

Opravný list k diplomové práci:

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, studijní obor: Biologie, Studijní obor:
Protistologie

Diverzita a rozšíření druhového komplexu *Euastrum humerosum/didelta* (Desmidiáles)

Bc. Eva Kupčíková

Školitel: Mgr. Jan Šťastný, Ph.D.

Praha, 2018

Poděkování:

s. 3 Chtěla bych dále poděkovat Heleně Bestové, Pavlovi Škaloudovi a Pavle Urbánkové, za půjčení vzorků, Janu Šťastnému a Katarině Nemjové za půjčení kultur, a Kateřině Trumhové a Tereze Šoljakové za cenné poznámky. Děkuji také za příjemné prostředí...

Abstrakt

s. 4 Použili jsme geometrickou morfometriku a měření rozměrů délky a šířky semicely, isthmu, polárního laloku, tzv. šířky krku a jejich poměrů.

SEM odhalila jeden ...Lineární diskriminační analýza krásivek z literatury odhalila, že je možné částečně odlišit skupiny variet (*E. humerosum* var. *parallelum* a *E. didelta* v linii A; dvě formy *E. didelta* fa val *Piora* a *E. didelta* fa *latior* v linii B; *E. didelta* var. *inermiforme* a *E. humerosum* var. *affine* v linii C).

Abstract

s. 4 We used the geometric morphometrics with the measuring of the length and breadth of the semicell, isthmus, polar lobe, so called breadth of the neck and their ratios.

SEM revealed the one...Linear discriminant analysis of the desmids from literature revealed that is possible to partly discriminate groups of the varieties (*E. humerosum* var. *parallelum* and *E. didelta* in lineage A; two formae *E. didelta* fa val *Piora* and *E. didelta* fa *latior* in lineage B; *E. didelta* var. *inermiforme* and *E. humerosum* var. *affine* in lineage C).

Seznam použitých zkratk

s. 7 trnG^{ucc}

Obsah

s. 9 **5.3 Zařazení krásivek z literatury lineární diskriminační analýzou (LDA) do molekulárních linií druhového komplexu *E. humerosum/didelta***

5.6 Co bychom mohli dál studovat?

1.2 Druhy a druhový koncept

s. 11 Typicky se zohledňuje fylogenetický i morfologický přístup, často s využitím informací z ultrastruktury buňky a moderně i z geometricko-morfometrických dat. Dříve se zohledňoval i biologický přístup křížením různých kmenů řas a tvorbou spor (např. Blackburn & Tyler, 1987). U protist bylo zjištěno, že tvoří trvalá stádia ve vysychajících místech a naopak ve stále vhodných podmínkách tuto schopnost ztrácejí (Corliss & Esser, 1974; Coesel, 1989; Foissner, 1997, 2006).

Molekulární marker trnG intron má unikátní výskyt v plastidu řas (Turmel et al., 2005) a jeho fylogeneze se shoduje s rbcL a cox III (Škaloud et al., 2012a). Proto by mohl trnG intron být vhodným kandidátem i pro barcoding krásivek (Desmidiaceae), i když zatím byly používány především markery rbcL nebo SSU a ITS. Pro barcoding se používají molekulární markery, které jsou přesně a rychle zjištělné (Hall et al., 2010). Molekulární marker ITS (podobně jako trnG intron) je rychle mutující, ale jako rDNA (spolu s SSU, nebo LSU) má několik tisíc kopií a v případě, že nedošlo k homogenizaci úseků (concerted evolution), je třeba jej klonovat (Hillis & Dixon, 1991; Liao, 1999; Hall et al., 2008).

1.3 Krásivky

s. 12 Jejich vysoká morfologická plasticita vedla k popsání více než 4000 druhů, z toho jen 3000 druhů mají krásivky (Desmidiales; Gerrath, 2003).

s. 15 Jak se prokázalo, krásivky...

Při nižším pH...její laloky rovnoměrně rostou. Naopak...

s. 16 ...(v Indomalajské oblasti a severní Austrálii)...

s. 18 **Tab. 1.1** Rozměry u druhového komplexu *Euastrum humerosum/didelta* (upraveno...)

3. Materiál a metody

3.4 Fylogenetické analýzy

s. 24 trnG^{ucc}

Globální alignment byl vytvořen pomocí algoritmu ClustalW v programu MEGA 6 (Thompson et al., 1994; Kumar et al., 2016).

Bylo získáno 426 pozic v alignmentu.

Substituční modely byly vybrány v programu MEGA 7, podle hodnot BIC. Pro trnG marker byl vybrán Tamura-3-parametrový substituční model...

Pro zjištění posteriorních pravděpodobností v nodech stromů byla použita MCMC metoda (Markov chain Monte Carlo metoda, Metropolis et al., 1953; Hastings, 1970), za použití dvou paralelních výpočtů studených řetězců v programu MrBayes v. 3.2.1 x64 (pro trnG intron) a MrBayes v. 3.2.6 x64 (pro SSU intron; Ronquist & Huelsenbeck, 2003; Ronquist et al., 2011). Odlišné programy byly použity kvůli přeinstalování OS Windows a získání nových verzí programu.

Při výpočtech v programu MrBayes byl použit parametr (`lset=2`) pro HKY model a parametry (`lset nst=1 prset statefreqpr=fixed(equal)`) pro JC+ G model (Kimura, 1980; Hasegawa et al., 1984, 1985; brantfaircloth, 2015). Běhy MCMC byly kontrolovány konvergenčními diagnostikami ESS (Estimated Sample Size), a PSRF (Potential Scale Reduction Factor; Gelman & Rubin, 1992). PSRF by měl při konvergování řetězců MCMC dosáhnout 1.0. Dále byla kontrolována směrodatná odchylka, která měla dosáhnout nuly, jakmile řetězce zkonvergovaly.

3.5 Morfologie buněk a kvantitativní metody

s. 25třikrát poly-L-Lysinovým roztokem...

....dvakrát v 100% acetonu...

s. 26 Při výpočtech mezi stejnými typy dat, skóre na relativních warpech, byla použita variance, při kombinaci s měřením byla použita korelace (podobně jako u měřených dat spolu s jejich poměry).

s. 27 **Obr. 3.1** Atributy... Ipl – Isthmus polárního laloku, tvz. šířka krku,

4. Výsledky

4.1 Fylogenetické analýzy

s. 28 Genetická diverzita u trnG intronu ...(viz obr. 4.1; viz složka *alignment* v elektronické příloze).

Určené kmeny jako *E. humerosum* var. *affine* byly narozdíl od ostatních morfotypů jen v jedné linii C spolu se kmeny původně určenými jako *E. humerosum* (*E. humerosum* var. *affine* bylo parafyletické). Na základě tvaru po kultivaci morfotyp *E. didelta* byl polyfyletický (na základě vroubkování bazálního laloku se prakticky vyskytoval ve všech liniích; viz obr. 4.1).

druhý odstavec začínající: „Příbuzné druhy *E. oblongum*, ... – na začátek podkap. 4.1.2

s. 29 Ostatní kmeny z linie A, ...(K14, K15 a K61, z Norska a Švédska; K4, z Portugalska,...

Pro podrobnější zkoumání byly kmeny rozděleny na dva subsety *humerosum* a *didelta* ...

Genetická variabilita byla zkoumána u 18 kmenů.

SSU intron byl uvnitř... variabilní (viz složka *alignment* v elektronické příloze).

s. 31 **Obr. 4.2** Fylogenetické stromy pro SSU intron

4.2 Morfologie buněk

s. 32 Velikosti laterálních laloků byly poměrově menší (u morfotypu *E. didelta*) nebo stejně velké (u morfotypu *E. humerosum*).

s. 33 Kmeny se lišily v zakončení polárního laloku: buď byl lalok i) výrazně rozšířený...

U kmenu E9 měl polární lalok většinou srdčité zakončení a výjimečně i zakončení obloukovité a tak se kmen mohl podobat i morfotypu *E. didelta* (...)

s. 34 U jiných ilustrací a mikrofotografií druhového komplexu centrální pár zobrazen byl (...; přesné citace ilustrací byly uvedeny v kap. 4.2.1; ...).

Tab. 4.1; linie C - u *E. humerosum* byly laloky rozdvojené; u *E. didelta* byly výrazně větší než ostatní laloky; převažovalo distální rozšíření,

4.3 Metrické analýzy a geometrická morfometrika

s. 38 Kmen E12 byl ze všech nejmenší a rozmezí délky u linie C bylo větší než u ostatních linií.

Rozměry polárního laloku v linii C....., a krk byl u morfotypu *E. humerosum* nejužší (viz tab. 8.6, prac. podskupina *affine-humerosum*).

Metrické hodnoty (Pl, Ipl;...)... (bez nich by byla nevysvětlená variabilita 41,25%).

Při porovnání rozmezí hodnot délky semicely morfotypu *Euastrum humerosum* s obvyklými hodnotami poloviční délky buňky (Růžička, 1981; ...

s. 41 Do rozmezí hodnot morfotypu *E. humerosum* var. *affine* (Růžička, 1981) byly zařazeny podle poloviční délky buňky (40-) 50-65 (-70) téměř všechny kmeny, ...

s. 42 **Graf 4.6** Grafy PCA a CVA molekulárních linií s hodnotami měření (rozměrů a poměrů) s biplotem. **A:** graf PCA, **B:** graf CVA....

s. 43 Výsledky pro GM byly bez rozdělení na subsety (v 5 podskupinách: LDA ...

Graf 4.7 - Legenda: hum – morfotyp *E. humerosum* s vroubkováním bazálního laloku, did – morfotyp *E. didelta*; tzv. šířka krku je také uváděna jako Isthmus polárního laloku, Ipl.

s. 44 Druhá PC osa zobrazila 15,54 % z celkové variability, v záporné části měly buňky zářezy hluboké, v kladné části mělké. Třetí PC osa zobrazila 10,62 % z celkové variability, v záporné části měly buňky zářezy mělké, v kladné části zářezy hluboké a relativně delší krk.

Tyto hodnoty platí jak pro tři skupiny (grafy 4.7, 4.8), tak pro skupin pět (viz tab. 8.9).

Rozdělením na dva subsety *humerosum* a *didelta* podle vroubkování bazálního laloku (viz obr. 4.1, tab. 8.11) jsme získali velice dobré rozdělení, v subsetu *humerosum* spolehlivost diskriminace mezi liniemi A a C dosáhla dokonce 100%, v subsetu *didelta* spolehlivost diskriminace dosáhla pouze 97%. Podskupina *humerosum-humerosum* měla rovnější krk a mělké zářezy laloků a podskupina *affine-humerosum* měla výrazný polární lalok s tvarem jako zátka od karafy (viz tab. 8.9 – 8.10). Tvarové preference podskupin v subsetu *didelta* nebyly tak jednoznačné jako v subsetu *humerosum*, jelikož se v PCA podskupiny dosti překrývaly (viz tab. 8.9).

s. 44, první věta v 2. odstavci:

LDA geometricko-morfometrických dat rozlišila linie A a C; B a C z více než 95%, v kombinaci s měřením se rozlišily linie A a B z více než 93 % a A a C dokonce z více než 99% (viz tab. 4.5, grafy 4.6 A,B). Rozdělením skupin na dva základní morfotypy...

s. 44 Kmeny s relativně jednotným tvarem, kde se max. 2 buňky podobaly jiné skupině, byly K1, K15, K23, K27, K28, K32, K62.

s. 46 **Graf 4.9** – ... LibreOffice (dostupného na LibreOffice.org)...

s. 47 Do podskupiny *humerosum-humerosum* (Linie A, tab. 8.13, skupina 2) byli zařazeni zástupci jak podle tvaru (GM dat), tak podle tvaru spolu s poměry (GM+ MP); *E. didelta* (...), *E. humerosum* (Ells, 1998, Fig. 6; Škaloud, 2006, ... v Německu), poslední zástupce *E. humerosum* se zařadil podle tvaru spojeném s měřením i s poměry (GM+ MP). Nicméně zástupce *E. didelta* (West & West, 1905) byl podle záznamů delší než buňky z linie A. Varieta *E. humerosum* var. *parallelum* (Krieger, 1937, Taf. 69, Fig. 9) byla velice podobná buňkám z podskupiny *humerosum-humerosum* a byla zařazená pouze geometrickou morfometrikou (GM), protože byla v literatuře uvedena bez rozměrů.

s. 48 ...*E. didelta* var. *cuneatiforme* (s délkou a šířkou: 97 x 39 μm, Scott & Prescott, 1961).

Ve Francii se pravděpodobně vyskytovala ...André, 2017). Všechny krásivky ze Švýcarska i Francie byly na stejném západním břehu Rýna.

V Čechách byl výskyt *E. didelta* ... (s uvedenými rozměry, délkou a šířkou: 70-140 x ...)...

s. 49 Jednalo se o všechny základní morfotypy bez uvedených rozměrů a ilustrací.

...*E. humerosum* var. *parallelum*....

5. Diskuse

s.51 Jelikož je u krásivek enormní fenotypická plasticita, jak bylo uvedeno ve studiích na téma ekologicky podmíněných tvarových změn (Neustupa et al., 2008; Černá & Neustupa, 2010), a rovněž byla také uvnitř populací, jak uvedl Růžička (1977, 1981), potýkali jsme se s ní i ve výsledcích vevnitř vlastních kmenů pěstovaných z jediné buňky (viz Obr.tab. I-III). V literatuře docházelo k častým záměnám mezi druhy či mezi varietami, především u hraničních forem, které se podobaly oběma či více zaměňovaným druhům (*E. affine*, *E. didelta* a *E. humerosum* a jejich varietám). Použití biologického konceptu křížením jako ve studii od Blackburn & Tyler (1987), nepřicházelo v úvahu, protože pohlavní rozmnožování bylo málokdy zjištěné (Brook, 1981). Přicházelo v úvahu použití fylogenetické analýzy a zjištění diference evolučních linií klasickou morfologií, SEM a doplnění kvantitativními metodami (geometrickou morfometrikou a měřením). V této diplomové práci....

5.1 Fylogenetické analýzy

s. 51 Jelikož použití kombinace molekulárních markerů SSU a rbcL vedlo k popsání polyfyletických rodů (*Cosmarium*, *Euastrum* nebo *Staurastrum*, Gontcharov & Melkonian, 2008), a použití ITS nepřinášelo použitelné výsledky, bylo zapotřebí použít jiné rychle se měnící se

molekulární makrery, aby odhalily diverzitu na druhové úrovni. Použili jsme trnG intron a SSU intron. Studie molekulárního markeru trnG intronu

s. 51 Všechny tři morfotypy (*E. affine*, *E. pinnatum*, *E. oblongum*) si byly velice podobné a lišily se pouze svým latelárním lalokem, a s větší složitostí se zvyšovala i velikost celé buňky (West & West, 1905), u jiných variet *E. pinnatum* nebo *E. oblongum* byla podobnost s *E. affine* mnohem menší, protože se lišily také v polárním laloku.

V budoucnosti by se měla ověřit fylogenetická příbuznost, hlavně mezi *E. humerosum/affine* a *E. pinnatum*, protože jejich buňky si byly velice podobné. U *E. oblongum* pravděpodobně existují infraspecifické linie, jelikož u něho existují dvě rozmezí rozměrů (West & West, 1905; Scott & Prescott, 1945).

Narozdíl od SSU intronu je trnG intron plastidovým markerem s unikátním výskytem (Turmel et al., 2005).

s. 52 Tento marker koreluje se základní tvarovou specifitou, a je pravděpodobně v úzké genetické vazbě s některými odpovědnými geny např. pro tvar krku nebo velikost. Tím, že u chloroplastu dochází málokdy k rekombinaci (Rédei, 2008), budou pravděpodobně ve vazbě všechny plastidové geny, včetně molekulárního markeru rbcL s trnG intronem.

ITS je marker pravděpodobně spojený, že nešly jednodušší sekvenací DNA přečíst (bez klonování markeru ITS).

s. 53 Nicméně podle literatury se vyskytovaly v Severní Americe, a po celé Evropě, a byly pojmenovány jako *E. affine* nebo *E. humerosum* var. *affine*, podobně jako buňky z této podskupiny (viz obr. 4.3;).

5.2 Morfologie buněk

s. 53 U krásivek jsme se potýkali s enormní fenotypickou plasticitou (viz Obr.tab. I-III), i když jsme je pěstovali za stejných podmínek. Přesto se nám je podařilo, alespoň částečně, rozdělit podle tvarových preferencí polárního laloku, podle tvaru krku a rozměrů délky a šířky semicely a šířky krku. Zjistili jsme to tak, že jsme krásivky rozdělili do dvou hlavních morfotypů: *E. humerosum* s vroubkovaným bazálním lalokem; a morfotypu *E. didelta*, s celokrajným bazálním lalokem (viz obr. 4.1; kap. 4.1.1.1)....

Některé buňky v kmenu musely mít smíšené formy, kde každá semicela vypadala jako jiný morfotyp.

Archer (1875) pozoroval konjugaci mezi *E. humerosum* x *E. didelta*. Pravděpodobně šlo o morfologickou plasticitu krásivky s nedovyvinutou buňkou (se vzhledem druhého morfotypu), spíše než, že došlo ke křížení, jak předpokládal původně Archer. Jelikož Ralfs...

s. 53 U některých kmenů z linie A a B s max. 2 buňkami odlišnými od základního tvaru (viz graf 4.9) byly asi recesivní geny nebo zde došlo k morfologické plasticitě z jiných důvodů. Tyto hypotézy by se musely otestovat křížením nebo environmentálními testy ...

s. 54 Linie se lišily nejvíce v polárním laloku, podobně jako krásivky v jiné studii o *Micrasterias crux-melitensis/M. radians* (Neustupa et al., 2010).

Při porovnání mikrofotografií SEM... z frontálního pohledu stejné znaky...

Zda to má souvislost i s jejich totožnými sekvencemi SSU, se možná dozvíme, až bude víc otestovaných druhů *Euastrum*, včetně druhových komplexů obsahující různý počet centrálních pórů (např. *E. crassum*; Šťastný, nepubl.). Vypadá to, že bude asi tento znak, počet centrálních pórů, důležitý podobně jako výskyt bradavic a trnů (Šťastný & Kouwets, 2012, dále viz níže). Výskyt jediného ...

s. 55 Použijeme-li všechny rozměry: délku, šířku, isthmus, polární lalok a jeho isthmus (tzv. šířku krku),...

Základní rozměry buněk (délka a šířka semicely, isthmus) trnG linií korelovaly s molekulárními daty (viz graf 4.1), ale nekorelovaly s údaji z literatury pro střední Evropu (Růžička, 1981, tab. 1.1, 4.3).

s. 56 Zjišťování fyziologických důvodů, proč se lišila především tzv. šířka krku, bylo nad rozsah diplomové práce, ale pravděpodobně to bylo zapříčiněné variantou genu, která byla většinou aktivní a proto se většina kmenů v této skupině nezaměňovala s ostatními skupinami a u některých buněk E9 byly asi funkční i recesivní geny (viz graf 4.9). Příčiny bychom mohli zjistit podrobnějším studiem DNA (např. zjištěním methylace nebo jiných úprav, nezjistitelných sekvencí; či zjištěním transkriptomu genů důležitých pro tvorbu buněčné stěny). Další možností zjištění funkčních genů potřebných pro tvarovou diferenciaci by mohlo být použití knock-outu neboli vyřazení funkčních genů; ale pravděpodobně by to bylo zbytečné, protože bychom výsledky mohli získat za striktních podmínek, neustále při stejné teplotě pro všechny kultury nebo v jejich gradientu v různých kulturách, původně ze stejné buňky a tím i teoreticky se stejnou genetickou informací. Mohlo totiž dojít i k osvětlení slunečním světlem, které rovněž i zahřálo kultury a mohlo tak ovlivnit tepelně aktivovanou morfologickou plasticitu. Mohlo dojít k rychlejšímu růstu buněčné stěny u osvětlenějších kultur a naopak u zastíněnějších docházelo ke stálejšímu tvaru. Je dost možné, že geny ovlivňující vzhled jsou v genetické vazbě, v jádře na různých chromozomech, či v různých částech buňky.

V literatuře se nejčastěji uvádí délka buňky, která..., ale důležitá je také uváděná šířka semicely nebo často opomenuté rozměry polárního laloku nebo jeho isthmus (Isthmu polárního laloku, tzv. šířky krku, viz graf 4.5, 4.6),...

s. 56 Totéž nastalo i u jedné skupiny linií *Micrasterias* (Škaloud et al., 2011).

Rozdělením na dva subsety *humerosum* a *didelta* podle vroubkování bazálního laloku (viz obr. 4.1, tab. 8.11, v příloze), jsme získali ..., ale morfotyp *E. didelta*...

s. 57 Je pravděpodobné, že zde zůstalo ... ovlivňující tvar, z původního druhu,... Proto Archer možná pozoroval mezi dvěma hraničními formami konjugaci, kde se buňky podobaly dvěma různým morfotypům *E. didelta* a *E. humerosum*. Mohly být vlivem...

Z naměřených údajů jsme předpokládali, že krásivky s morfotypem *E. didelta* budou delší, podobně jako v linii A.

...(John & Williamson, 2009)...

Zda-li je *E. didelta* var. *cuneatiforme* nedovyvinutou formou druhového komplexu, musela by se provést fyziologická zkoumání vývoje buněk, po celou dobu jejího dorůstání.

Vyplývá z toho, že z výskytu delších variet než byla linie A (*E. didelta* var. *bengalicum*, *E. didelta* var. *quadriceps*, *E. humerosum*, Wagner, 2014). Je možné, že má linie A...

Díky svým dvěma centrálním pórům předpokládáme, že varieta *E. didelta* var. *bengalicum* patřila do jiného druhu (...). Byly by tyto dvě formy oddělené podobně jako skupiny variet: *M. crux-melitensis*... (Neustupa et al., 2010)...(Šťastný et al., 2013); nebo jako linie komplexu *E. humerosum/didelta* podobné podle GM krásivkám z literatury (viz kap. 5.3).

Díky této schopnosti bylo popsáno u Desmidiáles 3000 druhů (Gerrath, 2003), i když někdy umělých.

5.3 Zařazení krásivek z literatury lineární diskriminační analýzou (LDA) do molekulárních linií druhového komplexu *E. humerosum/didelta*

s. 58 Lineární diskriminační analýzou krásivek z literatury se nám podařilo zjistit, že není výpis druhů jednoznačný, protože docházelo k záměnám. A také i přerozdělení typu *b* z druhu *E. didelta* do *E. humerosum*. Tím se také potlačilo jejich rozměrově odlišné pojetí (délky buňky), protože se jinak naměřené hodnoty s hodnotami z literatury dosti překrývaly. Taktéž tvar polárního laloku byl trochu zavádějící, protože obvyklý jeho tvar u *E. didelta* byl buď rovný nebo vypoulený (podobně jako u *E. humerosum* var. *affine*, ale téměř s neznatelným vroubkováním bazálního laloku) a u *E. humerosum* byl polární lalok velice rozšířený.

Problém představovala fenotypická plasticita, protože by se veškeré tvary musely ověřit v ekofyziologickém výzkumu v gradientu teplot a pH. Tím bychom také potvrdili rozdělení skupin variet

linie A) *E. didelta*, *E. humerosum* var. *parallelum*

linie B) *E. didelta* fa *val Piora*, *E. didelta* fa *latior*

linie C) *E. didelta* var. *inermiforme*, *E. humerosum* var. *affine*.

s. 58 Vyplyvá z toho, že došlo alespoň k částečnému oddělení variet, ale tvoří pouze parafyletické skupiny, oproti *Micrasterias truncata* var. *pusilla*, která byla oddělena i molekulárně (Nemjová et al, 2011).

Některé kmeny se podobaly... (West&West, 1905),....

... Příkládala bych větší váhu ML stromu.

Lineární diskriminační metodu geometricko-morfometrických dat z literatury jsme zjistili shodu se všemi zkoumanými podskupinami. Ikonotypy.... nikoli totožné.

Geograficky je možný střet podle molekulárních dat na severu Evropy, ale podle LDA dat z literatury možná i ve střední Evropě a v Kanadě.

odstavec začínající: „Enormní překrývání rozměrů v literatuře...“

Znovu spojení obou ikonotypů *E. didelta* by možná pak korelovalo s původní délkou buněk druhů *E. didelta* a *E. humerosum* (Ralfs, 1848), jelikož *E. humerosum* měl rozměry podobné linii C.

s. 59 Nicméně se tu jeví pattern, že..... 1.8, kromě těch v Grónsku)...

Po rozdělení *E. didelta* Turpin ex Ralfs připadlo označení *E. humerosum* krásivce s méně dilatovaným polárním lalokem, než bylo u jeho původního popisu a došlo občas k záměně s varietou *E. humerosum* var. *affine*. Ikonotyp *E. affine* Ralfs měl méně dilatovaný lalok než *E. humerosum* Ralfs. Oba ikonotypy *E. affine* Ralfs a *E. humerosum* Ralfs se sice zařadily do stejné podskupiny *affine-humerosum* neboli do linie C, morfotypy *E. humerosum*, ale méně spolehlivě. Podle Wallicha (1860) a Raciborskiho (1885) si byly příbuzné. Podle Ralfse se krásivky *E. humerosum* a *E. affine* lišily nejen tvarem buňky, ale i počtem hrbolků, které byly podle autorů West&West (1905) špatně zakreseleny. Jelikož se kmeny, v podskupině *affine-humerosum*, lišily se nepatrně polárním lalokem od *E. affine* Ralfs, proto byly označeny jako *E. humerosum* var. *affine*. Nedošlo k záměně mezi *E. humerosum* a *E. humerosum* var. *affine* u monografie od Růžičky (1981), přesto je trochu matoucí rozšíření morfotypu *E. humerosum* (podle literatury) s užším polárním lalokem (zřejmě asi *E. didelta*, typ b). V datasetu tedy máme pouze linie podobné (nikoli shodné) původním druhům *E. affine* a *E. didelta* a některým jeho varietám, ale vzhledem k tomu, že jsme netestovali britské krásivky, nevíme do jaké linie patří původní morfotyp *E. humerosum* Ralfs. Buňky podobné *E. humerosum* Ralfs, nevíme zda patří do stejné linie C jako *E. affine*, jak naznačuje LDA GM dat z literatury, nebo zda patří do jiné linie, nebo specifický tvar *E. humerosum* Ralfs byl vlivem morfologické plasticity či vlivem mikroevoluce (v jiné linii). Do jakých linií patří tyto ikonotypy by se muselo ověřit až jejich molekulárním testováním, včetně obou typů *E. didelta*. Bohužel...

s. 59 A jelikož typové variety *E. affine* Ralfs, *E. humerosum* Ralfs ani *E. didelta* Ralfs (typ a,b) se zcela neshodovaly v LDA pouze geometrickou morfometrkou, ale pouze svými rozměry (u *E. didelta* typ *a* i spojením s geometrickou morfometrikou, kde převažoval vliv rozměrů nad GM), byla by potřeba další zkoumání...

Přesto se morfologická plasticita ...2011). Použití ilustrací by sice trochu mohlo pomoci zařadit krásivky do molekulární linie, porovnáním s ilustracemi z obrazové tabule Obr.tab. I-III, popř. molekulárním způsobem se sekvencemi trnG intronu, jakožto použitelným tzv. barcodingem pro krásivky (*Micrasterias fimbriata*; nebo druhový komplex *E. humerosum/didelta*; Hall et al., 2010; Neustupa et al., 2011b).

s. 60 Možným důvodem setkání linií mohlo být, že ...

Nicméně se zdá, ...). Ve střední Evropě a Kanadě došlo ke střetu linií podle LDA GM dat, v Kanadě minimálně u dvou linií A a B (South, 1984), ale podle literárních záznamů možná i s linií C, která se nejvíce podobala *E. affine* Ralfs (Croasdale & Gronblad, 1964). Ve Francii

Pravděpodobně zde neplatí ...Rýn. Je možné, že řeka Rýn pouze omezuje šíření linie C.

...(Corliss & Esser, 1974;...

5.5 Taxonomické shrnutí důležitých znaků evolučních linií druhového komplexu *Euastrum humerosum/didelta*

Linie A (*E. didelta* a *E. humerosum* var. *parallelum*; pracovní skupiny *humerosum-didelta*, *humerosum-humerosum*)

s. 61 Krk býval stejně široký nebo užší než polární lalok. Ostatní kmeny měly vzhled podobající se *E. humerosum* svým vroubkováním bazálního laloku, a tak se linie velice podobala nebo v sobě zahrnovala *E. didelta* typu *a*, nebo *b* (Ralfs, 1848). Krásivka *E. didelta* typu *b* byla označována jako *E. humerosum* (West&West, 1905).

Buňky měly rozměry v 10.-90. percentilu následující (zaokrouhlené na jedno desetinné číslo):...

...27 - 32,3 μm v polárním laloku a 25,1 - 30,8 μm v tzv. šířce krku...

Linie B (*E. didelta* fa *latior* a *E. didelta* fa *val Piora*; pracovní skupina *scandinave*)

s. 61 Buňky měly rozměry v 10.-90. percentilu následující (zaokrouhlené na jedno desetinné číslo):...

... 27,6 – 30,1 μm v polárním laloku a 27,6 – 30,5 μm v tzv. šířce krku...

Linie C (*E. didelta* var. *inermiforme* a *E. humerosum* var. *affine*, pracovní skupiny *affine-didelta* a *affine-humerosum*)

s. 62 Buňky měly rozměry v 10.-90. percentilu následující (zaokrouhlené na jedno desetinné číslo):...

s. 62 ...24,2 – 33,3 μm v polárním laloku a 19,4 – 26,2 μm v tzv. šířce krku...

5.6 Co bychom mohli dál studovat?

s. 62 Další studium by se mohl odvíjet klonováním SSU intronu (popř. ITS), ekofyziologickým zkoumáním v gradientech teploty a pH a mohli bychom zjistit, zda výskyt trnů u některých variet je ovlivněn v přírodě predátory (*E. didelta* var. *denticulatum*) nebo studiem exotičtějších variet morfotypu *E. didelta* (např. *E. didelta* var. *bengalicum*), bychom mohli odhalit nové linie.

Podobné odhalení pseudokryptické diverzity....

Další výzkum by mohl pokročit rychleji při vyhodnocování řas pomocí jasně definovaných a spolehlivých molekulárních markerů pro dané skupiny řas a jeví se zde, že u krásivek (Desmidiaceae) by se mohl použít trnG intron, i když není zcela dokonalým pro použití barcodingu (Hall et al., 2010), aby se používal pro všechny skupiny zelených řas, u kterých se hodí jiné molekulární markery. Navíc by se měly přehodnotit....

Jakmile by se objevila podobná skupina, s rozměry odlišnějšími více než 10 μm , mohlo by se jednat o jiný druh nebo varietu a podobně....

6. Závěr

s. 64 V práci jsme se potýkali enormní fenotypickou plasticitou, protože se formy navzájem dosti překrývaly. Použili jsme polyfázický přístup, morfologie, fylogenetiky a kvantitativních metod (geometrické morfometriky a měření), protože jsem nemohli použít křížení pro zjištění biologického konceptu druhů.

Tato práce nám umožnila vhléd do pseudokryptické diverzity krásivek fylogenetickou analýzou odhalením tří linií v trnG intronu v Evropě. Jelikož SSU intron nebyl homogenní, předpokládáme že linie jsou velice mladé. *Euastrum humerosum* Ralfs var. *affine* Wallich (*E. affine* Ralfs) je parafyletickou skupinou v linii C, nepodařilo se nám ji odlišit na molekulární úrovni.

Podářilo se nám rozdělit...

Některé morfologicky definované poddruhy..., jak jsme zjistili částečně u *E. humerosum* var. *parallelum* patřící do linie A, nebo výskytem dvou forem *E. didelta* fa *latior* a *E. didelta* fa *val* *Piora* patřící do linie B, a nakonec u variet *E. didelta* var. *inermiforme* spolu s *E. humerosum* var. *affine* patřící do linie C. Výskyt jednoho centrálního póru u druhového komplexu *E. humerosum/didelta* naznačuje, že by mohla být varieta se dvěma póry *E. didelta* var. *bengalicum* v jiné linii. Pěstováním ve stejných podmínkách....

trnG^{ucc} intron

Liší se především relativní šířkou krku...

s. 64 Lineární diskriminační analýza geometricko-morfometrických dat z literatury odhalila časté záměny mezi druhy, možnost sjednocení obou typů *E. didelta* Ralfs a hrubé nastínění možné biogeografie, která by se musela otestovat podrobnějšími odběry.

Závěrem, jak definovat druhový koncept krásivek? Pokud jsou taxony rozdělitelné ve více faktorech, pomocí různých způsobů, jsou už jinými druhy. Když jsou molekulárně odlišitelné a jsou odlišitelné buď tvarem (použitím geometrické morfometriky), SEM, markantně svými rozměry nebo ekologií či ultrastrukturou buňky – jsou jinými druhy. Jestliže jsou druhy morfologicky plastické, nevyhneme se použitím více metod, jako v této diplomové práci.

7. Seznam použité literatury

s.67 Gelman, A., Rubin, D.B., 1992. Inference from Iterative Simulation Using Multiple Sequences. - *Statist. Sci.* 7, 457–472.

s.69 Islam, A.N., Irfanullah, H.M., 2006. Hydrobiological studies within the tea gardens at Srimangal, Bangladesh. V. Desmids (*Euastrum*, *Micrasterias*, *Actinotaenium* and *Cosmarium*). - *Bangl. J. Plant Taxon.*13, 1–20.

s. 77 *E. humerosum* var. *parallelum*

s. 81, Tab.8.6:

místo „*affine-affine*“ by mělo být „*affine-humerosum*“

s. 88, Tab. 8.13:

LDA výsledky krásivek z literatury...a jejich poměrů, GM+ P...

Isthmus polárního laloku

s. 90 *E. didelta* var. *inermiforme*

s. 91 *E. humerosum* var. *parallelum*