

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Botanika



Bc. Tereza Poláčková

Bilaterální asymetrie krásivkových společenstev, fenomény na úrovni populací a komplexita buněk

Bilateral asymmetry of desmid communities, population phenomena and cellular complexity

Diplomová práce

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

Praha, 2013

Prohlášení:

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

V Praze, 29. 4. 2013

Tereza Poláčková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem kolegům z algologického pracoviště za vytvoření inspirujícího pracovního prostředí. Poděkování patří zejména mému školiteli Jiřímu Neustupovi za čas strávený diskutováním výsledků a podnětné připomínky k této práci, Janě Kulichové za cenné rady při sepisování práce a Honzovi Šťastnému za pomoc s terénními odběry. V poslední řadě děkuji také Krtkovi, který sice ke vzniku této práce nepřispěl vůbec nijak, ale jeho opomenutí by mohlo mít nedozírné následky.

Abstrakt

Předkládaná diplomová práce se zabývá studiem morfologické asymetrie populací krásivky rodu *Micrasterias* (Desmidiiales, Viridiplantae). K tomuto účelu bylo studováno 71 populací náležících do 13 druhů, které byly nalezeny na 31 odběrových lokalitách.

V této práci bylo kromě tradičního přístupu k hodnocení asymetrie u objektů s biradiálním typem symetrie (společná PCA symetrických kopií všech buněk) použito také nového přístupu založeného na PCA symetrických kopií u každé buňky zvlášť. Obě metody se ukázaly být zcela nahraditelné, ovšem druhý způsob nabízí širší využití.

Dominantním typem asymetrie byla asymetrie mezi dvěma půlbuňkami, tedy segmenty, které představují mateřskou a dceřinou část buňky. Vznik půlbuněk je časově oddělen a vysoká míra této asymetrie je dána různými abiotickými podmínkami v době jejich vzniku. Důležitou roli může hrát i fakt, že mladší půlbuňka nemusí být ještě plně dorostlá. Asymetrie mezi levou a pravou částí buňky a transversálně ležícími polovinami se ukázala být méně významná.

Relativní zastoupení jednotlivých typů variability bylo mezi populacemi poměrně stabilní.

Vliv morfologické komplexity na míru asymetrie nebyl prokázán, což znamená, že morfogeneze buněk komplexnějších druhů *Micrasterias* není zatížena vyššími ontogenetickými nepřesnostmi. Byly zaznamenány rozdílné asymetrické trendy mezi jednotlivými druhy, ovšem tyto trendy pravděpodobně souvisí s velikostními rozdíly jednotlivých druhů, jelikož míra asymetrie se ukázala být silně pozitivně korelovaná s velikostí buněk. Existence společných asymetrických trendů u druhů se společným výskytem naznačuje, že se v rámci linie *Micrasterias* uchovaly společné evolučně konzervované rysy, prostřednictvím kterých buňky reagují na abiotické podmínky prostředí.

Klíčová slova: alometrie, asymetrie, Desmidiiales, geometrická morfometrika, komplexita, *Micrasterias*

Abstract

This thesis deals with the morphological asymmetry of the desmid genus *Micrasterias* (Desmidiaceae, Viridiplantae). In total, 71 populations belonging to 13 species sampled at 31 different locations were used.

In addition to the traditional approach of the biradial asymmetry decomposition (joint PCA of the symmetric copies of all the cells) a novel approach based on a PCA of the symmetric copies of each cell separately was also used. Both these methods were found to be replaceable, but the second method may have broader applications.

The dominant asymmetric pattern was described by the differences in shape of the opposite semicells, i.e. those segments that represent the juvenile and adult parts of the cells. Cellular ontogenesis of semicells is separated in time and, therefore, this asymmetry may be determined by varying abiotic conditions. However, a part of this asymmetric pattern would also be explained by ontogenetic differences among mature and developing semicells. The asymmetry between the left and right part of the cells, as well as the transversal asymmetry proved to be less conspicuous. Relative representation of the different asymmetric patterns between populations proved to be relatively stable.

Morphological complexity did not correlate with the asymmetric levels. This means that the morphogenesis of even the most complicated *Micrasterias* cells was not accompanied by inherent ontogenetic inaccuracies. The different asymmetrical trends among species were recorded, but these trends were likely related to size differences among species, as the degree of asymmetry proved to be strongly positively correlated with their cell sizes. The joint asymmetric trends in sympatrically occurring species indicated that evolutionarily conserved features shared by multiple species may have been preserved in the *Micrasterias* lineage.

Key words: allometry, asymmetry, complexity, Desmidiaceae, geometric morphometrics, *Micrasterias*

OBSAH

1. ÚVOD	1
1.1. Typy symetrie v přírodě	1
1.2. Matematická definice symetrie	3
1.3. Analýza symetrie a asymetrie.....	4
1.3.1. Symetrická a asymetrická variabilita.....	4
1.3.2. Studie, ve kterých byl použit rozklad variability pro objekty s komplexní symetrií.	5
1.4. Krásivky jako vhodná modelová skupina	6
1.5. Cíle práce.....	8
2. MATERIÁL A METODY	9
2.1. Terénní odběry	9
2.2. Mikroskopické zpracování vzorů	10
2.3. Geometrická morfometrika	10
2.3.1. Digitalizace landmarků a semilandmarků	11
2.4. Analýza dat.....	12
2.4.1. Hodnocení velikosti a komplexity buněk	12
2.4.2. Transformované kopie	14
2.4.3. Hlavní trendy morfologické variability mezi jednotlivými druhy.....	14
2.4.4. Rozklad variability	15
2.4.5. Lineární regrese a korelace.....	16
2.4.6. Permutační MANOVA	16
3. VÝSLEDKY	18
3.1. Analyzované populace	18
3.2. Hlavní trendy morfologické variability mezi jednotlivými druhy	18
3.3. Rozklad variability	20
3.3.1. Rozklad variability pro jednotlivé druhy.....	21
3.3.2. Vliv komplexity na míru asymetrie	24
3.3.3. Vliv velikosti buněk na míru asymetrie.....	25
3.3.4. Vzájemný vztah jednotlivých typů asymetrie	30
3.3.5. Relativní zastoupení jednotlivých typů asymetrie.....	30
3.3.6. Vliv lokality a druhu na míru asymetrie	34
4. DISKUZE.....	36
4.1. Dva přístupy k získání absolutních hodnot asymetrie pro jednotlivé buňky	36
4.2. Použití semilandmarků při analýze asymetrie u biradiálně symetrických objektů	37
4.3. Morfologická charakteristika jednotlivých druhů	37

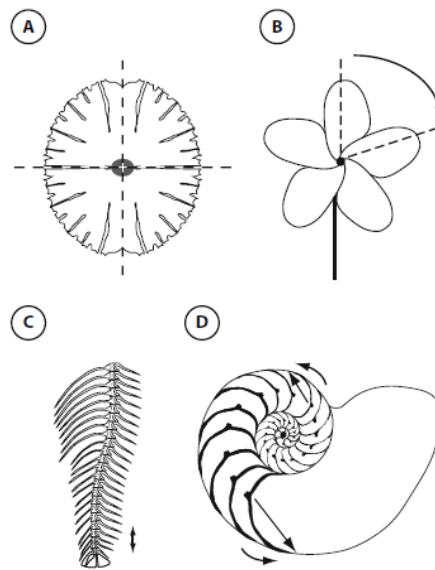
4.4. Proporce jednotlivých typů variability	37
4.4.1. Příčiny vysokého podílu horno-dolní asymetrie.....	39
4.4.2. Podíl symetrické složky a asymetrických složek variability	39
4.5. Vliv komplexity a velikosti buněk na míru asymetrie	40
4.6. Vliv lokality a druhu	42
4.6.1. Vliv fylogenetické struktury na míru asymetrie	43
4.7. Otázky vzešlé z této práce	43
5. ZÁVĚR.....	45
6. LITERATURA.....	47
7. PŘÍLOHY	53

1. ÚVOD

Jako symetrické označujeme ty organizmy, jejichž tělní plán je tvořen opakujícím se motivem. Jde o jev, který je u živých organizmů velmi běžný a existuje jen málo skupin, které by primárně nevykazovaly žádný typ symetrie. Na symetrii biologických objektů je možné nahlížet dvěma způsoby. První přístup je zaměřen na ontogenezi symetrických struktur a mechanismy tohoto procesu, druhý se pak orientuje na evoluční důsledky symetrie. Tyto dva přístupy ovšem nejsou striktně oddělené a jejich propojení přináší další cenné informace (Endress, 1999). Symetrie biologických objektů je ovšem pouze zdánlivá, jelikož od dokonale symetrického stavu téměř vždy existují drobné odchylky, které označujeme jako asymetrie. Tato diplomová práce se zabývá studiem těchto asymetrií u skupiny zelených řas (krásivky), které zkoumá z pohledu ontogenetického i evolučního.

1.1. Typy symetrie v přírodě

Nejrozšířenějším a nejjednodušším typem symetrie, který se v přírodě vyskytuje, je symetrie bilaterální. Jde o symetrii, kterou vykazují organizmy s jednou osou souměrnosti. Bilaterálně symetrické objekty jsou tvořeny dvěma identickými polovinami, které jsou vůči sobě zrcadlově převrácené. Příkladem takto symetrické struktury může být například lidský obličej. Dalším a o něco málo složitějším typem je symetrie biradiální (disymetrie, reflekní symetrie; Obr. 1a), která je definovaná dvěma navzájem kolmými osami souměrnosti. Biradiálně symetrické objekty jsou tedy tvořeny čtyřmi identickými kvadranty, které jsou vůči sobě levo-právě a horno-dolně převrácené. Příkladem mohou být některé mikroskopické řasy, například frustuly rozsivky *Frustulia* či buňky krásivky *Micrasterias*. Dalším běžně se vyskytujícím typem symetrie je symetrie rotační (radiální; Obr. 1b), která je charakterizována více než jednou osou souměrnosti (např. rozsivka *Cyclotella*). Zcela jiný charakter symetrie vykazuje symetrie translační (*serial homology*, Obr. 1c), která je dána periodicky se opakujícím motivem (např. rozsivka *Aulacoseira*), u kterého může i nemusí být zachována jednotná velikost, nebo symetrie spirální (*scale symmetry*, Obr. 1d), pro kterou je typické spirální opakování stejného zvětšujícího se motivu (např. Hargittai & Pickover, 1992; Hall, 1994; Martindale & Henry 1998; Savriama & Klingenberg, 2011). Všechny výše zmíněné typy symetrie popisují symetrii v rámci jednoho objektu. Existují ovšem i symetrické objekty, které nejsou součástí jednoho celku, ale jsou od sebe zřetelně oddělené. Osa souměrnosti tedy neprochází samotným objektem, ale mimo něj. Tento typ symetrie je označován jako *matching symmetry*. Příkladem tohoto typu symetrie mohou být například lidské ruce či křídla hmyzu (Klingenberg et al., 2002).



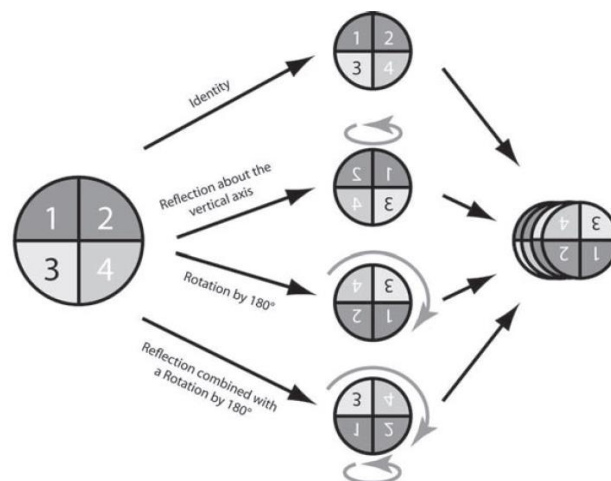
Obr. 1: Základní typy symetrie, se kterými se setkáme u živých organizmů. a) biradiální symetrie u krásivky *Micrasterias rotata*, b) rotační symetrie u květu *Plumeria alba*, c) translační symetrie u obratlů, d) spirální symetrie u ulity *Nautilus* (převzato od Savriama & Klingenberg, 2011)

Všechny nesystematické odchylky od těchto symetrických stavů se nazývají flukтуаční asymetrie. Konkrétní projevy flukтуаční asymetrie jsou většinou nepredikovatelné a její míra je běžně používaným měřítkem vývojové nestability či stresu, jelikož stresové podmínky (vnitřní i vnější) vedou k narušení vnitřní homeostázy a ke zvýšení variability epigenetických procesů a tím pádem i ke zvýšení fenotypové variability a míry flukтуаční asymetrie v populaci (Wójcik et al., 2007). Z evolučního hlediska je možné nárůst míry variability a flukтуаční asymetrie vnímat jako cestu vedoucí ke zvětšení pole působnosti přírodního výběru a tím pádem i ke zvýšení šancí na nalezení optimálního řešení v daných podmínkách (Rasmuson, 2002). Tento jev byl pozorován nejen v laboratorních podmínkách, ale i na přírodních stanovištích, a na toto téma existuje velké množství studií zkoumajících různé organizmy (např. Scullin et al., 1979; Imasheva et al., 1990; Moller & Eriksson, 1994; Lens et al., 1999; Saucède et al., 2006). Detailní studium flukтуаční asymetrie a morfologické variability může být užitečné z několika důvodů. Může sloužit nejen k vzájemnému porovnávání komplexních a plastických struktur, které přesahují možnosti klasické morfologie (Neustupa & Škaloud, 2007), ale také jako nástroj ke studiu populací vzhledem k měnícím se environmentálním podmínkám od centra areálu k okrajům či k extremitě stanoviště a schopnosti populace se s těmito podmínkami vyrovnat (Kark, 2001). Další aplikací studia flukтуаční asymetrie může být srovnávání genetické variability mezi blízkce

příbuznými populacemi či účinnosti mechanismů regulujících ontogenezi (Palmer & Strobeck, 1986).

1.2. Matematická definice symetrie

Nástroje analýzy symetrie objektů vycházejí z matematické definice symetrie, jejímuž stručnému nastínění se věnuje tato kapitola. Prvním krokem k pochopení definice symetrie je objasnění pojmů transformace a grupa. Transformace je reverzibilní geometrická změna, která zobrazí libovolný bod objektu do jiného bodu ve stejné rovině. Z hlediska definice symetrie jsou důležité zejména ty transformace, po jejichž aplikování zůstává celková symetrie objektu nezměněna. Nejjednodušší z těchto transformací je identita, která zobrazí každý bod objektu do sebe sama, takže transformovaný obraz je stejný jako jeho původní vzor. Dalšími důležitými transformacemi jsou translace (posunutí objektu v určitém směru), rotace (otočení objektu o určitý úhel), reflexe (vytvoření zrcadlové kopie objektu) a změna velikosti objektu. Všechny transformace je možné vzájemně kombinovat. Geometrická definice symetrie říká, že objekt je symetrický vzhledem k určité transformaci, pokud po jejím užití zůstává symetrie objektu nezměněna (například po doplnění poloviny lidského obličeje o jeho zrcadlovou polovinu dostaneme obličej celý, samozřejmě při zanedbání drobných asymetrií, které se mezi jednotlivými polovinami vyskytují). Každý objekt může být nezměněn vzhledem k libovolnému množství transformací. Množinu symetrických transformací označujeme jako symetrická grupa (Obr. 2) (např. Rosen, 1975; Weyl, 1975).



Obr. 2: Symetrická grupa u biradiálně symetrických objektů. Tato grupa zahrnuje transformace identita, reflexe okolo vertikální osy, rotace o 180° a reflexe okolo horizontální osy. Převzato od Savriama et al., 2010.

1.3. Analýza symetrie a asymetrie

Landmarková geometrická morfometrika (GM) je metoda hojně využívaná ke studiu tvarů nejrůznějších objektů. Jejím základním principem je vyznačení klíčových bodů na objektu (tzv. landmarky), s jejichž souřadnicemi se dále pracuje (Zelditch et al., 2004). Landmarky jsou konkrétní body, jejichž poloha je jasně definovaná a jednoznačně určitelná mezi různými jedinci určité skupiny organizmů. Princip kvantifikace míry symetrie a asymetrie datového souboru pomocí GM je založena na srovnávání původního objektu se všemi jeho symetricky transformovanými kopiemi. V případě nejjednodušší bilaterální symetrie jde o kopii vzniklou po užití transformace reflexe, tedy zrcadlení podél osy souměrnosti. Analýza asymetrie pro bilaterálně symetrické objekty je dobře zavedená a běžně používaná technika (Auffray et al., 1999; Mardia et al., 2000; Kent & Mardia, 2001; Klingenberg et al., 2002), která byla postupně rozšiřována pro studium složitějších (komplexnějších) typů symetrie. Pro některé specifické typy symetrie byly popsány metody založené na jiném principu, jako například pro symetrii rotační. Tato metoda popisuje míru symetrie a asymetrie objektu pomocí jeho porovnání s pravidelným n -úhelníkem (Frey et al., 2007).

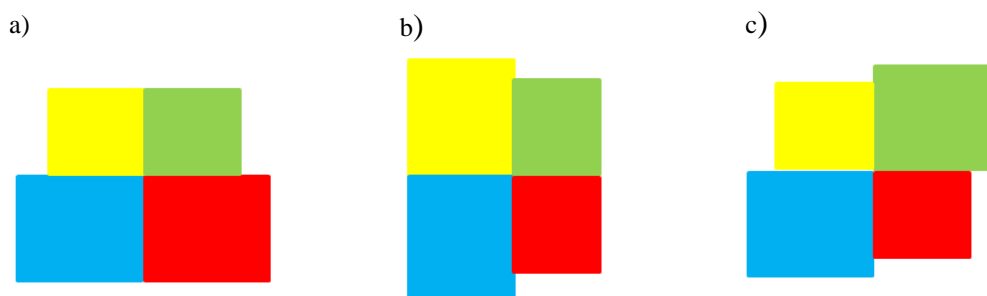
Potapova & Hamilton (2007) popsali metodu studia biradiálně symetrických objektů. Pro studium symetrické variability rozsivek vytvořili symetrickou buňku zprůměrováním buněk vzniklých rotací původní buňky okolo horizontální a vertikální osy o 180° . Negativním důsledkem této symetrizace je ovšem ztráta informace o asymetrii jednotlivých částí buňky. Savriama et al. (2010) tento postup rozšířili o nástroje analýzy asymetrie založené na porovnání původní konfigurace a konfigurace symetricky transformovaných kopií pomocí analýzy hlavních komponent (PCA). Savriama & Klingenberg (2011) zobecnili výše zmíněný postup pro libovolný typ symetrie. Díky této obecné metodě založené na PCA datového souboru, který obsahuje všechny symetrické transformace originální buňky, je možné rozložit variabilitu na symetrickou a asymetrickou. Jednotlivé PC osy pak popisují buď symetrické, nebo asymetrické rozdíly mezi originálními buňkami a jejich symetrickými kopiemi.

1.3.1. Symetrická a asymetrická variabilita

Jako symetrickou variabilitu označujeme vždy tu proporcí tvarové variability, kterou získáme vzájemným porovnáním dokonale symetrických buněk mezi sebou. Symetrická variabilita je tedy míra variability mezi jednotlivými objekty v datovém souboru. Asymetrická variabilita je naopak variabilita mezi jednotlivými symetrickými segmenty objektu, kterou získáme porovnáním původní konfigurace a transformovaných konfigurací landmarků každého

jednotlivého objektu. Jako směrné asymetrie označujeme průměrnou asymetrii celého datového souboru, jako flukuační pak asymetrii každého jednotlivého objektu.

U biradiálně symetrických objektů rozlišujeme asymetrii horizontální, vertikální a transverzální, což je variabilita mezi kvadranty objektu, které spolu sousedí transverzálně (Obr. 3). Metody studia biradiální asymetrie jsou v současné době na vzestupu zejména díky novým technikám, které umožňují jejich kvantifikaci (Savriama et al., 2010; Savriama & Klingenberg, 2011).



Obr. 3: Typy asymetrie u biradiálně symetrických objektů. a) horizontální, b) vertikální, c) transverzální asymetrie

1.3.2. Studie, ve kterých byl použit rozklad variability pro objekty s komplexní symetrií

První studie je věnována rozkladu variability u mikroskopické řasy druhu *Micrasterias rotata*. Savriama et al. (2010) se zde zabývají rozkladem variability u klonální kultury krásivky, jejíž buňky jsou biradiálně symetrické. Studie ukázala, že téměř dvě třetiny morfologické variability mezi buňkami byly dány rozdíly mezi jednotlivými půlbuňkami (termín půlbuňka označuje mateřskou či dceřinou část buňky krásivky, viz kapitola 1.4., Obr. 4). Při korelaci míry variability a velikosti buňky se ukázalo, že velká část této variability je ale dána vlivem velikosti půlbuňky na její tvar, tzn., že menší půlbuňky mají jiný tvar než půlbuňky větší. Symetrická variabilita pak činila zhruba 26 % a variabilita mezi levou a pravou polovinou buňky o něco málo přes 6 %.

Další aplikaci rozkladu asymetrie pro objekty s komplexní symetrií na několika druzích krásivek rodu *Micrasterias* můžeme najít ve studii, která se věnuje rozkladu variability u třech klonálních kultur druhů *M. radians* var. *bogoriensis*, *M. radians* var. *evoluta* a *M. semiradiata* (Neustupa, 2013). Opět se zde ukázal dominantní význam symetrické variability a variability mezi půlbuňkami. Zajímavé bylo porovnání absolutní míry variability mezi jednotlivými druhy, protože se ukázalo, že variabilita obou variet druhu *M. radians* byla větší než variabilita morfologicky jednoduššího druhu *M. semiradiata*.

Savriama & Klingenberg (2011) se ve své studii zabývali asymetrií schránek korálů. Díky složité struktuře této schránky je na každé možné určit tři odlišné typy symetrie. Dílčí studie jednotlivých typů symetrií ukázaly významný podíl asymetrické složky variability; ve dvou případech byl podíl asymetrické složky dokonce větší než 96%.

V další studii byly pomocí tohoto nového přístupu analyzovány květy *Erysimum mediohispanicum* (Brassicaceae) z pohoří Sierra Nevada (Savriama et al., 2012). Výsledky ukázaly, že přibližně polovina tvarové variability byla dána symetrickou složkou. Zbytek variability byl z velké části tvořen fluktuální asymetrií a směrnou asymetrií zaujímala minoritní podíl.

1.4. Krásivky jako vhodná modelová skupina

Krásivky (Desmiales, Streptophyta, Viridiplantae) jsou skupinou zelených řas, která dominuje zejména v mikrofytobentosu mírně kyselých rašeliništních biotopů (Brook, 1981). V eutrofních vodách je jejich výskyt minimální, jelikož pravděpodobně nejsou schopny konkurovat ostatním druhům s rychlejší růstovou rychlostí (Coesel, 1982). Krásivky se rozmnožují převážně vegetativním dělením, i když se u nich výjimečně setkáme se specifickým způsobem pohlavního rozmnožování zvaným spájení (konjugace) (Coesel & Meesters, 2007). Jejich buňka je nejčastěji tvořena dvěma symetrickými půlbuňkami a zářezem (isthmus), v jehož rovině dělení probíhá (Obr. 4). Taxonomie krásivek je z velké části založena na morfologii buněčné stěny a doposud bylo popsáno přibližně 6000 druhů (Brook, 1981). Kromě druhů jsou ovšem často popisovány i další intraspecifické taxony, jako například variety, poddruhy (subspecies) či formy (Gontcharov & Melkonian, 2011). Díky poměrně snadné determinaci a specifickým ekologickým nárokům je druhové složení krásivek často používáno k odhadu ekologické stability rašeliništních ekosystémů (Coesel, 2001).

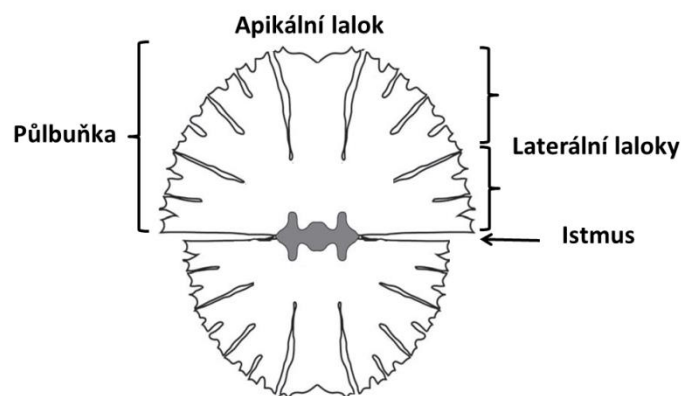
Krásivka rodu *Micrasterias*, která je v této diplomové práci použita jako modelový druh, získal své jméno z řečtiny a znamená „malá hvězda“. V současné době je v tomto rodu zařazeno přibližně 60 druhů a několik set nižších taxonů (Krieger, 1939; Růžička, 1981). Buňky *Micrasterias* se vyznačují biradiální symetrií a pro studium asymetrické variability jsou vhodné z několika důvodů.

1) Jejich buňky se skládají ze dvou symetrických půlbuněk (Obr. 4). Jedna půlbuňka je mateřskou částí a druhá dceřinou částí buňky. Vývoj obou půlbuněk je tedy časově oddělený a obě části tak vznikají v odlišném prostředí. Tento fakt umožňuje studovat působení

environmentálních podmínek na míru morfologické variability, jelikož obě půlbuňky mají stejný genetický vklad (Meindl, 1993).

2) Půlbuňka je také bilaterálně symetrická, což umožňuje studovat míru asymetrie danou ontogenetickými nepřesnostmi, jelikož obě poloviny půlbuňky vznikají za zcela identických podmínek.

3) Krásivky rodu *Micrasterias* patří mezi jednu z morfologicky nejrozmanitějších skupin jednobuněčných organizmů a představují jedny z tvarově nejkomplexnějších rostlinných buněk (Brook, 1981), díky čemuž jsou odchylky od symetrického tvaru dobře kvantifikovatelné. Jejich půlbuňka je tvořena jedním apikálním a dvěma laterálními laloky, které mohou být značně redukováné či naopak větvené do laloků vyšších řádů (Obr. 4). Výhodný je i plochý tvar buňky a relativně velká velikost, což výrazně usnadňuje fotografování pod mikroskopem.



Obr. 4: Popis morfologie krásivky na příkladu druhu *M. rotata* (upraveno podle Savriama et al., 2010).

4) Morfologii *Micrasterias* již bylo věnováno mnoho pozornosti. Díky svému nápadnému tvaru byl tento rod popsán již počátkem 19. století (Agardh, 1827). Existují studie, které se zabývají vztahem morfologie druhů a jejich fylogenetické struktury (např. Neustupa & Škaloud, 2007; Neustupa et al., 2010; Nemjová et al., 2011; Škaloud et al., 2011), fenotypickou plasticitou a vlivem abiotických podmínek (Neustupa et al., 2008; Černá & Neustupa, 2010) a dokonce již byly publikovány studie, které se zabývají rozkladem variability u různých druhů (Savriama et al., 2010; Neustupa, 2013).

1.5. Cíle práce

Tato diplomová práce si klade dva hlavní cíle. (1) Prvním z nich je zjistit, zda existuje vztah mezi morfologickou složitostí buněk přírodních populací rodu *Micrasterias* a mírou jejich bilaterální asymetrie. Cílem této části je ověřit, zda excesivní morfologická komplexita buněk krásivek koreluje se zvýšenou asymetrií u taxonů s nejkomplicovanějšími buňkami. Neustupa (2013) ukázal, že buňky klonálních kultur druhu *M. semiradiata* byly méně variabilní (symetricky i asymetricky) než morfologicky komplexnější buňky druhu *M. radians*. To by tedy znamenalo, že morfologicky komplexnější stavba buňky vede k větší nepřesnosti ontogenetického procesu. Znalost vlivu morfologické komplexity buněk na míru jejich asymetrie by mohla pomoci najít odpověď na otázku, zda má morfologická složitost buněk své limity, které již není možné překročit.

(2) Druhým cílem je ověřit, zda přírodní společenstva krásivek rodu *Micrasterias* z jedné lokality vykazují společné trendy v asymetrii. Morfologie krásivek má zřejmě adaptivní význam, čemuž nasvědčuje její vysoká plasticita vzhledem k různým environmentálním podmínkám (Neustupa et al., 2008; Černá & Neustupa, 2010). Krásivky se prostřednictvím změn buněčné morfologie vyrovnávají se širokým spektrem podmínek prostředí. Fenotypická plasticita krásivek je ovlivněna celou řadou environmentálních faktorů, například teplotou (Neustupa et al., 2008), vysycháním lokality a jevy s tím spojenými, klimatickými podmínkami (Neustupa et al., 2011) či pH prostředí (Neustupa et al., 2009; Černá & Neustupa, 2010). Výskyt společných asymetrických trendů populací žijících na stejných lokalitách by naznačoval vysokou konzervovanost a adaptivnost ontogenetického procesu podmíněnou environmentálními faktory.

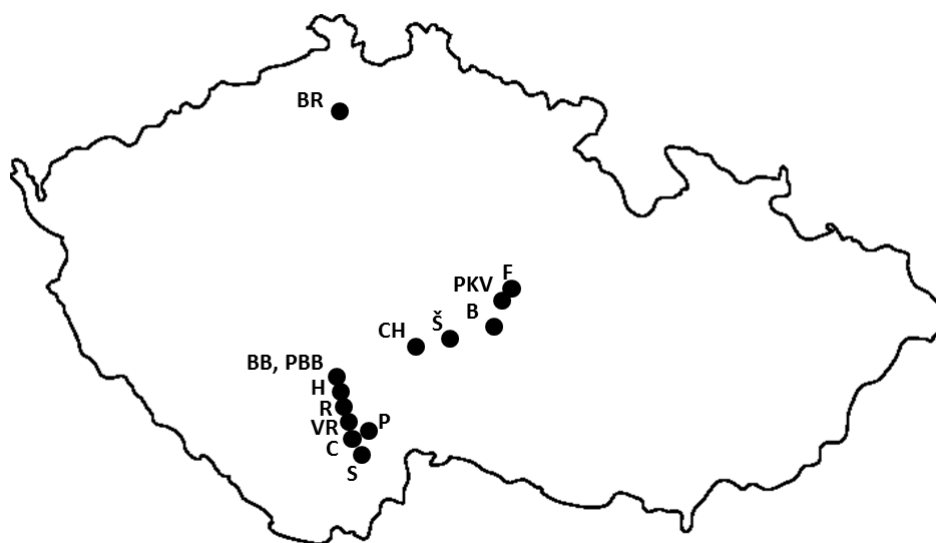
2. MATERIÁL A METODY

2.1. Terénní odběry

Většina vzorků byly nasbírány v průběhu jara a léta 2012 na rašeliništích, v mokřadech, a v litorálu rybníků v České Republice (Obr. 5, Tab. 1). Pět vzorků, z nichž čtyři pocházely ze zahraničí, bylo již odebráno dříve a byly mi zapůjčeny od kolegů z algologického pracoviště. Odběrové lokality byly vybírány tak, aby na nich bylo možné odebrat vícedruhové vzorky rodu *Micrasterias* a aby překryv výskytu druhů na jednotlivých lokalitách byl co nejvyšší. Odběry byly prováděny ždímáním vegetace v rámci čtverce o hraně 10 centimetrů. Vzorky byly uchovávány živé v ledničce po dobu maximálně 14ti dnů. Pokud nebyly v tomto časovém horizontu dále zpracovány, byly nafixovány Lugolovým roztokem (Křisa & Prášil, 1994) a pro další práci bylo použito těchto fixovaných vzorků. Celkem bylo nalezeno 13 druhů na 31 lokalitách.

Tab. 1: Seznam odběrových míst a zkratk použitých v dalším textu. Vzorky pocházející z lokalit označených * nebyly sbírány za účelem této diplomové práce, ale pocházely od kolegů z algologického pracoviště.

B	rašeliniště Babín
BB 1-5, BB1*	rašeliniště Borkovická Blata
BR 1-4	Břehynský rybník
C	pískovna Cep
F	litorál Fejtovského rybníka
H	rašeliniště Hliníř
CH 1, 2	rašeliniště Chvojnov
P 1, 2	rašeliniště Pele
PBB	pískovna u Borkovických Blat
PKV	rašeliniště Pod Kamenným vrchem
R 1-3	litorál rybníka Rod
S 1, 2	pískovna Suchdol
Š	rašeliniště Šimanov
VR 1, 2	rašeliniště V Rájích 1, 2
Fr*	litorál jezera, Francie (Akvitánie)
I1*	rašeliniště Irsko
M*	litorál rybníka Marienteich (Německo)
PO*	rašeliniště Podstavka (Vihorlat, Slovensko)



Obr. 5: Odběrová místa. Zkratky jednotlivých lokalit jsou uvedeny v Tab. 1.

2.2. Mikroskopické zpracování vzorů

V každém vzorku bylo náhodně vybráno 30 buněk od každého druhu. Jednotlivé druhy byly určeny pomocí monografie Růžička (1981). Pokud bylo na buňce zřejmé, že rozdíl ve velikosti půlbuněk je ovlivněn nedávným dělením (půlbunčka nebyla ještě plně dorostlá), či že morfologie vykazovala teratogenní rysy, byla tato buňka ze souboru vyřazena a nahrazena buňkou jinou. Stejně bylo postupováno i v případě podezření na deformaci buňky jinými faktory, jako je například rozmáčknutí krycím sklíčkem.

Buňky byly fotografovány pomocí světelného mikroskopu Olympus BX 51 vybaveného digitálním fotoaparátem Olympus Z5060 při 200 násobném zvětšení. Kvůli technické závadě na tomto fotoaparátu byla malá část buněk focena fotoaparátem Olympus E-PL3. V obou případech bylo vyfoceno měřítko a fotografie z nového fotoaparátu byly přeškálovány tak, aby jejich velikost přesně odpovídala fotografiím vyfoceným původním fotoaparátem.

Fotografie byly následně ořezány a otočeny z důvodu následného zpracování morfometrickými metodami. Všechny tyto úpravy byly provedeny pomocí programu Gimp 2.8.2. (Kimball et al., 2012).

2.3. Geometrická morfometrika

GM je soubor mnohorozměrných statistických technik, které se používají k analýze tvaru dvojrozměrných i trojrozměrných objektů (Zelditch et al., 2004). Tradiční morfometrické metody popisují tvar objektu pomocí délek, šířek, úhlů, poměrů či obsahů ploch. Z charakteru těchto měření je zřejmá jejich vysoká korelace a nevhodnost těchto metod k analýze širokého

spektra biologických tvarů. Landmarková GM, která byla použita v této práci, uchovává tvarovou informaci v podobě prostorových souřadnic tzv. landmarků, tedy bodů vyznačených na zkoumaném objektu. Prvním krokem GM analýzy je tzv. Prokrustovská superimpozice, tedy proces, během kterého je z dat odstraněna veškerá „netvarová“ informace (Kendal, 1977). Princip této operace je změna polohy, rotace a velikosti objektů tak, aby suma vzdálenosti homologních landmarků (vzájemně si odpovídajících svou polohou na objektech) byla co nejmenší (Zelditch et al., 2004). Takto upravená data jsou dále analyzována mnohorozměrnými statistickými technikami, z nichž nejčastější je analýza hlavních komponent (PCA). PCA je technika, která transformuje hlavní trendy tvarové variability v datech do systému vzájemně kolmých a nekorelovaných os. Procenta variability, které jednotlivé osy vysvětlí, klesají s narůstajícím pořadovým číslem osy a tak je možné zredukovat dimenzi původních dat do menšího počtu dimenzí při ztrátě nejmenšího možného množství variability. Důležitou součástí GM analýz je i možnost vizualizace tvaru pomocí metody „thin-plate spline“ (Zelditch et al., 2004). Jde o interpolační funkci, která na základě změn poloh mezi landmarky modeluje tvar jako deformaci tenkých plátek. Tato metoda je založena na představě projekce objektu na nekonečně tenký pásek, který je za použití určitého množství energie možné natahovat a ohýbat (Bookstein, 1989).

Největší výhody GM tedy spočívají v možnosti práce s tvarem jako s kompaktním celkem, což umožňuje použití nejrůznějších statistických technik testujících různé vědecké hypotézy. Neopomenutelná je také možnost modelování tvarů a tvarových závislostí na nejrůznějších parametrech (Klingenberg & Monteiro, 2005). Technik GM je možné využít ke studiu nejrůznějších problémů z oblasti ekologie (např. Adams & Rohlf, 2000; Adams, 2004; Costa & Cataudella, 2007) či taxonomie (např. Valentin et al., 2002; Baylac et al., 2003; Pretorius, 2005). Nechybí ani studie, které se zabývají přímo morfologií krásivek rodu *Micrasterias* (např. Neustupa et al., 2008; Neustupa et al., 2010; Savriama et al., 2010)

2.3.1. Digitalizace landmarků a semilandmarků

Vstupními soubory pro vlastní GM analýzu byly fotografie 30 buněk z jednotlivých analyzovaných populací. V programu TpsUtil ver. 1.53 (Rohlf, 2012) byly z těchto fotografií vytvořeny vstupní soubory pro další analýzy. Na každé buňce bylo v programu TpsDig2 ver. 2.16 (Rohlf, 2010) vyznačeno 36 landmarků. Jejich umístění bylo voleno tak, aby si jejich pozice byla mezi jednotlivými druhy homologní (Obr. 6). Tyto homologie byly určeny pomocí monografie Růžička (1981). Landmarky č. 1, 3, 5 a 7 byly umístěny po okrajích laterálních laloků, č. 2 a 6 v jejich zářezech, č. 4 v zářezu mezi oběma laloky. Landmark č. 8

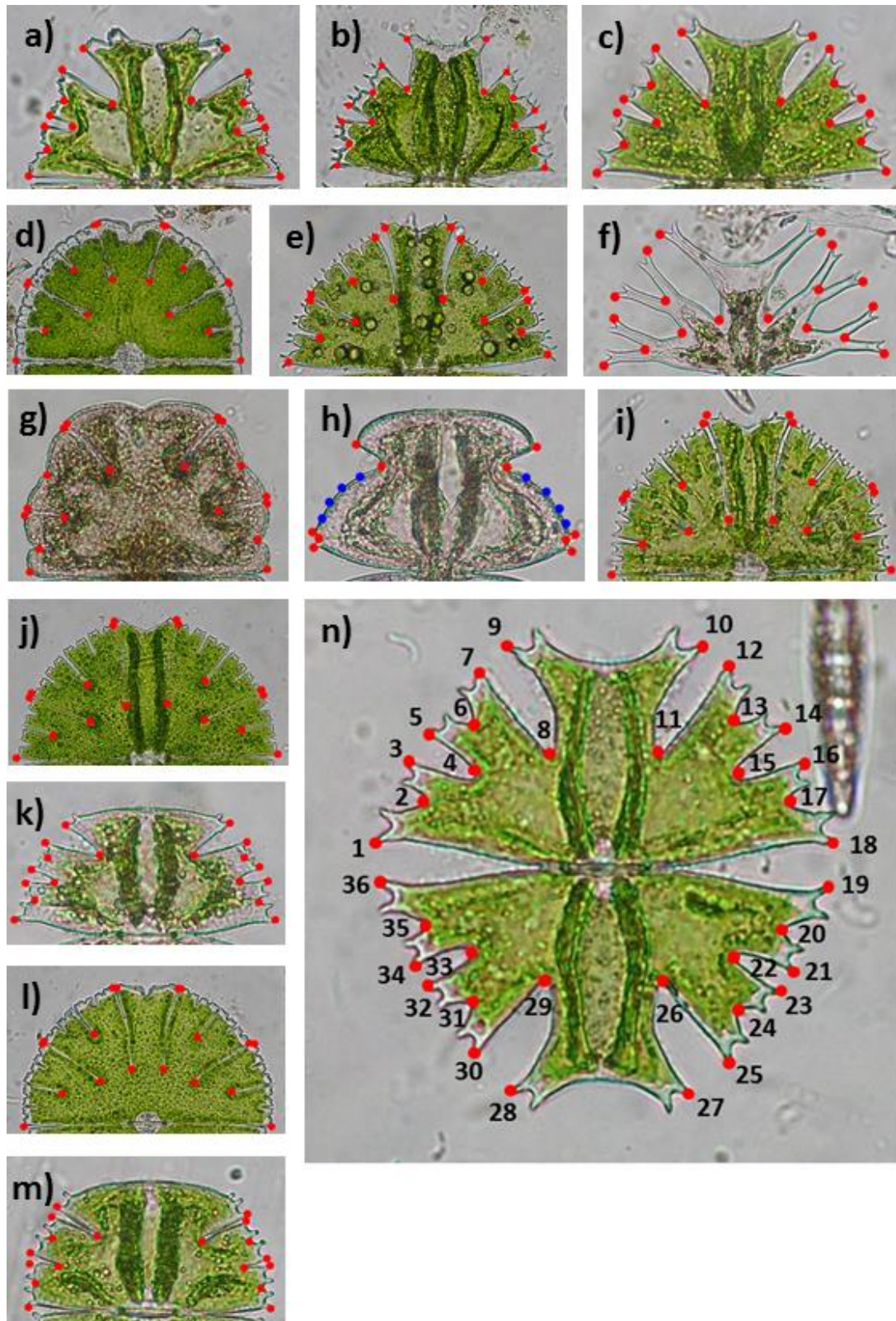
značil zářez apikálního laloku a č. 9 pak jeho okraj. Landmarky na zbývajících třech čtvrtinách buňky (č. 19-36) byly umístěny tak, že jejich poloha odpovídala landmarkům č. 1-9. V případě druhů *M. brachyptera* a *M. fimbriata* byly landmarky umístěny nikoliv na vnější okraj buňky jako ve všech ostatních případech, ale na místě styku buněčné stěny s cytoplazmou, jelikož vnější výběžky jsou pouze ztlustlými výstupky buněčné stěny. Pouze v případě druhu *M. oscitans* (Obr. 6h) byly namísto landmarku 4-7 a jejich homologů použity semilandmarky (Bookstein, 1997), tedy body, jejichž pozice není pevně dána. Tyto body se mohou při následné superimpozici pohybovat po spojnici mezi sousedními landmarky. Bylo tak učiněno kvůli zaniklému laterálnímu laloku, který pravděpodobně splynul se zbylým lalokem (Růžička, 1981), a nebylo tudíž možné definovat homologní body pro umístění landmarků.

2.4. Analýza dat

2.4.1. Hodnocení velikosti a komplexity buněk

Velikost buněk byla vypočtena jako odmocnina sumy druhých mocnin vzdálenosti landmarků od těžiště landmarkové konfigurace. Tato hodnota je tradičně používána v GM jako měřítko celkové velikosti objektu a nazývá se centroidová velikost (Zelditch et al., 2004). Velikost buněk byla změřena v programu TpsRelw, ver. 1.49 (Rohlf, 2010)

Komplexita neboli globularita buněk byla hodnocena na základě izoperimetrického kvocientu (např. Osserman, 1978). Tento kvocient je definován jako podíl obsahu buňky a obsahu kruhu o obvodu odpovídajícím obvodu buňky a vypočte se jako $Q = \frac{4\pi A}{L^2}$, kde A představuje plochu a L obvod buňky. Z výše uvedeného vzorce je zřejmé, že izoperimetrický kvocient nabývá hodnot od 0 do 1 a že jeho hodnota je zcela nezávislé na velikosti buňky. Buňky s morfologicky méně komplexní, jejichž tvar se více podobá kružnici (mající vyšší globularitu) dosahují vyšších hodnot kvocientu, zatímco buňky morfologicky komplexnější dosahují hodnot nižších. Obvod každé buňky byl změřen v programu TpsDig2 (Rohlf, 2010). U druhů *M. brachyptera* a *M. fimbriata* byla k měření obvodu brána opět pouze část buňky bez ztlustlých výběžků.



Obr. 6: Umístění landmarků (červená) a semilandmarků (modrá) na půlbuňkách jednotlivých druhů. a) *M. americana*, b) *M. brachyptera*, c) *M. crux-melitensis*, d) *M. denticulata*, e) *M. fimbriata*, f) *M. furcata*, g) *M. jenneri*, h) *M. oscitans*, i) *M. papillifera*, j) *M. rotata*, k) *M. semiradiata*, l) *M. thomasiana*, m) *M. truncata*, n) ukázka umístění landmarků na celé buňce *M. crux-melitensis*

2.4.2. Transformované kopie

Pro rozklad variability na symetrickou složku a horno-dolní, levo-pravou a transversální složku asymetrie bylo použito nové techniky založené na PCA datového souboru, který obsahuje všechny symetrické kopie buňky (tedy kopie, na které byly aplikovány všechny transformace z grupy symetrických transformací) (Savriama et al., 2010; Savriama & Klingenberg, 2011). Grupa symetrických transformací pro biradiálně symetrické objekty, mezi které spadá i krásivka *Micrasterias*, zahrnuje kromě identity také transformace reflexe okolo vertikální osy, reflexe okolo horizontální osy a rotace o 180° (Obr. 2). Tyto transformované kopie byly vytvořeny z originální konfigurace landmarků po Prokrustovské superimpozici pomocí skriptu v programu R ver. 2.15.2 (R Development Core Team, 2012). U kopie symetrické podle vertikální osy došlo nejprve k zaměnění odpovídajících si x-ových souřadnic landmarků podél této osy (tzn. např. x-ová souřadnice prvního landmarku odpovídá x-ové souřadnici osmnáctého landmarku, druhého landmarku sedmáctému landmarku) (Obr. 6) a poté byly hodnoty těchto zaměněných x-ových souřadnic vynásobeny (-1). V případě kopie symetrické podle horizontální osy byly zaměňovány y-ové souřadnice odpovídajících si landmarků (tzn. např. landmarky 1-36, 2-35 atd.), v případě transversálně symetrické kopie byly zaměňovány x-ové i y-ové souřadnice transversálně ležících kvadrantů (např. 1 s 19, 2 s 20). V obou případech byly zaměňované hodnoty také vynásobeny (-1) (Klingenberg et al., 2002). Informace o souřadnicích originální konfigurace a transformovaných kopií buňky byla spojena do jednoho datového souboru, který je v dalším textu označován jako zčtyřnásobený.

2.4.3. Hlavní trendy morfologické variability mezi jednotlivými druhy

Na základě zčtyřnásobeného datového souboru byly vypočteny průměrné (a tedy dokonale symetrické) pozice landmarků pro každou buňku. Symetrizace biologických dat za účelem GM analýzy je zcela běžně užívanou technikou (např. Mardia et al., 2000; Zollikofer & León, 2002; Demayo et al., 2010). Je prováděna za účelem odstranění vlivu nebiologických (nemožnost určit levou a pravou stranu buňky) i biologických faktorů (fluktuční asymetrie), které by mohly nežádoucím způsobem ovlivnit interpretaci výsledků. Na těchto symetrizovaných buňkách byla provedena PCA. PCA byla provedena v programu PAST, ver. 2.17b. (Hammer et al., 2001). Hlavní trendy morfologické variability podél prvních dvou PC os byly vizualizovány v programu TpsRelw (Rohlf, 2010) (vizualizace byla provedena z výstupu analýzy relativních warpů při velikosti faktoru $\alpha=0$, která je zcela ekvivalentní PCA) (Zelditch et al., 2004).

2.4.4. Rozklad variability

Princip metody - PCA zčtyřnásobeného datového souboru

Základem samotného rozkladu variability je PCA zčtyřnásobeného datového souboru. Jednotlivé PC osy je možné rozdělit do čtyř kategorií podle toho, jaký typ variability vysvětlují. Tyto kategorie jsou: zcela symetrická variabilita, a tři segmenty variability asymetrické (horno-dolní, levo-pravá a transverzální). Horno-dolní asymetrie popisuje rozdíl ve tvaru půlbuněk, levo-pravá mezi levou a pravou částí buněk a transverzální asymetrie pak rozdíl mezi dvojicemi šikmo protilehlých kvadrantů. Typ variability, kterou daná osa popisuje, je možné určit na základě porovnání vzájemné pozice čtyř kopií vůči této ose. Pokud se všechny kopie překrývají, jde o variabilitu symetrickou, jelikož trend této osy popisuje rozdíly mezi jednotlivými buňkami, nikoliv mezi čtyřmi transformacemi téže buňky. Pokud se mezi sebou překrývají dvojice tvořená původní konfigurací a konfigurace reflektovaná okolo vertikální osy, jde o variabilitu horno-dolní. Dvojice buněk na opačných stranách příslušné PC osy se totiž liší ve tvaru půlbuněk. Pokud jde o osu popisující levo-pravou variabilitu, na jedné straně PC osy se nachází buňka původní a buňka reflektovaná podle horizontální osy, a tato osa pak vysvětluje variabilitu mezi levou a pravou stranou jednotlivých transformací. Poslední případ, kdy se na jedné straně PC osy nachází buňka identická a rotovaná o 180° , vypovídá o variabilitě transverzální, jelikož popisuje rozdíl mezi transverzálně ležícími kvadranty.

Absolutní a relativní hodnoty asymetrie pro jednotlivé buňky, populace a druhy

Absolutní hodnoty asymetrie pro jednotlivé buňky byly určeny na základě dvou nezávislých datasetů. První dataset obsahoval konfigurace originálních buněk a jejich transformovaných kopií, na kterých byla provedena jedna společná Prokrustovská superimpozice a rozklad variability (tento soubor je v dalším textu označován jako dataset 1). Hodnoty absolutní asymetrie pro jednotlivé buňky pak byly získány jako suma absolutních hodnot skóre buňky na PC osách, které vysvětlují stejný typ variability. Získání absolutních hodnot asymetrie na základě společné PCA je již zavedená technika, která byla využita ve všech studiích, které se rozkladem asymetrie u objektů s komplexní symetrií zabývaly (Savriama et al., 2010; Savriama et al., 2011; Savriama & Klingenberg, 2011; Neustupa, 2013). Na základě tohoto datasetu byla pro jednotlivé populace také zjišťována relativní míra symetrie a asymetrie, tedy poměrné zastoupení jednotlivých typů variability. Tyto hodnoty byly vypočteny jako suma procent variability vysvětlené PC osami dané kategorie.

Pro druhý datový soubor (dále označovaný jako dataset 2) byly absolutní hodnoty asymetrie získány po samostatné Prokrustovské superimpozici a PCA zčtyřnásobeného datového souboru pro každou buňku zvlášť. Výsledkem této PCA jsou čtyři PC osy, z nichž každá popisuje jiný typ variability. Hodnoty absolutní asymetrie byly určeny jako směrodatné odchylky skóru objektů na PC ose příslušného typu. Tato technika zatím nebyla použita v žádné studii, ačkoliv oproti prvnímu způsobu přináší jisté výhody (např. umožňuje srovnávat objekty s nesterjým počtem landmarků či porovnávat soubory s nesterjým počtem objektů). Součástí této diplomové práce je také porovnání obou metod získání absolutních hodnot asymetrie. Prokrustovská superimpozice a PCA byla v obou případech prováděna v programu R.

PCA a následný rozklad variability byly také prováděny pro jednotlivé druhy. V tomto případě byla prováděna společná Prokrustovská superimpozice všech populací daného druhu. Účelem této analýzy bylo zjistit, zda se jednotlivé druhy liší v charakteru asymetrie.

Symetrické a asymetrické trendy byly vizualizovány v programu TpsRelw (Rohlf, 2010), opět jako výstup z RWA při velikosti fakotru $\alpha=0$ (Zelditch et al. 2004). Tyto trendy byly kvůli lepší čitelnosti grafů zvýrazněny dvakrát v případě levo-pravé asymetrie a třikrát v případě asymetrie transverzální.

3.4.5. Lineární regrese a korelace

Pomocí lineární regrese byl testován vliv komplexity a velikosti buněk na míru symetrie a asymetrie. Byly použity hodnoty absolutní asymetrie pro jednotlivé buňky z datasetu 1 i 2. Na základě hodnot pro jednotlivé buňky byly vypočteny průměrné hodnoty pro jednotlivé populace, které byly v těchto analýzách také testovány. Pro vztah mezi jednotlivými typy asymetrie (opět dataset 1 i 2 vyjádřený v absolutních hodnotách pro jedince i populační průměr) byly zvoleny korelační analýzy. Obě metody byly provedeny v programu PAST (Hammer et al. 2001).

2.4.6. Permutační MANOVA

Vliv lokality, druhu, komplexity a velikosti buněk na míru jednotlivých typů asymetrie byl testován permutační MANOVou (Multivariate Analysis of Variance) v programu R (R Development Core Team, 2012). Permutační MANOVA je součástí statistického balíku Vegan (Oksanen et al., 2011), do něhož je implementovaná pomocí funkce *adonis*. Permutační MANOVA je mnohorozměrnou neparametrickou verzí analýzy variance (ANOVA), která umožňuje rozklad variability dat. Analýza byla provedena za použití absolutních hodnot pro jednotlivé buňky z obou datasetů. V rámci každého datasetu byl

vyjádřen čistý vliv lokality, druhu, komplexity a velikosti buněk na každý typ asymetrie. Čistý vliv každé proměnné byl zjištěn po odečtení vlivu ostatních proměnných na variabilitu dat (zájmová proměnná byla do modelu vždy zahrnuta na posledním místě). Signifikance všech testů byla ověřována testy s 999 permutacemi.

3. VÝSLEDKY

3.1. Analyzované populace

V této práci bylo analyzováno 71 odlišných populací rodu *Micrasterias*, které náležely do 13 druhů a byly nalezeny na 31 lokalitách. Nalezené vzorky obsahovaly od 1 do 4 druhů. Seznam nalezených druhů na jednotlivých lokalitách ukazuje Tab. 2. Buňky byly analyzovány pomocí landmarkové GM, což je hojně využívaná metoda ke studiu tvarů v moderní biologii. Její výhodou je, že umožňuje studovat pouze tvar buněk očištěný od všech dalších fakotrů, jako je například velikost. Bylo použito nového přístupu rozkladu asymetrie, který umožňuje studovat asymetrie jednotlivých buněk na základě jejich porovnání s kopiemi transformovanými operacemi z grupy symetrických transformací (Savriama et al. 2010, Savriama & Klingenberg, 2011).

3.2. Hlavní trendy morfologické variability mezi jednotlivými druhy

Nejprve byla pro každou buňku vytvořena horizontálně, vertikálně a transverzálně symetrické kopie, jejichž zprůměrováním vznikla symetrická kopie každé buňky. Struktura datového souboru symetrických buněk všech populací po Prokrusovské superimpozici, tedy po jejich standardizaci na velikost, rotaci a pozici v prostoru ukazuje Obr. 7.



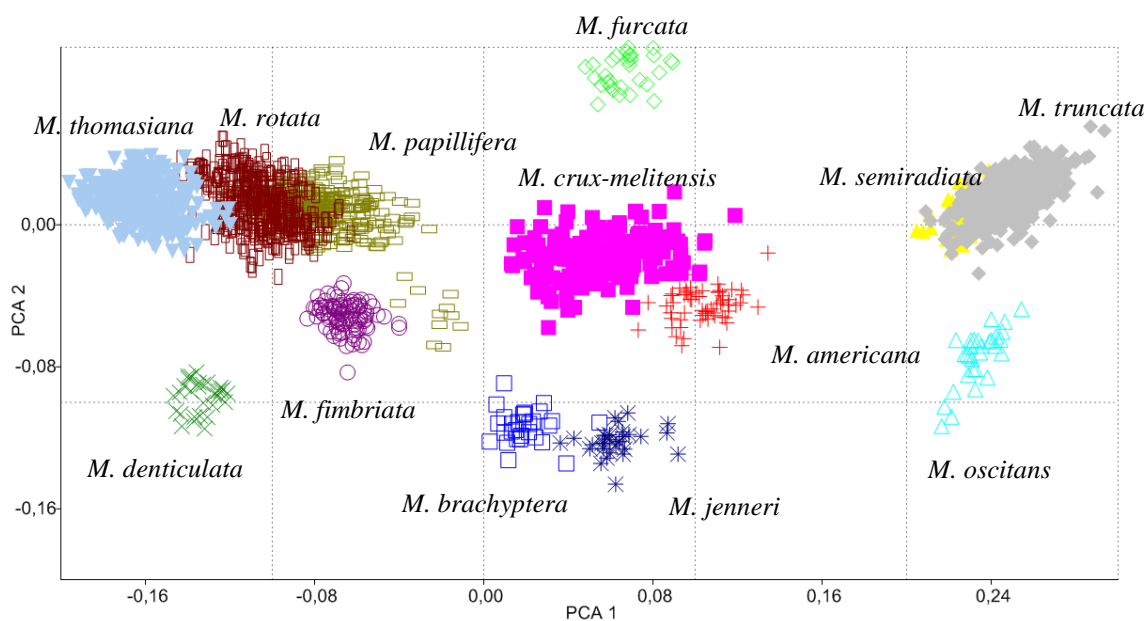
Obr. 7: Struktura souboru symetrických buněk po Prokrustovské superimpozici.

Na symetrickém datovém souboru byla provedena PCA, která odhalila hlavní vzájemně nekorelované morfologické trendy v datech. Na Obr. 8 je vidět struktura dat v prostoru vymezeném první a druhou PC osou a míra morfologické plasticity jednotlivých druhů. První osa PCA vysvětluje 87,46% morfologické variability, druhá pak již pouze 4,33 %. Je zřejmé, že některé druhy jsou morfologicky hůře rozlišitelné (např. *M. truncata* a *M. semiradiata*), jiné naopak tvoří kompaktní izolovaný shluk, který je morfologicky velmi dobře definovaný (např. *M. denticulata* a *M. oscitans*). Morfologicky nejvíce variabilní vzhledem k poloze většiny buněk svého druhu je shluk buněk *M. papillifera*, který se spíše podobá druhu *M.*

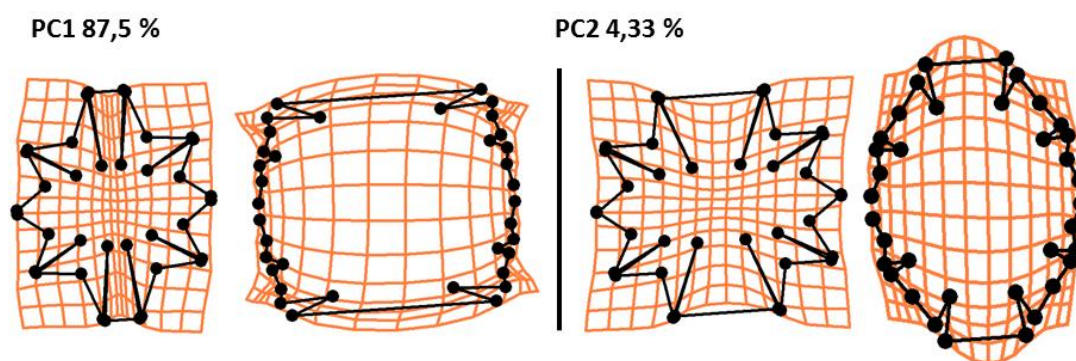
fimbriata. Tvarové trendy, které popisuje první a druhá PC osa ukazuje Obr. 9. První PC osa postihuje zejména variabilitu v šíři apikálního laloku a následkem toho i hloubku laterálních zářezů prvního i vyššího řádu. Druhá PC osa pak popisuje taktéž hloubku jednotlivých zářezů, ovšem při zachování víceméně stejné šířky apikálního laloku.

Tab. 2: Zastoupení druhů na jednotlivých lokalitách. *Micrasterias* amer=*americana*, brac=*brachyptera*, crux=*crux-melitensis*, dent=*denticulata*, fimb=*fimbriata*, furc=*furcata*, jenn=*jenneri*, osci=*oscitans*, papi=*papillifera*, rota=*rotata*, semi=*semiradiata*, thom=*thomasiana*, trun = *truncata*. Výskyt druhu na dané lokalitě je vyznačen černým polem. Zkratky lokalit jsou uvedeny v Tab1.

	<i>Micrasterias</i>												
	amer.	brac.	crux.	dent.	fimb.	furc.	jenn.	osci.	papi.	rota.	semi.	thom.	trun.
B													
BB1													
BB2													
BB3													
BB4													
BB5													
BR1													
BR2													
BR3													
BR4													
C													
F													
H													
CH1													
CH2													
P1													
P2													
PBB													
PKV													
R1													
R2													
R3													
S1													
S2													
Š													
VR1													
VR2													
I1													
I2													
M													
PO													



Obr. 8: Rozmístění symetrických buněk v tvaroprostoru tvořeném první a druhou PC osou. PC1 vysvětluje 87,46 % variability, PC2 4,33 %.



Obr. 9: Morfologické trendy popsané první a druhou PC osou a procenta vysvětlené variability. Trend na první PC ose je popsán zleva doprava, trend na druhé PC ose od shora dolů.

3.3. Rozklad variability

Vlastní rozklad variability a určení hodnot asymetrie pro jednotlivé buňky byl prováděn dvěma různými způsoby. Prvním z nich byla společná Prokrustovská superimpozice zčtyřnásobeného datového souboru obsahujícího všechny studované buňky a jejich následná PCA (dataset 1), druhým pak superimpozice a PCA čtyř symetrických transformací každé buňky jednotlivě (dataset 2). Výsledkem společné PCA zčtyřnásobeného datového souboru (dataset 1) všech buněk je 68 PC os, z nichž každá může být zařazena do jedné ze čtyř kategorií podle toho, zda vysvětluje symetrickou, horno-dolní, levo-pravou či transversální variabilitu. Charakter jednotlivých PC os ukazuje Tab. 3. Prvních 8 os s výjimkou osy č. 5 popisuje symetrickou variabilitu, tedy zejména mezidruhové rozdíly. Všechny symetrické osy

dohromady vysvětlily 96,7 % celkové variability. Relativně nejvýznamnějším asymetrickým segmentem variability je pak asymetrie horno-dolní (2,6 % vysvětlené variability). Asymetrie levo-pravá a transverzální (obě 0,4 % vysvětlené variability) se ukazují jako relativně méně významné.

Tab. 3: Charakter PC os zčtyřnásobeného datového souboru. Hodnota v závorce za pořadím os ukazuje celkové množství vysvětlené variability

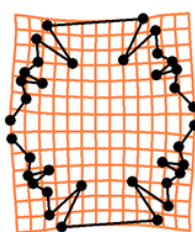
Typ variability popsané jednotlivými osami	Pořadí osy a vysvětlená variabilita
Symetrická	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 16, 19, 23, 26, 31, 37, 45, 48 (celkem 96,7 %)
Horno-dolní	5, 9, 10, 14, 17, 18, 20, 22, 24, 28, 29, 32, 36, 44, 50, 59, 61(celkem 2,6 %)
Levo-pravá	15, 27, 30, 38, 39, 41, 42, 47, 51, 53, 56, 58, 60, 62, 65, 68 (celkem 0,4 %)
Transverzální	21, 25, 33, 34,35, 40, 43, 46, 49, 52, 54, 55, 57, 63, 64, 66, 67 (celkem 0,4 %)

3.3.1. Rozklad variability pro jednotlivé druhy

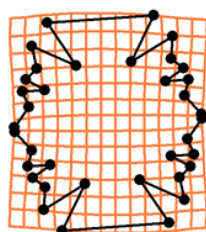
PCA a rozklad variability byly taky také provedeny zvlášť pro soubor všech populací jednoho druhu. Obr. 10 ukazuje tvarové trendy popsané osami, které vysvětlují nejvíce z každého typu variability.

Micrasterias americana

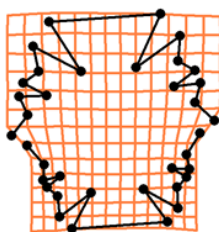
PC2, 28,19%



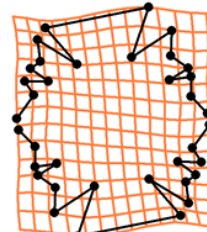
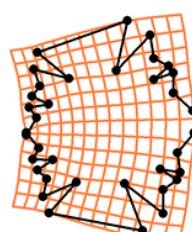
PC1, 13,2%



PC3, 7,24%

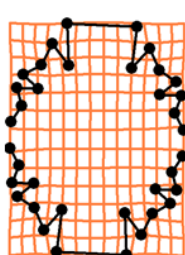


PC11, 1,44%

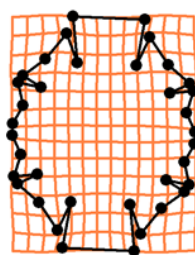


Micrasterias brachyptera

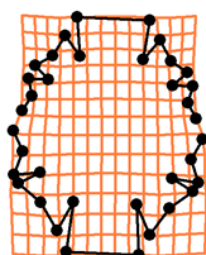
PC2 15,29%



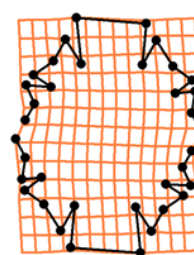
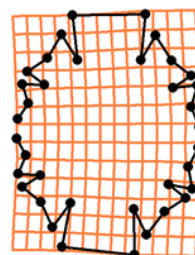
PC1 32,79%



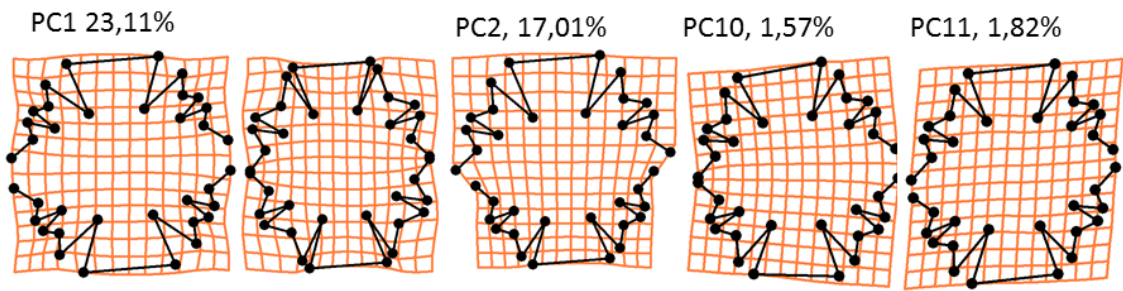
PC9 1,81%



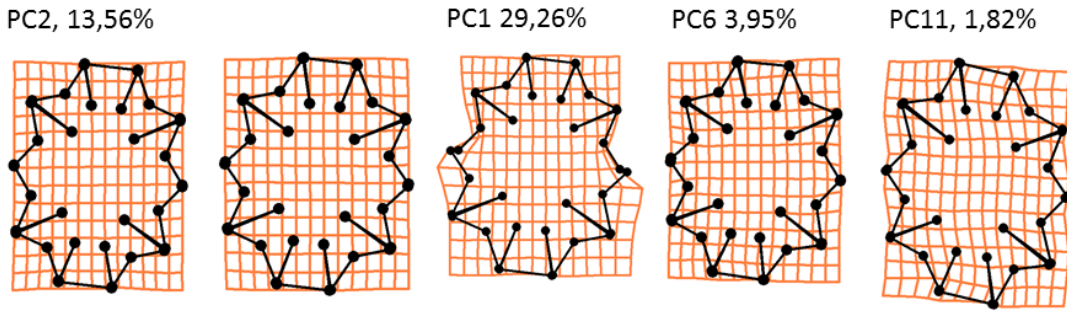
PC10 1,54%



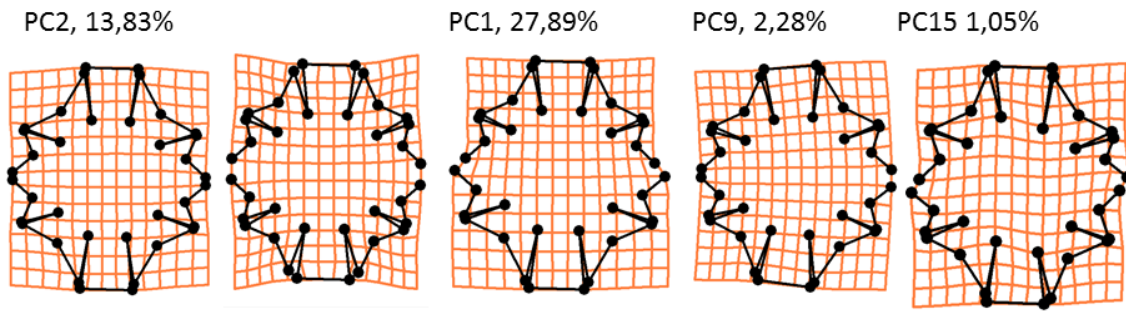
Micrasterias crux-melitensis



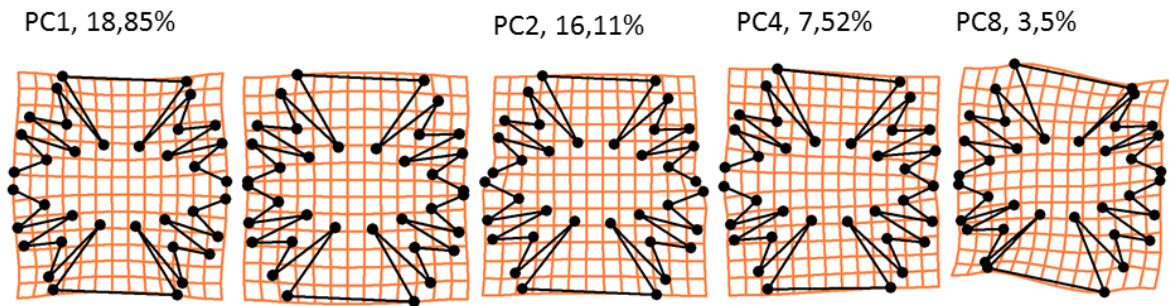
Micrasterias denticulata



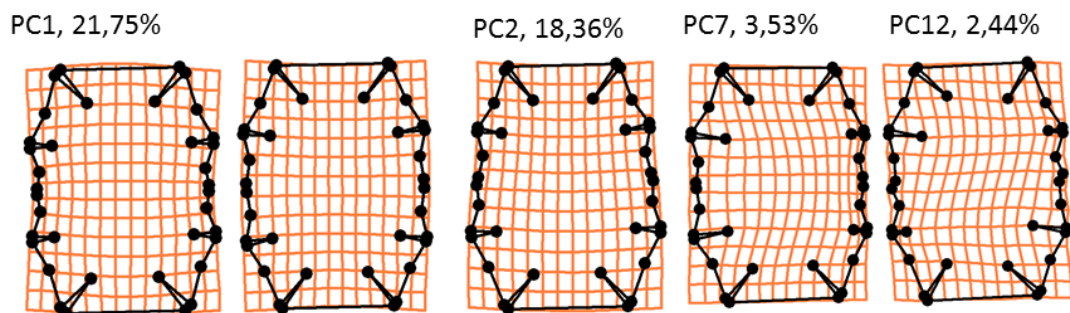
Micrasterias fimbriata



Micrasterias furcata



Micrasterias jeneri



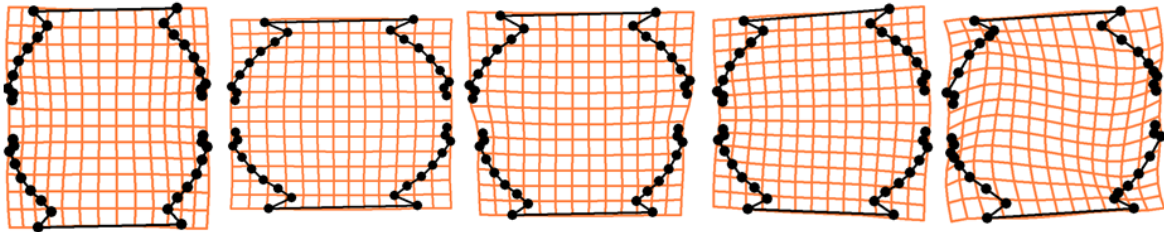
Micrasterias oscitans

PC1, 28,54%

PC2, 18,8%

PC6, 4,08%

PC4, 10,69%



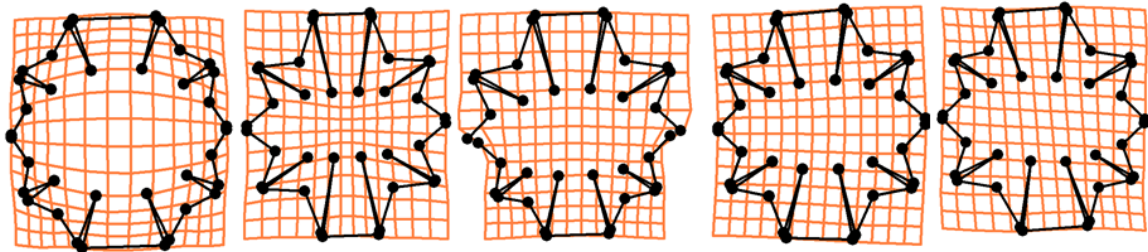
Micrasterias papillifera

PC2 22,52%

PC1 23,51%

PC13, 1,31%

PC16, 0,94%



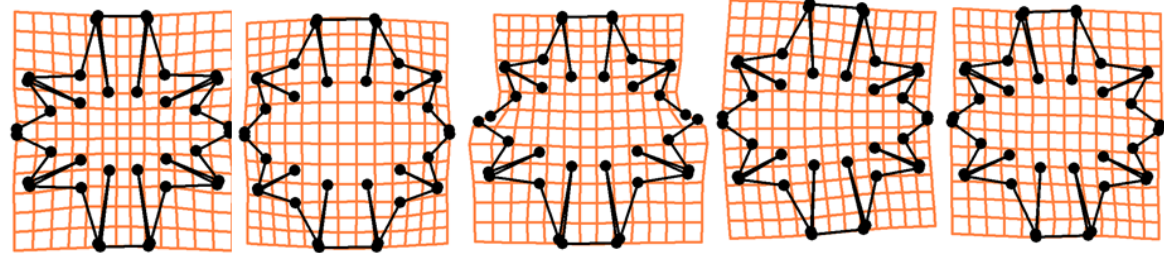
Micrasterias rotata

PC2, 19%

PC1, 25,52%

PC11, 1,43%

PC16, 0,72%



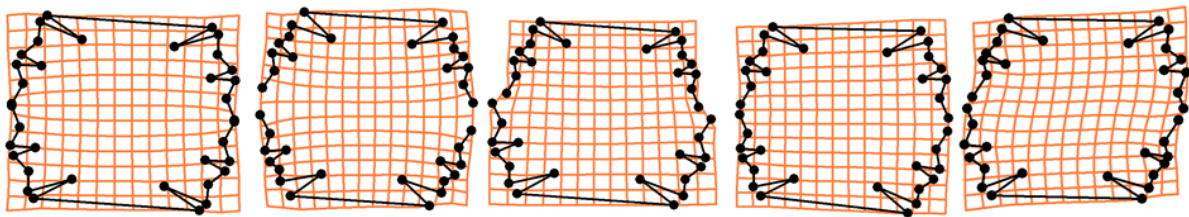
Micrasterias semiradiata

PC2, 12,65%

PC1, 38,02%

PC9, 1,91%

PC13, 1,19%



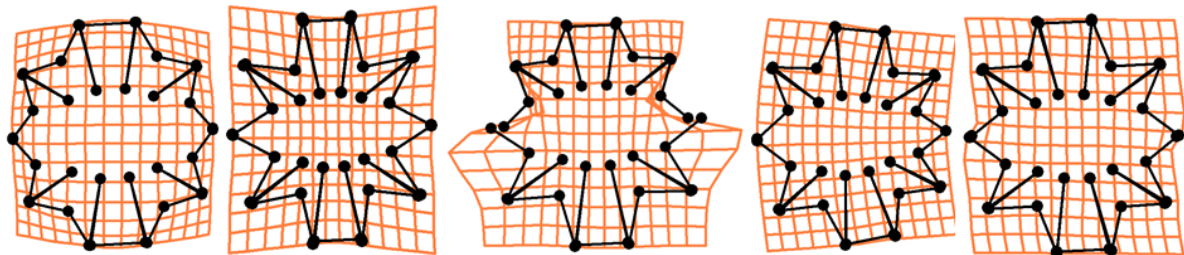
Micrasterias thomasi

PC2, 21,61%

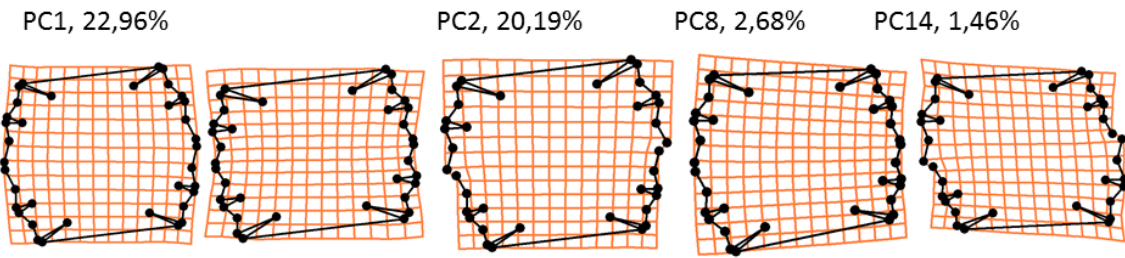
PC1, 22,78%

PC11, 1,59%

PC16, 0,84%



Micrasterias truncata



Obr. 10: Trendy popsané osami, které vysvětlují nejvíce variability pro daný typ symetrie či asymetrie a procenta variability, která se těmito osami podařilo vysvětlit. První dva sloupce představují krajní případy na symetrické ose. Třetí sloupec představuje horno-dolní asymetrii, čtvrtý levo-pravou (trend je dvakrát zvětšen oproti nejextrémnějšímu případu) a pátý transverzální (tříkrát zvětšen). V případě asymetrické variability je zobrazen pouze jeden extrém, protože druhý je k němu symetrický.

Pro hlavní trend symetrické variability, který je ve všech případech popsán první (*M. crux-melitensis*, *M. furcata*, *M. jenneri*, *M. oscitans*, *M. truncata*) či druhou (*M. americana*, *M. brachyptera*, *M. denticulata*, *M. fimbriata*, *M. papillifera*, *M. rotata*, *M. semiradiata*, *M. thomasiiana*) PC osou, je charakteristická změna šířky a zahloubení laloků laterálních i laloku apikálního. Výjimku tvoří druh *M. oscitans*, u kterého byly laloky redukovány. I přesto je však změna šířky buňky hlavním symetrickým trendem. Horno-dolní variabilita, která je ve všech případech také popsána první či druhou PC osou kopíruje symetrickými trend. Větší semicela má tedy ve srovnání se semicelou menší rozšířenější a hlubší laloky. Levo-pravá a transverzální asymetrie jsou ve většině případů méně významné a jsou popsány osami s vyšším pořadovým číslem, které málokdy vysvětlují více než 4,1 % variability. V případě levo-pravé asymetrie tvoří výjimku druhy *M. americana* kde je tato variabilita vysvětlena třetí PC osou, která vysvětluje 7,2 % a *M. furcata*, kde je tato osa čtvrtá a popisuje 7,5 % variability v datech. U transverzální asymetrie je výjimkou druh *M. oscitans*, kde čtvrtá transverzální osa popsala 10,7 % variability. Hlavní trend levo-pravé variability je naklonění semicely na jednu stranu doprovázené zmenšením laloků na komprimované straně a naopak jejich zvětšením opačné straně. Transverzální asymetrie se projevuje nerovnoměrným rozevřením laloků.

3.3.2. Vliv komplexity na míru asymetrie

Vliv komplexity (globularity) na míru asymetrie byl testován pomocí lineární regrese (Obr. 11 a 12). Pro analýzu byly použity dataset 1 i 2 a vliv byl testován pro jedince i pro populační průměry. Analýzy obou nezávislých datasetů ukazují velmi podobné výsledky. Společné analýzy jednotlivých buněk (obr. 11) ukázaly velmi slabý vliv komplexity buněk na míru jejich asymetrie. V případě horno-dolní variability nebyly výsledky testu signifikantní,

v případě levo-pravé a transverzální variability byla signifikance velmi vysoká (menší nebo rovna 0,001), ovšem s nízkými procenty vysvětlené variability. Komplexita (globularita) vysvětlila 1,2 % (dataset 1)/1,6 % (dataset 2) v případě horno-dolní variability a 4,9 % (dataset 1)/5,9 % (dataset 2) v případě variability transverzální. Ve všech případech byla globularita s mírou asymetrie pozitivně korelovaná. S rostoucí globularitou klesá komplexita buněk, což tedy znamená, že čím komplexnější buňka byla, tím byla méně levo-právě a transverzálně asymetrická.

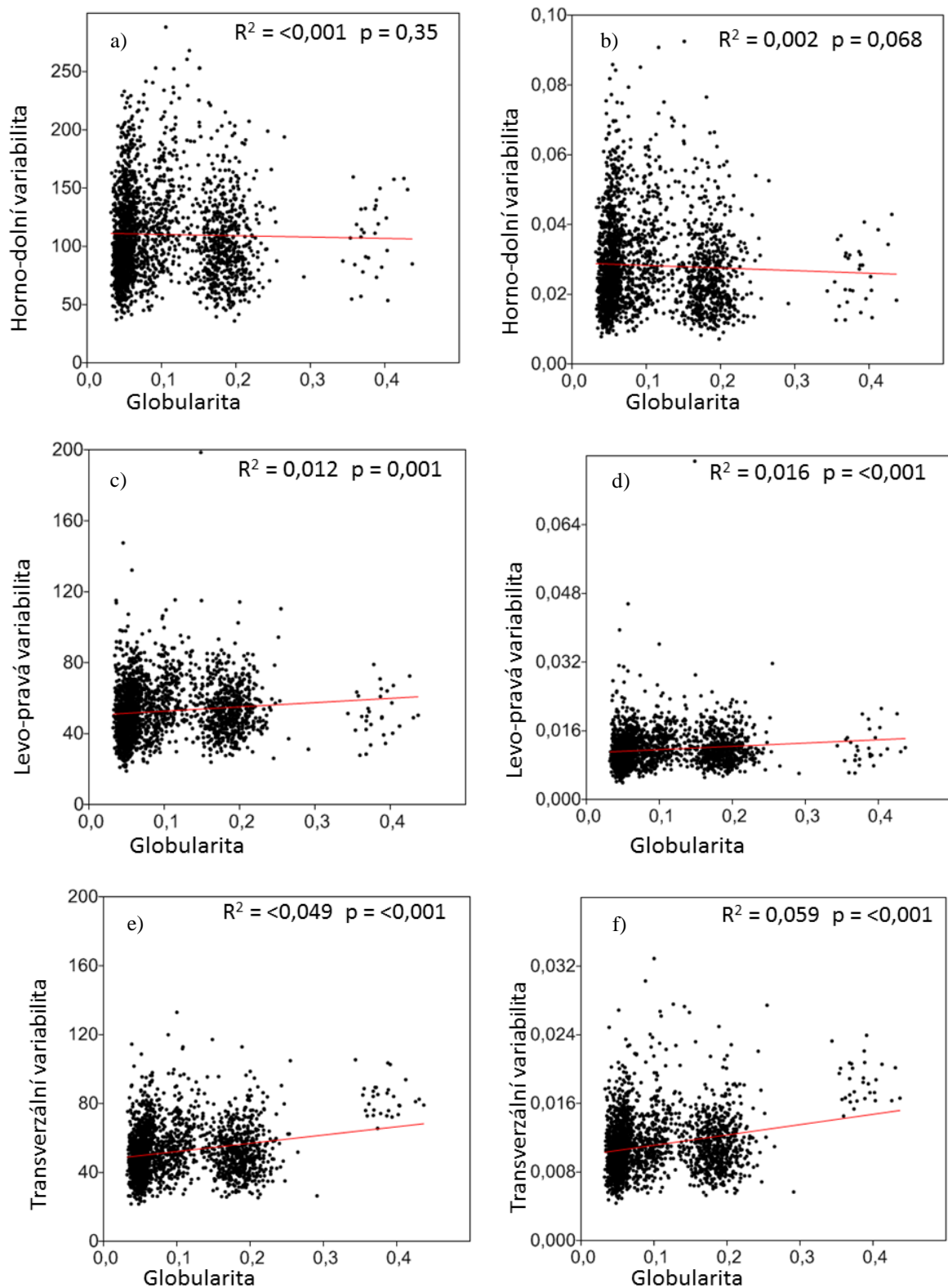
Analýza populačních průměrů (Obr. 12) ukázala ve srovnání s analýzou jednotlivých buněk lehce vyšší vliv komplexity na míru asymetrie se stejným trendem, který byl ovšem v případě horno-dolní variability opět nesignifikantní. Vliv klesající komplexity na zvyšující se míru levo-pravé asymetrie byla na hladině 0,05 signifikantní pouze v případě pužití datasetu 2 ($p = 0,018$), kde komplexita vysvětlila 7,6 % variability. Stejně jako v případě analýzy pro jednotlivé buňky se ukázal nejvyšší vliv komplexity na míru asymetrie transverzální.

V případě datasetu 1 vysvětlila komplexita 15 % variability ($p = 0,002$) a v případě datasetu 2 19,1 % variability ($p < 0,001$). Tyto hodnoty jsou ale pravděpodobně podmíněny vysokou transverzální asymetrií druhu *M. oscitans*, jehož globularita je velmi vysoká. Hodnoty absolutní asymetrie pro jednotlivé buňky a jejich globularita jsou uvedeny v Příloze 2.

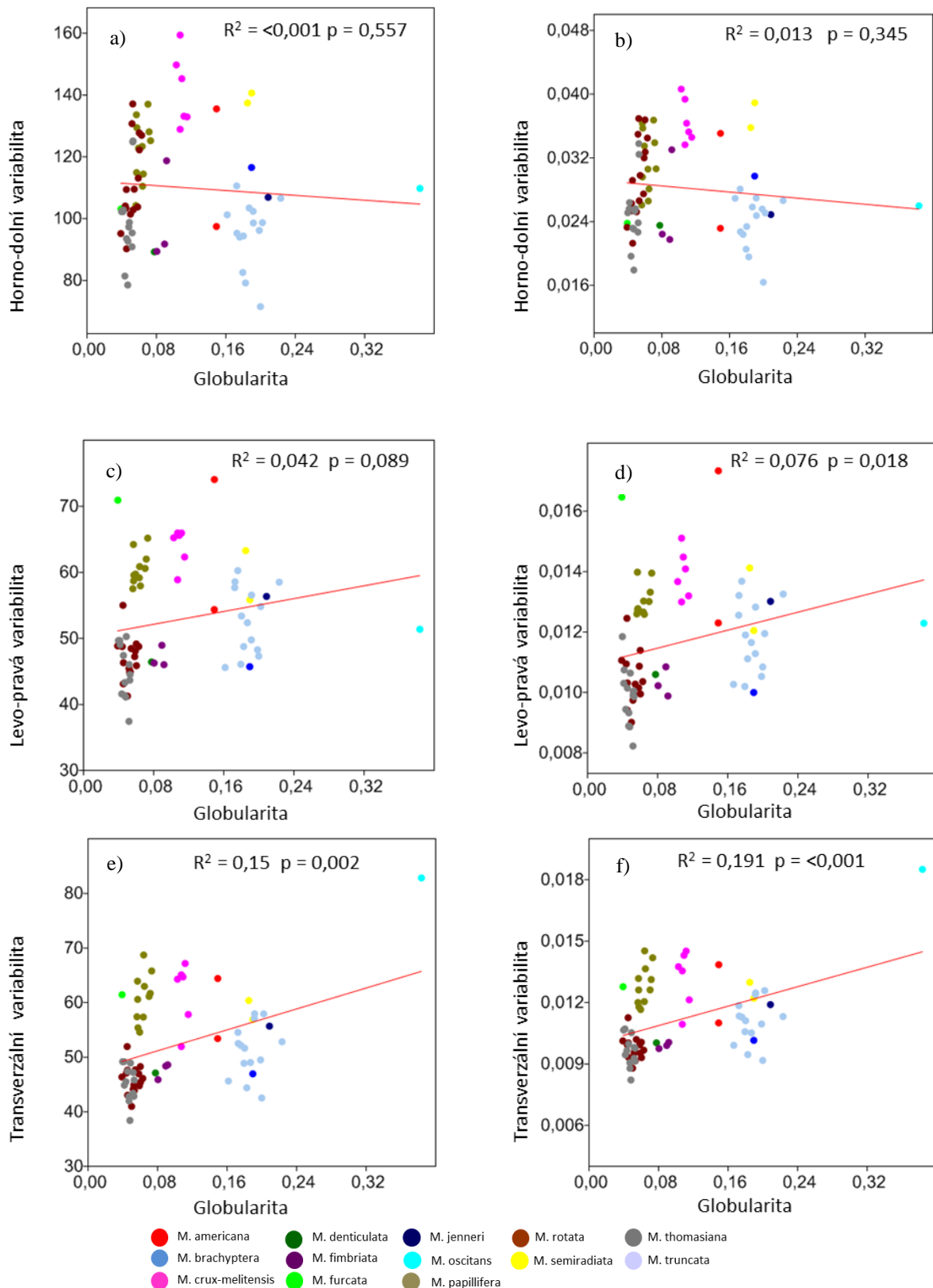
3.3.3. Vliv velikosti buněk na míru asymetrie

Vliv velikosti buněk na míru jednotlivých typů asymetrie (Obr. 13 a 14) byl opět testován pomocí lineárního regresního modelu. Opět bylo použito obou datasetů a hodnot absolutní míry asymetrie pro jedince a populační průměry. Společná analýza jedinců (Obr. 13) vysvětlila na základě velikosti nejnížší podíl variability v případě horno-dolní variability (v obou případech méně než 1,5 % vysvětlené variability, $p < 0,001$). V případě levo-pravé asymetrie se vysvětlená variabilita ($p < 0,001$ v obou případech) pohybovala v hodnotách 12,1 % (dataset 1)/8,6 % (dataset 2). U transverzální asymetrie byly tyto hodnoty v rozmezí od 12,4 % (dataset 1) do 11,5 % (dataset 2). Ve všech případech byla velikost buněk a míra asymetrie negativně korelovaná, což znamená, že větší buňky byly méně asymetrické.

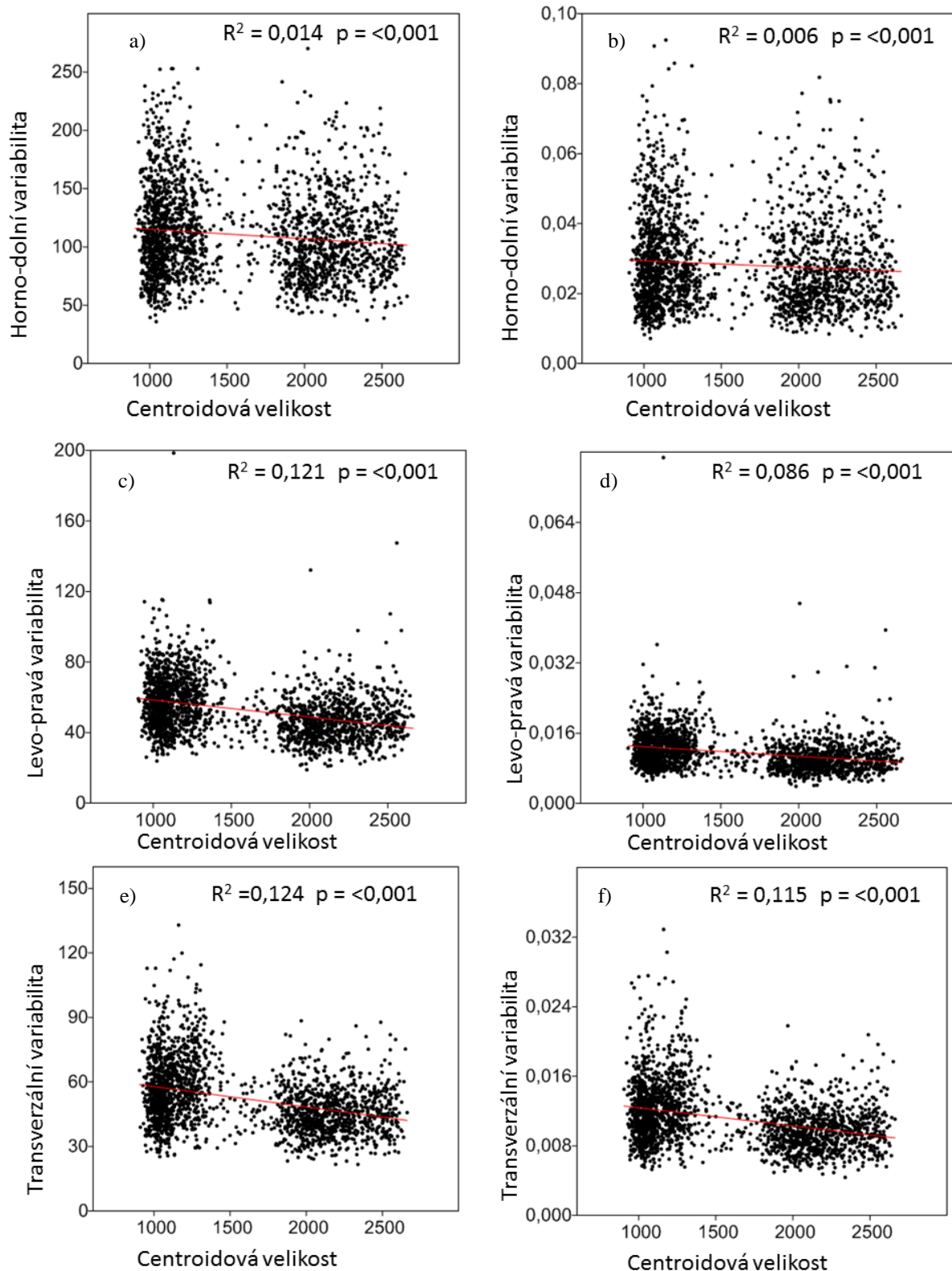
Pro populační průměry (Obr. 14) byla vysvětlená variabilita opět vyšší a závislost velikost buněk a míry asymetrie byla opět negativní. Vliv velikosti na horno-dolní variabilitu nebyl statisticky průkazný. V případě variability levo-pravé a transverzální byly výsledky ve všech případech průkazné ($p < 0,001$). Procenta vysvětlené variability se u levo-pravé asymetrie pohybovala v obou případech okolo 44 % a v případě variability transverzální okolo 39 %. Centroidová velikost jednotlivých buněk je uvedena v Příloze 2.



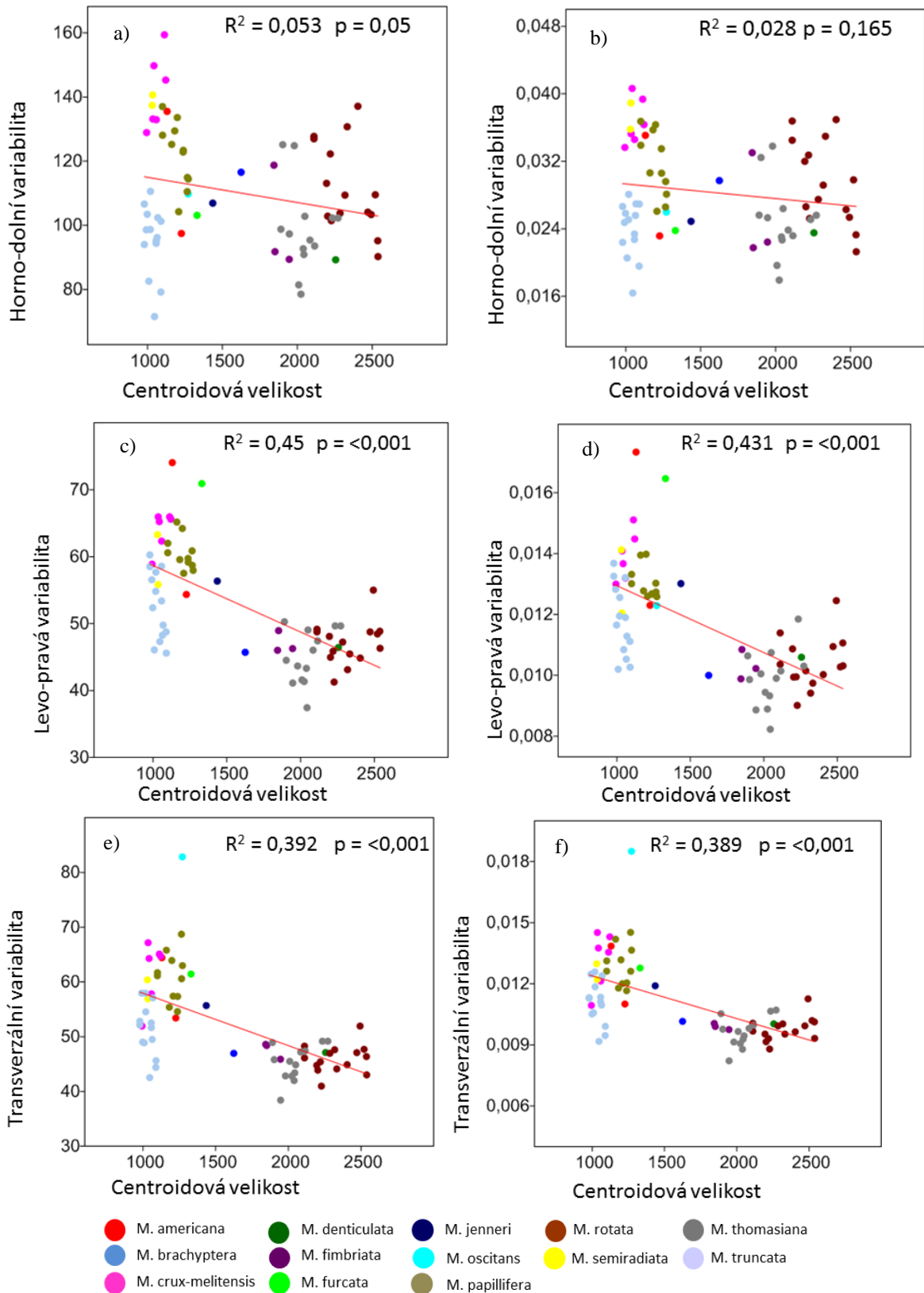
Obr. 11: Vliv complexity, která klesá s rostoucí globularitou, na míru horno-dolní, levo-pravé a transverzální asymetrie pro jednotlivé buňky. Grafy 11a, 11c, 11e obsahují hodnoty získané po společné PCA všech buněk a jejich transformovaných kopií (dataset 1), 11b, 11d, 11f po PCA jednotlivých buněk a jejich transformovaných kopií (dataset 2). Koeficient determinace a p-hodnota testu jsou uvedeny v horní části grafů.



Obr. 12: Vliv komplexity, která klesá s rostoucí globularitou, na míru horno-dolní, levo-pravé a transverzální asymetrie pro populační průměry. Grafy 12a, 12c, 12e obsahují hodnoty získané po společné PCA všech buněk a jejich transformovaných kopií (dataset 1), 12b, 12d, 12f po PCA jednotlivých buněk a jejich transformovaných kopií (dataset 2). Koefficient determinace a p-hodnota testu jsou uvedeny v horní části grafu.



Obr. 13: Vliv velikosti buněk na míru horno-dolní, levo-pravé a transverzální asymetrie pro jednotlivé buňky. Grafy 13a, 13c, 13e obsahují hodnoty získané po společné PCA všech buněk a jejich transformovaných kopií (dataset 1), 13b, 13d, 13f po PCA jednotlivých buněk a jejich transformovaných kopií (dataset 2). Koeficient determinace a p-hodnota testu jsou uvedeny v horní části grafu.



Obr. 14: Vliv velikosti buněk na míru horno-dolní, levo-pravé a transverzální asymetrie pro populační průměry. Grafy 14a, 14c, 14e obsahují hodnoty získané po společné PCA všech buněk a jejich transformovaných kopií (dataset 1), 14b, 14d, 14f po PCA jednotlivých buněk a jejich transformovaných kopií (dataset 2). Koeficient determinace a p-hodnota testu jsou uvedeny v horní části grafu.

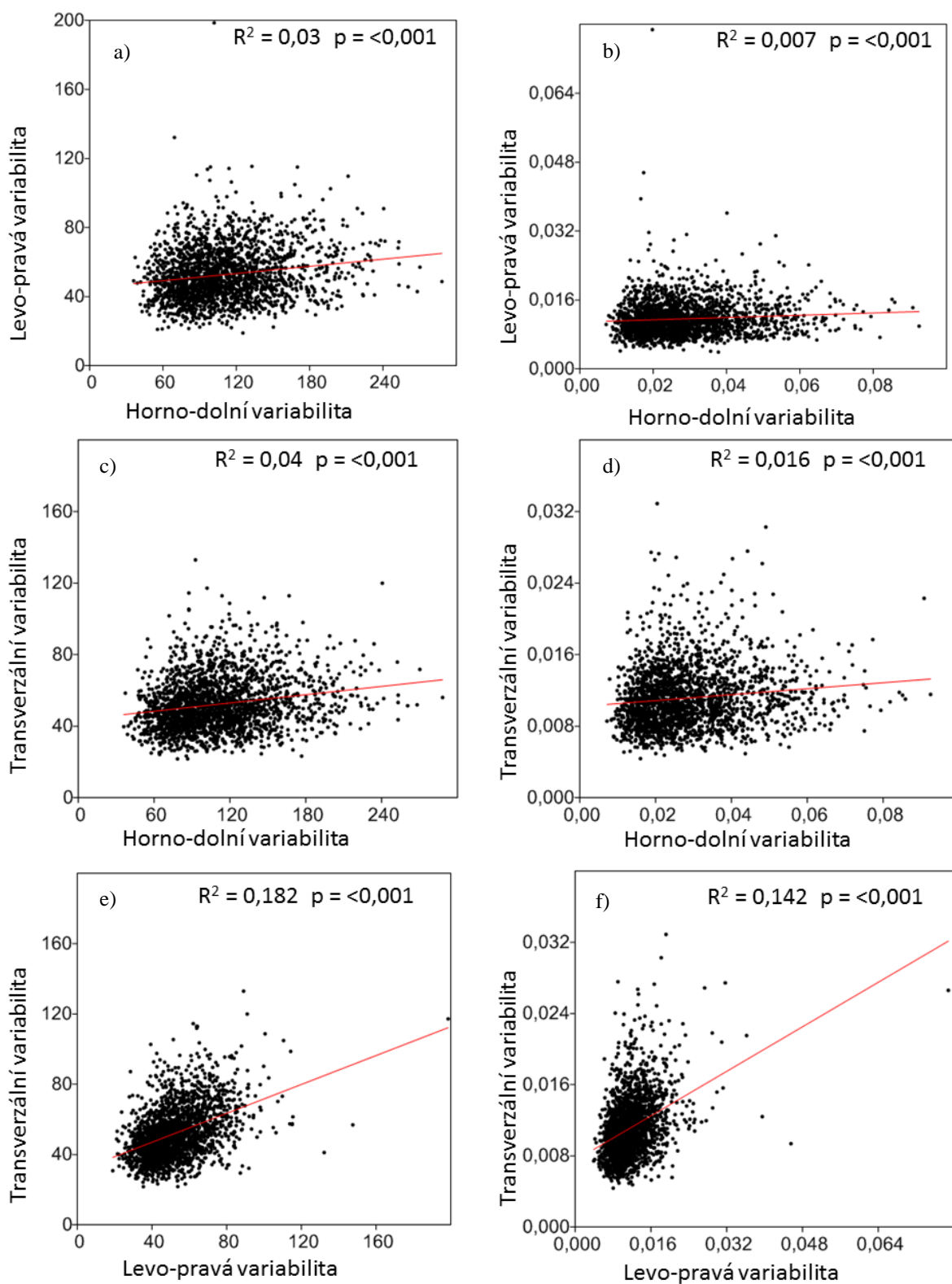
3.3.4. Vzájemný vztah jednotlivých typů asymetrie

Vzájemný vztah jednotlivých typů asymetrie (Obr. 15 a 16) byl testován lineární korelační analýzou na obou datasetech nejprve společně pro jednotlivé buňky a poté pro populační průměry. V případě analýzy jedinců (Obr. 15) je k ostatním dvěma typům variability v nejslabším vztahu variabilita horno-dolní, která vysvětlila pouze 3 % (dataset 1)/0,7 % (dataset 2) variability levo-pravé a 4 % (dataset 1)/1,6 % (dataset 2) variability transverzální. Levo-pravá variabilita pak v případě datasetu 1 vysvětlila 18,2 % transverzální variability, v případě datasetu 2 14,2 %. Ve všech případech je signifikance těchto hodnot menší než 0,001 a korelace míry asymetrie je pozitivní.

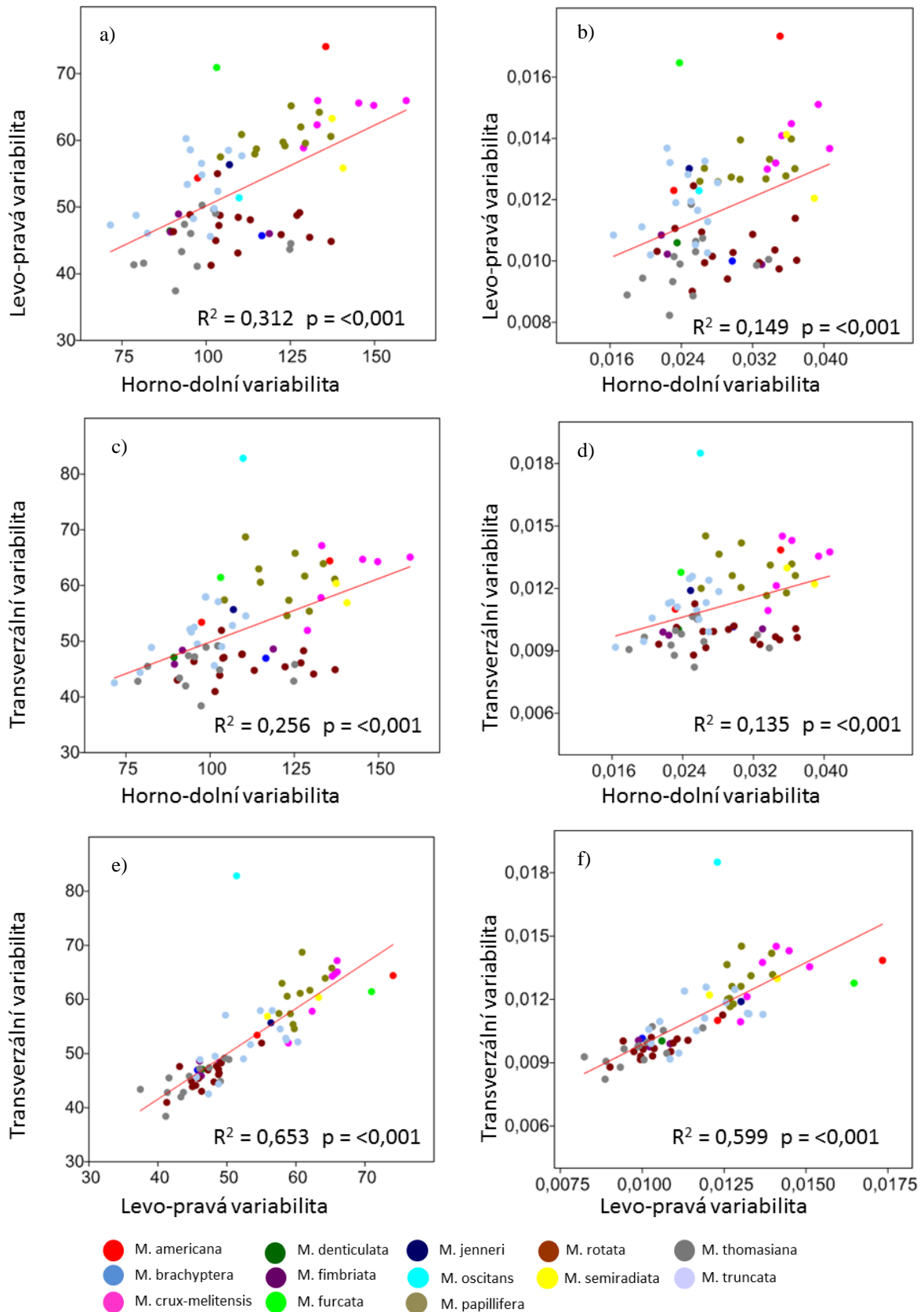
Korelace populačních průměrů (Obr. 16) ukazuje stejný, tedy pozitivní, trend jako korelace hodnot pro jednotlivé buňky. Tyto korelace byly opět silnější než korelace prováděná na jednotlivých buňkách. Horno-dolní variabilita se zde ukázala být v těsnějším vztahu k levo-pravé a transverzální variabilitě než v případě analýzy jednotlivých buněk. Korelace míry této asymetrie a asymetrie levo-pravé vysvětlila 31,2 % (dataset 1)/14,2 % (dataset 2). V případě korelace s transverzální asymetrie se podařilo vysvětlit 25,6 % (dataset 1)/13,5 % (dataset 2). Tato analýza opět prokázala silný pozitivní vztah levo-pravé a transverzální asymetrie (65 % vysvětlené variability v případě datasetu 1, 59 % v případě datasetu 2). Signifikance těchto hodnot byla opět ve všech případech $< 0,001$

3.3.5. Relativní zastoupení jednotlivých typů asymetrie

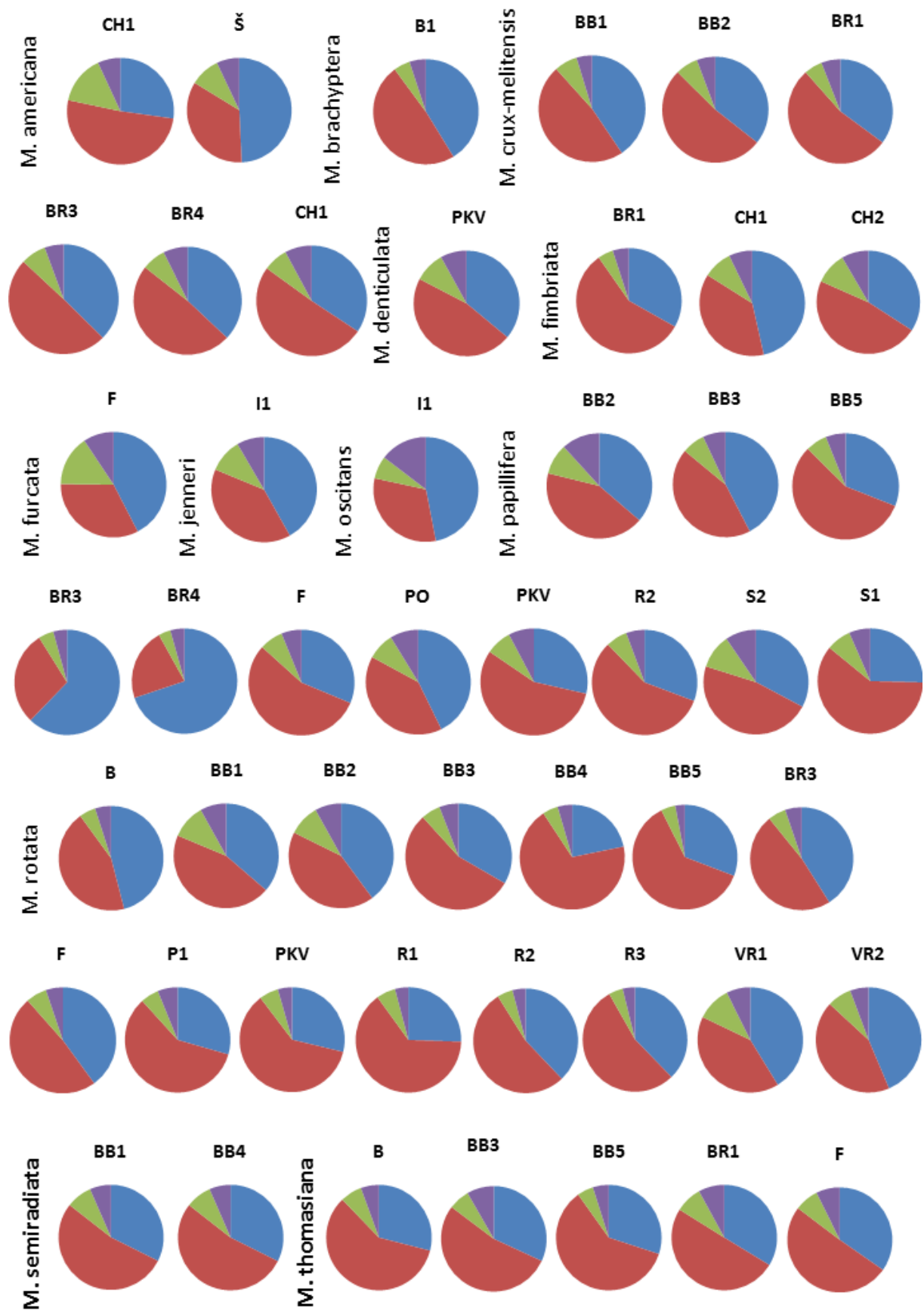
Relativní zastoupení jednotlivých typů variability v každé populaci zobrazuje Obr. 17. Proporce jednotlivých typů asymetrie jsou mezi lokalitami i druhy podobné. Výjimku tvoří jen několik populací, které budou zmíněny níže. Ve všech případech se o největší podíl dělí symetrická (21,8 – 69,8 % vysvětlené variability) a horno-dolní (20,5 – 68,9 %) variabilita. Symetrická variabilita zaujímá více než 50% pouze u druhu *M. papillifera* na lokalitách BR3 a BR4 a u druhu *M. truncata* na lokalitě I1. Horno-dolní variabilita zaujímá nadpoloviční podíl na větším množství lokalit (přibližně ve třetině). Největší podíl pak tato variabilita zaujímá u druhu *M. rotata* z lokality BB4. Levo-pravá (3,7 – 15,6 %) a transverzální (3 – 14,6 %) variabilita zaujímají podíl minoritní, který výjimečně překračuje 10%. Výjimkou je druh *M. oscitans*, u kterého je patrný vysoký podíl transverzální asymetrie. Další trendy, které by ukazovaly závislost poměrů asymetrie na lokalitě či druhu nejsou z grafů zřejmé. Přesné hodnoty proporce symetrické a asymetrické variability jsou uvedeny v Příloze 1.

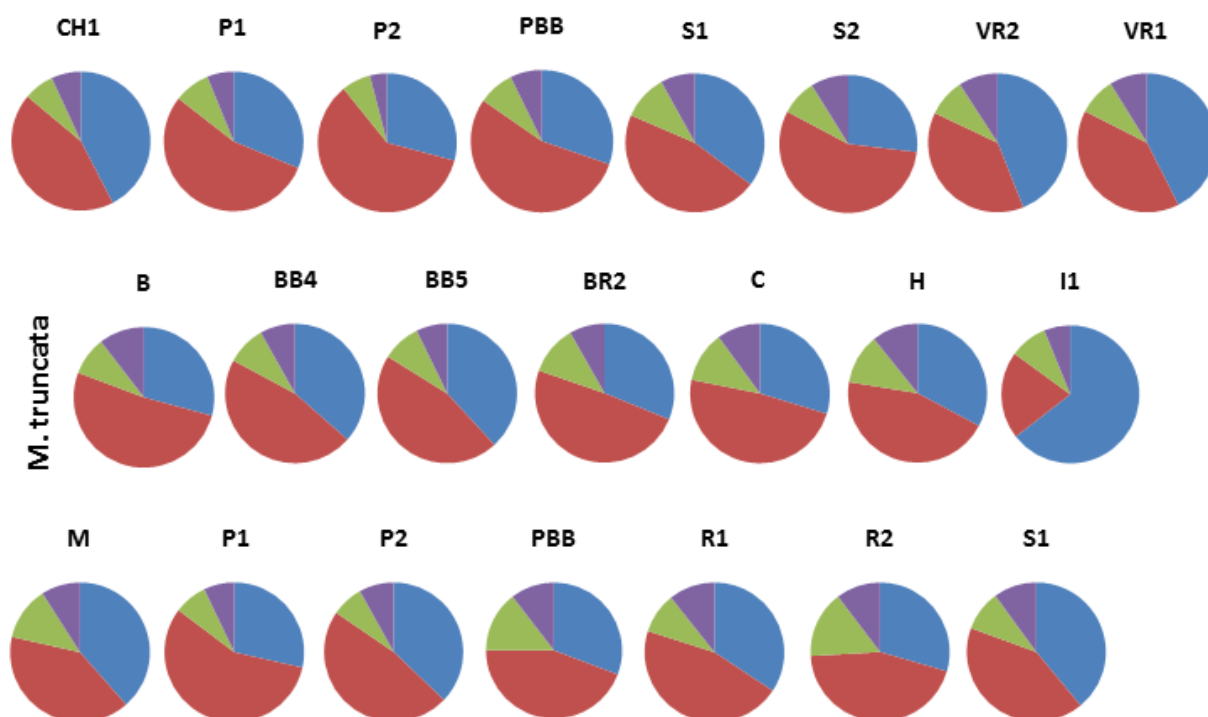


Obr. 15: Vzájemné korelace jednotlivých typů asymetrie po pro jednotlivé buňky. Grafy 15a, 15c, 15e obsahují hodnoty získané po společné PCA všech buněk a jejich transformovaných kopií (dataset 1), 15b, 15d, 15f po PCA jednotlivých buněk a jejich transformovaných kopií (dataset 2). Koeficient determinace a p-hodnota testu jsou uvedeny v horní části grafu.



Obr. 16: Vzájemné korelace jednotlivých typů asymetrie pro populační průměry Grafy 16a, 16c, 15e obsahují hodnoty získané po společné PCA všech buněk a jejich transformovaných kopií (dataset 1), 16b, 16d, 16f po PCA jednotlivých buněk a jejich transformovaných kopií (dataset 2). Koeficient determinace a p-hodnota testu jsou uvedeny ve spodní části grafu.



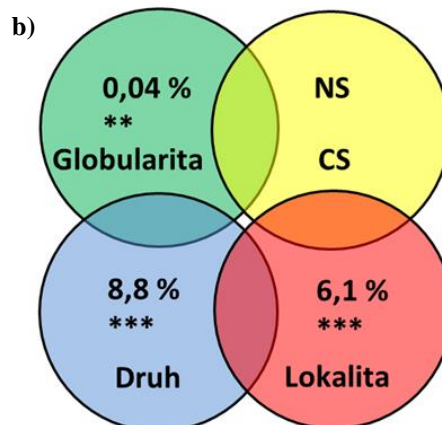
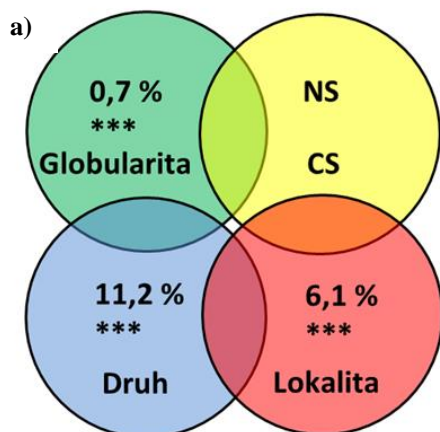


Obr. 17: Koláčové grafy ukazují relativní míru variability pro jednotlivé populace (modrá – symetrická variabilita, červená – horno-dolní variabilita, zelená – levo-pravá variabilita, fialová – transverzální variabilita). Písmena nad grafy značí kód lokality.

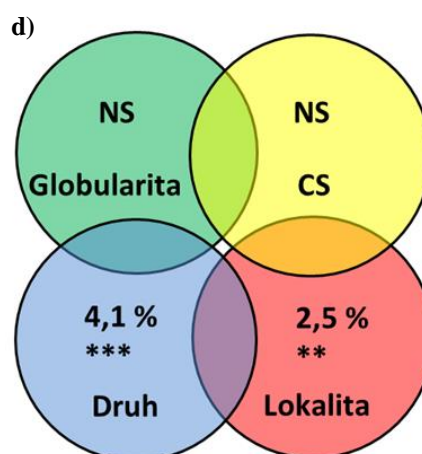
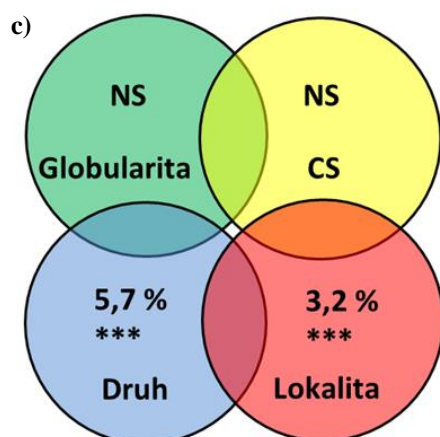
3.3.6. Vliv lokality a druhu na míru asymetrie

Čistý vliv lokality a druhu na míru asymetrie byl testován na absolutních hodnotách pro jedince z obou datasetů pomocí mnohorozměrné analýzy variance (Obr. 18). Do analýzy byly přidány také proměnné globularita (míra komplexity) a centroidová velikost. V případě všech analýz se jako proměnná, která vysvětlila největší podíl variability (po odečtení vlivu ostatních třech proměnných), ukázal být druh. V případě horno-dolní variability šlo o 11,2 % (dataset 1)/8,8 % (dataset 2), v případě levo-pravé variability vysvětlil druh 5,7 % (dataset 1)/4,1 % (dataset 2) a u transverzální 10,1 % (dataset 1)/9,1 % (dataset 2). Vliv lokality byl o něco nižší, ale také významný: 6,1 % v obou modelech popisujících horno-dolní variabilitu, 3,2 % (dataset 1)/ 2,5 % (dataset 2) vysvětlené variability v případě asymetrie levo-pravé a necelá tři procenta v obou případech asymetrie transverzální. Vliv globularity a velikosti byl po odečtení vlivu druhu a globularity malý (nepřesáhl 0,7 % vysvětlené variability), případně přestal být statisticky průkazný. Konkrétní hodnoty asymetrických proporcí jsou uvedeny v Příloze 1.

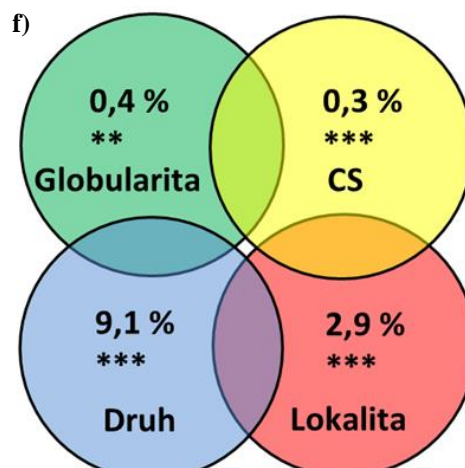
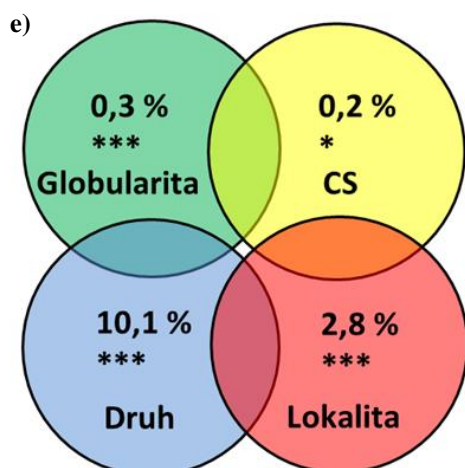
Horno-dolní variabilita



Levo-pravá variabilita



Transverzální variabilita



Obr. 18: Mnohorozměrná analýza variance. Grafy ukazují čistý vliv globularity, velikosti, druhu a lokality na míru jednotlivých typů asymetrie. Grafy 18a, 18c, 18e obsahují hodnoty získané za použití datasetu 1, grafy 18b, 18d, 18f byly získány za použití datasetu 2. Jednotlivé hodnoty představují čistý vliv dané proměnné, tedy vliv zbývající po odstranění vlivu předchozích třech proměnných. Hvezdičky značí hladiny signifikance: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

4. DISKUZE

Krásivka *Micrasterias* je jedním z protistních modelových druhů, na kterém se studují zejména problémy spojené s morfogenezí (např. Kallio & Lehtonen, 1973; Kiermaier, 1981; Meindl, 1993; Holzinger & Lütz-Meindl, 2002). V rámci této diplomové práce bylo celkem analyzováno 71 populací tohoto rodu, které náležely do 13 odlišných druhů. Bylo použito nového geometricko-morfometrického přístupu (Savriama et al., 2010; Savriama & Klingenberg, 2011), který umožňuje rozdělit variabilitu na symetrickou složku (variabilita mezi buňkami) a na jednotlivé komponenty asymetrické variability (variabilita mezi bilaterálně symetrickými segmenty buňky). Míra asymetrické variability byla korelována s komplexitou a velikostí buněk a dále byly testovány mezidruhové rozdíly v míře asymetrie a vliv společného výskytu na lokalitě.

4.1. Dva přístupy k získání absolutních hodnot asymetrie pro jednotlivé buňky

Pro rozklad asymetrie bylo použito dvou nezávislých přístupů. V prvním případě byly hodnoty absolutní asymetrie pro jednotlivé buňky získány po společné Prokrustovské superimpozici originálních konfigurací a konfigurací transformovaných kopií jako suma absolutních hodnot skóru buňky na všech PC osách vysvětlujících daný typ variability, v druhém případě pak jako směrodatné odchylky skóru objektů na PC ose příslušného typu po PCA jednotlivých buněk a jejich symetricky transformovaných kopií. Výsledky obou datových souborů ukazují velmi podobné výsledky, které se mezi sebou liší minimálně (rozdíl v procentech vysvětlené variability se pohybuje v řádu několika jednotek a pouze ve dvou případech přesahuje 10%). Oba způsoby hodnocení dat jsou tedy plně nahraditelné. Všechny studie, ve kterých byl použit rozklad asymetrie pro objekty s komplexní symetrií (Savriama et al., 2010; Savriama & Klingenberg, 2011; Savriama et al. 2012; Neustupa, 2013), použily prvního přístupu, ačkoliv druhý způsob má oproti prvnímu jisté výhody. Například umožňuje navzájem porovnávat datové soubory, které obsahují různé počty studovaných objektů (s rostoucím počtem objektů roste proporce nejdominantnějšího typu variability a relativní hodnoty zastoupení asymetrií v těchto datových souborů se tak stávají neporovnatelné) či objekty s různým počtem landmarků (na kterých nejde provést společná superimpozice). Umožňuje také studovat asymetrie v rámci jedné buňky, což může být užitečné např. při studiu změn proporce typů asymetrie v průběhu ontogeneze.

4.2. Použití semilandmarků při analýze asymetrie u biradiálně symetrických objektů

Pouze u druhu *M. oscitans* bylo použito semilandmarků, tedy landmarků, jejichž pozice není pevná, ale při Prokrustovské superimpozici se může měnit v rámci spojnice sousedních landmarků (Bookstein, 1997). Druh *M. oscitans* byl výjimečný svými vysokými hodnotami transversální asymetrie a výrazně ovlivňoval výsledky týkající se této asymetrie. Savriama et al. (2012) upozorňují, že při analýze asymetrie u objektů s komplexní symetrií mohou být semilandmarky příčinou jistých, blíže nespecifikovaných, potíží. Je tedy možné, že vysoká míra transversální asymetrie u *M. oscitans* je způsobena metodickými artefakty, které nemají reálný biologický základ. Zajímavá je že, zvýšená míra asymetrie byla pozorována pouze u asymetrie transversální. Znamená to tedy, že semilandmarky ovlivňují pouze některé segmenty asymetrie? Použití semilandmarků u bilaterálně symetrických objektů nebylo shledáno problematickým a příčiny potíží při aplikaci na objekty s komplexní symetrií nejsou známy. Problém míry asymetrie u druhu *M. oscitans* a vliv semilandmarků na tuto míru je jistě zajímavý problém, který by zasluhoval další studium.

4.3. Morfologická charakteristika jednotlivých druhů

Vzájemná morfologická podobnost jednotlivých druhů a jejich morfologická plasticita byla popsána pomocí PCA symetrických buněk (Obr. 8 a 9). Pomocí prvních deseti os se podařilo zachytit 99,7 % variability v datech. Trend na první PC ose koresponduje nejvíce s šířkou apikálního laloku a s tím spojeným změlčením zářezů u druhů s širším apikálním lalokem, trend na druhé PC ose pak s hloubkou zářezů jednotlivých laloků při zachování šířky apikálního laloku. Neustupa & Šťastný (2006) se za použití metod landmarkové GM zabývali morfologickou charakteristikou u 14 přírodních populací středoevropských krásivek rodu *Micrasterias*. I přes některé odlišnosti ve zkoumaných druzích (nezařazení druhů *M. oscitans* a *M. semiradiata* a naopak zařazení druhů *M. apiculata*, *M. decemdentata* a *M. radiosa*) byl trend popsán první a druhou PC osou téměř identický. Neustupa & Škaloud (2007) také ukázali stejný mezidruhový trend morfologické variability

4.4. Proporce jednotlivých typů variability

Pro většinu krásivek rodu *Micrasterias* je typická ideálně symetrická stavba buňky (Brook, 1981) a každá odchylka od tohoto symetrického stavu nastává v důsledku působení nejrůznějších faktorů v průběhu ontogeneze. Rozklad tvarové variability ukázal, že mezi všemi populacemi hrála dominantní roli symetrická variabilita (21,8 – 69,8 % vysvětlené variability) a horno-dolní asymetrie (20,5 – 68,9 %), zatímco levo-pravá (3,7 – 15,6 %) a transversální (3 – 14,6 %) asymetrie hrály spíše roli minoritní (Obr. 17). Savriama et al.

(2010) ve své studii zabývající se rozkladem asymetrie u druhu *M. rotata* (zkoumáno 50 buněk) poukázali na dominantní roli asymetrie horno-dolní (62,3 % vysvětlené variability), méně významná pak byla variabilita symetrická (25,8 %) a minoritní roli hrály asymetrie levo-pravá a transverzální (obě přibližně 6 %). Neustupa (2013) se zabýval rozkladem asymetrie u druhu *M. semiradiata* (38 buněk) a dvou variet rodu *M. radians* (31 buněk). Ve všech třech případech se proporce symetrické a horno-dolní variability pohybovala přibližně okolo 40 %, levo-pravá a transverzální asymetrie opět zaujímaly pouze minoritní podíl. Srovnání zastoupení jednotlivých typů variability na základě relativních proporcí je ovšem velmi problematické, jelikož poměry jednotlivých typů variability jsou ovlivněny celou řadou dalších faktorů. Relativní proporce jsou například ovlivněny variabilitou jednotlivých objektů, jelikož zvýšená míra symetrické či libovolného typu asymetrické variability vede ke snížení relativní proporce ostatních typů variability. Důležitý je také počet analyzovaných objektů, jelikož s rostoucím počtem objektů stoupá proporce dominantního typu variability. Dále je třeba mít na zřeteli, že korelace míry levo-pravé a transverzální asymetrie s asymetrií horno-dolní je výrazně nižší než korelace levo-pravé a transverzální asymetrie (Obr. 15 a 16). Může tedy například dojít k tomu, že stejné absolutní hodnoty levo-pravé a transverzální asymetrie budou v případě relativního vyjádření výrazně jiné kvůli zvýšené míře horno-dolní asymetrie v jedné populaci.

V obou výše zmíněných studiích byly zkoumány klonální populace, tedy populace kultivované v laboratorních podmínkách, které vznikly z jedné buňky. Zdá se tedy, že dominantní role horno-dolní asymetrie je u krásivek zcela běžná bez ohledu na to, zda jde o populace klonální či přírodní.

Poměr jednotlivých typů variability je mezi různými populacemi poměrně stabilní, ovšem mezi studovanými populacemi byly nalezeny některé, které vykazovaly výrazněji zvýšenou míru symetrické (*M. papillifera* z odběrového místa BR3 a BR4) či transverzální asymetrie (*M. oscitans* z lokality I1). Vzhledem k tomu, že obě populace *M. papillifera* pocházejí ze stejné lokality, je možné, že zdejší abiotické podmínky vyvolaly zvýšenou míru fenotypické plasticity, která se projevila v rozdílné morfologii jednotlivých buněk. Nápadná je také vysoká míra transverzální asymetrie u druhu *M. oscitans* má oproti ostatním studovaným druhům redukovaný jeden laterální lalok a tak k jeho studiu muselo být použito takzvaných semilandmarků, tj. landmarků, jejichž pozice není pevně dána, ale tyto body mohou klouzat po spojnici sousedních dvou landmarků (Bookstein, 1997). Možné příčiny zvýšené transverzální asymetrie tohoto druhu jsou diskutovány v kapitole 4.2.

4.4.1. Příčiny vysokého podílu horno-dolní asymetrie

Vysoký podíl horno-dolní asymetrie ve srovnání s asymetrií levo-pravou a transverzální je dán jejím odlišným charakterem. Tato asymetrie totiž odráží rozdíl mezi dvěma půlbuňkami, jejichž vývoj je časově oddělen, zatímco levo-pravá a transverzální asymetrie srovnává dva segmenty tvořené oběma půlbuňkami. V případě levo-pravé a transverzální asymetrie hrají pravděpodobně dominantní roli vnitřní ontogenetické faktory, zatímco v případě horno-dolní asymetrie se ještě přidává vliv abiotických podmínek a alometrie na morfologii půlbuněk.

Vliv abiotických faktorů na morfologii a velikost půlbuněk je zřejmý a je diskutován v několika publikacích zabývajících se krásivkami (Neustupa et al., 2008, Černá & Neustupa, 2010). Černá & Neustupa (2010) ukázali, že morfologie buněk je ovlivněna pH, ve kterém se buňky krásivek vyvíjejí, a Neustupa et al. (2008) poukázali na vliv teploty na morfologii buněk. O tom, že se obě půlbuňky vyvíjejí zcela nezávisle na sobě, svědčí i porovnání čtyř kvadrantů buňky v rámci třech klonálních populací druhů rodu *Micrasterias* (Neustupa, 2013). Podobnost dvou kvadrantů tvořících jednu půlbuňku byla vyšší než podobnost kvadrantů z opačné půlbuňky. Mezi kvadranty pocházejícími z opačné půlbuňky ovšem nebyl vyšší rozdíl než mezi kvadranty ze zcela odlišných buněk.

Důležitou roli může hrát i fakt, že mladší půlbuňka ještě nemusí být plně dorostlá. Je známo, že aktuální morfologie krásivky *Micrasterias* je závislá na velikosti půlbuňky a v průběhu ontogeneze se tedy mění (Lacalli, 1975; Meindl, 1993). Růst nové půlbuňky *Micrasterias* nastává díky prodlužování a větvení jejích vnějších částí. Nově vzniklé laloky se také rozšiřují do šířky (Meindl, 1993). Pro morfologický trend na ose, která popisuje nejvíce horno-dolní asymetrie, je typická změna hloubky zářezů a změna šířky laloků mezi půlbuňkami. Tyto tvarové rozdíly odpovídají změně tvaru buňky v průběhu růstu (Lacalli, 1975). Podobný trend jako mezi půlbuňkami je patrný i na první symetrické PC ose, což naznačuje, že symetrická variabilita je dána zejména rozdílem ve velikosti buněk. To potvrzuje i Savriama et al. (2010), kteří ukázali, že tvar buňky *Micrasterias* je silně korelován s její velikostí. Hlavní tvarové trendy spojené s horno-dolní, levo-pravou i transverzální asymetrií se shodují s oběma studiemi (Savriama et al., 2010; Neustupa, 2013), které se popisem asymetrických trendů u krásivky *Micrasterias* zabývaly.

4.4.2. Podíl symetrické složky a asymetrických složek variability

Vysoký význam asymetrických složek tvarové variability byl ukázán i u jiných skupin organismů s vyšším stupněm symetrie. Savriama & Klingenberg (2011) se zabývali studií schráněk polypů a ukázali, že asymetrická složka dosahovala až 96 %. Příčinou takto

vysokého podílu asymetrie je pravděpodobně přisedlý způsob života korálů a s tím spojená vysoká nestabilita abiotických podmínek. Savriama et al. (2012) se zabývali rozkladem variability u biradiálně symetrických květů *Erysimum mediohispanicum* (Brassicaceae). Ukázali, že přibližně polovina tvarové variability mezi květy je dána asymetrickou složkou, z níž nejméně významná byla, stejně jako v této studii, asymetrie transverzální. Autoři tento vysoký podíl asymetrie připisují různým genetickým faktorům a také přisedlému způsobu života.

Existuje mnoho studií, které se zabývají studiem bilaterální asymetrie u mnohobuněčných organismů (např. Klingenberg & Zaklan, 2000; Iriarte et al. 2003; Wilmore et al., 2005) a i tyto studie ukazují vysoký podíl asymetrické složky variability. Jako hlavní zdroj flukтуаční asymetrie jsou u bilaterálně symetrických organismů považovány ontogenetické nepřesnosti (např. Klingenberg, 2003; Dongen, 2006; Babbitt, 2008), které mohou být zesíleny genetickými faktory či environmentálním stresem (Klingenberg & Nijhout, 1999; Roy & Stanton, 1999; Queitsch et al., 2002). U krásivek je význam těchto procesů nezanedbatelný a projevuje se v míře levo-pravé a transverzální asymetrie, ovšem mnohem významnější roli mají mechanismy stojící za velkou fenotypickou plasticitou vzhledem k environmentálním podmínkám (horno-dolní asymetrie).

4.5. Vliv komplexity a velikosti buněk na míru asymetrie

Jednou z hlavních otázek této práce bylo zjistit, zda morfologická komplexita buněk ovlivňuje míru jejich asymetrie. Na základě vstupní hypotézy byla očekávaná pozitivní korelace mezi morfologickou komplexitou buněk a mírou jejich asymetrické variability. Tato hypotéza vychází z pozorování Neustupy (2013), který sledoval vyšší míru symetrické i asymetrické variability u dvou morfologicky komplexnějších druhů rodu *Micrasterias* v porovnání s druhem třetím, morfologicky méně komplexním. Výsledky této diplomové práce nejsou nicméně s výsledky citované studie v souladu (Obr. 11 a 12). Horno-dolní variabilita se zdá být na morfologické komplexitě buněk zcela nezávislá. Levo-pravá a transverzální variabilita byly s komplexitou buněk slabě negativně korelované, což znamená, že čím méně byla buňka komplexní, tím vyšší míru asymetrie vykazovala. Tento trend byl několikrát silnější v případě transverzální asymetrie, ovšem tento výsledek je ovlivněn druhem *M. oscitans*, jehož buňky jsou velmi málo komplexní a vykazují vysokou transverzální asymetrii. Možné příčiny tohoto jevu jsou diskutovány v kapitole 4.2. Po odstranění tohoto druhu z analýzy se výrazně snížila procenta vysvětlené variability přibližně na hodnoty levo-pravé asymetrie a v případě průměrných populačních hodnot pro dataset 1 přestaly být hodnoty signifikantní. Odstranění

druhu *M. oscitans* v případě analýz pro levo-pravou asymetrii nemělo na % vysvětlené variability ani na míru signifikance velký vliv. Zdá se tedy, že evoluce morfologicky komplexních druhů není limitována nepřesnostmi v průběhu ontogeneze, které by se projevíly zvýšenou mírou asymetrie u komplexnějších druhů. Do této studie však nebyly zahrnuty nejkompaktnější druhy *Micrasterias* (např. *M. radiosa*, *M. sol*), jejichž analýza by jistě přinesla další zajímavá data pro srovnávací analýzu.

Regrese velikosti buněk (Obr. 13 a 14) na míru levo-pravé a transverzální asymetrie ukázala silný vztah mezi těmito dvěma proměnnými. Vliv velikosti buněk na míru horno-dolní asymetrie nebyl statisticky signifikantní, ovšem velikost vysvětlila velkou část asymetrie levo-pravé a transverzální. Tento vztah byl ve všech případech negativní a větší buňky tedy byly více asymetrické. Jelikož mezi komplexitou buněk a jejich velikostí existuje silná korelace ($r = -0,63$), je pravděpodobné, že slabě pozitivní korelace komplexity buněk a míry asymetrie je spíše důsledkem negativní korelace velikosti a míry asymetrie.

U protistních organismů obecně platí, že čím větších rozměrů jejich buňky dosahují, tím nižší jsou jejich růstové rychlosti (např. Reynolds, 1984; Chisholm, 1992; Tang, 1995; Kagami & Urabe, 2001). Ačkoliv v této práci nebyly růstové rychlosti měřeny, dá se očekávat, že tento vztah platí i pro krásivku *Micrasterias*. Je tedy možné, že vyšší míra asymetrie u menších buněk je dána kratším časem na utvoření symetrické morfologie a naopak. Tuto domněnku podporují i výsledky studie věnované *M. rotata*, které ukázaly, že morfologická disparita (tedy míra morfologické variability) byla vyšší mezi buňkami rostoucími v 15 - 30°C než mezi buňkami kultivovanými v 10 °C (a tudíž nejpomaleji rostoucími – např. Montagnes et al., 2003, Montagnes & Franklin, 2001) (Neustupa et al., 2008).

Studie porovnávající míru asymetrie u druhu *M. semiradiata* a *M. radians* ukázala vyšší míru symetrické i asymetrické variability (vyjádřené v absolutních hodnotách) pro morfologicky komplexnější druh *M. radians*. V této studii ale byly studovány klonální populace, tedy populace (1) rostoucí v laboratorních podmínkách, které jsou ve srovnání s přírodními populacemi výrazně stabilnější a (2) vznikající z jedné buňky, takže mezi jedinci není genetická variabilita. Je tedy možné, že v přírodních podmínkách působí další ekologické faktory, které míru asymetrie mezi více a méně komplexními druhy vyrovnají. Mezi tyto faktory by mohlo patřit například nízké pH, kolísání teploty či nedostatek živin. Zajímavé by také bylo porovnání absolutních hodnot míry asymetrie mezi přírodními populacemi a klonálními kulturami, jelikož se na základě výše zmíněných předpokladů dá očekávat vyšší míra absolutní asymetrie u přírodních populací.

4.6. Vliv lokality a druhu

Vliv lokality a druhu na míru asymetrie byl testován pomocí neparametrické MANOVy (Obr. 18). Společně s těmito faktory byl také testován vliv komplexity a velikosti buněk. Ve všech případech byl testován čistý vliv této proměnné, tedy efekt po odečtení vlivu ostatních faktorů. Rozdíl v abiotických podmínkách na jednotlivých lokalitách není odražen jejich druhovým složením a lokalita tedy reprezentuje soubor abiotických podmínek na jednotlivých odběrových místech, ačkoliv tyto podmínky nebyly přímo měřeny.

Rozdíly v míře asymetrie vysvětlené pomocí mezidruhové variability byly vždy vyšší než variabilita vysvětlená společným výskytem na lokalitě. Společný výskyt na lokalitě vysvětlila více variability v případě asymetrie horno-dolní (6,1 %) než v případě levo-pravé a transverzální asymetrie (přibližně 3 %). Mezidruhové rozdíly pak vysvětlil přibližně 10 % v případě asymetrie horno-dolní a transverzální (po odstranění druhu *M. oscitans* klesne tato hodnota přibližně na 6 %) a 5 % v případě asymetrie levo-pravé.

Signifikantní vliv lokality i po odečtení vlivu všech ostatních faktorů naznačuje, že společenstva pocházející z jedné lokality vykazovala společné asymetrické trendy. To tedy znamená, že určité abiotické podmínky ovlivňují míru asymetrie specifickým způsobem bez ohledu na druh. Krásivky jsou kvůli jejich specifickým druhovým nárokům považovány za bioindikační druhy (Coesel, 1975; Coesel, 2001; Šťastný, 2009). V určitém prostředí tedy mohou být různé druhy stresovány různě a vykazovat různou míru asymetrie. I přesto se však zdá, že se v rámci linie *Micrasterias* zachovaly určité společné ontogenetické rysy, které se projevují prostřednictvím stejných asymetrických trendů u populací se společným výskytem. Vyšší podíl vysvětlené variability v případě asymetrie horno-dolní, jejíž míra je ovlivněna zejména abiotickými podmínkami, tomu také nasvědčuje.

O vztahu fylogeneze a morfologických trendů u *Micrasterias* se již zmiňuje Neustupa & Škaloud (2007), kteří ukázali, že fylogeneticky příbuznější druhy vykazují podobnější rysy fenotypické plasticity než buňky méně příbuzné. Je tedy možné, že i míra asymetrie je předurčena fylogenetickou strukturou rodu a že odlišná evoluční historie jednotlivých druhů vedla nejen k vytvoření odlišných morfologických znaků, ale i k odlišným rysům morfologické variability (symetrické i asymetrické) v rámci jednotlivých linií.

Vliv mezidruhových rozdílů se nicméně ukázal být vyšší než vliv lokality a plně vysvětlil i vliv velikosti. To tedy znamená, že rozdíl mezi druhy je částečně či úplně ovlivněn rozdíly ve velikosti jednotlivých druhů. Zajímavý je vysoký vliv druhu na míru horno-dolní asymetrie v porovnání s levo-pravou a transverzální asymetrií. Rozptyl hodnot této asymetrie je přibližně třikrát vyšší než v případě ostatních dvou typů a vyšší procenta vysvětlené

variability by tedy mohla být spíše důsledkem nestejného rozptylu dat než vyšším vlivem druhu na míru této asymetrie.

4.6.1. Vliv fylogenetické struktury na míru asymetrie

Škaloud et al. (2011) mapovali míru morfologické komplexity, délku buňky a strukturu ve větvení buněčných laloků u jednotlivých druhů na robustní multigenový fylogenetický strom rodu *Micrasterias*. Ukázalo se, že komplexita není na rozdíl od délky buňky a struktury větvení buněčných laloků nijak podstatněji fylogeneticky korelovaná. Jednotlivé druhy se v průběhu evoluce zřejmě adaptovaly na různé podmínky prostředí, kterým byly vystavované, prostřednictvím změn své komplexity (čemuž nasvědčuje i fakt, že vnitrodruhová míra komplexity je u krásivek faktor velmi proměnlivý, který je závislý na abiotických podmínkách, jako je teplota (Neustupa, 2008) či pH (Černá & Neustupa, 2010)), ovšem tendence k uchování velikosti a struktury větvení buněčných laloků mezi jednotlivými liniemi přetrvala. Společné asymetrické trendy *Micrasterias* na jednotlivých lokalitách naznačují, že i asymetrické tendence by mohly být fylogeneticky korelované. Rozdíly mezi jednotlivými druhy by také mohly souviset s fylogenetickými faktory, ovšem otázkou zůstává, zda jsou příčinou těchto rozdílů vnitřní fylogenetické faktory dané podobnou evoluční tendencí linií obsahujících velké či malými druhy nebo ekologické rozdíly mezi velkými a malými buňkami.

Zdá se, že na míru asymetrie nemá vliv struktura větvení laloků, jelikož druhy *M. papillifera* a *M. jenneri*, které mají laterální laloky větvené až do třetího řádu, se spíše shlukují s druhy menšími, méně větvenými. Zajímavé ovšem je, že druhy *M. denticulata* a *M. thomasiana* vykazují výrazně nižší hodnoty asymetrie než druh *M. jenneri*, který je jejich nejbližším příbuzným. Tyto druhy se ale také výrazně liší v míře komplexity, ačkoliv morfologické trendy u všech třech druhů jsou podobné. Mapování asymetrických trendy na fylogenetický strom rodu *Micrasterias* by jistě bylo zajímavé téma hodné dalšího studia, které by mohlo přinést další informace ohledně evoluce linie *Micrasterias*. Mapování není součástí této práce kvůli chybějícím datům pro referenční skupinu mimo linii *Micrasterias* (tzv. outgroup), která by umožnila zakořenění stromu.

4.7. Otázky vzešlé z této práce

Tato diplomová práce si kladla dvě hlavní otázky: ověřit, zda existuje vztah mezi morfologickou složitostí krásivkových buněk a mírou jejich asymetrie a zda společný výskyt druhů na lokalitě implikuje společné trendy v asymetrii. Na tyto otázky našla odpověď, ovšem vyvolala mnoho dalších otázek. Ty nejzajímavější jsou: (1) Je rozdíl v absolutních

hodnotách asymetrie mezi klonálními populacemi pěstovanými v laboratorních podmínkách a přírodními populacemi? Je mezi těmito populacemi rozdíl v proporcích asymetrie? (2) Jaká je míra asymetrie u morfologicky nejkompexnějších druhů, jako je například *M. radiosa* či *M. sol*? (3) Proč jsou větší buňky méně asymetrické? Je to důsledek fylogenetické korelovanosti znaku či to souvisí s nějakým ekologickým fenoménem či morfogenetickým aspektem? (4) Které abiotické podmínky ovlivňují míru asymetrie? Jakým způsobem ji ovlivňují?

5. ZÁVĚR

- V této diplomové práci bylo použito dvou nezávislých technik rozkladu variability. První přístup již byl použit v různých studiích a je založen na společné PS všech studovaných objektů. Druhý přístup, který byl v této diplomové práci použit, je rozklad variability v rámci čtyř kopií každé jednotlivé buňky. Bylo ukázáno, že oba přístupy poskytují velmi podobné výsledky. Druhý přístup ovšem oproti prvnímu umožňuje porovnávat datové soubory s nesterjým počtem objektů či objekty s různým počtem landmarků. Umožňuje také studovat proporce asymetrie v rámci jedné buňky.
- Podíl symetrické variability a tří typů variability asymetrické je mezi jednotlivými populacemi stabilní. Dominantními typy variability jsou variabilita symetrická a horno-dolní, levo-pravá a transverzální variabilita je spíše minoritního charakteru. Od tohoto stabilního poměru se mohou objevovat vzácné výchyly.
- Korelace absolutních hodnot jednotlivých typů asymetrie je vysoká, zejména pak vztah levo-pravé a transverzální asymetrie. Korelace těchto dvou typů s asymetrií horno-dolní je nižší. Příčinou je odlišný charakter horno-dolní asymetrie, která popisuje rozdíl mezi dvěma půlbuňkami (a odráží tak odlišné abiotické podmínky v době vzniku půbuněk či menší velikost mladší půlbuňky), zatímco levo-pravá a transverzální asymetrie popisuje asymetrie mezi dvěma částmi tvořenými oběma půlbuňkami a odráží tak spíše ontogenetické nepřesnosti.
- Míra levo-pravé a transverzální asymetrie je negativně korelovaná s velikostí buněk a větší buňky tedy vykazují vyšší míru asymetrie. Tento trend ovšem neplatí v případě asymetrie horno-dolní, kde byl prokázán minimální vliv velikosti.
- Míra levo-pravé a transverzální asymetrie je slabě pozitivně korelovaná s morfologickou komplexitou buněk a v případě asymetrie horno-dolní nebyl tento vztah signifikantně prokázán. To tedy znamená, že morfogeneze komplexnějších buněk není doprovázená větší mírou asymetrie a že případná limitace morfologické komplexity buněk není dána ontogenetickými nepřesnostmi.
- Podobné asymetrické trendy, které vykazovaly populace nacházející se na jedné lokalitě (a které tedy byly vystaveny stejným abiotickým podmínkám), naznačují, že v rámci linie *Micrasterias* existují určité společné evolučně konzervované ontogenetické rysy, které se projevují shodnou reakcí jednotlivých druhů na stejné abiotické podmínky.
- Vliv mezidruhových rozdílů se ukázal být také velmi silný a plně vysvětlil i variabilitu danou různou velikostí jednotlivých druhů. Velikost buněk je v rámci linie *Micrasterias* fylogeneticky korelovaný faktor a otázkou tedy zůstává, zda jsou příčinou těchto rozdílů

vnitřní fylogenetické faktory dané podobnou evoluční tendencí linií obsahujících velké či malými druhy nebo ekologické rozdíly mezi velkými a malými buňkami.

6. LITERATURA

- Adams D. C. & Rohlf F. J. (2000): Ecological character displacement in *Plethodon*: Biomechanical Differences Found From a Geometric Morphometric Study. PNAS. 97: 4106-4111.
- Adams D. C. (2004): Character displacement via aggressive interference in Appalachian salamanders. Ecology. 85: 2664-2670.
- Agardh C. A. (1827): Aufzählung einiger in den österreichischen Ländern gefundenen neuen Gattungen und Arten von Algen, nebst ihrer Diagnostik und beigefügten Bemerkungen. Flora 10: 625–646.
- Auffray J. C., Debat V., Alibert P. (1999): Shape asymmetry and developmental stability. V: Chaplain M. A. J., Singh G. D., McLachlan J. C.: On Growth and form: Spatio-temporal Pattern Formation in Biology. Chichester, UK: Wiley, 309-324.
- Babbitt G.A. (2008): How accurate is the phenotype? An analysis of developmental noise in a cotton aphid clone. BMC Developmental Biology 19: 1-9.
- Baylac M., Villemant C., Simbolotti G. (2003): Combining geometric morphometrics with pattern recognition for the investigation of species complex. Biological Journal of the Linnean Society 80: 89-98.
- Bookstein F. L. (1989): Principal warps: Thin-plate splines and the decomposition of deformations. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence 11: 567–58.
- Bookstein F. L. (1997): Morphometric tools for landmark data: Geometry and Biology. Cambridge University Press.
- Brook A. J. (1981): The Biology of desmids. Blackwell, Oxford.
- Coesel P. F. M. (1975): The relevance of desmids in the biological typology and evaluation of fresh waters. Hydrobiological Buletin 9: 93-101.
- Coesel, P. F. M. (1982): Structural characteristics and adaptations of desmid communities. Journal of Ecology 70: 163-177.
- Coesel, P. F. M. (2001): A method for quantifying conservation value in lentic freshwater habitats using desmids as indicator organisms. Biodiversity and Conservation 10: 177-87.
- Coesel, P. F. M. & Meesters, K. J. (2007): Desmids of the lowlands- Mesoteniaceae and Desmidiaceae of the European lowlands. KNNV Publishing, Zeist, The Netherlands.
- Costa C. & Cataudella S. (2007): Relationship between shape and trophic ecology of selected species of Sparids of the Caprolace coastal lagoon (Central Tyrrhenian Sea). Environmental Biology of Fishes 78: 115-123.
- Černá K. & Neustupa J. (2010): The pH-related morphological variations of two acidophilic species of Desmidiaceae (Viridiplantae) isolated from a lowland peat bog, Czech Republic. Aquatic Ecology 44: 409-419.

- Demayo C. G., Torres M. A. J., Olvis P. R., Manlegro N. (2010): Face shape differences in selected indigenous peoples' groups in Mindanao, Philippines. *The Internet Journal of Biological Anthropology* 4.
- Dongen S. V. (2006): Fluctuating asymmetry and developmental instability in evolutionary biology: Past, present and future. *Journal of Evolutionary Biology*. 19:1727-1743.
- Endress P. K. (1999): Symmetry in flowers: diversity and evolution. *International Journal of Plant Sciences* 160: 3-23.
- Frey F. M., Robertson A., Bukoski M. (2007): A method for quantifying rotational symmetry. *New Phytologist* 175: 785–791.
- Gontcharov A. A. & Melkonian M. (2011): A study of conflict between molecular phylogeny and taxonomy in the Desmidiaceae (Streptophyta, Viridiplantae): Analyses of 291 rbcL sequences. *Protist* 162: 253-267.
- Hall B. K. (1994): *Homology: the hierarchical basis of comparative biology*. Academic Press.
- Hammer Ø., Harper D. A. T., Ryan, P. D. (2001): PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaentologia Electronica*4:1-9.
<http://nhm2.uio.no/norlex/past/>
- Harrigittai I. & Pickover C. A. (1992): *Spiral symmetry*. World Scientific.
- Holzinger A. & Lütz-Meindl U. (2002): Kinesin-like proteins are involved in postmitotic nuclear migration of the unicellular green alga *Micrasterias denticulata*. *Cell Biology International Reports* 26: 689-697.
- Chisholm S. W. (1992): What limits phytoplankton growth? *Oceanus* 35: 36-46.
- Imasheva A. G., Bosenko D. V., Bubli O. A. (1990): Variation in morphological traits of *Drosophila melanogaster* (fruit fly) under nutritional stress. *Heredity* 82: 187–192.
- Iriarte P. F., Céspedes W., Santos M. (2003): Quantitative-genetic analysis of wing form and bilateral asymmetry in isochromosomal lines of *Drosophila subobscura* using procrustes methods. *Journal of Genetics* 82: 95-113.
- Kagami M. & Urabe J. (2001) Phytoplankton growth rate as a function of cell size: An experimental test in lake Biwa. *Limnology* 2: 111-117.
- Kallio P. & Lehtonen J. (1973): On the plasmatic template system in *Micrasterias* morphogenesis. *Annales Academiae Scientiarum Fennicae*199: 1-6.
- Kark S. (2001): Shifts in bilateral asymmetry within a distribution range: The case of the chukar partidge. *Evolution* 55: 2088-2096.
- Kendall D. (1977): The diffusion of shape. *Advances in Applied Probability* 9:428-430.

- Kent J. T. & Merdia K. V. (2001): Shape, procrustes tangent projections and bilateral symmetry. *Biometrika* 88: 469-485.
- Kiermaier O. (1981): Cytoplasmic basis of morphogenesis in *Micrasterias*. *Cytomorphogenesis in Plants* 8: 147-189.
- Kimball S., Mattis P. a vývojový tým GIMP (2012): <http://www.gimp.org/>
- Klingenberg C. P. & Nijhout H. F. (1999): Genetics of fluctuating asymmetry: A developmental model of developmental instability. *Evolution* 53: 358-375.
- Klingenberg C. P. & Zaklan S. D. (2000): Morphological integration between developmental compartments in the *Drosophila* wing. *Evolution* 54:1273–1285.
- Klingenberg C. P., Barluenga M., Meyer A. (2002). Shape analysis of symmetric structures: Quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* 56: 1909-1920.
- Klingenberg C. P. (2003): Developmental instability as a research tool: using patterns of fluctuating asymmetry to infer the developmental origins of morphological integration, str.427–442. V Polak M.: *Developmental instability: Causes and consequences*. New York, Oxford University Press.
- Klingenberg C. P. & Monteiro L. R. (2005): Distances and directions in multidimensional shape spaces: Implications for morphometric applications. *Systematic Biology* 54:678–688.
- Krieger W. (1939): *Die Desmidiaceen Europas mit Berücksichtigung der aussereuropäischen Arten*. Band 13. Abteilung 1, Teil 2, Lieferung 1 of Dr. Akademische Verlagsgesellschaft M.B.H., Leipzig
- Kříska B. & Prášil K (1994): *Sběr, preparace a konzervace rostlinného materiálu*. Přírodovědecká fakulta UK.
- Lacalli T. C. (1975): Morphogenesis in *Micrasterias*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 33: 117-126.
- Lens L., van Dongen S., Wilder M. Ch., Brooks T. M., Matthysen E. (1999): Fluctuating asymmetry increases with habitat disturbance in seven bird species of a fragmented afro-tropical forest. *Proceedings: Biological Sciences* 266: 1241-1246.
- Mardia K. V., Bookstein F. L., Moreton I. J. (2000): Statistical assessment of bilateral symmetry of shapes. *Biometrika* 87: 285–300.
- Martindale M. Q. & Henry J. Q. (1998): The development of radial and biradial symmetry: The evolution of bilaterality. *Biometrika* 87: 285-300.
- Meindl U. (1993): *Micrasterias* cells as a model system for research on morphogenesis. *Microbiological Reviews* 57: 415-433.
- Moller A. P., Eriksson M. (1994): Patterns of fluctuating asymmetry in flowers: Implications for sexual selection in plants. *Journal of Evolutionary biology* 7: 97-113.

- Montagnes D. J. S. & Franklin D. J. (2001): Effect of temperature on diatom volume, growth rate, and carbon and nitrogen content: Reconsidering some paradigms. *Limnology and Oceanography* 46: 2008-2018.
- Montagnes D. J. S., Kimmance, S. A., Atkinson, D., (2003): Using Q10: can growth rates increase linearly with temperature? *Aquatic Microbial Ecology* 32, 307–313.
- Nemjová K., Neustupa J., Šťastný J., Škaloud P., Veselá J. (2011): Species concept and morphological differentiation of strains traditionally assigned to *Micrasterias truncata*. *Phycological Research* 59: 208-220.
- Neustupa J. & Šťastný J. (2006): The geometric morphometric study of central european species of the genus *Micrasterias* (*Zygnemophyceae*, *Viridiplantae*). *Preslia* 78: 253-263.
- Neustupa J. & Škaloud P. (2007): Geometric morphometrics and qualitative patterns in the morphological variation of five species of *Micrasterias* (*Zygnemophyceae*, *Viridiplantae*). *Preslia* 79: 401-417.
- Neustupa J., Šťastný J., Hodač J. (2008): Temperature-related phenotypic plasticity in the green microalga *Micrasterias rotata*. *Aquatic Microbial Ecology* 51: 77-86.
- Neustupa J., Škaloud P., Šťastný J. (2010): The Molecular phylogenetic and geometric morphometric evaluation of *Micrasterias crux-melitensis*/*M. radians* species complex. *Journal of Phycology* 46: 703-714.
- Neustupa J., Černá K., Šťastný J. (2011): The effects of aperiodic desiccation on the diversity of benthic desmid assemblages in a lowland peat bog. *Biodiversity and Conservation* 20: 1695-1711.
- Neustupa J. (2013): Patterns of symmetric and asymmetric morphological variation in unicellular green microalgae of the genus *Micrasterias* (Desmidiaceae, Viridiplantae). *Fottea* 13: 53-63
- Oksanen J., Blanchet G. F., Kindt R., Legendre P., O'Hara R. B. (2011): *Vegan: Community ecology package*. R package version 1.17-8. <http://CRAN.R-project.org/package=vega>
- Osserman R. (1978): The isoperimetric inequality. *Bulletin of the American Mathematical Society* 84: 1182-1238.
- Palmer A. R. & Strobeck C. (1986): Fluctuating asymmetry: Measurement, analysis, patterns. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 17: 391-421.
- Potapova M. & Hamilton P.B. (2007): Morphological and ecological variation within the *Achnanthes minutissimum* (Bacillariophyceae) species complex. *Journal of Phycology* 43: 561–575.
- Pretorius E. (2005): Using Geometric Morphometrics to Investigate Wing Dimorphism in Males and Females of Hymenoptera – a Case Study Based on the Genus *Tachysphex* (Sphecidae: Larrinae). *Australian Journal of Entomology*. 44:113-121.

- Queitsch C., Sangster T., Lindquist S. (2002): Hsp90 as a Capacitor of Phenotypic Variation. *Nature* 417: 618–624.
- R Development Core Team (2012): R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria. <http://www.r-project.org/>
- Rasmuson M. (2002): Fluctuating Asymmetry – Indicator of what? *Hereditas* 136: 177-189.
- Reynolds C. S. (1984): *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press.
- Rohlf F. J. (2010). tpsDig, version 2.16 Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook, New York. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Rohlf F. J. (2010): tpsRelw, version 1.49 Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook, New York. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Rohlf F. J. (2012): tpsUtil, version 1.53 Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook, New York. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Rosen J. (1975): *Symmetry Discovered*. – Cambridge University Press, Cambridge.
- Roy, B. A. & Stanton M. L. (1999): Asymmetry of Wild Mustard, *Sinapis arvensis* (Brassicaceae), in Response to Severe Physiological Stresses. *Journal of Evolutionary Biology* 12: 440-449.
- Růžička, J. (1981): *Die Desmidiaceen Mitteleuropas*. Band 1(2). Lieferung. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- Saucède T., Alibert P., Laurin B., David B. (2006): Environmental and Ontogenetic Constrains on Developmental Stability in the Spatangoid Sea Urchin *Echinocardium* (Echinoidea). *Biological Journal of Linnean Society* 88:165–177.
- Savriama Y., Neustupa J., Klingenberg C. P. (2010): Geometric morphometrics of symmetry and allometry in *Micrasterias rotata* (Zygnematophyceae, Viridiplantae). *Nova Hedwigia* 136: 43-54.
- Savriama Y. & Klingenberg C. P. (2011): Beyond Bilateral Symmetry: Geometric Morphometric Methods for any type of Symmetry. *BMC Evolutionary Biology* 11: 280-304.
- Savriama Y., Gómez J. M., Perfectti F., Klingenberg C. P. (2012): Geometric Morphometrics of Corolla Shape: Dissecting Components of Symmetric and Asymmetric Variation in *Erysimum mediohispanicum* (Brassicaceae). *New Phytologist* 196: 945-954.
- Scuilli P.W., Doyle W. J., Kelley C., Siegel P., Siegel M. I. (1979): The Interaction of Stressors in the Induction of Increased Levels of Fluctuating Asymmetry in the Laboratory rat. *American Journal of Physical Anthropology* 50: 279-284.

Škaloud P., Nemjová, K., Veselá, J., Černá, K., Neustupa, J. (2011): A Multilocus Phylogeny of the Desmid Genus *Micrasterias* (Streptophyta): Evidence for the Accelerated Rate of Morphological Evolution in Protists. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61: 933-943.

Šťastný J. (2009): The Desmids of the Swamp Nature Reserve (North Bohemia, Czech Republic) and a Small Neighbouring Bog: Species Composition and Ecological Condition of Both Sites. *Fottea* 9:135-148.

Tang E. P. Y. (1995): The Allometry of Algal Growth Rates. *Journal of Plankton Research*. 17: 1325-1335.

Valentin A., Sévigny J.M., Chanut J. P. (2002): Geometric Morphometrics Reveals Body Shape Differences Between Sympatric Redfish *Sebastes mentella*, *Sebastes fardatus* and their Hybrids in the Gulf of St Lawrence. *Journal of Fish Biology*. 60: 857-875.

Weyl H. (1975): *Symmetry*. Princeton University Press.

Willmore K.E., Zelditch M.L., Young N., Ah-Seng A., Lozanoff S., Hallgrímsson B. (2006): Canalization and Developmental Stability in the Brachyrrhine Mouse. *Journal of Anatomy* 208: 361–372.

Wójcik J. M., Polly P. D., Wójcik A. M., Sikorski M. D. (2007): Epigenetic Variation of the Common Shrew, *Sorex araneus* in Different Habitats. *Russian Journal of Theriology*, 6: 43-49.

Zelditch M. L., Swiderski D. L., Sheets H. D. (2004): *Geometric Morphometrics For Biologists*. Elsevier Academic Press.

Zollikofer C. P. E., León M. S. P. (2002): Visualizing patterns of craniofacial shape variation in *Homo sapiens*. *Proceedings: Biological Sciences* 269: 801-807.

7. PŘÍLOHY

Seznam příloh:

Příloha 1: Relativní proporce symetrické a asymetrické variability u jednotlivých populací

Příloha 2 (CD): Absolutní hodnoty asymetrie pro jednotlivé buňky (dataset 1 a 2), centroidová velikost a komplexita buněk

Příloha 1 (část 1): Proporce symetrické a asymetrické variability u jednotlivých populací

Populace	Symetrická variabilita (%)	Horno-dolní variabilita (%)	Levo-pravá variabilita (%)	Transverzální variabilita (%)
M. americana (Š)	49,290	34,456	9,231	7,023
M. americana (CH1)	27,224	51,117	14,768	6,891
M. brachyptera (B1)	41,269	48,645	5,023	5,063
M. crux-melitensis (BB1)	40,566	47,774	6,961	4,699
M. crux-melitensis (BB2)	35,616	51,846	6,856	5,682
M. crux-melitensis (BR1)	35,106	53,363	5,633	5,898
M. crux-melitensis (BR4)	37,021	48,582	7,109	7,287
M. crux-melitensis (BR3)	37,398	49,562	7,434	5,606
M. crux-melitensis (CH1)	34,346	50,648	7,133	7,873
M. denticulata (PKV)	36,036	46,609	9,346	8,010
M. fimbriata (BR1)	33,196	57,089	4,731	4,984
M. fimbriata (CH1)	46,498	37,444	8,884	7,174
M. fimbriata (CH2)	34,124	47,501	9,973	8,402
M. furcata (Fr)	42,464	32,709	15,490	9,337
M. jenneri (I1)	41,881	39,347	10,367	8,405
M. oscitans (I1)	46,977	31,423	7,000	14,599
M. papillifera (BB2)	36,307	42,544	9,394	11,755
M. papillifera (BB3)	42,416	43,575	7,029	6,980
M. papillifera (F)	31,323	55,363	7,171	6,143
M. papillifera (S1)	25,411	60,485	7,547	6,556
M. papillifera (S2)	32,773	47,074	10,622	9,531
M. papillifera (PO)	42,791	40,130	8,340	8,739
M. papillifera (R2)	30,748	56,999	6,566	5,687
M. papillifera (BB5)	31,035	56,413	6,507	6,046
M. papillifera (PKV)	28,543	55,966	7,761	7,730
M. papillifera (BR4)	69,828	22,127	3,697	4,349
M. papillifera (BR3)	62,212	28,890	4,653	4,245
M. rotata (BB1)	36,341	44,975	10,632	8,053
M. rotata (BB2)	39,907	42,392	9,620	8,081
M. rotata (BB3)	33,361	54,888	5,849	5,901
M. rotata (BB4)	21,795	68,922	4,788	4,495
M. rotata (F)	39,973	48,489	6,351	5,186
M. rotata (P1)	29,463	58,810	5,577	6,150
M. rotata (R1)	25,565	64,470	5,838	4,128
M. rotata (R2)	37,919	53,212	4,790	4,079
M. rotata (R3)	37,733	54,092	4,372	3,803
M. rotata (BB5)	30,840	61,723	4,459	2,978
M. rotata (B)	45,977	44,032	5,039	4,951

Příloha 1 (část 2): Proporce symetrické a asymetrické variability u jednotlivých populací

Populace	Symetrická variabilita (%)	Horno-dolní variabilita (%)	Levo-pravá variabilita (%)	Transverzální variabilita (%)
M. rotata (VR1)	41,270	40,843	10,555	7,331
M. rotata (VR2)	43,648	43,222	7,434	5,696
M. rotata (PKV)	28,768	60,896	5,922	4,414
M. rotata (BR3)	41,043	48,142	5,596	5,218
M. semiradiata (BB4)	32,370	53,132	7,902	6,545
M. semiradiata (BR1)	28,381	60,924	5,290	5,405
M. thomasiiana (BB3)	31,895	53,359	6,463	8,284
M. thomasiiana (BR1)	33,709	50,166	8,163	7,962
M. thomasiiana (F)	34,681	50,616	7,385	7,318
M. thomasiiana (P1)	31,237	54,297	8,301	6,165
M. thomasiiana (P2)	29,141	60,042	6,780	4,036
M. thomasiiana (PBB)	30,288	54,357	8,137	7,218
M. thomasiiana (S1)	35,252	46,210	10,504	8,034
M. thomasiiana (S2)	26,901	55,870	8,370	8,858
M. thomasiiana (BB5)	30,056	60,105	4,968	4,871
M. thomasiiana (B)	29,004	58,771	6,656	5,569
M. thomasiiana (VR1)	42,574	39,920	8,686	8,819
M. thomasiiana (VR2)	43,985	38,075	8,791	9,149
M. thomasiiana (CH1)	42,431	43,642	7,026	6,901
M. truncata (BB4)	36,471	46,356	9,034	8,139
M. truncata (BR2)	31,159	49,129	11,472	8,240
M. truncata (H)	32,796	44,786	11,631	10,787
M. truncata (I1)	64,509	20,505	8,827	6,159
M. truncata (M)	38,512	40,019	12,439	9,030
M. truncata (P1)	28,525	56,766	7,613	7,096
M. truncata (P2)	37,135	47,400	7,381	8,084
M. truncata (C)	29,719	48,432	11,783	10,066
M. truncata (PBB)	30,751	44,326	14,468	10,455
M. truncata (S1)	39,001	41,576	9,396	10,027
M. truncata (R1)	34,290	45,613	9,414	10,683
M. truncata (R2)	29,503	44,557	15,592	10,348
M. truncata (BB5)	38,185	45,660	8,950	7,205
M. truncata (B)	29,226	51,478	8,826	10,469