

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Evoluční biologie



Bc. Daniel Heliodor Mezník

Alometrická diverzita a plasticita buněčných morfologií krásivek
(*Desmidiiales, Zygnematophyceae*)

Allometric diversity and plasticity of cellular morphologies of desmids
(*Desmidiiales, Zygnematophyceae*)

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Jiří Neustupa, CSc.

Praha, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vytvořil samostatně a za použití uvedených zdrojů. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného či stejného akademického titulu.

V Praze dne

Daniel Heliodor Mezník

Poděkování

Rád bych poděkoval především svému školiteli, neboť mi vždy poskytl rady a svůj čas, i když práce se mnou není vždy jednoduchá. Dále jsem vděčný členům algologického a protistologického oddělení za jejich zájem o mou práci a podnětné připomínky, které ovlivnily průběh mé práce. A v neposlední řadě mým přátelům, kteří se vždy dokážou vypořádat s mými záchvaty přehnaných ambicí i hlubokého poraženectví.

Abstrakt

Pokud se proporce dvou znaků organismu během růstu mění, nazýváme jejich vztah alometrickým. První část této práce kvantifikuje alometrický vztah obvodu a obsahu polobuněk jednobuněčných řas z 11 druhů rodu *Euastrum*. Tyto řasy jsou typické svou členitou morfologií, která bývá vysvětlována jako adaptace pro zvýšení buněčného povrchu, skrze který řasy přijímají živiny. Mou otázkou bylo, zda větší jedinci v populaci mají komplexnější tvar, a tím pádem delší obvod polobuňky. Pracoval jsem s mikrofotografiemi desítek dospělých polobuněk získaných ze zafixovaných přírodních populací. U všech zkoumaných druhů jsem zjistil výrazný nárůst komplexity tvaru. Stejný trend jsem pozoroval i na mezidruhové úrovni. Výsledky jsem porovnával s existujícími studiemi na příbuzném rodu *Micrasterias*.

V druhé části práce jsem se zabýval alometrickými vztahy během ontogeneze polobuněk řas z rodů *Euastrum* i *Micrasterias*. Pomocí geometrické morfometrie jsem analyzoval rostoucí klonální kultury. Konkrétně jsem porovnával relativní pozice 11 strukturně homologních landmarků na různě starých polobuňkách. Jednalo se o první obdobný experiment na těchto modelových organismech. Pro každý ze čtyř zahrnutých druhů jsem popsal ontogenetické změny poloh landmarků a z nich následně vytvořil alometrický prostor, který druhy seřadil podle podobnosti jejich ontogenetických změn tvaru. *M. thomasiana* se podle mých výsledků chová výrazně jinak než další tři druhy a stáří buňky vysvětluje pro druhy z rodu *Micrasterias* významnou část tvarové variability. Kvůli nízkému počtu zahrnutých druhů z těchto dat nelze vyvodit více závěrů. Diskutoval jsem však o metodice tohoto pokusu a o možných změnách designu v budoucích experimentech.

Klíčová slova: alometrie, geometrická morfometrie, *Euastrum*, *Micrasterias*, landmarky

Abstract

If the proportions of two features of an organism change during its growth, their relationships can be described as allometry. The first part of this thesis quantifies the allometric relationship of semicellular perimeter and area of 11 species of unicellular microalgae from the genus *Euastrum*. These algae are recognized for their fractal morphology, which is theorized to be an adaptation for increasing their surface area which is used to absorb nutrients. The question was whether larger individuals within a population have a more complex shape and therefore a longer perimeter. I examined microphotographs of tens of semicells obtained from preserved wild populations. All included species exhibited a marked increase in shape complexity. The same trend could be noticed on and interspecific level. I compared these results to existing studies conducted on the related *Micrasterias* lineage.

The second part of this thesis deals with allometric changes during semicells ontogeny in both *Euastrum* and *Micrasterias*. I analyzed growing clonal cultures using geometric morphometry. Specifically, I observed the relative position of 11 structurally homologous landmarks on semicells of different ages. This has been the first experiment of its kind on these model organisms. I described the ontogenetic change in landmark position for all four included species and used these to construct an allometric space, which arranged the species based on the similarity of their ontogenetic shape development. According to my results, *M. thomasi* differs greatly from the other three species, and the age of the semicells explains the majority of shape variance observed in the included *Micrasterias* species. Because of the low number of included species, it is not possible to arrive at any more conclusions based on this data. I however discussed the methods of this experiment and several possible improvements in future attempts.

Keywords: allometry, geometric morphometrics, *Euastrum*, *Micrasterias*, landmarks

Obsah

Obsah.....	6
1 Úvod.....	7
1.1 Cíle práce	7
1.2 Alometrie	7
1.3 Tvar buněk, povrch a objem.....	9
1.4 Morfometrika	10
1.4.1 Principy morfometriky.....	11
1.5 Modelové organismy	12
1.5.1 Proces cytomorfogeneze	14
2 Metody a materiál	15
2.1 Část statické alometrie	15
2.1.1 Sběr buněk a zahrnuté druhy	15
2.1.2 Mikrofotografie a jejich zpracování	16
2.2 Část ontogenetické alometrie	16
2.2.1 Zahrnuté druhy a kultivace.....	16
2.2.2 Mikrofotografie a jejich zpracování	17
3 Výsledky.....	24
3.1 Statická část.....	24
3.1.1 Alometrické trajektorie jednotlivých druhů	24
3.1.2 Statistické hodnoty modelů	28
3.2 Ontogenetická část.....	30
3.2.1 Průměrné pozice landmarků jednotlivých datasetu	30
3.2.2 Tvaroprostory	32
3.2.3 Regresní modely	34
3.2.4 Alometrický prostor.....	38
4 Diskuze.....	39
4.1 Statická část.....	39
4.2 Ontogenetická část.....	41
5 Závěr	44
6 Literatura	45

1 Úvod

1.1 Cíle práce

Tato práce si klade za cíl přinést vzhled do jak evolučního, tak ontogenetického vývoje tvaru jednobuněčných desmidií (krásivek). Předem podotýkám, že se v práci soustředím na ultimátní příčiny a evoluční implikace tvaru krásivek, nikoliv fyziologické procesy vzniku jejich buněčných stěn (ani ty však nejsou zcela objasněné).

V první části práce se zaměřuji na statickou alometrii, tedy variabilitu dospělých jedinců jednoho druhu. Výsledkem této části budou konkrétní hodnoty alometrických trajektorií několika druhů z fylogenetické linie „core“ *Euastrum*. Z výsledků experimentu bude možné extrapolovat závěry o vztahu velikosti a tvaru buněk, a to jak v rámci jednotlivých přírodních populací, tak mezi druhy.

Druhá část práce se zabývá strukturou ontogenetické alometrie. V rámci tohoto experimentu bude možné pozorovat morfologii vznikajících polobuněk v různých stádiích vývoje, a tento proces morfogeneze následně porovnávat mezi zahrnutými druhy. Zahrnutí druhů z dvou příbuzných monofyletických linií (*Micrasterias* a *Euastrum*) umožní interpretaci dat s ohledem na evoluční příbuznost jednotlivých druhů. Jedná se však o experiment, pro který nejsou ustanoveny metody, jeho podstata bude tedy spíše explorativní.

V neposlední řadě bude součástí této práce zasazení experimentů do širšího evolučního kontextu. Jsou alometrické trajektorie evolučně konzervovaným znakem? Reflektuje proces růstu polobuněk evoluční historii linií?

1.2 Alometrie

Slovem „alometrie“ označujeme vztah dvou veličin, které se mění nestejnou rychlostí (Thompson, 1942). Dobře představitelným příkladem může být vztah délky těla a velikosti hlavy dětí – novorozenci mají poměrně větší hlavu než batolata, neboť lebka roste jinou rychlostí než kosti končetin. Koncept alometrie lze pozorovat nejen na morfologických znacích, jako tomu je v této práci, ale také další biologických jevech, třeba vztahu rychlosti metabolismu a velikosti těla organismu.

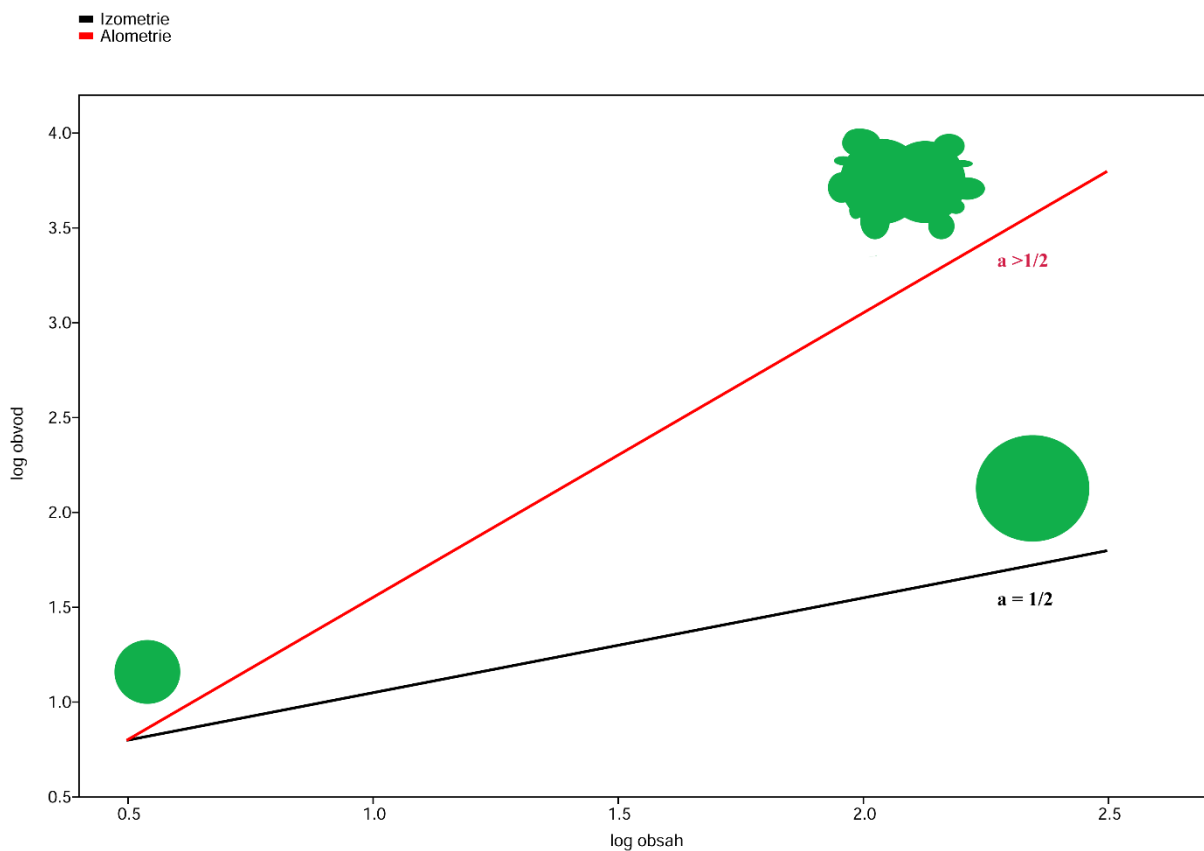
Alometrické vztahy lze popsat tzv. *power law* rovnicí,

$$y = kx^a$$

kde pro morfologické znaky zkoumané pouze v jedné dimenzi zastupuje y velikost zkoumaného orgánu, x představuje velikost celého těla, k je poměr dané ho orgánu ku velikosti těla za předpokladu, že $x = 1$ (Huxley, 1932). Rovnici lze po logaritmické transformaci vyjádřit jako

$$\log y = a \log x + \log k$$

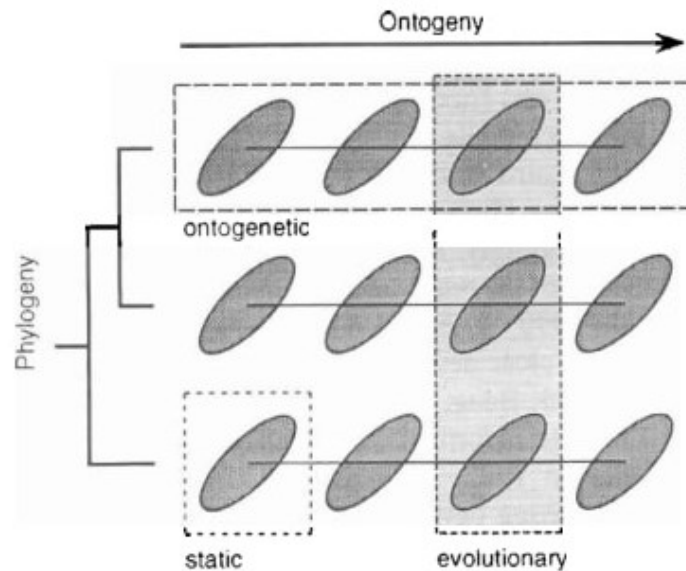
Exponent a (takzvaný škálovací exponent) je pro nás nejzajímavější, protože popisuje, jakou relativní rychlostí orgán oproti tělu roste. Pokud se bavíme o zmíněném poměru délky hlavy a těla dětí, byl by exponent a nižší než 1, neboť hlava roste „pomaleji“ než tělo. Když se $a = 1$, roste orgán stejně rychle jako zbytek těla, a hovoříme o tzv. izometrii (Obrázek 1) (Huxley & Teissier, 1936).



Obrázek 1: Logaritmicky transformovaný graf alometrických trajektorií dvoudimenzionálních projekcí fiktivních buněk. Tento příklad ilustruje, že buňka, která během růstu nemění tvar, roste izometricky. Škálovací exponent vztahu obvodu a obsahu $a = 1/2$. Oproti tomu buňka, která během růstu tvoří zářezy či laloky zvětšuje svůj relativní povrch, proto zde $a > 1/2$. Druhý vztah je alometrický.

Pokud se chceme pohybovat i ve vyšších dimenzích a za veličinu y dosadíme povrch či obsah, izometrie nebude definovaná $a = 1$, nýbrž $a = 1/2$. Při dosažení objemu by se izometrický exponent dál snižoval, konkrétně na $a = 1/3$.

Podle zkoumaných organismů a kontextu studovaných datasetů můžeme mluvit o třech typech alometrických vztahů. Statická alometrie porovnává jedince jednoho druhu ve stejné vývojové fázi. Ontogenetická alometrie také porovnává jedince jednoho druhu, avšak v různých vývojových fázích. Evoluční alometrie proti sobě staví jedince různých fylogenetických linií v odpovídajících vývojových stádiích (Obrázek 2) (Klingenberg, 1996).



Obrázek 2: Ilustrace zobrazující vztahy organismů, které by byly zahrnuty v daných alometrických vztazích (Klingenberg, 1996).

V této práci se budu pohybovat na úrovni statické a ontogenetické alometrie.

1.3 Tvar buněk, povrch a objem

První část mé práce se zabývá alometrickým vztahem tvaru polobuněk (zastoupeného obvodem) a jejich velikosti (zastoupené obsahem). Protože jde o jednu jednorozměrnou a jednu dvourozměrnou veličinu, izometrický předpoklad, a tedy nulová hypotéza, je $a = 1/2$.

Tvar organismu je typicky jeho definující vlastností, může reflektovat jeho evoluční i ontogenetickou historii či fitness – například skrze asymetrii či malformace (van Valen, 1962). Tvar také do určité míry odpovídá povrchu těla, tedy ploše, skrze kterou organismus komunikuje s okolím. Pro jednobuněčné krásivky, kterými se tato práce zabývá, představuje povrch jedné buňky veškeré rozmezí mezi organismem a prostředím a probíhá skrze něj či na něm mnoho fyziologických funkcí, jako například látková výměna. V různých situacích jsou výhodné různě velké povrchy – například v oligotrofním prostředí bude mít výhodu buňka s větším povrchem, skrze který bude moci přijímat limitující živiny. Tvar buňky tím pádem výrazně ovlivňuje její schopnost kompetice (Grover, 1989).

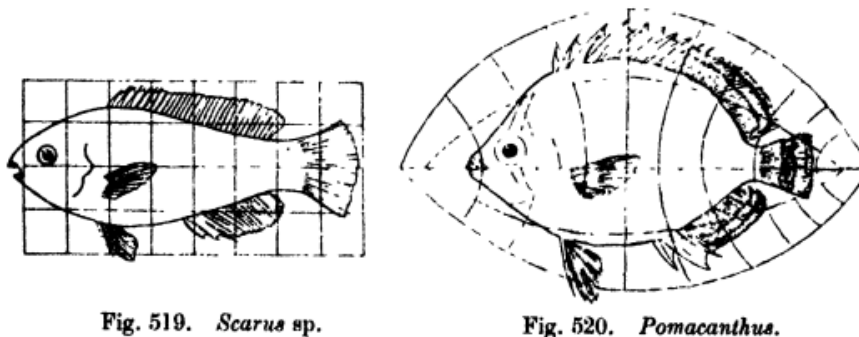
Jak je zmíněno výše, při konstantním tvaru a izometrii neroste povrch lineárně s velikostí buňky. To znamená, že větší buňky mají na jednotku objemu méně povrchu, který mohou využít na pokrytí nutričních a dalších potřeb této biomasy (Gould, 1966). Jordan Okie ve své publikaci detailně popsal způsoby, kterými mohou organismy tento jev kompenzovat (Okie, 2013). Čtyři základní strategie jsou zvyšování komplexity povrchu, změna tvaru na méně podobný kouli (která má, jak známo, nejmenší poměr povrchu ku objemu ze všech těles), redukce biologicky aktivního objemu skrze tvorbu dutých prostor, a internalizace metabolizujících povrchů, jako jsou například endosymbiotické organely.

První část této práce navazuje na dřívější publikace, které si všímají zvětšujících se povrchů jednobuněčných řas s jejich rostoucí velikostí (Lewis, 1976; Neustupa, 2016).

1.4 Morfometrika

Blackith a Reyment (Blackith & Reyment, 1971) hledají původ této disciplíny v pravěkých pokusech o zachycení světa skrze nástěnné malby. Mezi průkopníky morfometrie řadí filozofy, matematiky a umělce jako Pythagora, Albrechta Dürera či Leonarda da Vinciho, nicméně pro účely mé práce se zaměřím spíše na moderní pojetí morfometrie a především její praktické implikace.

Morfometrika je vědecká disciplína, jejíž cíl je měřit a kvantifikovat formy organismů (Blackith & Reyment, 1971). Podle jiné definice nejsou objektem zkoumání samotné formy, nýbrž jejich asociace, vztahy a následky (F. L. Bookstein, 1991). Jinak řečeno, jedná se o přístup, který porovnává rozdíly mezi jedinci. Klasicky lze rozdíly mezi jednotlivými organismy zobrazit například pomocí mřížky relativních souřadnic, sestavené podle jednoho exempláře, která je následně deformována tak, aby odpovídala exempláři druhému (Obrázek 3).



Obrázek 3: Rozdíl v morfologii ryb rodů *Scarus* a *Pomacanthus* lze zobrazit pomocí deformace několika os (Thompson, 1942).

1.4.1 Principy morfometrie

Fred Bookstein, kterého lze považovat za otce současných morfometrických metod, ve své učebnici (F. L. Bookstein, 1991) předkládá čtyři principy, se kterými je třeba během morfometrické práce počítat.

Na podobném systému jako výše zmíněná mřížka založen princip landmarků. Jedná se o lokace, o kterých předpokládáme, že jsou mezi organismy homologní (Rohlf & Slice, 1990). Každému landmarku je přiřazen název (například „kořen nosu“ nebo „špička prstu“), tedy logický popis jeho relativní pozice společný pro všechny organismy zařazené do studie. Každý landmark má zároveň konkrétní souřadnice. Následně sledujeme, jak se mění jejich relativní pozice, ať už na statické, ontogenetické, či evoluční úrovni (Esquerré et al., 2017; Gerber et al., 2008; Neustupa, 2016).

Druhým principem jsou „*shape coordinates*“. Jedná se o vektory, které popisují konfiguraci landmarků. Vektory jsou nezávislé na velikosti objektu, čehož může být docíleno tím, že pozice landmarku je popsána ve vztahu ke dvěma landmarkům, které jsou fixovány na souřadnicích (0,0) a (0,1) v teoretické rovině. Všechny landmarky jsou tedy vztaženy ke dvěma pevným bodům, čímž je relativizována jak velikost objektů, tak jejich rotace a pozice.

Zatřetí se Bookstein věnuje formě otázek, které chceme skrze morfometriku zodpovědět. Tvrdí, že skrze multivariační analýzu „*shape coordinates*“ můžeme nalézt odpověď na téměř jakoukoliv otázku týkající se forem organismů, včetně predikcí mimo naše pozorování. Můžeme se ptát například na vliv věku a růstu na formu, korelaci mezi tvarem a nemorfologickými znaky (například fitness či ekologií) či rozřazení objektů do skupin.

Poslední Booksteinův princip se zabývá formou odpovědí, které nám morfometrika může poskytnout. Místo numerického výstupu typického pro jiné metody je vhodnější data zobrazit geometrickými diagramy či modely pozorovaného objektu. Příklady grafického zobrazení morfometrických dat jsou k vidění v sekci Výsledky.

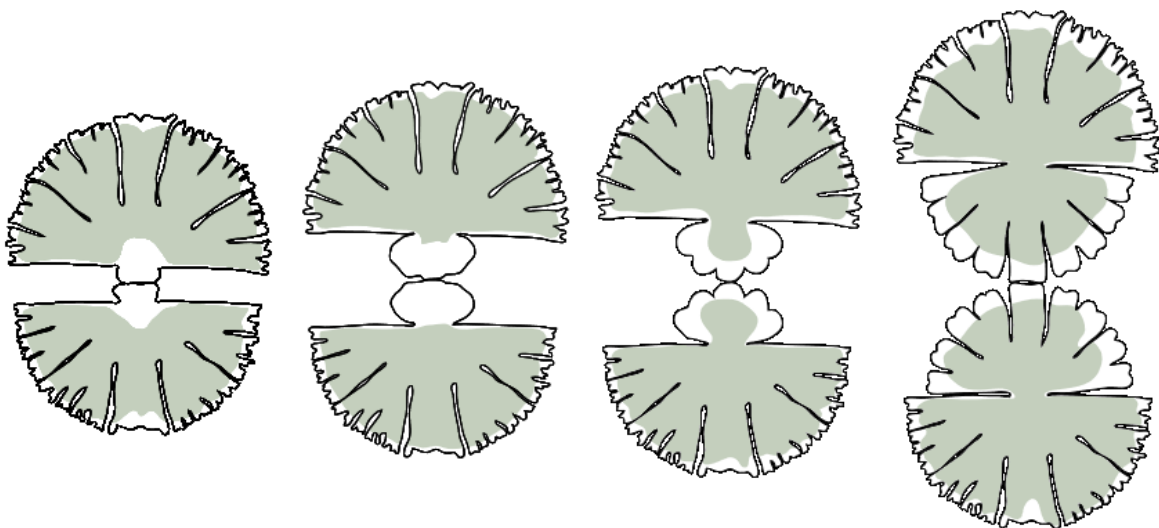
Specifickou formou morfometrické analýzy je tvorba alometrického prostoru. Jedná se o mnohorozměrný prostor založený na alometrických koeficientech pro jednotlivé taxony (Gerber et al., 2008). Každý taxon je charakterizován vektorem popisujícím jeho alometrický ontogenetický vývoj, který je získán z analýzy hlavních komponent jeho morfometrických pozorování. Z koeficientů této analýzy je následně tvořen alometrický prostor. Jeden bod v tomto prostoru tedy odpovídá celému vektoru ontogenetické změny, nikoliv jednomu pozorování tvaru, jako tomu bývá u jiných morfometrických analýz.

V současné době je morfometrika rozšířená především v zoologii, antropologii a příbuzných oborech. Nachází uplatnění při studiu kosterních pozůstatků zvířat (Brusatte et al., 2012) i lidí (F. Bookstein et al., 1999), kdy pomáhá při rekonstrukci průběhu evoluce. Velmi zajímavé je využití morfometrického přístupu v neurologii. Díky rozšíření magnetické rezonance existuje mnoho dat, na kterých lze sledovat například proměny tvaru mozku během průběhu psychiatrických onemocnění či v následku jeho poranění (Klein et al., 2017; Mazaharally et al., 2022).

Ve své práci využívám landmarků k popsání ontogenetických změn tvaru polobuněk krásivek. Trajektorie těchto landmarků pro jednotlivé druhy pak používám ke konstrukci alometrického prostoru, který ukazuje, jak podobně se druhy během růstu chovají.

1.5 Modelové organismy

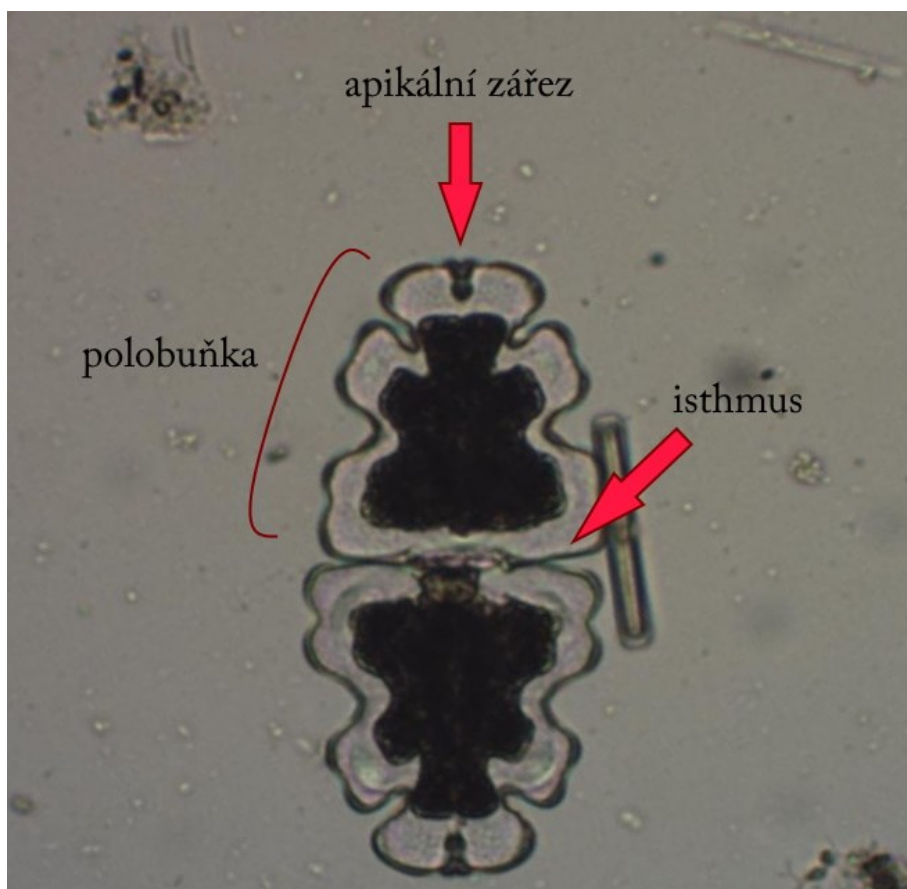
Ve své práci se zabývám několika druhy řas rodů *Micrasterias* a *Euastrum*. Všechny náleží do čeledi *Desmidiaceae* (krásivky), které se širěji řadí do řádu *Desmidiales* a třídy *Zygnematophyceae*. Jedná se o autotrofní zelené řasy relativně blízce příbuzné suchozemským rostlinám. Krásivky jsou typicky jednobuněčné, sestávají se ze dvou identických polobuněk, které se během nepohlavního dělení oddělí a následně dorostou – každý jedinec má tedy jednu starší a jednu mladší polobuňku (Obrázek 4). Průběhem tohoto růstu se zabývám ve druhé části práce. Přechod mezi polobuňkami tvoří zúženina, isthmus (Obrázek 5), ve které sídlí polyploidní jádro (Brook, 1981).



Obrázek 4: : Ilustrace zobrazující nepohlavní dělení buňky rodu *Micrasterias*. Rostoucí polobuňka během svého růstu výrazně mění morfologii (Brook, 1981).

Krásivky jsou schopné i pohlavního rozmnožování, takzvaného spájení, které dalo název celé třídě (česky spájivky). Jde o komplexní proces, který u řádu *Desmidiiales* nenastává často. Druhy mohou být hetero- i homothalické, jejich systém pohlaví zahrnuje několik takzvaných „mating types“, přičemž bylo pozorováno, že na přírodních lokalitách se kompatibilní „mating types“ vyskytují zřídka (Blackburn & Tyler, 1981; Brook, 1981).

Díky své fenotypové variabilitě byly druhy krásivek typicky určovány morfologicky, avšak současné molekulární poznatky tento systém zejména na úrovni tradičně definovaných rodů v řadě případů nepotvrdily (Gontcharov & Melkonian, 2011). Například rod *Euastrum* se zdá být polyfyletickým a molekulární analýza jej rozděluje na dva clady, do kterých navíc spadají druhy dříve považované za nepříbuzné. Současná systematika tyto poznatky zatím nereflektuje, pro svůj experiment jsem však vybíral pouze ty druhy euaster, které patří do monofyletické linie tzv. „core“ *Euastrum* (Gontcharov & Melkonian, 2011). Do této skupiny spadají druhy, jejichž buňky jsou větší a disponují apikálním zářezem (Obrázek 5). Rod *Micrasterias* se podle této studie nadále jeví být monofyletický (Škaloud et al., 2011).



Obrázek 5: Typické morfologické znaky desmidiálních buněk ilustrované na buňce *E. oblongum*.

Za druhově nejbohatší přírodní biotopy krásivek jsou považovány oligotrofní až dystrofní sladkovodní stanoviště, typicky rašeliniště, ve kterých tyto mikrořasy žijí benticky či epifytně. V úživnějších vodách je popsána snížená diverzita, menší druhy, a spíše planktonní výskyt (Brook, 1981; Coesel & Meesters, 2007). Většina druhů preferuje stojatou vodu a řada z nich je citlivá na environmentální stresy jako acidifikace, eutrofizace či vysychání, což z nich činí užitečné bioindikátory ekologicky stabilních habitatů (Coesel, 1982; Neustupa et al., 2011). Produkují sliz, který chrání proti klesání, umožňuje jim pohyb a obaluje buňky při pohlavním rozmnožování (Ruttner, 1953).

Pro mnou zkoumané rody jsou typické krásné, symetrické a složité tvary sestávající se z jednotlivých laloků a zářezů. Díky nim, a také díky relativně snadné izolaci a následné kultivaci klonálních populací, jsou velmi vhodným modelem pro výzkum buněčného tvaru a jeho vývoje (Neustupa, 2016).

1.5.1 Proces cytomorfogeneze

Při nepohlavním rozmnožování krásivek vzniká mezi polobuňkami nejprve septum, tenká a křehká struktura z pektinů, ze které vznikne primární buněčná stěna polobuňky. Po kompletním oddělení cytoplasmy zde začnou být deponovány strukturní polysacharidy buněčné stěny. Zářezy následně vznikají v oblastech, kde růst kontrolovaně přestane (Lütz-Meindl & Brosch-Salomon, 2000; Meindl, 1993). Naopak rostoucí laloky jsou asociovány s lokálně zvýšenou koncentrací vápníku. Přesný mechanismus znám není, je však pravděpodobné, že cytomorfogeneze krásivek úzce souvisí s pozicí a aktivitou vápníkových kanálů, podobně jako apikální růst pylových láček či kořenových vlásků (Hepler & Winship, 2010; Meindl, 1982).

2 Metody a materiál

2.1 Část statické alometrie

2.1.1 Sběr buněk a zahrnuté druhy

V první části práce jsem pracoval s 11 druhy spadajícími do cladu „core“ *Euastrum*. Vzorky byly vyždímány z fyto-bentosu či nabrány ze dna daného stanoviště (Tabulka 1) a následně fixovány Lugolovým roztokem.

Druh	n	Lokalita	Datum odb.
<i>E. ansatum</i>	58	Starý rybník, Krušné hory, Česká republika	04/2018
<i>E. ampullaceum</i>	51	Marais du Cla, Akvitánie, Francie	03/2011
<i>E. crassum</i>	20	Jämtland, Švédsko	08/2015
<i>E. cuneatum</i>	57	Sällsjöfjället, Jämtland. Švédsko	08/2017
<i>E. humerosum</i>	53	Starý rybník, Krušné hory, Česká republika	04/2018
<i>E. insigne</i>	51	Vorarlberg, Rakousko	07/2019
<i>E. intermedium</i>	57	Vorarlberg, Rakousko	07/2019
<i>E. oblongum</i>	58	rašeliniště Březina, Česká republika	08/2018
<i>E. pinnatum</i>	38	Jämtland, Švédsko	08/2017
<i>E. ansatum var. rhomboidale</i>	64	Rakousko	09/2015
<i>E. sinuosum</i>	39	Kothüttensee, Steiermark, Rakousko	07/2015

Tabulka 1: Seznam druhů zahrnutých v analýze statické alometrie, oblastí a dat jejich odběrů. n = počet zpracovaných buněk.

Druh	Typ stanoviště	pH
<i>E. ansatum</i>	rašelinný litorál rybníka	5,7
<i>E. ampullaceum</i>	minerotrofní rašelinná tůň	5,2
<i>E. crassum</i>	rašelinný litorál jezera	5,5
<i>E. cuneatum</i>	horská rašelinná tůň	4,8
<i>E. humerosum</i>	rašelinný litorál rybníka	5,7
<i>E. insigne</i>	rašelinný litorál horské minerotrofní tůně	5,3
<i>E. intermedium</i>	rašelinný litorál horské minerotrofní tůně	5,5
<i>E. oblongum</i>	rašeliniště	5,8
<i>E. pinnatum</i>	rašelinný litorál jezera	5,4
<i>E. ansatum var. rhomboidale</i>	minerotrofní rašeliniště	5,3
<i>E. sinuosum</i>	rašelinný litorál jezera	5,8

Tabulka 2: Seznam lokalit odběrů a naměřeného pH stanovišť.

Dohromady jsem získal a pracoval s 526 polobuňkami.

2.1.2 Mikrofotografie a jejich zpracování

Fixované vzorky jsem pozoroval mikroskopem Olympus BX51 při 200× zvětšení. Pomocí kamery Bresser a asociovaného softwaru MicroCamLab jsem pořídil mikrofotografie dospělých buněk euaster. Zaměřoval jsem se na vitální, tedy také morfologicky nedeformované jedince. Počet pořízených mikrofotografií se odvíjel od abundance kýženého druhu ve vzorku. Za základní morfologickou jednotku jsem považoval polobuňky, ne celé jedince, a to z důvodu jejich oddělené morfogeneze, kdy na finální tvar každé polobuňky mohou působit odlišné vlivy.

Mikrofotografie jsem v grafickém programu paint.NET rotoval tak, aby byl isthmus vodorovný a zkoumaná polobuňka orientovaná apikálním zářezem nahoru. V programu TpsDig2, ver. 2.31, (Rohlf, 2015) jsem u každé polobuňky definoval její obvod 150 rovnoměrně umístěnými semilandmarky (Gunz & Mitteroecker, 2013).

Ze souřadnic semilandmarků byl v programu R vypočítán obvod a obsah polobuněk. Obvod byl vypočítán jako délka spojnice semilandmarků, obsah pomocí funkce *polyarea*. Tyto výpočty byly prováděny v pixelech, následně jsem je převedl na mikrometry pomocí předem získaného měřítka.

V programu PAST, ver. 4.03 (Hammer et al., 2001), jsem posléze provedl lineární RMA regresi logaritmovaného obvodu ku logaritmovanému obsahu, neboť proměnné x i y jsou měřeny s chybou (Warton et al., 2006).

2.2 Část ontogenetické alometrie

2.2.1 Zahrnuté druhy a kultivace

V této části práce jsem pracoval s 3 druhy rodu *Micrasterias* a jedním druhem rodu *Euastrum*. Z přírodních vzorků byly skleněnou pipetou izolovány jednotlivé buňky, které byly nadále kultivovány v modifikovaném DY IV médiu (Neustupa, 2016).

<i>M. thomasiana</i>	50.5214303N, 13.2085025E, pH: 5.5
<i>M. radians</i>	SVCK 389
<i>M. compereana</i>	K 608
<i>E. humerosum</i>	K 502

Tabulka 3: Druhy zahrnuté v ontogenetické části studie a jejich původ.

V případě *E. humerosum*, *M. radians* a *M. compereana* jsem do média přeočkoval již existující kultury (Tabulka 3).

Médium bylo připraveno z 950 ml destilované vody, do níž byly přidány následující roztoky (Tabulka 4).

Objem [ml]	Zásobní roztok	Koncentrace [g/100 ml]
1	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	5
1	KCl	0,3
1	NH ₄ Cl	0,268
1	NaNO ₃	2
1	β – glycerolfosfát	0,216
1	H ₃ BO ₃	0,08
1	Na ₂ EDTA	0,7
1	Na ₂ SiO ₃	0,6
1	FeCl ₃ × 6 H ₂ O	0,166
1	CaCl ₂	7,5

Tabulka 4 : Složky modifikovaného média DYV.

Dále byly do média přidán 1 ml roztoku mikronutrientů (Tabulka 5a), 1 ml vitamínového roztoku (Tabulka 5b) a 200 mg MES pufru (Neustupa, 2016).

MnCl ₂ × 4 H ₂ O	31,4 mg
MnSO ₄ × H ₂ O	4,5 mg
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	1,46 mg
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	2,35 mg
NH ₄ VO ₃	0,13 mg
Na ₂ SeO ₃	0,27 mg

Rozpuštěno v 1000 ml destilované vody

Vitamin B ₁₂	5 mg
Thiamin HCl	10 mg

Rozpuštěno v 1000 ml destilované vody

Tabulka 5a a 5b: Složení roztoku mikronutrientů a vitamínového roztoku.

Po přidání všech složek byl objem média doplněn do 1000 ml a médium bylo sterilizováno v autoklávu.

2.2.2 Mikrofotografie a jejich zpracování

Kultury byly pěstovány za stabilní teploty 21 °C a stabilního světelného režimu světlo/tma (12:12) a pravidelně sledovány pod binolupou. Ve chvíli, kdy obsahovaly dostatek dělicích se jedinců (alespoň jedna dělicí se buňka na zhruba 10 buněk), jsem pořídil mikrofotografie

pomocí mikroskopu Olympus BX51 při 200× zvětšení, kamery Bresser a softwaru MicroCamLab. Snažil jsem se tak získat snímky buněk v různých stádiích vývoje.

Druh	n	min	max
<i>M. thomasiana</i>	40	0,569532009	1,007668298
<i>M. compereana</i>	58	0,443860181	1,024263588
<i>E. humerosum</i>	60	0,608907547	1,039202128
<i>M. radians</i>	49	0.450050454	1

Tabulka 6: Detaily získaných snímků. n = počet snímků, min = relativní velikost nejmenší nafocené buňky, max = relativní velikost největší nafocené buňky.

V programu TpsDig2, ver. 2.31, jsem poté na každou polobuňku umístil 11 landmarků (Obrázek 8). Změřil jsem také šířku dospělé polobuňky a rostoucí polobuňky, jejichž poměrem jsem reprezentoval stádium rostoucí polobuňky v ontogenetickém vývoji.

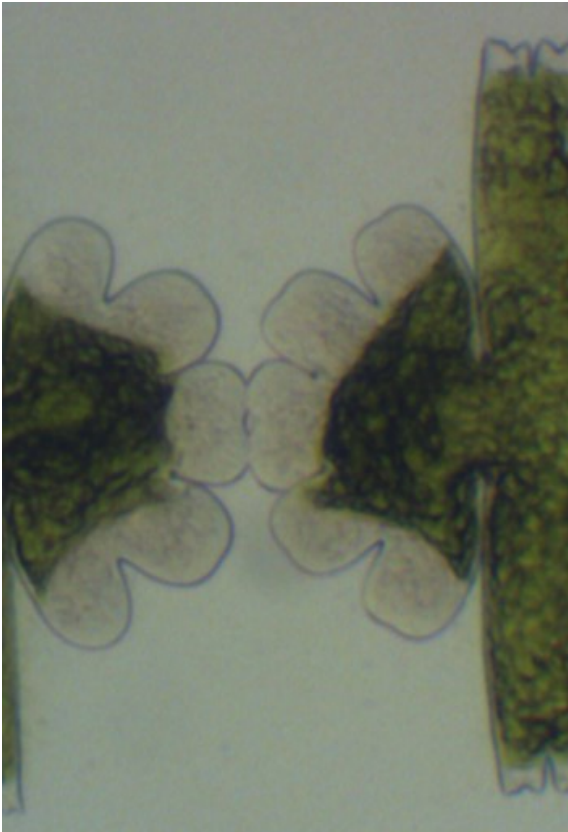
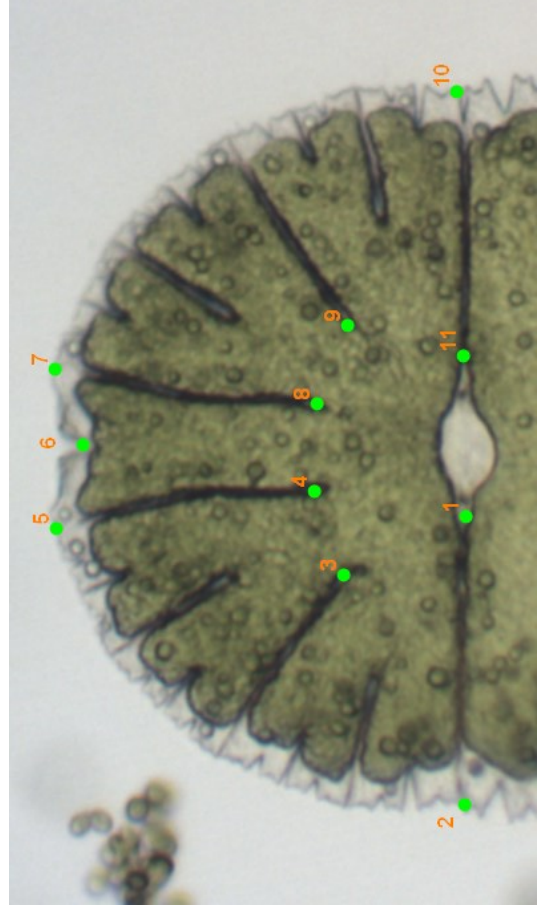
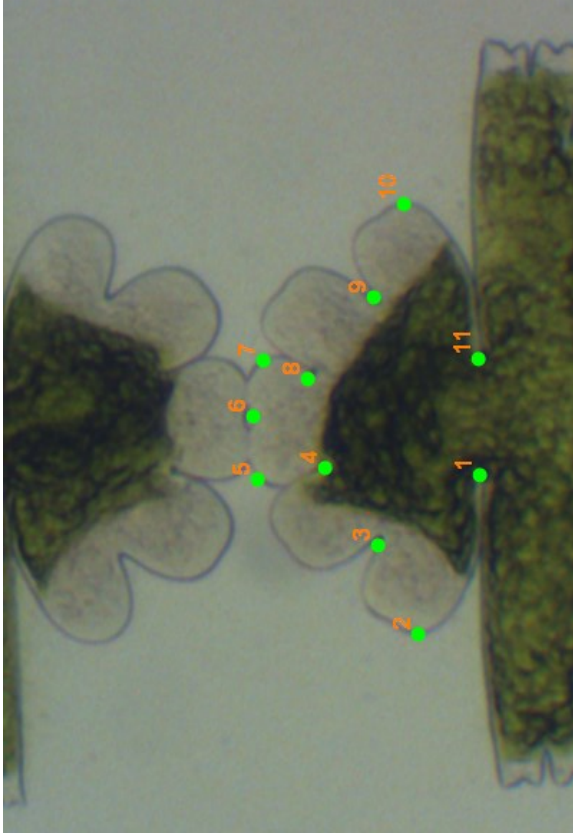
Souřadnice landmarků byly symetrizovány pomocí skriptu v programovací prostředí R (R Core Team, 2021). V programu TpsRelw, ver. 1.65 (Rohlf, 2015), byla provedena superimpozice pomocí Prokrustovy analýzy, která rozmístila landmarky tak, aby byla minimalizována suma čtverců vzdáleností mezi odpovídajícími si landmarky (Zelditch et al., 2012) (Obrázek 6). Tímto jsem dosáhl stavu popisovaného v kapitole „Principy morfometriky“ (strana 11) – pozice, rotace a velikosti objektů byly relativizovány tak, aby je mezi sebou bylo možné porovnat.



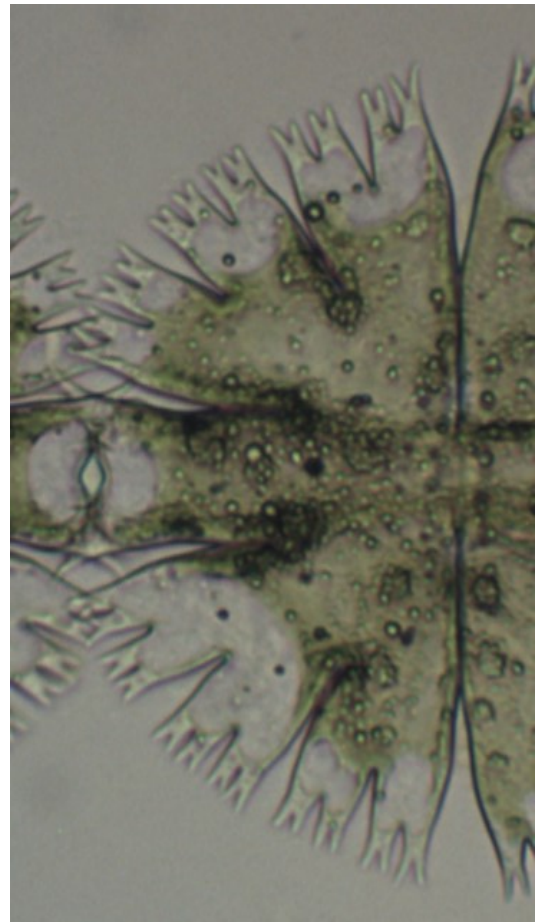
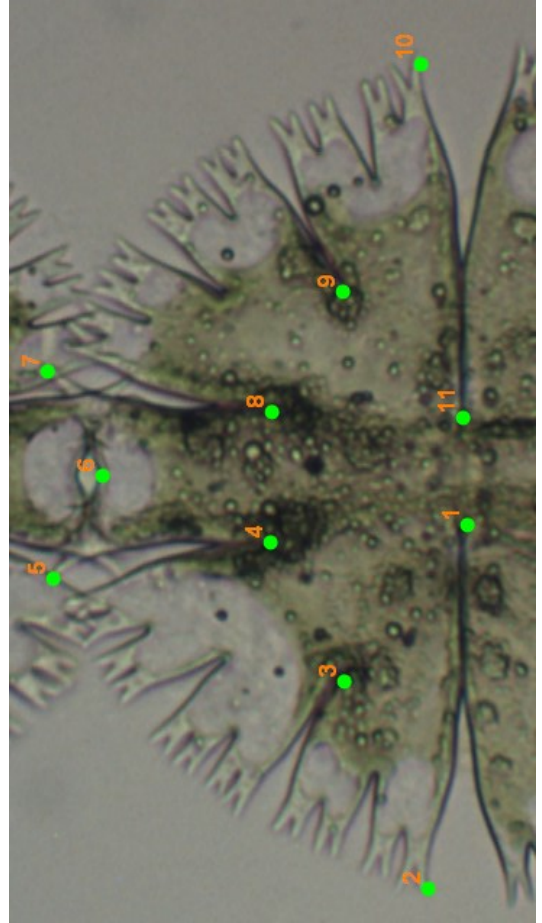
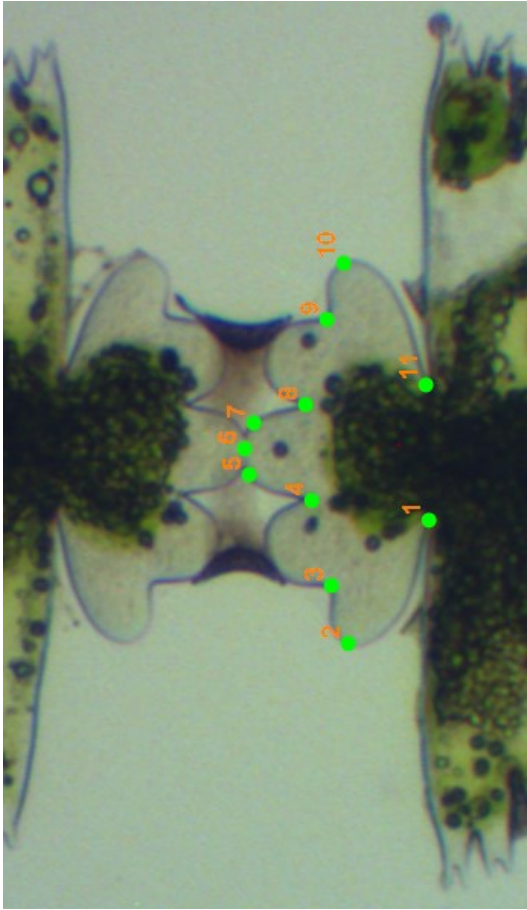
Obrázek 6: Výsledek superimpozice symetrizovaných landmarků polobuněk *M. compereana*.

Stejný program provedl i multivariační analýzu (PCA) a sestrojil tvaroprostory (v tomto případě dvourozměrnou reprezentaci valné části pozorovaných změn tvaru) pro jednotlivé druhy. Z tvaroprostorových dat jsem také získal pozici landmarků průměrné buňky datasetu pro každý druh.

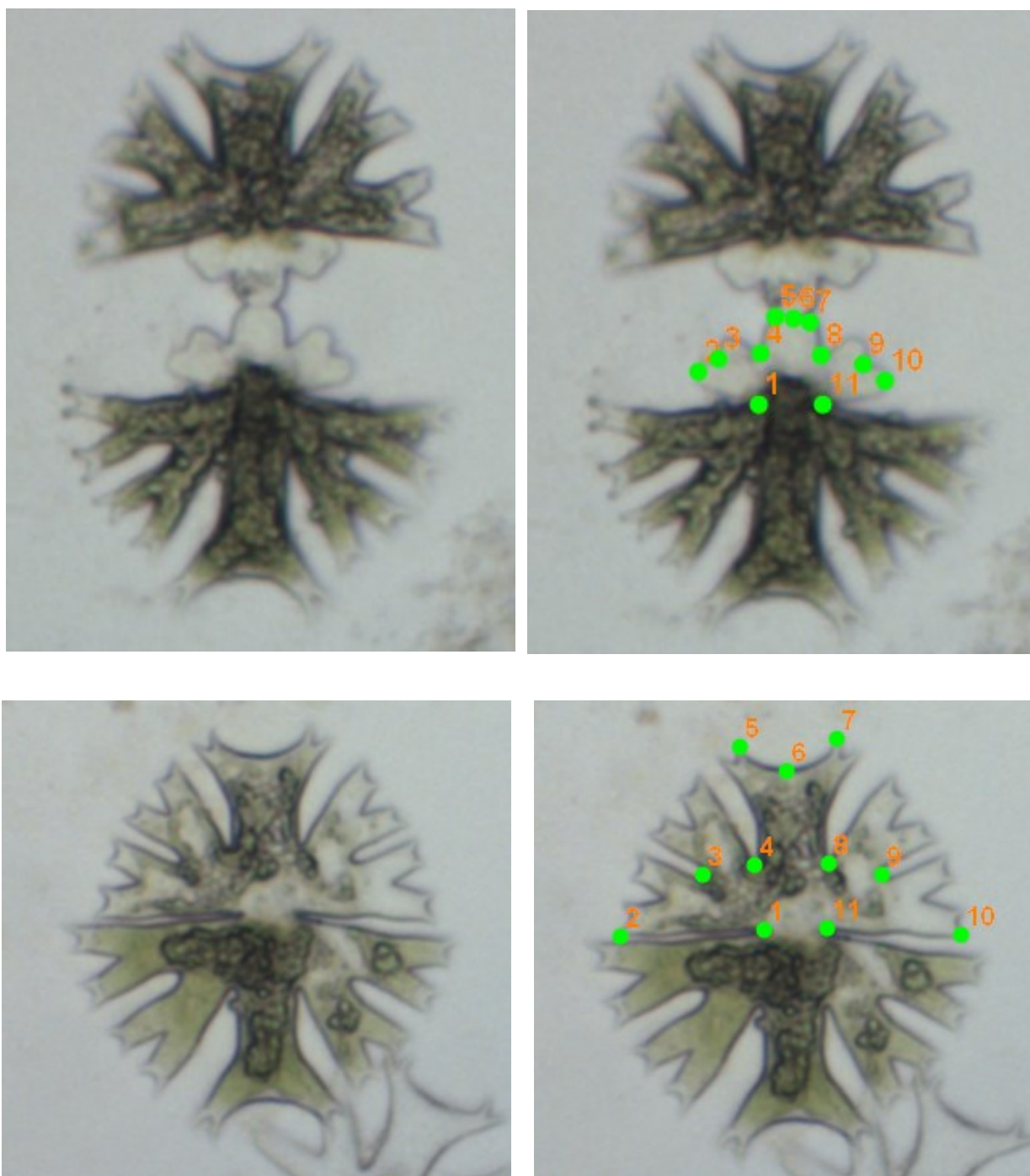
V programu TpsRegr, ver. 1.50 (Rohlf, 2015), jsem provedl multivariační regresi, do které jsem dosadil poměr dospělé a rostoucí polobuňky jako nezávislou proměnnou. Tím jsem získal informace o vztahu tvaru polobuňky a jejím vývojovým stádiem pro každý druh. Z parametrů těchto regresních modelů jsem následně v programu PAST, ver. 4.03 (Hammer et al., 2001), multivariační regresi získal alometrický prostor, který graficky ukazuje podobnost mezi ontogenetickými změnami tvaru jednotlivých druhů (Gerber et al., 2008).



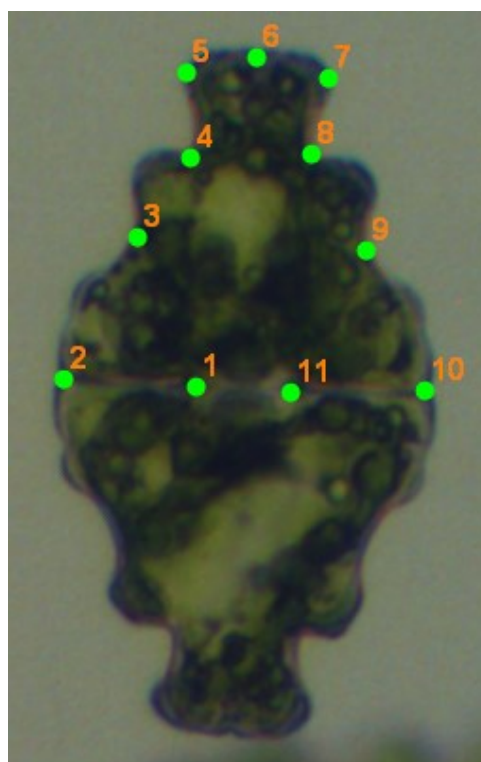
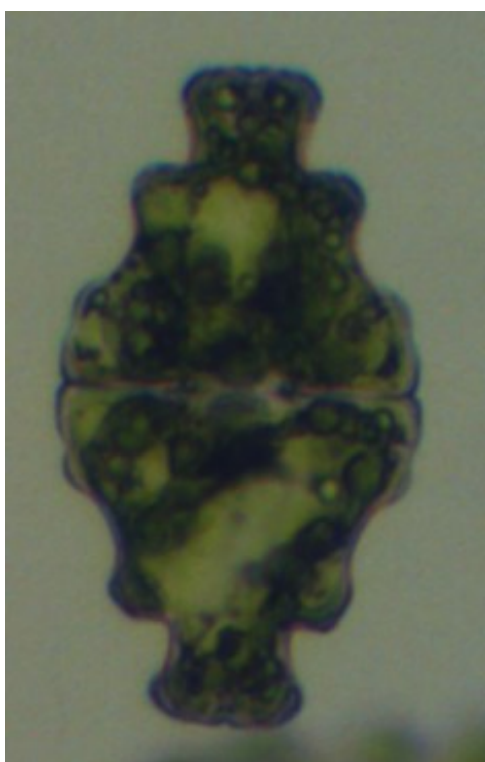
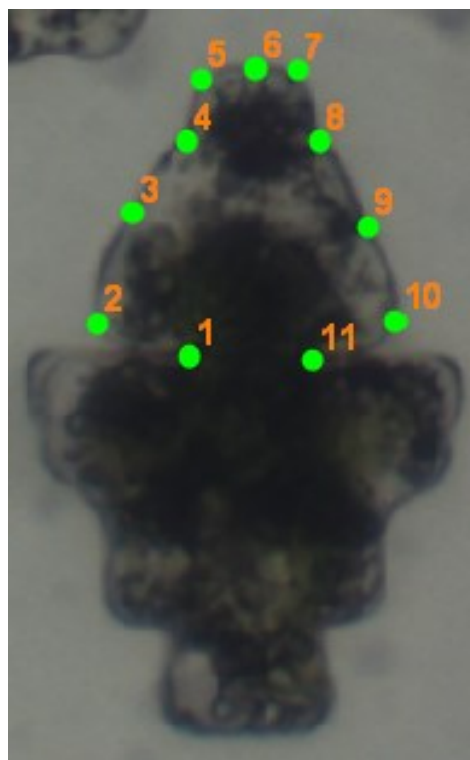
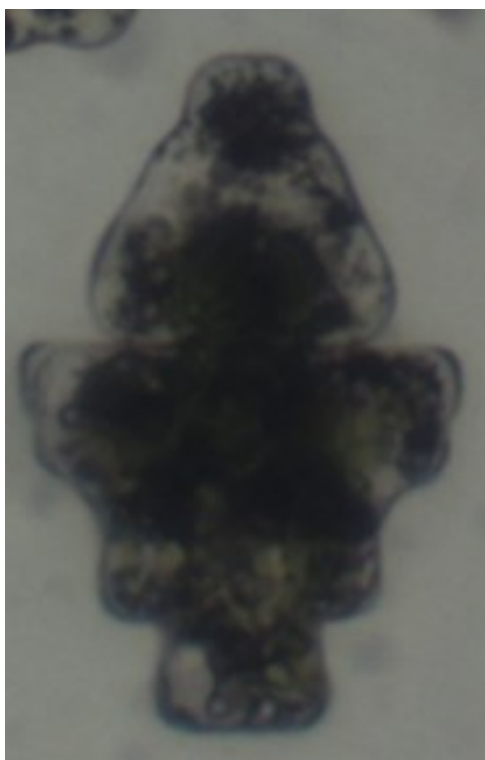
Obrázek 7: Umístění landmarků na buňkách *M. thomasiana*.



Obrázek 8: Umístění landmarků na buňkách *M. compereana*.



Obrázek 7: Umístění landmarků na buňkách *M. radians*.



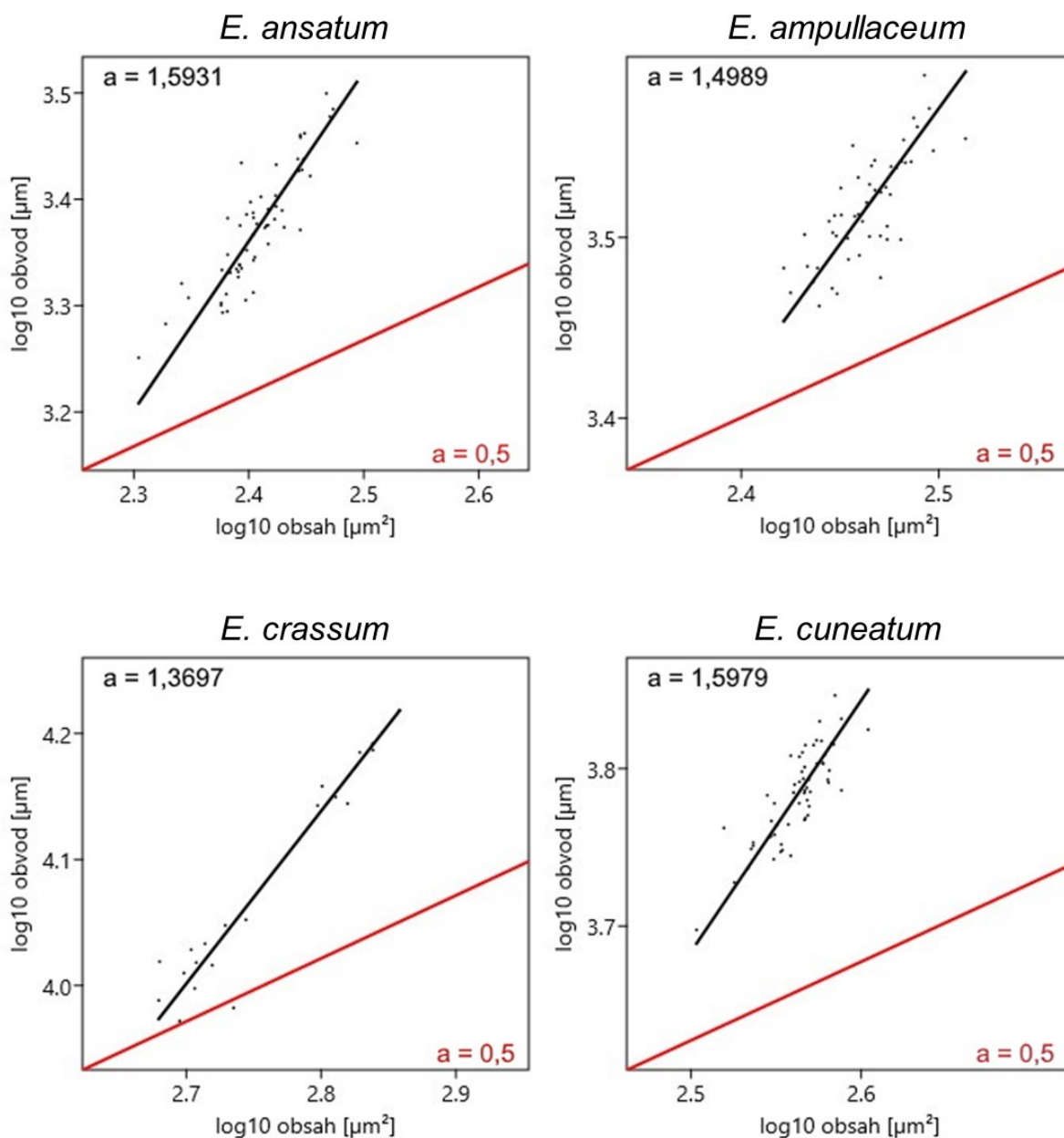
Obrázek 8: Umístění landmarků na buňkách *E. humerosum*.

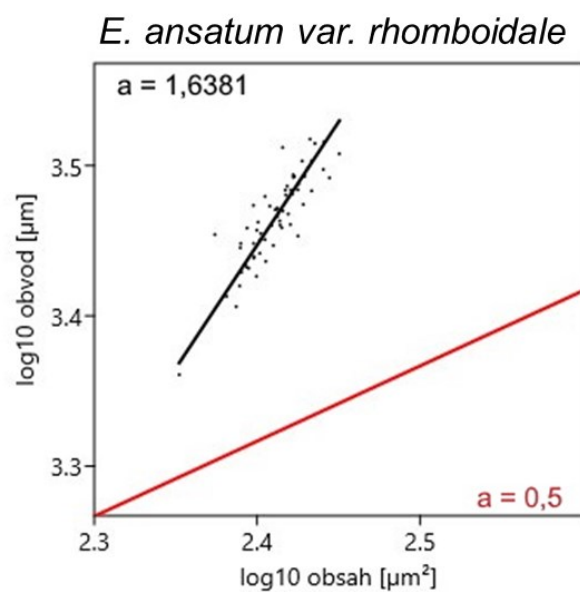
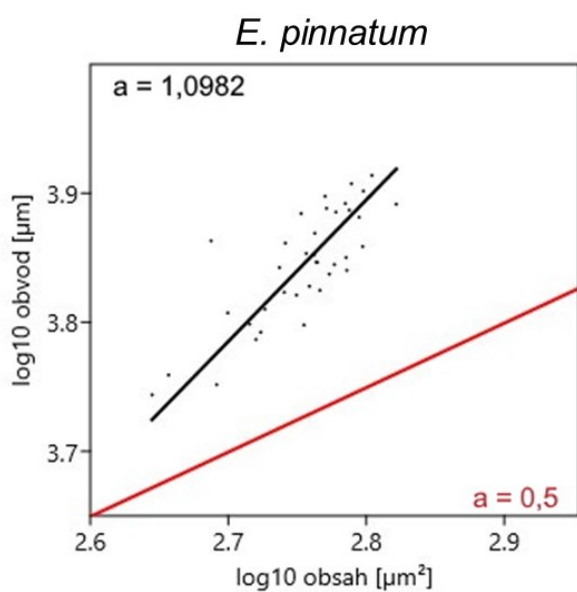
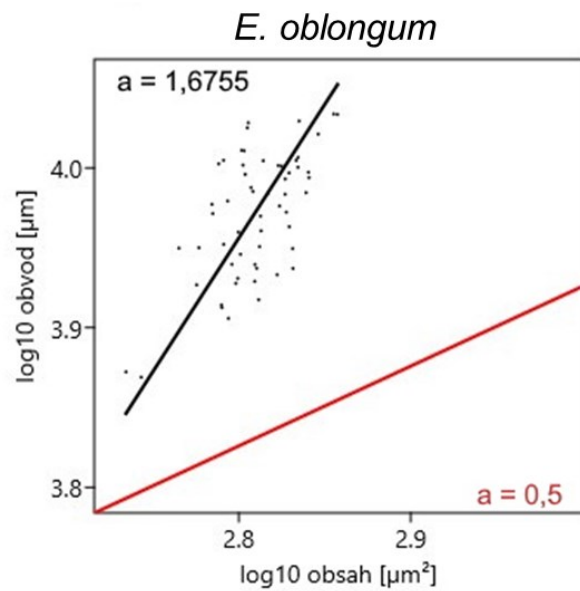
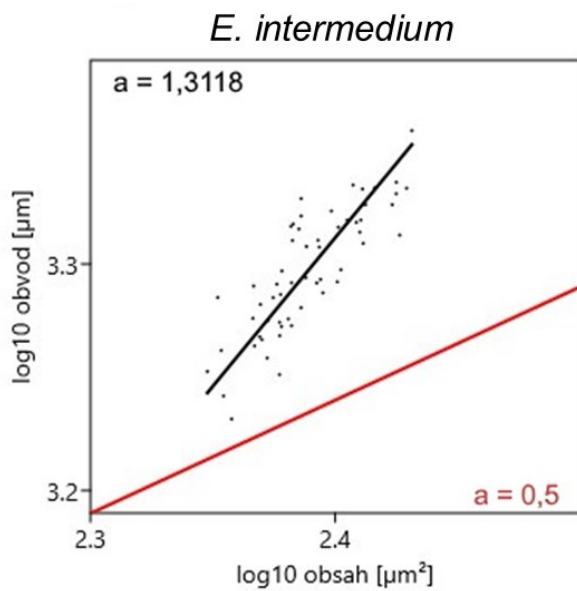
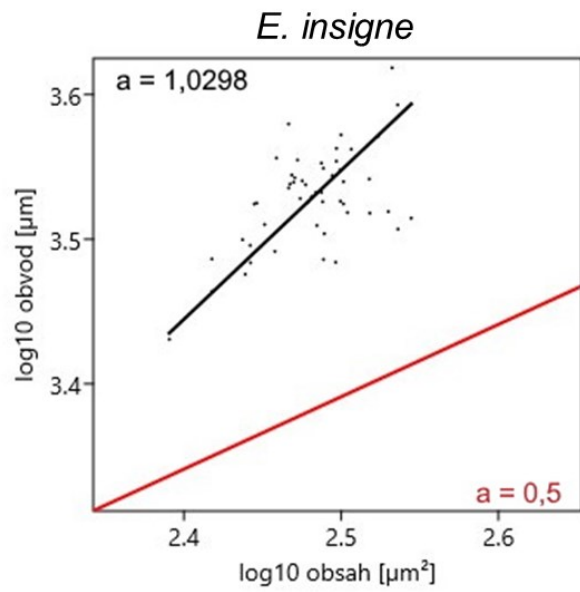
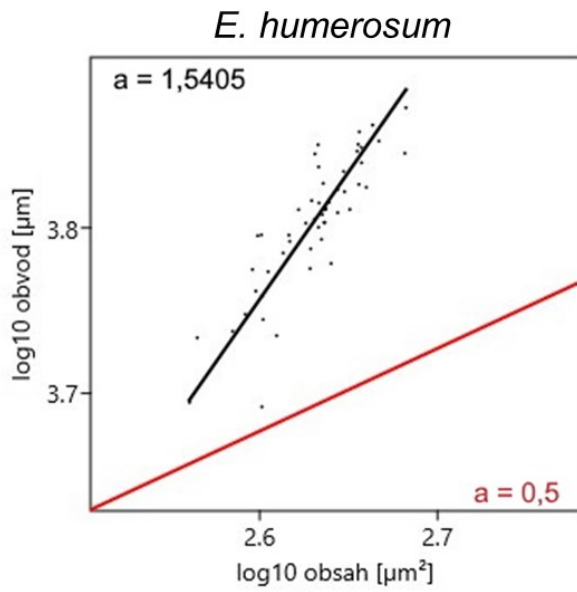
3 Výsledky

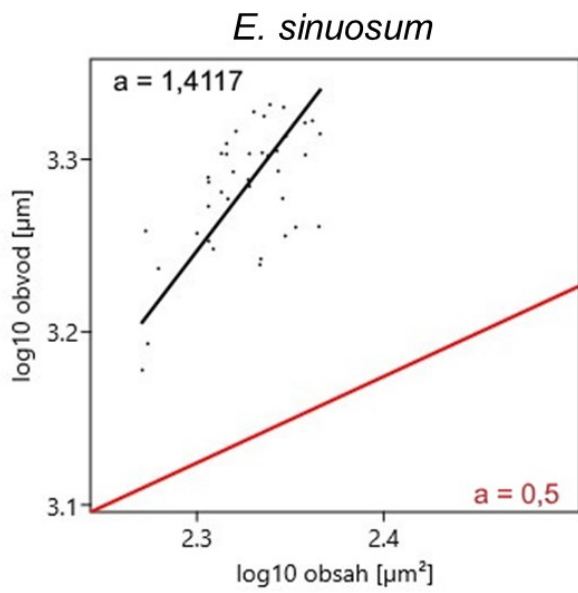
3.1 Statická část

3.1.1 Alometrické trajektorie jednotlivých druhů

Škálovací exponenty pro všechny zkoumané druhy se ukázaly býti výrazně vyšší než sklon izometrického vztahu (0,5) (Obrázky 11 a-k). Nejvyšší sklon vykazovalo *E. oblongum* ($a = 1,6755$; 95% konf. interval (1,3092; 1,8944)), naopak nejnižší *E. insigne* ($a = 1,0298$; 95% konf. interval (0,84924; 1,2121)). To nasvědčuje tomu, že u všech zahrnutých druhů s velikostí roste komplexita obvodu.

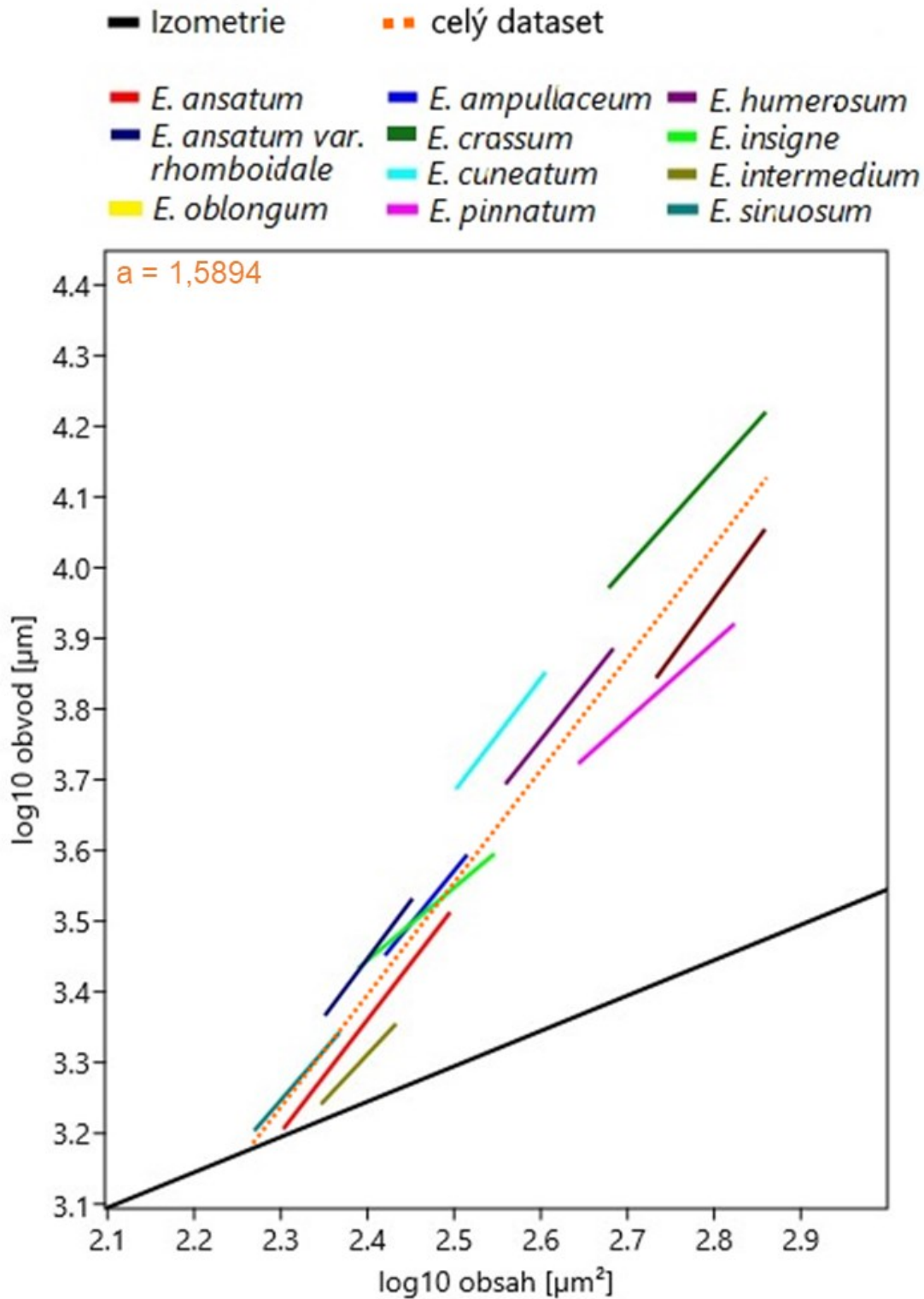






Obrázky 9 a-k: Logaritmizované vztahy obsahů a obvodů polobuněk jednotlivých populací druhů. Červené úsečky představují izometrii, tedy stav, při kterém si obvod zachovává konstantní složitost. Černé úsečky zobrazují lineární modely vztahů.

Pokud zahrneme do analýzy buňky všech druhů, vychází $a = 1,5894$; to je opět výrazně více než izometrické $a = 0,5$ (Obrázek 10). Zdá se tedy, že trend zvyšující se komplexity lze pozorovat i na mezidruhové úrovni.



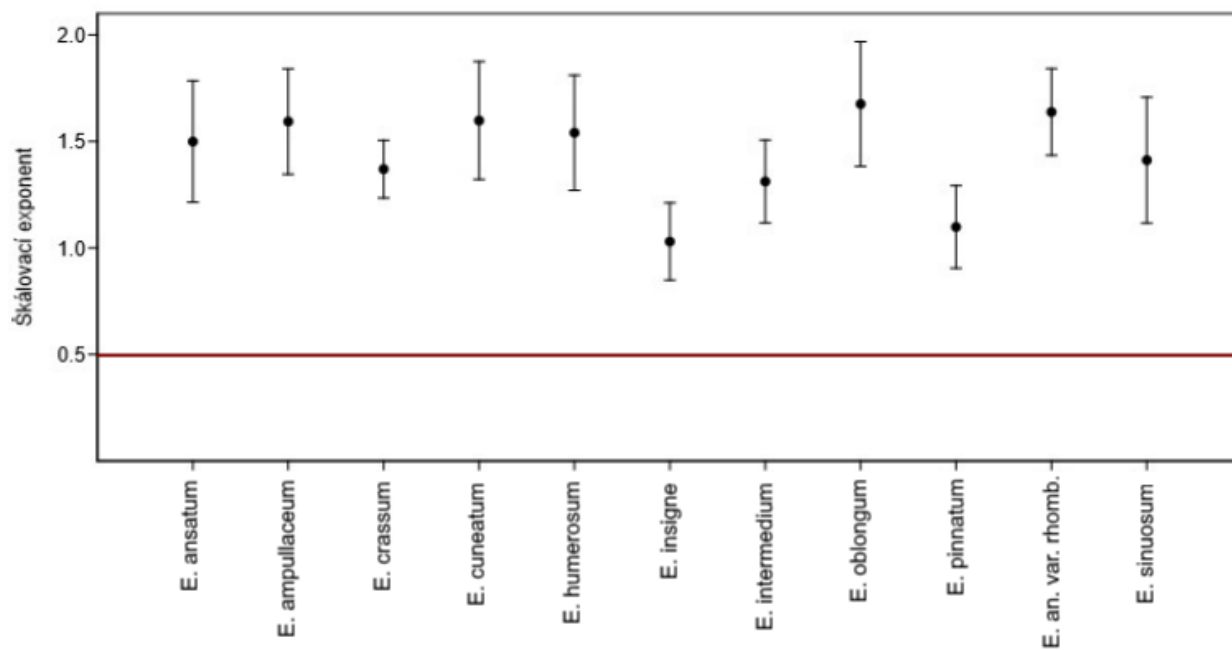
Obrázek 10: Graf, který obsahuje lineární modely jednotlivých populací (barevné úsečky) a zároveň lineární model celého souboru (oranžová čerchovaná úsečka). Černá úsečka zde značí izometrii.

3.1.2 Statistické hodnoty modelů

Veškeré vztahy popsány v této části jsou silně signifikantní (Tabulka 7). Některé z nich popisují naprostou většinu variability (například u *E. crassum*, více než 92 %), u jiných korelační koeficient takto vysoký není (například u *E. insigne*, zhruba 33 %). U celého datasetu pak model vysvětluje přes 90 % pozorované variability. Všechny tyto výsledky nicméně ukazují, že větší jedinci mají relativně větší obvody a komplexnější tvary. Konfidenční intervaly všech vztahů vylučují izometrický stav $a = 0,5$ (Obrázek 11). Izometrický vztah tedy můžeme jak v rámci jednotlivých druhů, tak všech zúčastněných jedinců, zavrhnout.

	Škálovací exponent	Spodní meze konf. intervalu	Horní meze konf. intervalu	Korelační koeficient (r^2)	Signifikance
<i>E. ampullaceum</i>	1,4989	1,1926	1,7628	0,58371	0,0001
<i>E. ansatum</i>	1,5931	1,3149	1,8098	0,75254	0,0001
<i>E. crassum</i>	1,3697	1,2284	1,4987	0,93258	0,0001
<i>E. cuneatum</i>	1,5979	1,2834	1,8367	0,67653	0,0001
<i>E. humerosum</i>	1,5405	1,2442	1,7837	0,74505	0,0001
<i>E. insigne</i>	1,0298	0,84924	1,2121	0,33014	0,0001
<i>E. intermedium</i>	1,3118	1,1065	1,4955	0,6868	0,0001
<i>E. oblongum</i>	1,6755	1,3092	1,8944	0,35064	0,0001
<i>E. pinnatum</i>	1,0982	0,86526	1,253	0,65673	0,0001
<i>E. an. var. rhomboidale</i>	1,6381	1,4351	1,8418	0,76206	0,0001
<i>E. sinuosum</i>	1,4117	1,1204	1,7112	0,35981	0,0001
Celý dataset	1,5894	1,5408	1,633	0,90754	0,0001

Tabulka 7: Statistické parametry lineárních modelů.

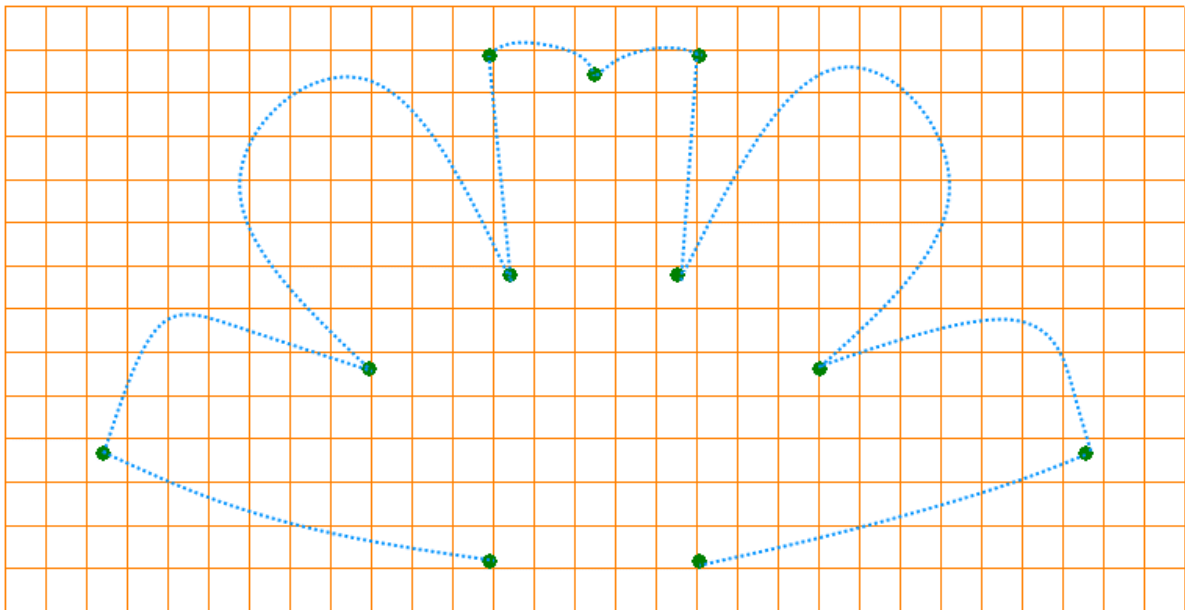


Obrázek 11: Hodnoty škálovacích exponentů a jejich konfidenční intervaly. Červená úsečka značí izometrii.

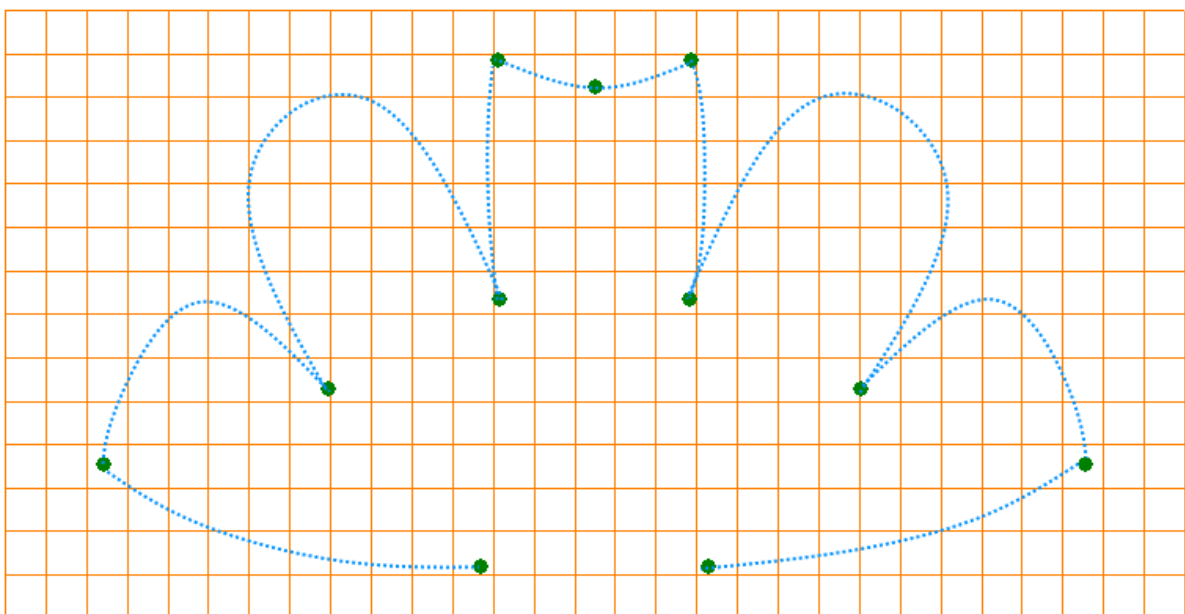
3.2 Ontogenetická část

3.2.1 Průměrné pozice landmarků jednotlivých datasetu

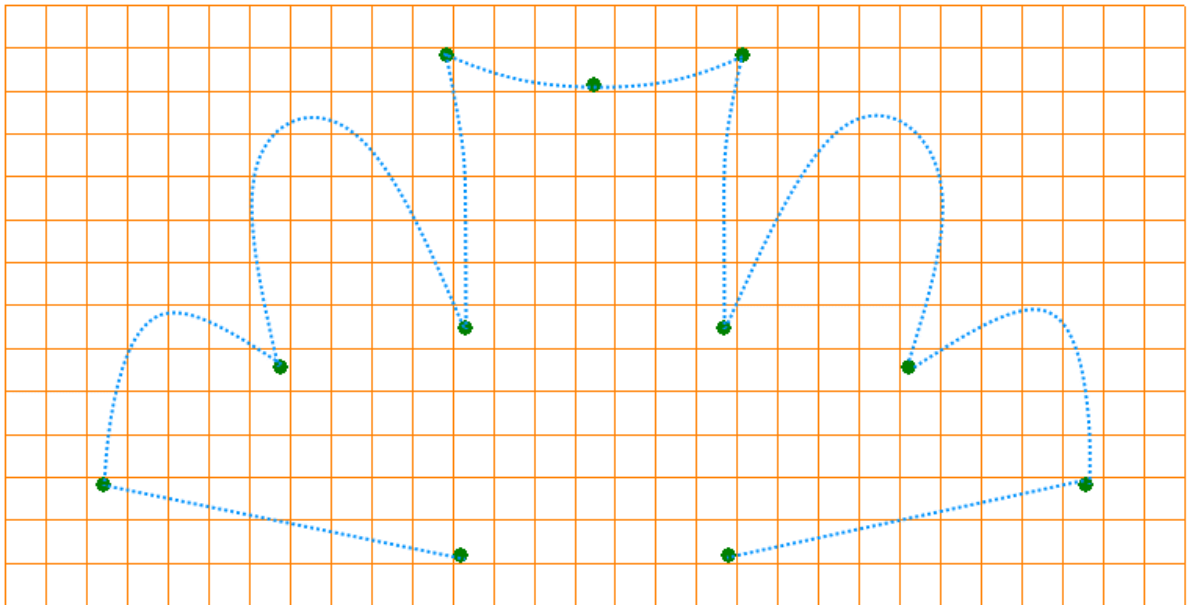
Skrze PCA pro jednotlivé druhy jsem získal data o tom, v jaké pozici byly landmarky v bodě (0, 0) svých tvaroprostorů (Obrázky 14-17). Jedná se tedy o aproximaci průměrné buňky datasetu. Zelené body jsou landmarky umístěné analýzou, modré přerušované obrysy byly přidány později v grafickém programu a plní pouze demonstrativní účely. Nejedná se o obrysy reálných buněk.



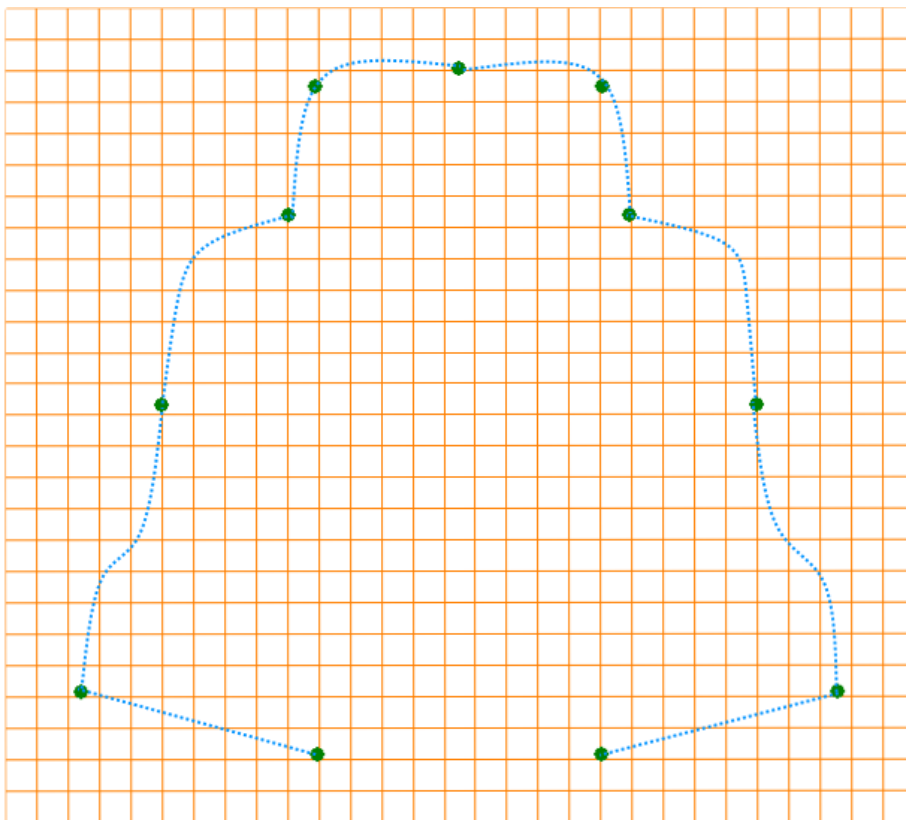
Obrázek 12: Průměrné pozice landmarků (zelené body) *M. thomasiana*.



Obrázek 13: Průměrné pozice landmarků (zelené body) *M. compereana*.



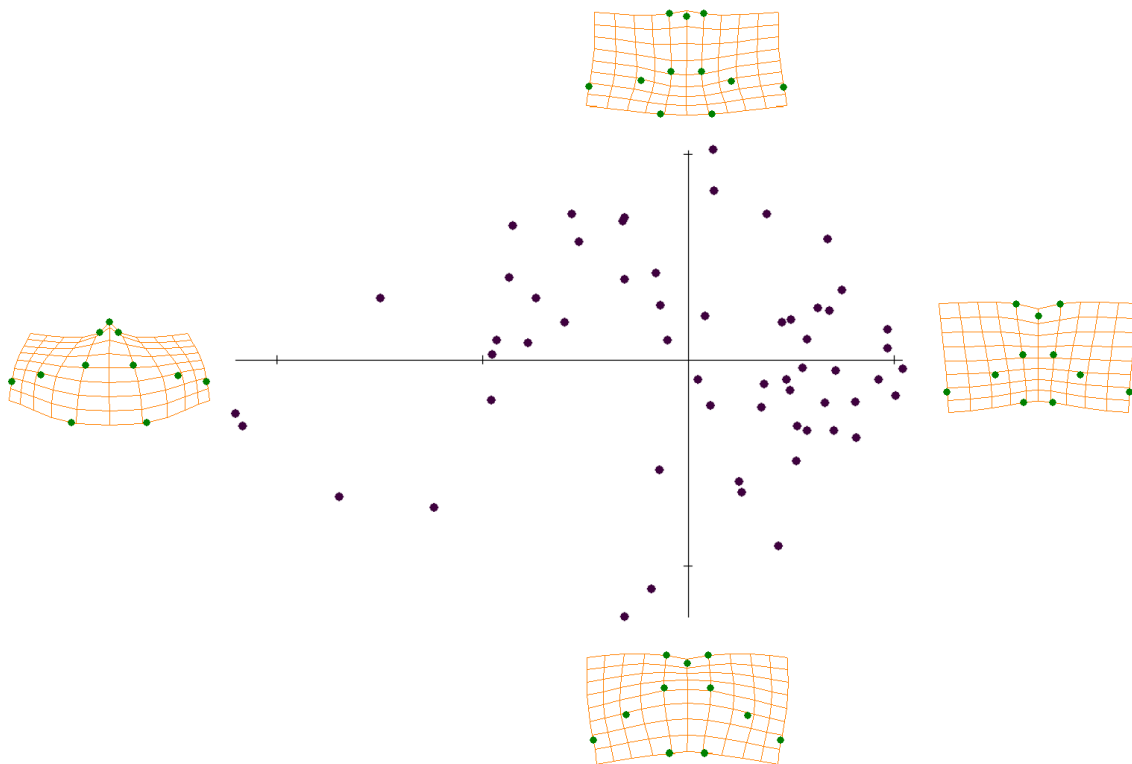
Obrázek 14: Průměrné pozice landmarků (zelené body) *M. radians*.



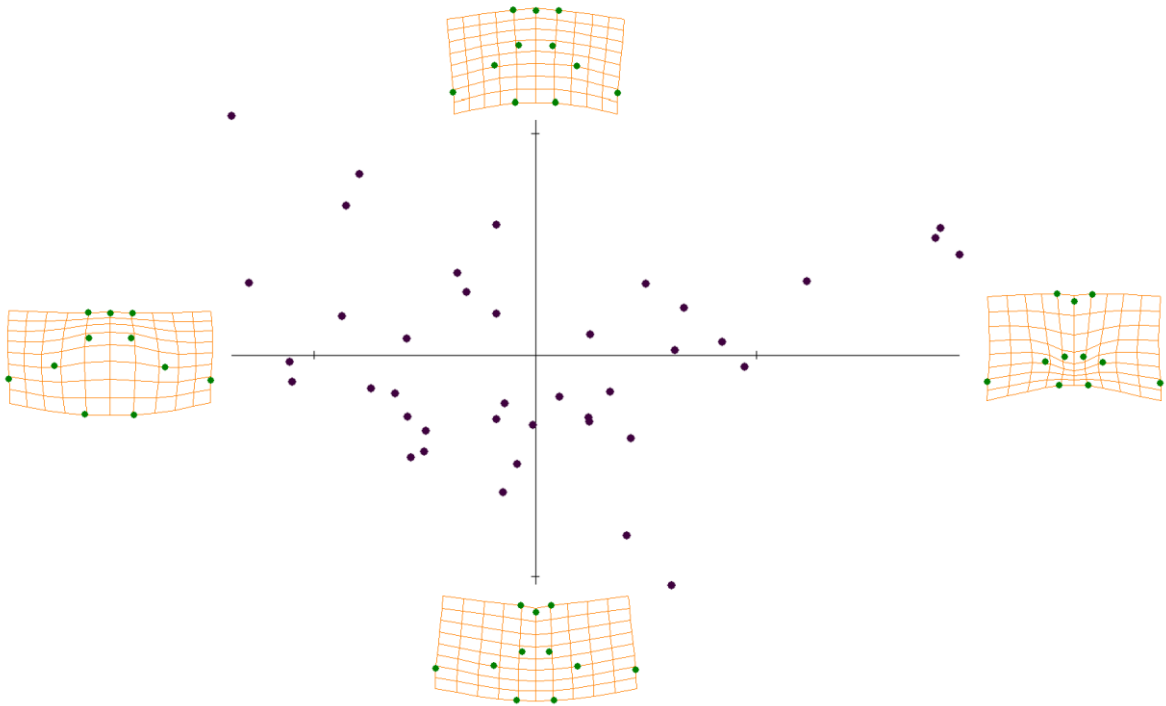
Obrázek 15: Průměrné pozice landmarků (zelené body) *E. humerosum*.

3.2.2 Tvaroprostory

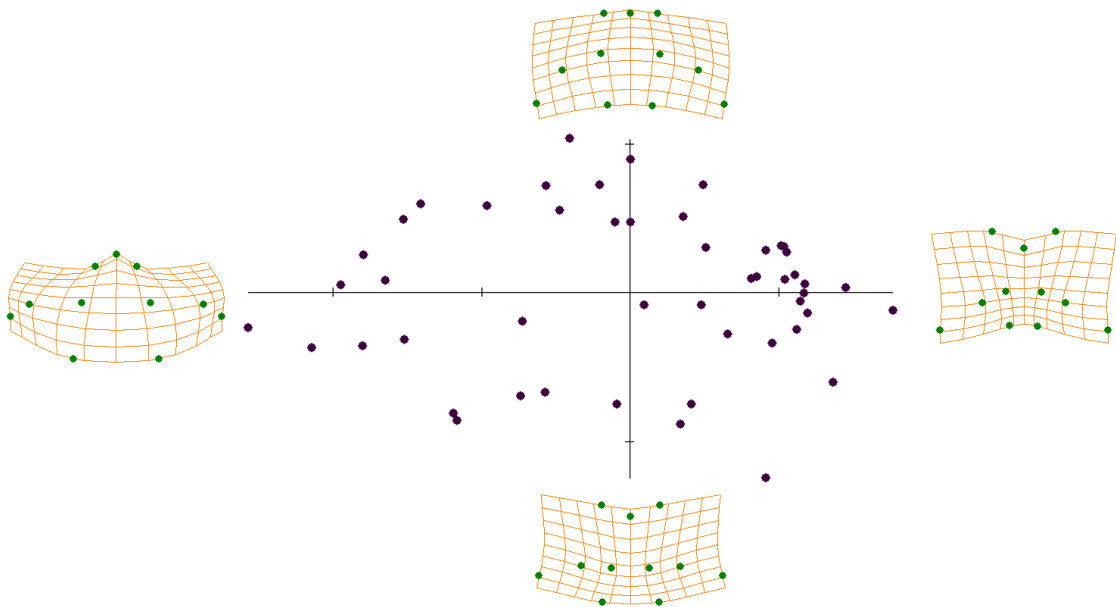
Tvaroprostory jednotlivých druhů reprezentují mnohorozměrnou regresi pozice landmarků – organizují tedy jedince na základě jejich tvaru. V těchto datech není zahrnuta velikost polobuněk. Černé body (Obrázky 18-21) reprezentují pozici jednotlivých polobuněk odvozenou od prvních dvou os PCA, krajní mřížky se zelenými body modelují, jak by vypadaly polobuňky na krajních pozicích obou os. Je nápadné, že u druhů z rodu *Micrasterias* vysvětlují první dvě osy zhruba $\frac{3}{4}$ pozorované variability, u druhu *Euastrum humerosum* je to pouze zhruba $\frac{1}{2}$.



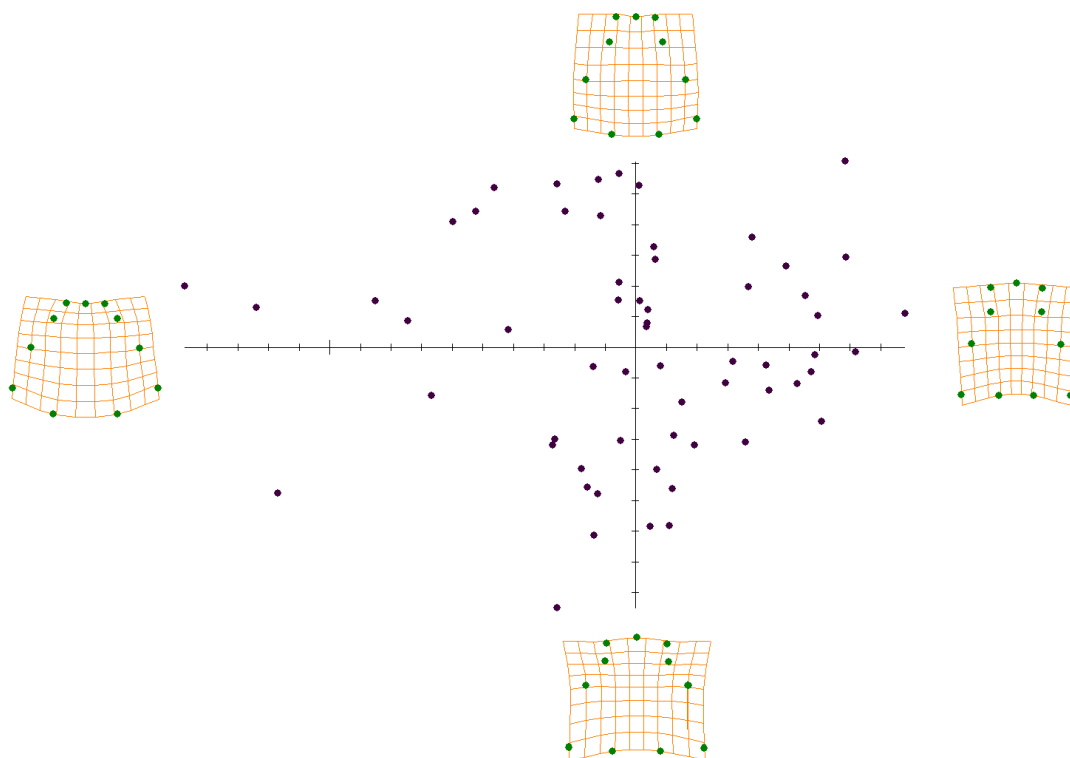
Obrázek 16: První dvě osy PCA ukazující tvarovou variabilitu rostoucích polobuněk u *M. compereana*. První osa vysvětluje 56,58 % a druhá 20,27 % pozorované variability.



Obrázek 17: První dvě osy PCA ukazující tvarovou variabilitu rostoucích polobuněk u *M. thomasiana*. První osa vysvětluje 58,91 % a druhá 17,26 % pozorované variability.



Obrázek 18: První dvě osy PCA ukazující tvarovou variabilitu rostoucích polobuněk u *M. radians*. První osa vysvětluje 65,49 % a druhá 13,45 % pozorované variability.

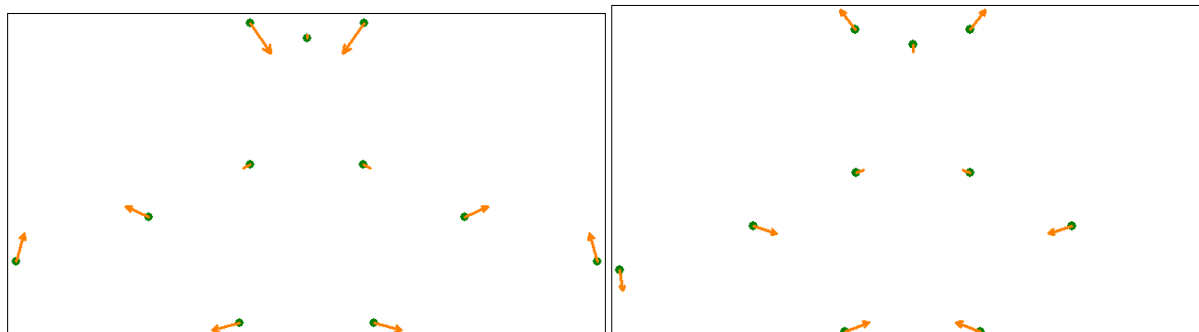
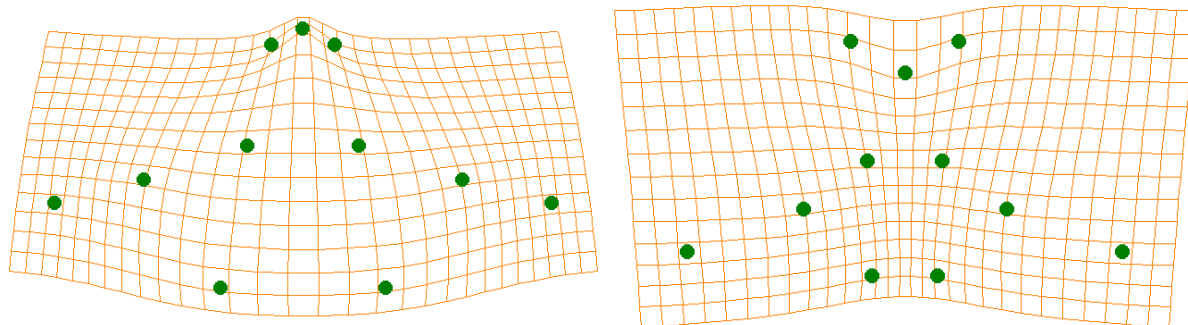


Obrázek 19: První dvě osy PCA ukazující tvarovou variabilitu rostoucích polobuněk u *E. humerosum*. První osa vysvětluje 36,76 % a druhá 18,79 % pozorované variability.

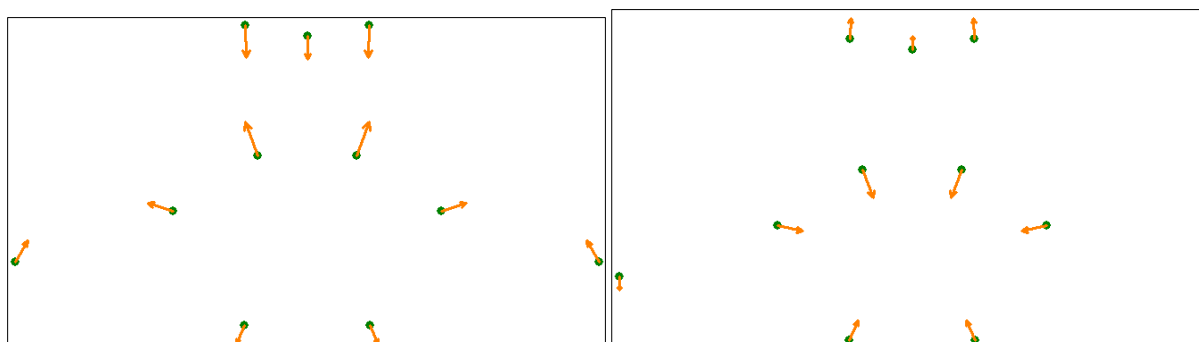
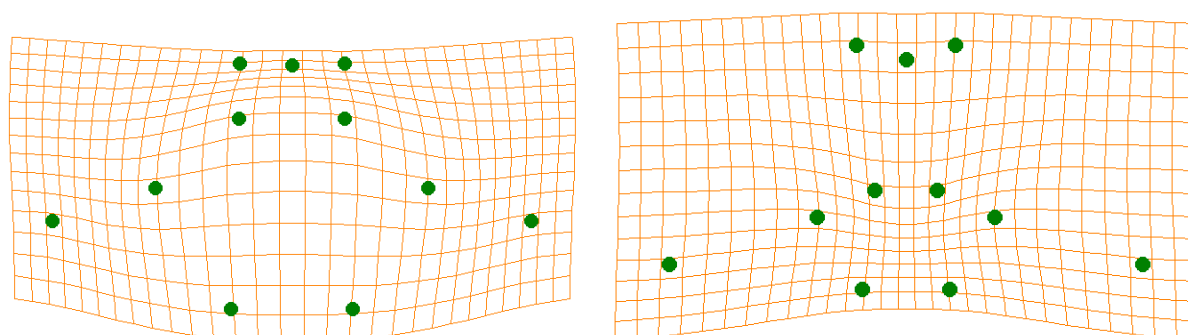
3.2.3 Regresní modely

Regresní modely s relativní velikostí jako nezávislou proměnnou umožnily modelovat umístění landmarků marginálně velkých polobuněk (Obrázky 22-25). Nejedná se o opravdová pozorování, ale stejně jako u mřížek v předchozí kapitole jsou to teoretické landmarky, které perfektně kopírují průběh regresního modelu. Levá mřížka zobrazuje landmarky pro nejmenší přítomnou relativní velikost, pravá mřížka pro tu největší. Konkrétní relativní velikosti lze nalézt v Tabulka 6.

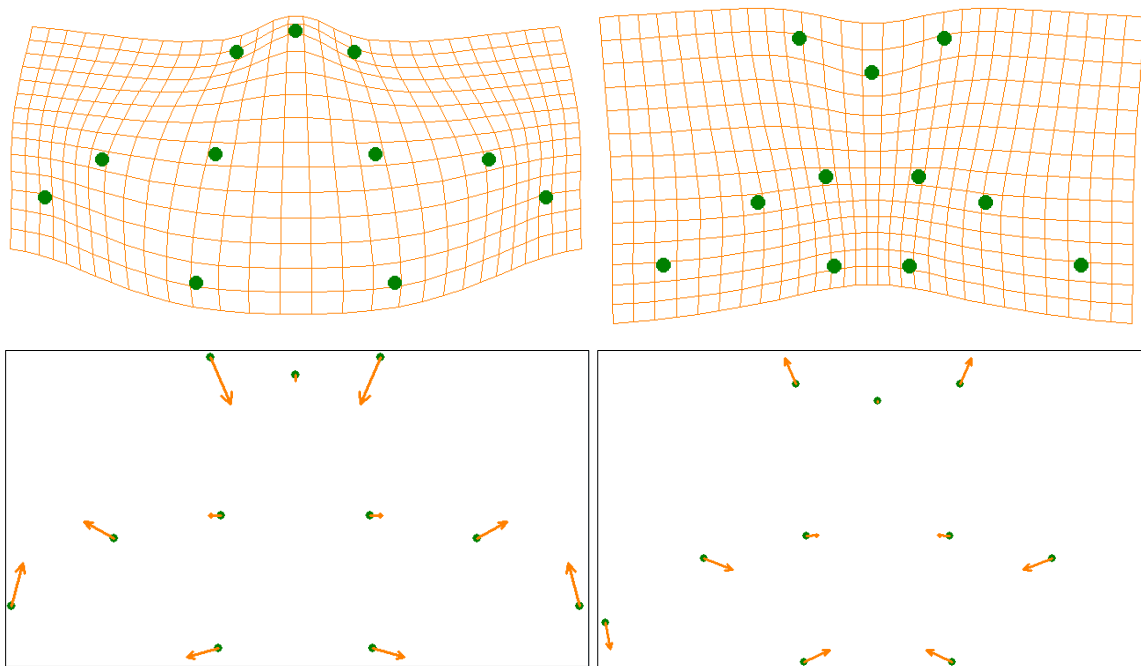
Stejně modely vyprodukovaly také vektory (spodní řádky obrázků), které ukazují relativní změny pozice landmarků od průměrné pozorované polobuňky k příslušnému marginálnímu modelu.



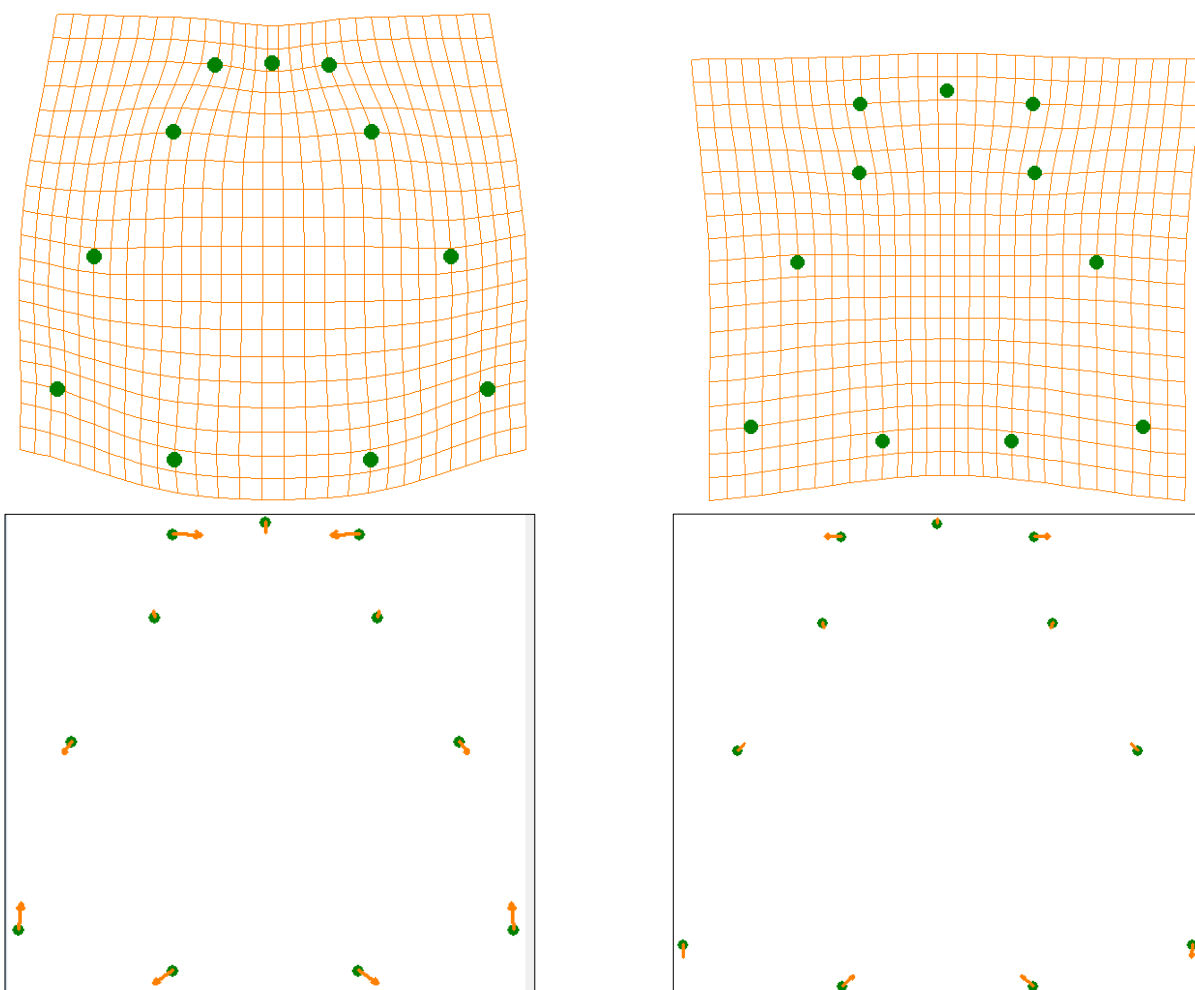
Obrázek 20: Rekonstrukce pozice landmarků polobuněk krajních velikostí *M. compereana*. Na spodním řádku je vidět relativní změna pozice landmarků.



Obrázek 21: Rekonstrukce pozice landmarků polobuněk krajních velikostí *M. thomasi*. Na spodním řádku je vidět relativní změna pozice landmarků.



Obrázek 22: Rekonstrukce pozice landmarků polobuněk krajních velikostí *M. radians*. Na spodním řádku je vidět relativní změna pozice landmarků.



Obrázek 23: Rekonstrukce pozice landmarků polobuněk krajních velikostí *E. humerosum*. Na spodním řádku je vidět relativní změna pozice landmarků.

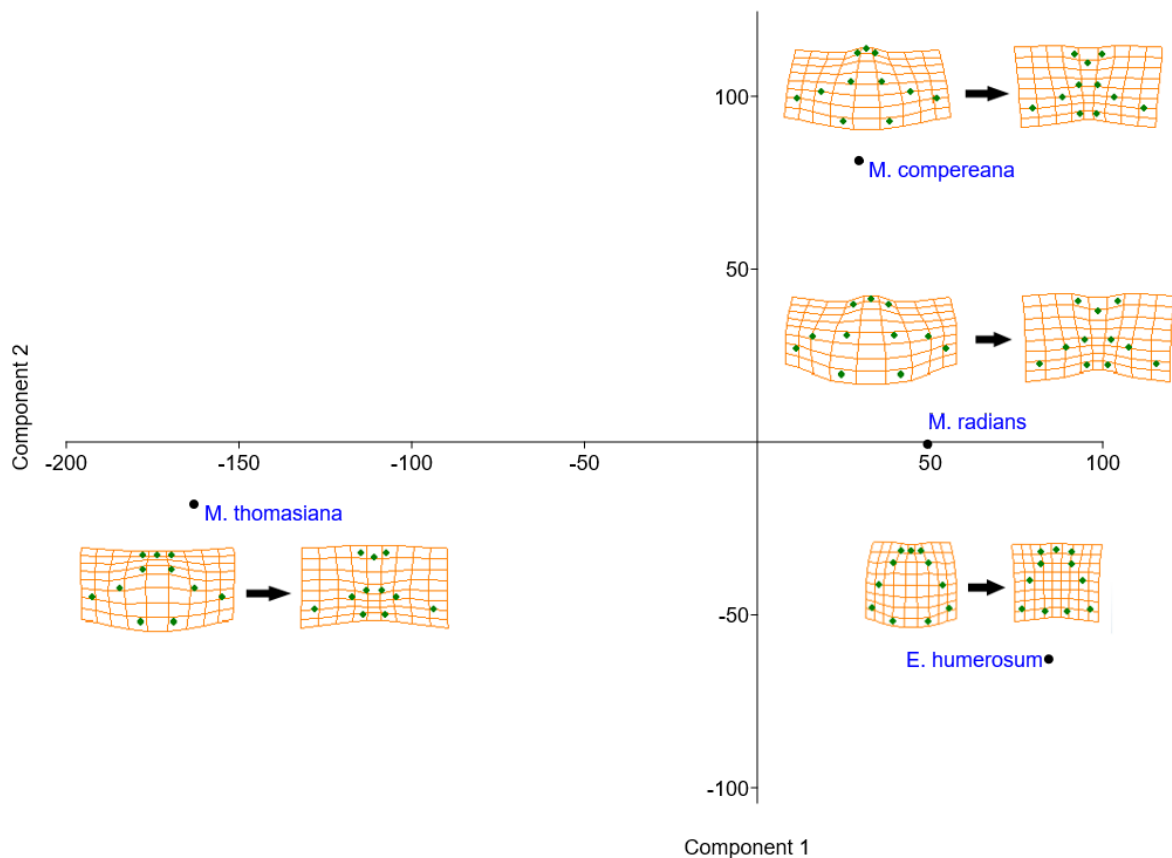
Ač jsou regresní modely pro všechny druhy signifikantní (Tabulka 8: Parametry regresních modelů.), nevysvětlují mnoho variability. U *M. thomasiانا* a *M. compereana* vysvětlují více než 40 %, u *M. radians* zhruba 32 %, a u *E. humerosum* pouze 15 %.

	% vysvětlené variability	signifikance
<i>M. thomasiانا</i>	43,0487	0,0001
<i>M. compereana</i>	47,3354	0,0001
<i>M. radians</i>	31,9296	0,0001
<i>E. humerosum</i>	15,6085	0,0001

Tabulka 8: Parametry regresních modelů.

3.2.4 Alometrický prostor

Alometrický prostor je konstruován ze změn tvaru závislé na relativní velikosti. Jednotlivé body tedy představují celý průběh růstu pro daný druh (Obrázek 24). Jejich vzájemná pozice v prostoru vypovídá o podobnosti jejich alometrických trajektorií. *M. thomasiana* leží odlehle od zbylých tří druhů podél první osy, která vysvětluje přes 75 % variability. *M. compereana*, *M. radians* a *E. humerosum* jsou dále rozmístěné podle druhé osy, která vysvětluje zhruba 22 % variability. Podle těchto dat je tedy průběh růstu *M. thomasiana* výrazně odlišný od zbylých druhů.



Obrázek 24: Alometrický prostor. Body reprezentují ontogenetickou změnu tvaru jednotlivých druhů, vložené mřížky pak tyto změny ilustrují. První komponent popisuje 75,117 % a druhý 22,114 % variability.

4 Diskuze

4.1 Statická část

V tomto experimentu jsem využil vzorky fixované Lugolovým roztokem. Výhodou této metody je časová stabilita preparátů, která mi umožnila studovat i vzorky staré mnoho let. U některých skupin planktonu, například rozsivek či obrněnek, existují důkazy o změně velikosti buněk během dlouhodobého uchovávání (Williams et al., 2016; Woelfl & Whitton, 2000). Nejedná se však o skupiny s celulózní buněčnou stěnou, která je u krásivek přítomná, a dodává jim jak rigiditu, tak chemickou stabilitu. Proto se odvažuji tvrdit, že Lugolův roztok je v tomto případě adekvátní fixativum, které nijak neohrožuje tvarovou integritu buněk.

Neustupa (Neustupa, 2013) ukázal, že mezi polobuňkami jednoho jedince je zhruba stejná míra morfologické diverzity jako mezi dvěma jedinci ve klonální populaci. Tento fakt lze vysvětlit průběhem nepohlavního rozmnožování, kdy každá polobuňka vzniká jindy, a tedy za mírně odlišných podmínek. Analýzu jsem tedy prováděl na jednotlivých polobuňkách, neboť se z morfologického hlediska chovají jako samostatné jednotky, a ne přesné kopie. Rozhodnutí zpracovávat jednotlivé polobuňky se ukázalo výhodným zvláště u některých druhů (například *E. crassum*), od kterých v preparátech nebyly téměř žádné celé buňky.

Předchozí publikace (Neustupa, 2016) místo obvodu a obsahu získávaly objem a povrch; pohybovaly se tedy o dimenzi výše. Dosáhly toho pomocí odhadu tloušťky buňky. Při plánování tohoto experimentu jsem dospěl k názoru, že vzhledem k tomu, že je tento odhad pro všechny buňky odvozen od stejného poměru tloušťky a šířky (Růžička, 1981), nepřinesl by do komparativních dat žádnou novou informaci. Na základě Okieho (Okie, 2013) modelů navíc nelze vyloučit, že se mezi různě velkými buňkami poměr šířky a tloušťky mění. Existují možnosti, jak exaktně změřit tloušťku jednotlivých buněk, například pomocí konfokální mikroskopie či manipulace s individuálními buňkami ve světelném mikroskopu. Obě zmíněné metody by ovšem znamenaly výrazně větší časovou náročnost samotného pořizování fotografií. Konfokální mikroskopie by navíc vyžadovala alespoň částečně čisté preparáty, a aby bylo dosaženo dostatečného rozlišení, bylo by potřeba pořídit desítky až stovky optických řezů na buňku. Získání statisticky signifikantního vzorku by proto bylo finančně a časově v podstatě neuskutečnitelné. Proto považuji své metody získání mikrofotografií z praktického hlediska za optimální.

V 90. letech vyšla studie (Niklas, 1994), podle níž nelze pozorované řasy odlišit od modelovaných izometrických objektů (alespoň co se vztahu povrchu a objemu týče). S touto studií si na základě svých výsledků dovoluji nesouhlasit. Ke stejnému závěru samozřejmě došlo

několik autorů přede mnou (např. Neustupa, 2016; Reynolds, 2006; Woodard et al., 2016). Studie potvrzují, že zvětšování povrchu může sloužit jako mechanismus kompenzující nároky rostoucí biomasy (Bestová et al., 2021).

V této práci se u všech 11 druhů potvrdila výrazně pozitivní alometrie. Větší jedinci daných druhů tedy zpravidla mají složitější tvar. Nejen to, ale stejný, velmi signifikantní trend lze pozorovat i na mezidruhové úrovni (Obrázek 10). Možnou interpretací je, že tlaky působící na vývoj jednotlivých druhů byl konstantně přítomné během evoluce celé linie. Zatímco škálovací exponent většiny druhů se pohybuje kolem 1,5, u dvou druhů, *E. insigne* a *E. pinnatum*, je o něco menší – zhruba 1,0 (Tabulka 7: Statistické parametry lineárních modelů.. Nejsm si vědom faktoru, který by s tímto jevem koreloval – jedná se o druhy různé velikosti, morfologie i místa odběru. Podobně u třech druhů (*E. insigne*, *E. oblongum* a *E. sinuosum*) vykazuje daný model výrazně nižší korelační koeficient než u zbytku druhů, bez jasného odlišujícího faktoru. Je možné, že tyto jevy lze vysvětlit například fylogeneticky, bohužel, jak je zmíněno v teoretickém úvodu, vnitřní struktura rodu *Euastrum* není zcela vyřešená a u řady druhů nejsou k dispozici žádná molekulární data. Určitý vhled by do této situace mohlo vnést zahrnutí více populací od každého druhu, které by pomohlo filtrovat vlivy jako například lokální podmínky a obecněji vliv vnitrodruhové variability.

Ve studii Neustupy (Neustupa, 2016), na kterou tato práce částečně navazuje, několik druhů z rodu *Micrasterias* dosahovalo izometrie či dokonce negativní alometrie, jejich povrch se tedy se zvyšujícím se objemem stává méně komplexním. Jedná se především o druh *M. ralfsii*, který má téměř nečleněný povrch. V mé práci se žádný druh takto nevychyloval. Je možné, že v linii „core“ *Euastrum* jsou škálovací exponenty více konzervované než v linii *Micrasterias*. Na potvrzení této hypotézy je však potřeba více dat.

Oligotrofní prostředí, ve kterém se krásivky vyskytují, pravděpodobně představuje důležitý tlak na zvyšování komplexity povrchu velkých buněk. Není známo, že by čelily požití zooplanktonem, a vzhledem ke svému bentickému výskytu se nepotřebují udržet ve vodním sloupci (Brook, 1981). Zároveň je možné, že v širším měřítku existuje i opačný tlak na méně složité povrchy menších buněk – na malou buňku se jednoduše vejde méně ornamentů.

Zajímavou otázkou je, zda jsou škálovací exponenty druhově pevně dané, nebo jestli mohou být ovlivněny prostředím během vývoje. Předchozí studie na linii *Micrasterias* (Neustupa, 2016) nasvědčují tomu, že v rámci jednoho druhu mohou populace dosahovat různých

škálovacích exponentů. Chybí však studie, které by zkoumaly vliv konkrétních faktorů na statickou alometrii krásivek, či který by koreloval škálovací exponenty s jejich rozšířením.

4.2 Ontogenetická část

Je vhodné podotknout, že tento experiment byl v určitých ohledech první svého typu. Konkrétně je to, pokud je mi známo, první pokus, který se zabývá ontogenetickou alometrií zelených řas. Naprostá většina morfometrických studií (a učebnic) se zabývá mnohobuněčnými, makroskopickými organismy či jejich orgány (např. Bookstein, 1991; Gerber et al., 2008; Klein et al., 2017). Metodika pro protistní organismy dosud není jasně stanovena, natož pokud se jedná o detailní pozorování jejich ontogeneze.

Krásivky se dělí oproti jiným mikrořasám relativně pomalu, zhruba jednou za den (Gough, 1977), ale i tak u nich nepřipadá v úvahu klasický přístup ve výzkumu ontogeneze obratlovců, a to pozorování konkrétního jedince ve stálých intervalech (např. Lammers & German, 2002; Pélabon et al., 2013). Proto jsem se rozhodl reprezentovat věk poměrem šířek rostoucí a dospělé polobuňky. Vzhledem k různým velikostem zkoumaných druhů se jedná o způsob, jak mezi nimi ulehčit porovnání. Protože u krásivek není možné odlišit pravou a levou stranu, je standardní postup landmarky symetrizovat (Neustupa, 2016).

V této části své práce jsem se potýkal s potížemi s kultivací krásivek. Kultury přeočkované z již existujících kultur se dělily bez obtíží a brzy dosáhly fáze, kdy bylo v jedné kultuře přítomno mnoho rostoucích polobuněk. U izolátů z přírodních vzorků se mi této fáze však málokdy podařilo dosáhnout. Vesměš šlo buď o problém nedostatečného růstu, kdy se izolovaná buňka nezačala dělit a toto stádium nikdy nenastalo, nebo naopak příliš rychlého růstu, kdy se buňka dělila úspěšně, ale období exponenciálního růstu jsem promeškal, a pozoroval jsem pouze zcela dospělé polobuňky. Ani opakovaným přeočkováním se mi nepodařilo dělení opětovně navodit. V druhém případě by se problému dalo vyhnout častější kontrolou kultur. To jsem aplikoval, a u nadcházejících pokusů jsem zvýšil frekvenci pozorování. Druh, u kterého tento problém nastal (*M. rotata*), se mi již zpracovat nepodařilo, ale u jiného druhu se tato komplikace neopakovala.

V případě nerostoucích buněk může být důvodů několik. Vzhledem k úspěšnému růstu jiných kultur jsem jako příčinu neúspěchu vyloučil hrubou chybu při přípravě média. Pokud k nějaké došlo, muselo by se jednat o faktor ovlivňující pouze určité druhy krásivek, které však běžně žijí ve stejných podmínkách jako ostatní, rostoucí druhy. Oproti běžně používanému receptu na DY V médium jsem použil MES, což je pufr, který udržuje kyselější pH přirozené

pro rašeliništní druhy. Zatímco nedodržení některého druhově specifického nároku nelze vyloučit zcela, nepovažuji jej za pravděpodobné. Stejně tak ostatní kultivační podmínky, především teplota a světelný režim, se zdají být pro ostatní kultury bezproblémové.

Mou hlavní teorií důvodu nedostatečného růstu je původ kultur. O kultivaci jsem se pokoušel na přelomu podzimu a zimy, přičemž krásivky dosahují nejvyšší abundance v létě při vyšších teplotách (Canter & Lund, 1966). Buňky odebrané v chladnějších měsících mohou být méně ochotné se dělit, a přesun do teplejšího média pro ně mohl představovat další šok. Krásivek navíc nebylo v přírodních vzorcích mnoho, a namísto na pohled zdravých a životaschopných jedinců jsem byl v některých případech nucen izolovat suboptimální exempláře. V případných nadcházejících kultivačních experimentech bych tedy doporučil buď práci s dlouhodobě udržovanými kulturami z řasových sbírek, nebo, v případě izolace vlastních kultur, odebrání přírodních vzorků během vegetačního období krásivek.

Co se týče výběru landmarků, je, jak jsem zmiňoval, naprosto kritické, aby byly umístěny ve strukturně homologních pozicích. V případě krásivek je nasnadě využít zářezů a laloků. Druhy rodu *Micrasterias* jsou však výrazně více členěné, než *E. humerosum*. To má dva následky: zaprvé, počet landmarků je omezen strukturami, které jsou přítomné u všech druhů, včetně méně komplexního euastra. Studie Neustupy (Neustupa, 2016), ve které jsou zahrnuty pouze druhy rodu *Micrasterias*, může pracovat s 21 landmarky, zatímco moje práce pouze s 11. Zadruhé, struktury se na různých druzích objevují v různých fázích vývoje. *Euastrum*, jehož zářezy jsou méně výrazné, začíná vykazovat stopy členění výrazně později v ontogenezi než *Micrasterias*. Bylo by možné najít více homologních landmarků, které by se ale u euastra objevily tak pozdě v ontogenezi, že bych je mohl umístit pouze na téměř hotové buňky, což jde přímo proti konceptu ontogenetické alometrie. V tabulce (Tabulka 6) vidíme, že nejmenší polobuňka *E. humerosum*, na které jsem byl schopen najít homologní body, měla šířku zhruba 60 % dospělé polobuňky, zatímco u micrasteriasů bylo možné body najít i u výrazně menších polobuněk. Tento fakt vede k nepoměrně dlouhým alometrickým trajektoriím u jednotlivých druhů. Regresní model *E. humerosum* vysvětluje pouze 15 % pozorované variability (Tabulka 8), výrazně méně než u jiných druhů, k čemuž může přispívat právě menší velikostní variabilita pozorovaných polobuněk. Pokud bychom chtěli popsat více variability, bylo by možné buď pracovat na úrovni mezirodové statické alometrie, nebo se zaměřit na užší fylogenetickou skupinu. V obou případech by bylo možné použít vyšší množství homologních landmarků na podobně dlouhých alometrických trajektoriích.

Původní plán práce počítal s možností odběru většího počtu druhů z přírodních lokalit v zahraničí, což ovšem kvůli pandemickým opatřením nebylo vždy proveditelné. Společně s výše zmíněnými kultivačními problémy to znamenalo, že jsem při studiu ontogenetické alometrie pracoval s poněkud redukováným počtem druhů. Originální záměr by byl schopen poskytnout více informací o struktuře alometrického prostoru.

Ačkoliv jsem si vědom možných zlepšení, dosáhl jsem, doufám, hodnotných výsledků. Podařilo se mi popsat ontogenetické změny vybraných krásivek a následně je mezidruhově porovnat. Regresní modely jsou signifikantní (Tabulka 8) a je dobře vidět (Obrázky 22 - 25), ve kterých oblastech dochází k největším změnám. K největším změnám dochází v oblasti polárního laloku (LM 5, 6, 7) a vrcholu laterálního laloku nejbližší k isthmu (LM 2, 11). Jedná se o oblasti, které v cytomorfologickém procesu vznikají nejpозději ze všech zkoumaných. Dává tedy smysl, že se během ontogeneze stihnou změnit nejvíce. Stojí za povšimnutí, že díky symetrizaci se landmark 6 pohybuje pouze po ose y, nikoliv po ose x.

V alometrickém prostoru (Obrázek 26) zřetelně odlišuje *M. thomasiانا* od ostatních tří druhů. Při důkladnějším pohledu na vektory změny (Obrázky 22 - 25) je to způsobeno zřejmě vlivem landmarků 5, 6 a 7. Je překvapivé, že tímto outlierem je *M. thomasiانا*, a ne morfologicky i fylogeneticky odlišnější *E. humerosum*. Naznačuje to, že k podobné finální morfologii nemusí vést vždy stejná cesta, a naopak různé morfologie mohou vznikat podobně.

Z takto malého vzorku nelze vyvádět jednoznačné závěry. Uspořádání alometrického prostoru nevyklučuje fylogenetickou konzervovanost, ale zároveň ji ani jasně nenaznačuje. K detailní interpretaci by bylo třeba důkladnější fylogenetické studie.

5 Závěr

V této diplomové práci jsem pracoval s přírodními vzorky druhů z rodu *Euastrum*, na kterých jsem sledoval vztah velikosti a délky obvodu. Pracoval jsem také s klonálními kulturami druhů z rodů *Micrasterias* a *Euastrum*, na nichž jsem zkoumal změny tvaru polobuněk během jejich ontogeneze.

Ukázalo se, že u všech zkoumaných druhů rodu *Euastrum* mají větší jedinci delší, a tím pádem složitější obvody. Tento trend je vidět i napříč druhy a vysvětluje naprostou většinu pozorované variability. Tyto výsledky interpretuji tak, že delší obvod implikuje větší povrch, a větší povrch umožňuje výživu větší buňky. Jedná se o výsledky v souladu s dosavadní literaturou, avšak na dříve nezkoumané linii.

V druhé části se mi podařilo popsat tvarovou variabilitu vyvíjejících se polobuněk pomocí geometrické morfometriky. Tuto variabilitu jsem vztahoval k velikosti polobuňky, jíž jsem reprezentoval její ontogenetické stádium. Sestrojil jsem alometrický prostor, který ukazuje příbuznost ontogenetických změn tvaru mezi druhy. Kvůli nízkému počtu exponenciálně rostoucích kultur, a tedy zahrnutých druhů, jsem z této části nevyvodil závěry o evoluční fixovanosti ontogenetické alometrie. Podařilo se mi však úspěšně zpracovat 4 druhy a tím ukázat, že použitou metodu lze aplikovat na výzkum morfologických změn jednobuněčných řas během jejich ontogeneze.

Zjistil jsem však, že geometricko morfometrický výzkum řas je relativně nezmapované pole. Své výsledky jsem měl jen s máločím diskutovat, neboť podobných studií je nemnoho, a v literatuře často chybí i zdánlivě základní poznatky, například vliv environmentálních faktorů na alometrické vztahy či evoluční historie modelových linií. Během zpracování tohoto tématu mě napadlo mnoho otázek – mohou buňky například měnit průběh své ontogeneze v reakci na okolní podmínky? Jak se liší alometrické vztahy jednotlivých buněk, kolonií a mnohobuněčných organismů v rámci jedné linie? Na ně v tuto chvíli nedokážu odpovědět, to ovšem nebylo mezi cíli této práce. Ty věřím, že byly splněny.

6 Literatura

- Bestová, H., Segrestin, J., von Schwartzberg, K., Škaloud, P., Lenormand, T., & Violle, C. (2021). Biological scaling in green algae: the role of cell size and geometry. *Scientific Reports*, 11(1).
- Blackburn, S. I., & Tyler, P. A. (1981). Sexual Reproduction in Desmids with Special Reference to *Micrasterias thomasiana* var. *notata* (Nordst.) Grönblad. *British Phycological Journal*, 16(3), 217–229.
- Blackith, R. E., & Reyment, R. A. (1971). *Multivariate Morphometrics*. Academic Press.
- Bookstein, F. L. (1991). *Morphometric Tools for Landmark Data*. Cambridge University Press.
- Bookstein, F., Schäfer, K., Prossinger, H., Seidler, H., Fieder, M., Stringer, C., Weber, G. W., Arsuaga, J.-L., Slice, D. E., Rohlf, F. J., Recheis, W., Mariam, A. J., Marcus, L. W., Recheis, W., Mariam, A. J., & Marcus, L. F. (1999). Comparing Frontal Cranial Profiles in Archaic and Modern Homo by Morphometric Analysis. *The Anatomical Record*, 257(6), 217–224.
- Brook, A. J. (1981). *The Biology of Desmids*. Blackwell Scientific Publications.
- Brusatte, S. L., Sakamoto, M., Montanari, S., & Harcourt Smith, W. E. H. (2012). The evolution of cranial form and function in theropod dinosaurs: Insights from geometric morphometrics. *Journal of Evolutionary Biology*, 25(2), 365–377.
- Canter, H. M., & Lund, J. W. G. (1966). The periodicity of planktonic desmids in Windermere, England. *SIL Proceedings, 1922-2010*, 16(1), 163–172.
- Coesel, P. F. M. (1982). Structural Characteristics and Adaptations of Desmid Communities. *Source: Journal of Ecology*, 70(1), 163–177.
- Coesel, P. F. M., & Meesters, K. J. (2007). *Desmids of the lowlands: Mesotaeniaceae and Desmidiaceae of the European lowlands*. Brill.
- Esquerré, D., Sherratt, E., & Keogh, J. S. (2017). Evolution of extreme ontogenetic allometric diversity and heterochrony in pythons, a clade of giant and dwarf snakes. *Evolution*, 71(12), 2829–2844.
- Gerber, S., Eble, G. J., & Neige, P. (2008). Allometric space and allometric disparity: A developmental perspective in the macroevolutionary analysis of morphological disparity. *Evolution*, 62(6), 1450–1457.
- 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(2), 253–267.
- Gough, S. B. (1977). The Growth of Selected Desmid (Desmidiales, Chlorophyta) Taxa at Different Calcium and pH Levels. *American Journal of Botany*, 64(10), 1297–1299.
- Gould, S. J. (1966). Allometry and size in ontogeny and phylogeny. *Biological Reviews*, 41, 587–640.
- Grover, J. P. (1989). Influence of Cell Shape and Size on Algal Competitive Ability. *Journal of Phycology*, 25, 402–405.

- Gunz, P., & Mitteroecker, P. (2013). Semilandmarks: A method for quantifying curves and surfaces. *Hystrix*, 24(1).
- Hammer, D. A. T., Ryan, P. D., Hammer, Ø., & Harper, D. A. T. (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. In *Palaeontologia Electronica* (Vol. 4, Issue 1). <http://palaeo-electronica.org>http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.
- Hepler, P. K., & Winship, L. J. (2010). Calcium at the cell wall-cytoplasm interface. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(2), 147–160.
- Huxley, J. S. (1932). *Problems of Relative Growth*. The Dial Press.
- Huxley, J. S., & Teissier, G. (1936). Terminology of Relative Growth. *Nature*, 137, 780–781.
- Klein, A., Ghosh, S. S., Bao, F. S., Giard, J., Häme, Y., Stavsky, E., Lee, N., Rossa, B., Reuter, M., Chaibub Neto, E., & Keshavan, A. (2017). Mindboggling morphometry of human brains. *PLoS Computational Biology*, 13(2).
- Klingenberg, C. P. (1996). Multivariate Allometry. In *Advances in morphometrics* (pp. 23–49).
- Lammers, A. R., & German, R. Z. (2002). Ontogenetic allometry in the locomotor skeleton of specialized half-bounding mammals. *Journal of Zoology*, 258(4), 485–495.
- Lewis, W. M. (1976). Surface/Volume Ratio: Implications for Phytoplankton Morphology. *Science*, 192.
- Lütz-Meindl, U., & Brosch-Salomon, S. (2000). Cell wall secretion in the green alga *Micrasterias*. *Journal of Microscopy*, 198(3), 208–217.
- Mazaharally, M., Stojanovski, S., Trossman, R., Szulc-Lerch, K., Chakravarty, M. M., Colella, B., Glazer, J., E. Green, R., & Wheeler, A. L. (2022). Patterns of change in cortical morphometry following traumatic brain injury in adults. *Human Brain Mapping*, 43(6), 1882–1894.
- Meindl, U. (1982). Local Accumulation of Membrane-Associated Calcium According to Cell Pattern Formation in *Micrasterias denticulata*, Visualized by Chlorotetracycline Fluorescence Brief Report. *Protoplasma*, 110, 143–146.
- Meindl, U. (1993). *Micrasterias* Cells as a Model System for Research on Morphogenesis. *Microbiological Reviews*, 57(2), 415–433.
- Neustupa, J. (2013). Patterns of symmetric and asymmetric morphological variation in unicellular green microalgae of the genus *Micrasterias* (Desmidiaceae, Viridiplantae). *Fottea*, 13(1), 53–63.
- Neustupa, J. (2016). Static allometry of unicellular green algae: Scaling of cellular surface area and volume in the genus *Micrasterias* (Desmidiaceae). *Journal of Evolutionary Biology*, 29(2), 292–305.
- Neustupa, J., Černá, K., & Št'astný, J. (2011). The effects of aperiodic desiccation on the diversity of benthic desmid assemblages in a lowland peat bog. *Biodiversity and Conservation*, 20(8), 1695–1711.
- Niklas, K. J. (1994). Size-Dependent Variations in Plant Growth Rates and the. *Source: American Journal of Botany*, 81(2), 134–144.

- Okie, J. G. (2013). General models for the spectra of surface area scaling strategies of cells and organisms: Fractality, geometric dissimilitude, and internalization. *American Naturalist*, *181*(3), 421–439.
- Pélabon, C., Bolstad, G. H., Egset, C. K., Cheverud, J. M., Pavlicev, M., & Rosenqvist, G. (2013). On the relationship between ontogenetic and static allometry. *American Naturalist*, *181*(2), 195–212.
- R Core Team. (2021). *R: A language and environment for statistical computing*. <https://www.R-project.org/>
- Reynolds, C. (2006). *Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press.
- Rohlf, F. J. (2015). *TPS Series*. SB Morphometrics. <http://www.sbmorphometrics.org/>
- Rohlf, F. J., & Slice, D. (1990). Extensions of the Procrustes Method for the Optimal Superimposition of Landmarks. *Systematic Zoology*, *39*(1), 40–59.
- Ruttner, F. (1953). *Fundamentals of Limnology*. University of Toronto Press.
- Růžička, J. (1981). *Die Desmidiaceen Mitteleuropas, Band 1*. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung.
- Škaloud, P., Nemjová, K., Veselá, J., Černá, K., & Neustupa, J. (2011). A multilocus phylogeny of the desmid genus *Micrasterias* (Streptophyta): Evidence for the accelerated rate of morphological evolution in protists. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *61*(3), 933–943.
- Thompson, D. W. (1942). *On Growth and Form*. Cambridge University Press.
- van Valen, L. (1962). A Study of Fluctuating Asymmetry. *Evolution*, *16*(2), 125–142.
- Warton, D. I., Wright, I. J., Falster, D. S., & Westoby, M. (2006). Bivariate line-fitting methods for allometry. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *81*(2), 259–291.
- Williams, O. J., Beckett, R. E., & Maxwell, D. L. (2016). Marine phytoplankton preservation with Lugol's: a comparison of solutions. *Journal of Applied Phycology*, *28*(3), 1705–1712.
- Woelfl, S., & Whitton, B. A. (2000). Sampling, preservation and quantification of biological samples from highly acidic environments (pH ≤ 3). *Hydrobiologia*, *433*, 173–180.
- Woodard, K., Kulichová, J., Poláčková, T., & Neustupa, J. (2016). Morphometric allometry of representatives of three naviculoid genera throughout their life cycle. *Diatom Research*, *31*(3), 231–242.
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., & Sheets, H. D. (2012). *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer*. Academic Press.