura sphagnicola* – teplotní pokus

Teplota	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
5 °C	-				
10 °C	0,0307	-			
15 °C	0,0176	0,0217	-		
20 °C	0,0523	0,0531	0,0423	-	
25 °C	0,0651	0,0702	0,0570	0,0179	-

d: *Mallomonas tonsurata* – teplotní pokus

Teplota	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
5 °C	-				
10 °C	0,0344	-			
15 °C	0,0461	0,0237	-		
20 °C	0,0473	0,0264	0,0129	-	
25 °C	0,0720	0,0528	0,0531	0,0477	-

e: *Synura petersenii* – pH pokus

pH	5,5	6,5	7,5	8,5
5,5	-			
6,5	0,0229	-		
7,5	0,0284	0,0221	-	
8,5	0,0409	0,0311	0,0209	-

f: *Mallomonas tonsurata* – pH pokus

pH	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5
4,5	-				
5,5	0,0227	-			
6,5	0,0294	0,0347	-		
7,5	0,0265	0,0420	0,0318	-	
8,5	0,0605	0,0701	0,0687	0,0614	-

**Tabulky P2a-f:** Výsledky permutačních testů shody průměrů jednotlivých dvojic teplotních (pH) skupin. V horní polovině matice je uvedena Mahalanobisova vzdálenost a v dolní p-hodnota. Provedeno 2000 permutací.

a: *Synura petersenii* – teplotní pokus

Teplota	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
5 °C	-	0,244	0,294	0,489	0,358
10 °C	0	-	0,155	0,342	0,276
15 °C	0	0,004	-	0,269	0,272
20 °C	0	0	0	-	0,385
25 °C	0	0	0	0	-

b: *Synura echinulata* – teplotní pokus

Teplota	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
5 °C	-	0,14	0,134	0,161	0,228
10 °C	0,008	-	0,118	0,148	0,249
15 °C	0,029	0,118	-	0,118	0,195
20 °C	0	0,004	0,12	-	0,177
25 °C	0	0	0	0	-

c: *Synura sphagnicola* – teplotní pokus

Teplota	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
5 °C	-	0,175	0,203	0,287	0,262
10 °C	0	-	0,133	0,28	0,255
15 °C	0	0,006	-	0,191	0,216
20 °C	0	0	0	-	0,109
25 °C	0	0	0	0,066	-

d: *Mallomonas tonsurata* – teplotní pokus

Teplota	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
5 °C	-	0,269	0,297	0,324	0,4
10 °C	0	-	0,152	0,171	0,338
15 °C	0	0,006	-	0,137	0,317
20 °C	0	0	0,022	-	0,264
25 °C	0	0	0	0	-

e: *Synura petersenii* – pH pokus

pH	5,5	6,5	7,5	8,5
5,5	-	0,148	0,205	0,191
6,5	0,008	-	0,181	0,177
7,5	0	0	-	0,145
8,5	0	0	0,013	-

f: *Mallomonas tonsurata* – pH pokus

pH	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5
4,5	-	0,139	0,247	0,263	0,489
5,5	0,017	-	0,228	0,277	0,434
6,5	0	0	-	0,206	0,468
7,5	0	0	0	-	0,361
8,5	0	0	0	0	-

**Tabulky P3a-f:** Srovnání velikostí šupin mezi jednotlivými dvojicemi skupin. V horní polovině matice jsou uvedeny p-hodnoty z F-testu (test shody rozptylů). V dolní polovině matice jsou p-hodnoty z permutačního testu shody průměrů. Provedeno 10000 permutací.

a: *Synura petersenii* – teplotní pokus

Teplota	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
5 °C	-	0,762	0,040	0,048	0,277
10 °C	0,87	-	0,019	0,023	0,165
15 °C	0,89	0,95	-	0,942	0,33
20 °C	0	0	0	-	0,366
25 °C	0	0	0,001	0	-

b: *Synura echinulata* – teplotní pokus

Teplota	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
5 °C	-	0,318	0,387	0,628	0,806
10 °C	0,174	-	0,893	0,607	0,214
15 °C	0,107	0,748	-	0,703	0,267
20 °C	0,938	0,147	0,075	-	0,465
25 °C	0,489	0,039	0,021	0,508	-

c: *Synura sphagnicola* – teplotní pokus

Teplota	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
5 °C	-	0,019	0,311	0,768	0,023
10 °C	0	-	0,001	0,040	0,951
15 °C	0	0,026	-	0,191	0,001
20 °C	0	0,15	0,394	-	0,046
25 °C	0	0,004	0	0	-

d: *Mallomonas tonsurata* – teplotní pokus

Teplota	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
5 °C	-	0,004	0,077	0,299	0,104
10 °C	0,939	-	0,259	0,063	0,203
15 °C	0,014	0,002	-	0,462	0,885
20 °C	0	0	0,001	-	0,554
25 °C	0	0	0	0	-

e: *Synura petersenii* – pH pokus

pH	5,5	6,5	7,5	8,5
5,5	-	0,032	0,003	0,031
6,5	0,941	-	0,396	0,989
7,5	0	0,002	-	0,404
8,5	0,001	0,002	0,814	-

f: *Mallomonas tonsurata* – pH pokus

pH	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5
4,5	-	0,635	0,03	0,045	0,449
5,5	0,132	-	0,009	0,014	0,778
6,5	0,058	0	-	0,867	0,004
7,5	0	0	0,006	-	0,006
8,5	0	0	0	0,017	-

**Tabulky P4a-f:** Analýza nealometrické složky tvarové variability: Výsledky permutačních testů shody průměrů jednotlivých dvojic pH skupin. V horní polovině matice je uvedena Mahalanobisova vzdálenost a v dolní p-hodnota. Provedeno 2000 permutací.

a: *Synura petersenii* – teplotní pokus

Teplota	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
5 °C	-	0,146	0,221	0,195	0,216
10 °C	0	-	0,110	0,135	0,139
15 °C	0	0,003	-	0,107	0,131
20 °C	0	0	0,009	-	0,177
25 °C	0	0	0	0	-

b: *Synura echinulata* – teplotní pokus

Teplota	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
5 °C	-	0,111	0,106	0,127	0,201
10 °C	0	-	0,107	0,121	0,205
15 °C	0	0,002	-	0,074	0,138
20 °C	0	0	0,102	-	0,122
25 °C	0	0	0	0	-

c: *Synura sphagnicola* – teplotní pokus

Teplota	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
5 °C	-	0,178	0,186	0,229	0,182
10 °C	0	-	0,129	0,246	0,227
15 °C	0	0	-	0,176	0,160
20 °C	0	0	0	-	0,109
25 °C	0	0	0	0,008	-

d: *Mallomonas tonsurata* – teplotní pokus

Teplota	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
5 °C	-	0,18	0,189	0,17	0,182
10 °C	0	-	0,115	0,137	0,132
15 °C	0	0,007	-	0,113	0,144
20 °C	0	0	0,008	-	0,157
25 °C	0	0	0	0	-

e: *Synura petersenii* – pH pokus

pH	5,5	6,5	7,5	8,5
5,5	-	0,109	0,127	0,13
6,5	0,004	-	0,072	0,1
7,5	0	0,241	-	0,101
8,5	0	0,016	0,012	-

f: *Mallomonas tonsurata* – pH pokus

pH	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5
4,5	-	0,112	0,149	0,167	0,225
5,5	0,006	-	0,156	0,207	0,234
6,5	0	0	-	0,178	0,267
7,5	0	0	0	-	0,28
8,5	0	0	0	0	-

**Tabulky P5a-f:** Permutační test shody průměrné skupinové variability ve tvaru (morfologické disparity). V tabulkách jsou uvedeny výsledné p-hodnoty. Provedeno 10000 permutací.

a: *Synura petersenii* – teplotní pokus

Teplota	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
5 °C	-				
10 °C	0	-			
15 °C	0,007	0	-		
20 °C	0,325	0	0,072	-	
25 °C	0	0	0	0	-

b: *Synura echinulata* – teplotní pokus

Teplota	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
5 °C	-				
10 °C	0	-			
15 °C	0	0	-		
20 °C	0	0	0	-	
25 °C	0	0	0	0,004	-

c: *Synura sphagnicola* – teplotní pokus

Teplota	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
5 °C	-				
10 °C	0	-			
15 °C	0,782	0	-		
20 °C	0,608	0	0,416	-	
25 °C	0	0	0	0	-

d: *Mallomonas tonsurata* – teplotní pokus

Teplota	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
5 °C	-				
10 °C	0	-			
15 °C	0	0	-		
20 °C	0	0	0	-	
25 °C	0	0	0	0	-

e: *Synura petersenii* – pH pokus

pH	5,5	6,5	7,5	8,5
5,5	-			
6,5	0	-		
7,5	0	0	-	
8,5	0	0	0	-

f: *Mallomonas tonsurata* – pH pokus

pH	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5
4,5	-				
5,5	0	-			
6,5	0	0	-		
7,5	0	0	0	-	
8,5	0	0	0	0	-

**Tabulka P6:** Porovnání průměrných objemů buněk *S. petersenii* z různých pokusných teplot. V matici jsou p-hodnoty permutačního testu shody průměrů (10000 permutací).

Teplota	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
5 °C					
10 °C	0				
15 °C	0	0,549			
20 °C	0	0,001	0,002		
25 °C	0	0,009	0	0	

**Tabulka P7:** Procenta variability vysvětlené jednotlivými relativními warpy. U každého pokusu je vždy uvedena hodnota pro každou osu zvlášť a kumulativní procentuální hodnota. (na další straně)

RW	Teplota						pH					
	<i>S. petersenii</i>		<i>S. echinulata</i>		<i>S. sphagnicola</i>		<i>M. tonsurata</i>		<i>S. petersenii</i>		<i>M. tonsurata</i>	
	%	kum. %	%	kum. %	%	kum. %	%	kum. %	%	kum. %	%	kum. %
1	40,65 %	40,65 %	43,37 %	43,37 %	56,60 %	56,60 %	31,68 %	31,68 %	49,07 %	49,07 %	29,44 %	29,44 %
2	18,36 %	59,01 %	27,78 %	71,15 %	30,69 %	87,30 %	16,79 %	48,47 %	17,52 %	66,59 %	16,35 %	45,79 %
3	13,17 %	72,17 %	10,51 %	81,66 %	4,95 %	92,24 %	12,21 %	60,69 %	9,64 %	76,23 %	12,14 %	57,93 %
4	8,29 %	80,47 %	8,19 %	89,85 %	3,49 %	95,73 %	10,92 %	71,61 %	5,51 %	81,74 %	11,04 %	68,97 %
5	4,35 %	84,82 %	3,97 %	93,82 %	1,39 %	97,13 %	7,60 %	79,21 %	3,90 %	85,64 %	6,83 %	75,80 %
6	2,58 %	87,40 %	1,86 %	95,68 %	1,24 %	98,36 %	4,56 %	83,76 %	2,56 %	88,20 %	5,22 %	81,02 %
7	1,98 %	89,38 %	1,41 %	97,14 %	0,72 %	99,08 %	3,13 %	86,89 %	1,91 %	90,12 %	3,29 %	84,31 %
8	1,74 %	91,12 %	0,97 %	98,11 %	0,40 %	99,48 %	2,52 %	89,36 %	1,48 %	91,60 %	2,80 %	87,12 %
9	1,24 %	92,36 %	0,55 %	98,65 %	0,28 %	99,76 %	1,98 %	91,34 %	1,25 %	92,85 %	2,62 %	89,74 %
10	1,04 %	93,40 %	0,39 %	99,04 %	0,19 %	99,95 %	1,46 %	92,88 %	0,93 %	93,78 %	1,74 %	91,48 %
11	0,78 %	94,18 %	0,28 %	99,32 %	0,02 %	99,97 %	1,20 %	94,08 %	0,87 %	94,65 %	1,46 %	92,93 %
12	0,73 %	94,92 %	0,19 %	99,51 %	0,01 %	99,98 %	1,12 %	95,20 %	0,75 %	95,40 %	1,24 %	94,17 %
13	0,66 %	95,57 %	0,15 %	99,66 %	0,01 %	99,99 %	0,88 %	96,08 %	0,64 %	96,05 %	0,99 %	95,16 %
14	0,64 %	96,21 %	0,14 %	99,79 %	0,00 %	99,99 %	0,67 %	96,74 %	0,55 %	96,59 %	0,76 %	95,92 %
15	0,52 %	96,73 %	0,10 %	99,89 %	0,00 %	100,00 %	0,61 %	97,35 %	0,47 %	97,06 %	0,72 %	96,64 %
16	0,45 %	97,18 %	0,09 %	99,98 %			0,49 %	97,84 %	0,41 %	97,47 %	0,60 %	97,25 %
17	0,39 %	97,58 %	0,01 %	99,99 %			0,41 %	98,26 %	0,33 %	97,80 %	0,44 %	97,69 %
18	0,34 %	97,91 %	0,01 %	99,99 %			0,27 %	98,52 %	0,30 %	98,10 %	0,38 %	98,07 %
19	0,29 %	98,21 %	0,00 %	100,00 %			0,25 %	98,77 %	0,26 %	98,36 %	0,32 %	98,39 %
20	0,25 %	98,45 %					0,23 %	99,00 %	0,25 %	98,61 %	0,30 %	98,69 %
21	0,23 %	98,68 %					0,21 %	99,21 %	0,22 %	98,82 %	0,27 %	98,96 %
22	0,18 %	98,86 %					0,18 %	99,39 %	0,19 %	99,01 %	0,24 %	99,20 %
23	0,17 %	99,04 %					0,17 %	99,56 %	0,17 %	99,18 %	0,20 %	99,39 %
24	0,15 %	99,18 %					0,14 %	99,70 %	0,12 %	99,31 %	0,16 %	99,55 %
25	0,14 %	99,33 %					0,10 %	99,80 %	0,11 %	99,41 %	0,15 %	99,70 %
26	0,12 %	99,45 %					0,07 %	99,87 %	0,10 %	99,51 %	0,08 %	99,79 %
27	0,10 %	99,55 %					0,04 %	99,91 %	0,09 %	99,61 %	0,07 %	99,86 %
28	0,09 %	99,65 %					0,02 %	99,93 %	0,08 %	99,69 %	0,05 %	99,90 %
29	0,08 %	99,72 %					0,02 %	99,95 %	0,07 %	99,76 %	0,03 %	99,93 %
30	0,07 %	99,79 %					0,01 %	99,96 %	0,07 %	99,83 %	0,02 %	99,95 %
31	0,05 %	99,84 %					0,01 %	99,97 %	0,05 %	99,88 %	0,01 %	99,96 %

32	0,05 %	99,89 %		0,01 %	99,98 %	0,04 %	99,92 %	0,01 %	99,97 %
33	0,03 %	99,92 %		0,01 %	99,98 %	0,02 %	99,93 %	0,01 %	99,98 %
34	0,02 %	99,95 %		0,00 %	99,99 %	0,01 %	99,95 %	0,00 %	99,98 %
35	0,01 %	99,96 %		0,00 %	99,99 %	0,01 %	99,96 %	0,00 %	99,99 %
36	0,01 %	99,97 %		0,00 %	99,99 %	0,01 %	99,97 %	0,00 %	99,99 %
37	0,01 %	99,97 %		0,00 %	99,99 %	0,01 %	99,97 %	0,00 %	99,99 %
38	0,00 %	99,98 %		0,00 %	99,99 %	0,01 %	99,98 %	0,00 %	99,99 %
39	0,00 %	99,98 %		0,00 %	100,00 %	0,00 %	99,98 %	0,00 %	99,99 %
40	0,00 %	99,98 %				0,00 %	99,99 %	0,00 %	100,00 %
41	0,00 %	99,99 %				0,00 %	99,99 %		
42	0,00 %	99,99 %				0,00 %	99,99 %		
43	0,00 %	99,99 %				0,00 %	99,99 %		
44	0,00 %	99,99 %				0,00 %	99,99 %		
45	0,00 %	99,99 %				0,00 %	99,99 %		
46	0,00 %	99,99 %				0,00 %	100,00 %		
47	0,00 %	100,00 %							