

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BOTANIKY

studijní program: Biologie
studijní obor: Botanika



Bc. Markéta Fialová

EKOLOGICKÝ POHLED NA MORFOLOGII ROZSIVEK

An ecological perspective on the morphology of diatoms

Diplomová práce

školicelka: Mgr. Jana Kulichová, Ph.D.

Praha 2013

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

Markéta Fialová, v Praze dne 14. srpna 2013

Poděkování

Ráda bych poděkovala především své školitelce Janě Kulichové za odborné vedení, ochotu, podnětné diskuze a cenné rady, které mi poskytla v průběhu studia a psaní diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Petře Mutinové za zapůjčení některých trvalých preparátů a všestrannou pomoc. Honzovi děkuji za asistenci v terénu a připomínky k práci, Janě Kreidlové, Tereze Poláčkové, Aničce Štifterové a Yvonne Němcové za ochotu při zodpovídání statistických dotazů. Tereze Ševčíkové děkuji za milou společnost v laboratoři při určování rozsivek. Velice si také cením podpory a důvěry rodiny. Děkuji!

Abstrakt

Tradiční druhový koncept rozsivek je založen na morfologických znacích jejich křemičitých schránek. Multidisciplinární přístup k vymezení druhů rozsivek umožnil objevení skryté diverzity tradičně definovaných druhů. Nově rozpoznané druhy jsou ale značně morfologicky variabilní a pouhým okem nerozlišitelné. Z dostupných studií bylo zjištěno, že jednotlivé morfotypy vykazují rozdílné ekologické preference. Tato práce se zabývá otázkou, zda morfologie přírodních populací rozsivek druhového komplexu *Frustulia rhomboides*, který zahrnuje více tradičních i kryptických druhů, odráží působení podmínek prostředí. Pomocí landmarkových metod geometrické morfometrie byla analyzována tvarová variabilita schránek zástupců tohoto druhového komplexu v různých rašeliništních biotopech na území ČR. Byly měřeny vybrané parametry prostředí a zjišťováno druhové složení rozsivkových společenstev ve vzorcích. Tato data byla použita při analýze vztahů mezi tvarovou variabilitou buněk v rámci komplexu a podmínkami prostředí. Analýzy odhalily hlavní trendy morfologické variability, které souvisejí s různými podmínkami prostředí. V rámci druhového komplexu *F. rhomboides* byly objeveny dva morfotypy charakteristické pro odlišné typy biotopu. Ukázalo se, že typ lokality a pH mají signifikantní vliv na morfologii modelového organismu i na strukturu bentických rašeliništních společenstev rozsivek. Tyto výsledky by mohly sloužit jako vodítko pro využití tvaru přírodních populací v aplikované ekologii.

Klíčová slova:

Bacillariophyceae, *Frustulia rhomboides*, geometrická morfometrie, morfologická variabilita, rašeliniště, rozsivky

Abstract

A traditional species concept of diatoms is based on morphological characters of their siliceous boxes. A multidisciplinary approach to defining species of diatoms has revealed the hidden diversity within the traditionally defined species. But the newly recognized species are morphologically variable and indistinguishable by the naked eye. Recent studies showed that different morphotypes show different ecological preferences. This master thesis focuses on the morphology of natural populations of the diatom species complex *Frustulia rhomboides* which contains both the traditional and the cryptic species, and it engages how the morphology reflects the effects of environmental conditions. Landmark methods of geometric morphometrics were used in order to analyze the morphological variability of diatom frustules of this species complex within various peat bog habitats in the Czech Republic. Selected environmental parameters were measured and the species composition of diatom communities present in the samples was investigated. These data were used to analyze the relationship between the environmental conditions and the cell shape variability within the complex. The analysis revealed the main trends of morphological variability related to different environmental conditions. Two morphotypes characteristic for different types of habitat were discovered within the *F. rhomboides* species complex. It appeared that the type of location and pH have a significant effect on the morphology of the model organism and influence the structure of peat benthic diatom communities. These results could help with using of the shape of natural populations in applied ecology.

Key words:

Bacillariophyceae, diatoms, *Frustulia rhomboides*, geometric morphometrics, morphological variability, peat bogs

Obsah

1 Úvod.....	7
1.1 Modelový organismus	8
1.2 Ekologické preference rozsivek.....	10
1.3 Morfologická variabilita rozsivek	11
1.4 Cíle práce	14
2 Charakteristika studovaného území	15
2.1 Rašeliniště.....	15
2.2 Lokality.....	15
3 Materiál a metody.....	21
3.1 Metodika odběrů a zpracování vzorků	21
3.2 Geometrická morfometrika.....	22
3.3 Analýza dat	24
4 Výsledky.....	29
4.1 Analýza tvarové variability <i>F. rhomboides</i>	29
4.2 Analýza velikosti <i>F. rhomboides</i>	32
4.3 Vztah tvaru <i>F. rhomboides</i> a parametrů prostředí	34
4.4 Společenstva rozsivek.....	36
4.5 Vztah společenstev rozsivek a tvaru <i>F. rhomboides</i>	39
5 Diskuze.....	41
5.1 Morfologická variabilita <i>F. rhomboides</i>	41
5.2 Společenstva rozsivek.....	46
6 Závěr.....	49
7 Literatura	50
8 Přílohy	58

1 Úvod

Rozsivky (Bacillariophyceae) tvoří diverzifikovanou skupinu jednobuněčných nebo koloniálních autotrofních protistních organismů. Znamé jsou především kvůli jejich nesčetnému množství úchvatných, geometrických tvarů buněk a složitě ornamentované křemičité buněčné stěně zvané frustula (Alverson 2008). Mají komplexní diplontní životní cyklus zahrnující netypické dělení (Amato et al. 2005). Rozsivky jsou rozšířené po celém světě a vyskytují se téměř ve všech typech vodních ekosystémů, některé druhy jsou subaerické. Jejich křemičité schránky jsou často využívány jako bioindikátory ekologického stavu vod (Potapova & Charles 2002, Smol & Stoermer 2010).

Úvod do systematiky rozsivek

Navzdory tomu, že jsou rozsivky z velké míry probádanou skupinou organismů a mají široké využití a globální význam, jejich taxonomie je problematická (Mann 1999). Díky rozmanité morfologii křemičitých frustul byla klasifikace rozsivek od počátku založena na tradičním morfologickém druhovém konceptu¹. Vzestup technologie ve druhé polovině 20. století umožnil diatomologům proniknout do zákulisí komplexní morfologie frustul a otevřel tak cestu specifitějším definicím při vymezení taxonů založených na popisech mikrostruktur, které jsou ve světelném mikroskopu neviditelné. Drobnohled skenovacího elektronového mikroskopu přispěl k objevování variability v ultrastrukturních znacích (Battarbee et al. 2002). Vznikalo větší množství morfometrických dat (délky a šířky různých valvárních struktur, počty otvorů a strií na schránce atd.), jejichž objektivní hodnocení umožnilo zavedení mnohorozměrných statistických analýz do studií zaměřených na výzkum rozsivek. Tradiční morfometrika, založená na kvantifikaci těchto morfometrických dat, se podílela na objevení mnoha dříve nepopsaných taxonů (Alverson 2008). Tento vývoj druhového konceptu se však záhy zkomplikoval.

Recentní důkazy molekulárních metod a křížících experimentů způsobily revoluci v tradičním pojetí morfologicky definovaných druhů a přispěly k objevení mnoha heterogenních komplexů v rámci tradičních druhů obsahujících jednotlivé biologické

¹tradiční morfologický druhový koncept rozsivek (odv. termín „tradiční druhy“) – založený na vizuální identifikaci schránek podle tvaru, velikosti a struktury valvy

entity, které by mohly být považovány za (semi/pseudo) kryptické druhy² (Mann et al. 2004, Créach et al. 2006, Alverson 2008, Pouličková et al. 2008, Vanormelingen et al. 2008, Trobajo et al. 2009, Pouličková et al. 2010). Ačkoli nám tento vývoj přiblížil reálnou přirozenou klasifikaci rozsivek, přinesl zároveň mnoho problémů souvisejících s nomenklatorickými změnami již zažitých tradičních druhů (Battarbee et al. 2002).

Definice tradičně (morfologicky) vymezených druhů mnohdy neodpovídají taxonům uvnitř druhových komplexů³, resp. na základě konzervativních morfologických definic v určovací literatuře není možné rozlišit taxony v rámci druhového komplexu (Kociolek & Stoermer 2010, Veselá et al. 2012). Tento problém výrazně prohlubuje spjitá morfologie uvnitř druhových komplexů, je tedy velmi obtížné jednoznačně stanovit morfologické hranice mezi druhy. V určitých případech mohou jednotlivé morfotypy (ať už se jedná o jakoukoli taxonomickou jednotku) odrážet podmínky prostředí (Potapova & Hamilton 2007, viz kapitola 1.2). Pokud by u těchto nejednoznačně morfologicky definovaných druhů existovala morfologicko-ekologická korespondence, bylo by možné prakticky využívat morfotypy pro biomonitoring.

V předkládané diplomové práci je hlavní studovanou problematikou právě vztah prostředí a morfologie modelového organismu z hlediska aplikovaného výzkumu. Výskyt charakteristických morfotypů v pro ně typickém prostředí by pomohl objasnit některé ekologické otázky.

1.1 Modelový organismus

Předkládaná diplomová práce řeší vztah morfologie a ekologie na modelovém organismu *Frustulia rhomboides* (obr. 1.1). Z taxonomického hlediska lze považovat rozsivku *F. rhomboides* za druhový komplex.

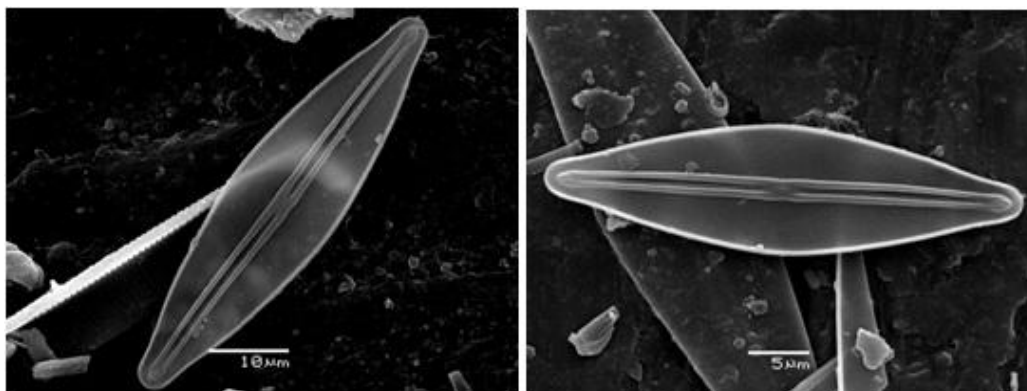
Původně stanovený druh *Frustulia rhomboides* (Ehrenberg) De Toni sensu Krammer & Lange-Bertalot (1986) zahrnoval pět nižších taxonomických jednotek: *F. rhomboides* var. *rhomboides*, *F. rhomboides* var. *saxonica* (Rabenhorst) De Toni, *F. rhomboides* var. *crassinervia* (Brebisson) Ross, *F. rhomboides* var. *amphipleuroides* (Grunow) De Toni, a *F. rhomboides* var. *viridula* (Brebisson) Cleve. Později byly tyto variety povýšeny na

²kryptické druhy – takové, které se liší geneticky, popř. fyziologicky a obvykle jsou vzájemně reprodukčně izolovány, ale nelze je jednoznačně odlišit morfologicky

³druhový komplex – skupina blízce příbuzných druhů, mezi kterými neexistují přesné hranice (ačkoli mohou být geneticky odlišné, morfologicky se obvykle překrývají)

samostatné druhy, *Frustulia krammeri* Lange-Bertalot & Metzeltin (syn. *F. rhomboides* sensu Hustedt), *Frustulia saxonica* Rabenhorst, *Frustulia crassinervia* (Brebisson) Lange-Bertalot & Krammer, *Frustulia amphipleuroides* (Grunow) Cleve-Euler, a *Frustulia erifuga* Lange-Bertalot & Krammer (Lange-Bertalot & Jahn 2000). Nejhojnějšími taxony v České republice (Veselá et al. 2012), které jsou mimochodem také celosvětově nejvíce zaznamenávané (Siver & Baskette 2004, Beier & Lange-Bertalot 2007), jsou *F. rhomboides*, *F. crassinervia* a *F. saxonica*. Zmíněné taxonomické změny a velké množství překrývajících se morfologických znaků přírodních populací z různých geografických oblastí pochopitelně způsobily komplikace v rozlišování druhů *F. krammeri* (*F. rhomboides*), *F. saxonica* a *F. crassinervia* (Siver & Baskette 2004, Veselá et al. 2012).

Tyto komplikace vedly k revizi *F. rhomboides* sensu lato, která s použitím multidisciplinárního přístupu odhalila velkou intraspecifickou variabilitu (Veselá et al. 2012). Molekulární markery detekovaly v rámci druhového komplexu 5 morfologicky se překrývajících samostatných fylogenetických linií. Bohužel tato genetická diferenciace nereflektuje morfologii tradičních druhů založenou na rozměrech a tvarových zakončení valvy podle Krammer & Lange-Bertalot (1986) či Lange-Bertalot (2001), což byl důvod volby zastaralého jména *F. rhomboides* pro morfologické druhy *F. krammeri*, *F. saxonica* a *F. crassinervia* v této diplomové práci. Důvodem volby *F. rhomboides* jako modelový organismus je relativně velká abundance v oligotrofním prostředí s nižším pH a morfologická variabilita. Detailní výzkum morfologické variability *F. rhomboides* usnadňují metody geometrické morfometrie, které se zdají být vhodným nástrojem pro kvantifikaci tvarových a velikostních nuancí rozsivek (Beszteri et al. 2005, Veselá et al. 2012). Jedním z možných vysvětlení inkongruence fylogeneze s morfologií je závislost morfologie spíše na podmínkách prostředí než na genetické podmíněnosti. Nabízí se tedy věnovat se problematické morfologii z ekologického úhlu pohledu.



Obr. 1.1: Různá morfologie modelového organismu *F. rhomboides* s. l. (SEM)

1.2 Ekologické preference rozsivek

Ekologická diferenciace tradičních morfologicky definovaných druhů

Rozsivky osidlují širokou škálu habitatů. Tradičně definované druhy jsou závislé na rozsahu a rozmanitosti stanovišť, které jsou specifické různou kombinací fyzikálních, chemických a biologických faktorů. Určitý druh se tedy obvykle vyskytuje v prostředí, které odpovídá optimálním podmínkám pro jeho růst. Důležitými fyzikálními faktory ovlivňujícími distribuci a abundanci rozsivek je např. teplota, ozáření nebo turbulence. Nejdůležitějším chemickým faktorem je pH, nicméně koncentrace živin, obsah dusíku, rozpuštěný organický materiál nebo salinita poskytují také cenné informace o rozšíření druhů. Biologické vztahy jako mutualismus, kompetice nebo parazitismus jsou faktory neméně důležité, ačkoli je obtížné je monitorovat (Round et al. 1990, Battarbee et al. 2002).

Specifický výskyt druhů vázaných na charakteristické přírodní podmínky souvisí s metodami environmentálního posuzování. Je známo, že právě rozsivky mohou sloužit jako významné bioindikátory některých ukazatelů kvality vod, např. eutrofizace a acidifikace (Smol & Stoermer 2010). Jsou proto hojně využívané v ekologickém monitoringu a paleoekologii (Battarbee et al. 2002).

Ekologie kryptických druhů

Ekologické preference (semi)kryptických druhů jsou obtížně interpretovatelné, právě protože se tyto taxony ve většině případů vyskytují sympatricky. Někdy může specifická distribuce kryptických druhů vysvětlit jejich odlišné ekologické nároky k mikrohabitatům a tudíž i vysvětlit sympatrickou přítomnost různých druhů (Kooistra et al. 2008, Pouličková et al. 2008, Vanelslander et al. 2009, Veselá et al. 2012). Bohužel ale zatím nejsou dostatečně probádané mechanismy podporující koexistenci kryptických druhů. Existují studie (Mann 1999, Rodriguez et al. 2005) vysvětlující tuto koexistenci odlišnými nároky na světlo nebo různou citlivostí k parazitickým houbám. Nicméně v určitých případech se kryptické druhy nevyznačují rozdílnou ekologií, jejich relativní abundance jsou podmíněné nejspíše náhodným driftem a disperzí (Hubbell 2001). Stále není dokonale známo, který z faktorů řídí výskyt kryptických druhů. Ideálním řešením by byl výzkum přírodních populací a interakcí vnějších faktorů v přirozeném biotopu v kombinaci s experimentálními testy. Zjistilo by se tak, jestli je variabilita ve výskytu

způsobená tolerancí environmentálních podmínek nebo jinými faktory (biotickými interakcemi, neutrálními mechanismy; Vanelander et al. 2009).

1.3 Morfologická variabilita rozsivek

Ačkoli druhová diverzita rozsivek je nyní marginálně podpořena především fylogenetickými výzkumy, tvar a ornamentace schránek jsou stále primárními znaky používanými při popisu a identifikaci druhů (Pappas & Stoermer 2003, Vartanian et al. 2009). Odlišnosti v morfologických znacích, které byly obvykle považovány za stabilní identifikační strukturu v rámci druhů, jsou využívány pro popis nových druhů (Lürling 2009). Křemičitá schránka rozsivek ale odráží odpovědi na mnoho různých vnějších faktorů a je výsledkem dynamických buněčných procesů probíhajících během určité doby (Cox 2010). Existence variability tvaru v rámci druhu vyplývá již z Mayrovy hypotézy druhového konceptu (Mayr 1942) a lze ji odůvodnit klíčovými evolučními procesy jako je adaptace a genový drift. Míra morfologické variability způsobená vnitřními (fluktuace genů) nebo vnějšími (podmínky prostředí) faktory by měla poskytovat cenné informace o robustnosti křemičité schránky a o podílu variability zachované mezi jedinci určité populace (Vartanian et al. 2009).

Morfologická variabilita během životního cyklu rozsivek

Správná identifikace rozsivek je ztížena také velkou morfologickou variabilitou během životního cyklu, která zahrnuje jak změny velikosti, tak změny celkového tvaru frustuly (Round et al. 1990). V průběhu vegetativního rozmnožování dochází u rozsivek ke zmenšování jedinců, protože po rozdělení mateřské buňky dorůstá dceřiné buňce vždy menší část frustuly. Původní velikost je obvykle obnovena sexuální fází životního cyklu zahrnující vznik unikátního typu buňky (auxospory), která nemá křemičitou schránku a je proto schopná abnormálního růstu. Uvnitř auxospory se vyvíjí velká vegetativní (iniciální) buňka (Round et al. 1990, Amato et al. 2005, Vanormelingen et al. 2008). Ačkoli výsledný tvar je striktně geneticky definovaný a informace o něm předávaná z generace na generaci, přesto dochází během ontogeneze ke změnám původní morfologie (Pappas & Stoermer 2003). S postupným zmenšováním buňky může docházet ke zkreslení nebo úplné ztrátě znaků důležitých při determinaci rozsivek a velmi malí jedinci mohou být zaměněni s příslušníky jiného druhu (Cerino et al. 2005, Rhode et al. 2001, Holmes & Reimann 1966, Veselá et al. 2009). Malé frustuly penátních rozsivek, které jsou

produkovány v konečné fázi vegetativního dělení, mají homogenní strukturu striace, narozdíl od velkých postiniciálních buněk, kde jsou strie rozprostřeny bimodálně. Frustuly jsou v průběhu zmenšování isodiametrické a kulatější a nejmenší buňky se stávají tvarově jednodušší (Round et al. 1990). Taxonomicky důležité struktury se nicméně obnoví při znovuzískání původní velikosti (po sexuálním procesu). Iniciální buňka má také specifickou morfologii, především extrémní velikost, jejíž rozsah už může spadat do definice jiného druhu.

Variabilita vznikající během životního cyklu rozsivek do jisté míry souvisí také s morfogenezí schránek (intracelulární tvorbou vlastního křemičitého aparátu). Tato příčina variability může vznikat kombinací vnějších i vnitřních faktorů. Vnitřní faktory jsou podmíněny molekulárně-chemickými procesy, jako je biomineralizace (Vartanian et al. 2009). Harold (1990) se zabýval morfogenezí mikroorganismů ve fyziologickém kontextu a shrnuje, že morfologie je vnějším vyjádřením dynamického funkčního uspořádání v buňce. Vývoj tvaru je podle něj soubor interakcí týkající se buněčné dědičnosti, biochemie, fyziologie a organizace. Morfogeneze rozsivek může být ovlivněna také vnějšími faktory, např. koncentrací křemíku v prostředí (Vartanian et al. 2009). Autoři ve studii (Vartanian et al. 2009) konstatují, že morfogeneze je robustní, ale neuniformní proces. Příkladují velkou důležitost porozumění tomuto procesu, protože výsledek morfogeneze určuje morfologický pattern schránky.

Sezónní morfologická variabilita

Změna velikosti a tvaru v čase jsou jevy u planktonních rozsivek známé už mnoho let (Bellinger 1977), nicméně v případě bentických rozsivek podobný fenomén známý prozatím není. Rozdíly ve velikosti schránek během roku souvisí s životním cyklem rozsivek a s environmentálními faktory ovlivňujícími načasování některých stadií životního cyklu. Studie (Cerino et al. 2005) demonstruje prostorový překryv výskytu různých velikostí planktonní mořské rozsivky *Pseudo-nitzschia galaxiae* a dokládá výskyt různých morfotypů v odlišných ročních obdobích. Autoři této studie pozorovali výskyt nejmenších jedinců v jarním období, výskyt středních velikostí dominoval v létě a největší buňky se objevovaly až na přelomu srpna a září. Tato období jsou charakteristická velmi odlišnými podmínkami prostředí, jako jsou teplota, stabilita vodního sloupce, dostupnost živin a světla a rozdílný výskyt fyto- a zooplanktonu. Podobných výsledků dosáhl také Bellinger (1977), který se zabýval temporální změnou velikosti a tvaru u planktonní centrické resp. penátní rozsivky *Stephanodiscus astraea*, resp. *Asterionella formosa*.

Vědci ve studii (Cerino et al. 2005) nicméně podotýkají, že růstové rychlosti, tedy proporce jednotlivých tvarů a velikostních skupin organismů během roku, mohou v přírodních podmínkách kolísat. Z evolučního hlediska může být sezónní morfologická variabilita v rámci životního cyklu rozsivek považována za optimální strategii kolonizace širokého spektra habitatů. Na druhou stranu by možná specifické morfotypy vyskytující se pouze v určitých časových intervalech mohly vést ke speciaci (Cerino et al. 2005).

Fenotypická plasticita

Důležitou roli ve variabilitě tvaru schránek rozsivek může hrát fenotypická plasticita (Mann 1999). Pravděpodobně spousta organismů může vykazovat mnoho různých morfologií, pokud jsou vystaveny odlišným environmentálním podmínkám (Lüring 2009). Schopnost genotypu vytvářet alternativní fenotyp hraje důležitou roli v evoluci. U rozsivek je takto modifikován vývoj schránky. Na základě způsobených aberací vznikají potíže při identifikaci druhů. U rozsivek může být polymorfismus a fenoplasticita občas detekována snadno, protože obě poloviny buňky vznikají v různém čase a tudíž i v mírně odlišných podmínkách (Mann 1999). Studium morfologické plasticity bývá obvykle testováno za pomoci experimentálních kultur (Harrison et al. 1977, Neustupa & Hodač 2005, Vartanian et al. 2009). V klonálních kulturách bylo zjištěno, že morfologické rysy jako tvar, struktura striace a rozměry valvy se u rozsivek mění v závislosti na teplotě, pH, salinitě nebo koncentraci živin. Ukázalo se, že fenotyp je plastický, ale plasticita má úzké limity. Kontinuální změny podmínek způsobily plynulé přechody morfologií rozsivek (Mann 1999). Experimentální studie kultur i přírodních populací komplexu druhů bentické penátní rozsivky *Sellaphora pupula* (Mann & Droop 1996) prokázaly, že minimum tvarové variability (velikost a struktura striace) má genetický základ. Příkladem extrémní fenotypové plasticity je planktonní penátní rozsivka *Phaeodactylum tricorutum* vyskytující se v brakických vodách, která může vykazovat v přírodě tři různé reverzibilní morfotypy (Borowitzka et al. 1977, Borowitzka & Volcani 1978, Tesson et al. 2009). Tyto tři morfotypy mohou představovat diferenciované ekofenotypy adaptované na odlišné podmínky prostředí (De Martino et al. 2007).

1.4 Cíle práce

Problematiku nejednoznačně definované morfologie a velké morfologické plasticity tradičních druhů rozsivek se pokoušelo objasnit několik autorů ve svých studiích (Babanazarova et al. 1996, Finlay 2004, Fenchel & Finlay 2006, Kociolek & Stoermer 2010). Je různá morfologie způsobena fenotypickou plasticitou? Nebo genetickou variabilitou? Jedná se o intraspecifickou druhovou diverzitu nebo variabilitu ve tvaru a velikosti jednoho druhu? Ačkoli by bylo prospěšné znát odpovědi na všechny tyto otázky, pro praktické studie využívající morfologii buněk jako environmentální markery nejsou tyto informace nezbytně důležité (Potapova & Hamilton 2007).

Předložená diplomová práce se podobně zabývá aplikovatelným morfologicko-ekologickým vztahem přírodních populací druhového komplexu *F. rhomboides* zahrnujícího více tradičních druhů (*F. crassinervia* a *F. saxonica*) a zároveň více geneticky odlišených linií (Veselá et al. 2012). Tento vztah pojímá působení faktorů prostředí (env. parametrů a biotopu) a vliv sezóny (ontogeneze a env. parametrů měnících se v čase) na morfologii schránek modelového organismu. Sezónní morfologická variabilita prokázaná u některých planktonních rozsivek (viz kapitola 1.3) mě vedla k průzkumu tohoto jevu u bentických penátních rozsivek. Pokud by se ukázalo, že vliv času na jejich morfologii je signifikantní, pak by bylo otázkou, zda má časová heterogenita větší vliv než prostorová. Protože společenstva rozsivek jako celek citlivě reagují na abiotické podmínky prostředí, vyvstala otázka, zda by mohl existovat vztah mezi jejich druhovým složením a variabilitou schránek komplexu *F. rhomboides*.

Cíle práce lze tedy shrnout do několika otázek:

- 1) Mění se tvar a velikost druhového komplexu *F. rhomboides* významným způsobem během roku, tj. lze detekovat změny v morfologii populací související s životním cyklem?
- 2) Jaké jsou morfologické trendy tohoto komplexu mezi lokalitami různého a stejného typu biotopů v různých geografických vzdálenostech?
- 3) Jaké environmentální faktory mají na tvarovou a velikostní různorodost vliv, existuje vztah mezi morfologií a ekologií modelového druhového komplexu?
- 4) Odpovídá složení rozsivkových společenstev na lokalitách morfologické variabilitě modelového organismu?

2 Charakteristika studovaného území

2.1 Rašeliniště

Ve vlhkém temperátním klimatu s nadbytkem srážek, nedostatečnou evaporací a pomalou dekompozicí organických zbytků může docházet ke vzniku rašeliny (Aerts et al. 1992). Vznikají tak unikátní komplexní ekosystémy představující extrémní podmínky pro život (Joosten & Clarke 2002). V našich geografických podmínkách jsou rozlišovány dva typy rašelinišť, přičemž se v přírodě může běžně vyskytovat jejich přechodná forma (přechodová rašeliniště). Prvním typem jsou ombrotrofní rašeliniště, tzv. vrchoviště, sycená výhradně na živiny chudou, srážkovou vodou rozkládající se převážně ve vyšších nadmořských výškách (Damman 1978). Dalším typem jsou minerotrofní rašeliniště, v minulosti také nazývaná slatiniště, sycená podzemní vodou, kterou se do systému dostávají minerální látky. Tyto dva základní typy rašelinišť se tedy liší primárně obsahem živin (Rydin & Jeglum 2006). Trvale zavodněné prostředí doprovázené nízkými hodnotami pH a nedostatkem dostupných živin je využíváno pouze specifickými druhy schopnými se přizpůsobit drsným podmínkám prostředí (Hájková et al. 2011). Z tohoto důvodu jsou na rašeliništích poměrně hojné masožravé rostliny jako např. rosnatka (*Drosera*), které vyrovnávají nedostatek živin alternativním živočišným příjmem. Z protistních organismů na rašeliništních biotopech tvoří dominantu mikrořasy, zejména bentické rozsivky a krásivky, které jsou v tomto prostředí velmi diverzifikované. K jejich rozmanitosti výrazně přispívá heterogenita mikrohabitátů a nízká konkurence v prostředí přirozeného výskytu. Nelze ovšem opomenout ani hojně se vyskytující krytenky, nálevníky a heterotrofní bičíkovce (Gilbert et al. 1998).

2.2 Lokality

Přehled všech lokalit, ze kterých byl odebrán materiál, je uveden na obrázku 2.1.

NPR Velký močál

Rašeliniště typicky vrchovištního typu v nadmořské výšce 910–930 m n. m. se nachází asi 3–3,5 km severovýchodně od obce Přebuz. Borovice kleč (*Pinus mugo*) tvoří neprostupný lem a dále vyplňuje suchá místa uprostřed plochy močálu. Dva vzorky jsem odebrala z

malých tůňek v centru rašeliniště vzdálených od sebe cca 50 m. Zajímavý je výskyt 3 typů rosnatek (*Drosera anglica*, *D. rotundifolia*, *D. x obovata*). Z hlediska pH je Velký močál považován za významný biotop. Jedná se o místo s velmi nízkými hodnotami pH v přirozených podmínkách (3 – 3,5), které tak vytváří specifické předpoklady pro život organismů.

PP Přebuzské vřesoviště

Původně vytěžené vrchoviště je komplex polopřirozených biotopů nacházející se severozápadně od obce Přebuz v nadmořské výšce 877-904 m n. m. (Zahradnický et al. 2004). Vzorke z této vysychavé lokality jsem odebrala ze dvou rašelinných tůní vzdálených od sebe cca 80 m. Kromě hojného vřesu obecného (*Calluna vulgaris*) zde roste např. vzácně se vyskytující borůvka bažinná (*Vaccinium uliginosum*) a bříza trpasličí (*Betula nana*).

Prameniště u Horní Blatné

Lokalita se nachází cca 1 km severovýchodním směrem od obce Horní Blatná (Karlovarský kraj) v nadmořské výšce přibližně 990 m n. m. Po pravé straně od silnice vedoucí z Horní Blatné do obce Bludná (v blízkosti turistického rozcestníku Bludná, rozc.) se v mírném svahu nacházelo prameniště. Dominantu tvořily různé druhy rašeliníků, mimo jiné např. *Sphagnum rubellum*.

NPR Břehyně-Pecopala (jižní část)

Lokalita se nachází cca 3 km severovýchodně od města Doksy a její nadmořská výška se pohybuje okolo 300 m n. m. Břehyňský rybník je součástí rezervace pro ojedinělé slatinné, rákosinné a vysokoostřicové porosty. Při budování rybníka došlo ke zdvihu vodní hladiny, což vedlo k oddálení zazemňovacího procesu a ke vzniku či rozšíření rašelinění (Natura 2000). V severovýchodní části Břehyňského rybníka se rozprostírá mineralizované rašeliniště, ze kterého pochází 2 vzorky.

NPP Swamp

Rezervace zajišťuje ochranu reliktního rašeliniště, které kdysi pokrývalo celé území dnešního Máchova jezera. NPP Swamp leží na písčítých náplavech s nízkou vrstvou humolitu. Jedná se o rašeliniště s četnými jezírky s kriticky ohroženými druhy rostlin. Chráněné území na východním cípu jezera ve výšce 265 m n. m. je významnou algologickou

lokalitou. Již v první polovině 20. století zde bylo popsáno několik nových druhů chrysofytních a xanthofytních řas německým algologem A. Pascherem. Lokalita je známá výskytem několika vzácných druhů třídy Synurophyceae. Z důvodu zdejší neobvyklé diverzity krásivek je lokalita navrhována jako jedna z nejdůležitějších ve střední a východní Evropě (Šťastný 2009, Šťastný 2010, Neustupa et al. 2011). Na lokalitě byly nalezeny a nově popsány také zástupci některých vzácných penátních rozsivek (Stojanovski & Kalina 1989). Své vzorky jsem odebírala ze dvou poměrně odlišných částí chráněného území. První odběrové místo bylo stanoveno v severní části rašeliniště rozkládajícího se na jihovýchodním cípu jezera, které je od jezera odděleno úzkou hrázkou zabraňující eutrofizaci oligotrofních, silně kyselých vod Swampu. Hojný je zde výskyt leknínových tůněk. V jihovýchodní části rašeliniště jsem odebrala druhý vzorek. Zdejší rašeliniště se nachází v blízkosti přítoku Máchova jezera, Břežňanského potoka. Parametry prostředí na obou místech se velmi lišily.

Z důvodu sledování sezónních morfologických změn modelového organismu v rámci lokality byla stanovena na NPP Swampu dvě odběrová místa (obr. 2.2), která se však geograficky mírně liší od již zmíněných míst jednorázového odběru. Jednoletý sezónní výzkum probíhal na rašeliništi rozkládajícím se na severním cípu Máchova jezera u Starých Splavů nedaleko autokempu Andrea (místo 5). Tato velmi cenná část NPP se pyšní výskytem jezírek s kriticky ohroženou hrotnosemenkou hnědou (*Rhynchospora fusca*). Dále pak sezónní odběry probíhaly na rašeliništi ve východním cípu jezera (místo 3).

Rašeliniště u Mariánského rybníka

Lokalita se nachází cca 400 m východně od obce Obora (Doksy, okres Česká Lípa) přibližně 275 m n. m. V oligomesotrofním Mariánském rybníku dominovaly obrněnky rodu *Ceratium*. Na severním břehu rybníka mezi vegetací byl odebrán první vzorek. Na východním cípu rybníka se nachází přilehlé rašeliniště, které bylo mineralizováno přítokem. Zde byl odebrán druhý vzorek.

PP Rašeliniště Černého rybníka

Přírodní památka se nachází cca 1,5 km jižně od obce Hamr na Jezeře ve výšce 350-379 m n. m. Chráněné území plynule přechází z litorálu Černého rybníka v minerotrofní rašeliniště na jeho jižní části. První odběr jsem prováděla v eutrofnější části rašeliniště v blízkosti rybníka, druhé odběrové místo jsem si stanovila asi o 80 m jižněji, v prostoru rozkládajícího se rašeliniště. Břeh rybníka je hustě porostlý orobincem (*Typha* sp.)

Následující tři lokality jsou součástí CHKO Jizerské hory. Většina rašelinišť v Jizerských horách je typická velmi nízkými hodnotami pH, které jsou částečně také způsobené znečištěním ovzduší během druhé poloviny 20. století (Štěpánková et al. 2008, Pouličková et al. 2013).

PR Rybí loučky

Přírodní rezervace je situována nedaleko obce Jizerka u česko-polské hranice. Na lokalitě pramení přítok Jizery. Vzorky byly odebrány ze dvou minerotrofních mělkých tůní.

PR Černá jezírka

Toto rašeliniště je považováno za ombrotrofní vrchoviště s dominujícím porostem rašeliníku a občasnými oligotrofními tůněmi. Ze dvou takových pocházejí mé vzorky.

PR Klečové louky

Lokalita se nachází ve výšce okolo 970 m n. m. Jedná se o ombrotrofní vrchoviště na západním úpatí hory Jizery. Charakteristické jsou husté porosty kleče a nízké hodnoty pH a konduktivity.

PR Cínovecké rašeliniště

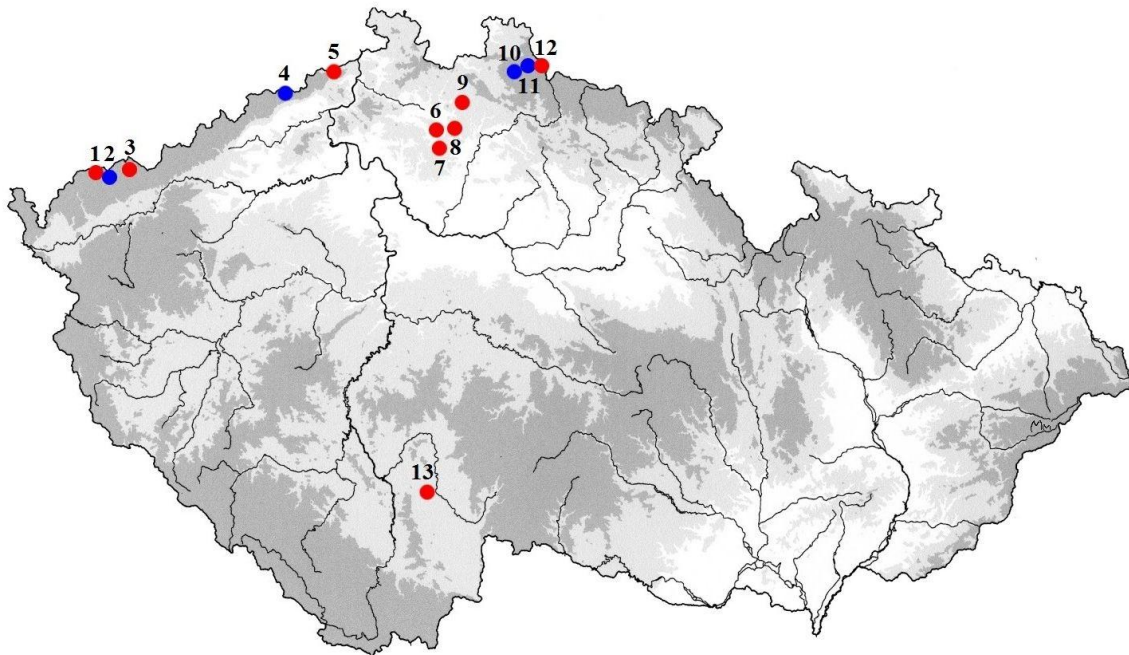
Přírodní rezervace se nachází severně od města Košťany v okrese Teplice. Na německé straně hranice navazuje chráněné území Georgenfelder Hochmoor. Rašeliniště typicky vrchovištního typu v nadmořské výšce 831-880 m n. m. představuje jeden z ohrožených ekosystémů Krušných hor. Otevřené vrchoviště je obklopeno porosty borovice rašelinné (*Pinus x pseudopumilio*) a kleče (*Pinus mugo*). Ze vzácných rostlinných druhů přítomných na lokalitě lze uvést např. rojovník bahenní (*Ledum palustre*), šichu černou (*Empetrum nigrum*) nebo břízu pýřitou (*Betula pubescens*) (Natura 2000).

Rašelinná tůňka na severozápadním okraji Ostrovského rybníka

Lokalita se nachází u obce Ostrov, vzdálené asi 1 km na sever od města Tisá (Ústecký kraj), v nadmořské výšce cca 440 m n. m. a náleží do CHKO Labské pískovce. Místo, kde jsem odebírala vzorky, se nacházelo asi 50 m od rybníka na okraji lesa. Jednalo se o silně podmáčený mineralizovaný polozastíněný biotop s hojným výskytem rašeliníku (*Sphagnum* sp.). Vzorky jsem odebrala na několika místech z rašelinných tůní, do své diplomové práce jsem ale zařadila pouze 1 vzorek z důvodu nedostatečné abundance modelového organismu v ostatních vzorcích.

PP Hliniř

Přechodové rašeliniště Hliniř, rozkládající se severozápadně od stejnojmenného rybníka a vzdálené asi 1,5 km západně od obce Ponědrážka, pravděpodobně vzniklo na vývěrech podzemní vody hlubinného oběhu na dislokacích svrchnokřídových sedimentů (Natura 2000). Nadmořská výška lokality se pohybuje okolo 422 m n. m. První vzorek jsem odebrala v ostřicových porostech s převahou ostřice zobánkaté (*Carex rostrata*) a suchopýrem úzkolistým (*Eriophorum angustifolium*) v blízkosti malé tůňky, ve které se vyskytoval kvetoucí leknín bělostný (*Nymphaea candida*). Druhý vzorek byl odebrán na okraji rašeliniště. Na obvodech jezírek roste běžně hrotnosemenka bílá (*Rhynchospora alba*).



Obr. 2.1: Mapa lokalit; modře jsou označena ombrotrofní vrchoviště, červeně minerotrofní rašeliniště; 1. PP Přebuzské vřesoviště, 2. NPR Velký močál, 3. prameniště u Horní Blatné, 4. PR Cínovecké rašeliniště, 5. rašelinná tůňka u Ostrovského rybníka, 6. NPP Swamp, 7. rašeliniště u Mariánského rybníka, 8. NPR Břehyně-Pecopala, 9. PP Rašeliniště Černého rybníka, 10. PR Klečové louky, 11. PR Černá jezírka, 12. PR Rybí loučky, 13. PP Hliniř



Obr. 2.2: Mapa sezónních odběrových míst (č. 3 a č. 5) v rámci minerotrofní lokality NPP Swamp; mapové podklady: © Geodis Brno, s.r.o.

3 Materiál a metody

3.1 Metodika odběrů a zpracování vzorků

Všechny vzorky pro tuto diplomovou práci byly odebrány z třinácti rašeliništních lokalit na území České republiky (příloha 1, obr. 2.1) za účelem výzkumu variability tvaru schránek druhového komplexu *Frustulia rhomboides*. Vzorky byly odebírány tak, aby reprezentovaly jak různé geografické oblasti Čech, tak i co nejširší spektrum biotopů (od silně kyselých ombrotrofních vrchovišť až po údolní, mírně kyselá minerotrofní slatiniště). V rámci blíže charakterizovaných třinácti lokalit (viz kapitola 2.2) byla stanovena dvě odběrová místa vzdálená od sebe od několika po desítky metrů (v případě lokality Swamp až stovky metrů). Tato odběrová místa sloužila pro analýzu vnitrolokalitové variability tvaru schránek druhového komplexu *F. rhomboides*. Na některých lokalitách (rašeliniště u Ostrovského rybníka a u Horní Blatné) byly použity buňky pouze z jednoho vzorku (= jednoho odběrového místa) z důvodu nedostatečného počtu buněk na dalších odběrových místech těchto lokalit.

Vzorky byly odebírány během let 2009-2012. Pro analýzu sezónní morfologické variability druhového komplexu *F. rhomboides* byly odebrány 4 vzorky během 1 roku pouze z lokality Swamp (na podzim a v zimě roku 2010, na jaře a v létě roku 2011) na dvou odběrových místech. Dále jsem během léta 2012 provedla jednorázový odběr 20 vzorků na jedenácti lokalitách (NPR Velký močál, NPR Břehyně-Pecopala (jižní část), NPP Swamp, PR Černá jezírka, PR Rybí loučky, PP Hliníř, PP Rašeliniště Černého rybníka, PP Přebuzské vřesoviště, Rašelinná tůňka na severozápadním okraji Ostrovského rybníka, Prameniště u Horní Blatné, Rašeliniště u Mariánského rybníka). Vlastní odběry jsem prováděla od roku 2011, vzorky z předešlých let mi byly zapůjčeny formou trvalých preparátů (zapůjčené preparáty z lokalit Klečové louky a Cínovecké rašeliniště byly do výzkumu přiřazeny posléze z důvodu nedostatku ombrotrofních rašelinišť). Odebírána byla výhradně epifytická společenstva z oligotrofních (rašeliništních) habitatů vyždímaním rašelínkové stélky. Na každém místě byl odběrový materiál fixován Lugolovým roztokem (Křisa & Prášil 1994) a v této podobě byl následně přesunut do laboratoře. V terénu byly zaznamenány parametry prostředí (pH a konduktivita) a GPS souřadnice, dále byla pořízena fotografie odběrového místa a zdokumentován typ biotopu. Měření pH a konduktivity bylo prováděno pomocí kombinovaného přístroje

(pH/konduktometru) WTW 340i (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Germany), zeměpisná poloha a nadmořská výška byla zaznamenána přístrojem Garmin e-trex legend (Taiwan).

Trvalé preparáty byly z přírodních vzorků v laboratoři vytvářeny dvěma způsoby. Přírodní vzorky byly obvykle koncentrovány sedimentací nebo centrifugací a následně mineralizovány reakcí peroxidu vodíku s dichromanem draselným (Krammer & Lange-Bertalot 1986). Z důvodu nadměrného rozlamování křemičitých schránek během chemické reakce se osvědčila také metoda zbavování organického materiálu vyžíráním nad kahanem (Battarbee et al. 2002). Očištěné křemičité frustuly rozsivek byly zafixovány do syntetické pryskyřice Naphrax (Brunel Microscopes Ltd, Wiltshire, UK), následně byly pozorovány a fotografovány ve světelném mikroskopu Olympus BX51 vybaveném digitálním fotoaparátem Olympus Z5060 (Tokyo, Japan) při zvětšení 1000x s Nomarského kontrastem. Fotografie byly upravovány v programu Adobe Photoshop CS3 Extended ver. 10.0. Schránky rozsivek byly pozorovány také ve skenovacím elektronovém mikroskopu (SEM JEOL 6380LV), kde bylo pořízeno několik ilustračních mikrofotografií (viz obr. 1.1). Aby se daly očištěné frustuly tímto způsobem pozorovat, musely být naneseny na hliníkové bločky a předem pokoveny tenkou vrstvou slitiny zlata. K identifikaci druhů rozsivek ve vzorcích byly použity určovací klíče (Krammer 2000, Lange-Bertalot 2001, Lange-Bertalot et al. 2011) a internetová databáze (Guiry & Guiry 2013). K určování cévnatých rostlin na lokalitách byla využita literatura (Kubát et al. 2002).

3.2 Geometrická morfometrika

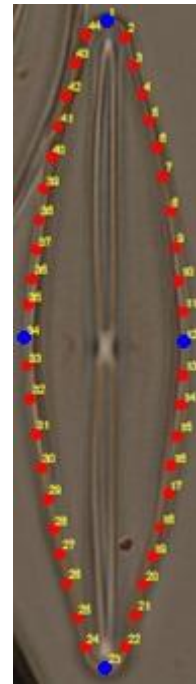
Metody geometrické morfometriky jsou v diatomologii využívány již několik let (Beszteri et al. 2005, Potapova & Hamilton 2007, Fránková et al. 2009, Pouličková et al. 2010) a jejich princip je relativně známý. Podrobnější popis těchto metod i se slovníkem termínů lze nalézt např. v pracích (Zelditch et al. 2004, Hodač 2007).

Pro vlastní analýzu morfologické variability druhového komplexu *Frustulia rhomboides* bylo náhodně vybráno vždy 30 schránek z populace (z každého vzorku resp. odběrového místa). Celkem bylo morfometricky analyzováno 960 buněk druhového komplexu *F. rhomboides*. K většině morfometrických analýz byl aplikován Thin – plate spline (TPS) software dostupný na: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>.

Ve své práci jsem využívala landmarkové metody geometrické morfometriky. Tyto metody jsou založené na souřadnicích homologních bodů (landmarků/semilandmarků) na

studované struktury. Každý objekt je tedy charakterizován souborem čísel označujícím polohu landmarků ve dvourozměrném prostoru. Landmarky byly digitalizovány na upravených fotografiích z optického mikroskopu pomocí morfometrických programů TpsUtil, ver. 1.47 (Rohlf 2010c) a TpsDig2, ver. 2.16 (Rohlf 2010a). Na obrysu schráněk rozsivek byly stanoveny 4 pevné homologické landmarky (vždy na vrcholech transversální a apikální osy buňky) a 40 doplňujících semilandmarků po obvodu frustuly (obr. 3.1). Protože tvar *F. rhomboides* je poměrně jednoduchý, je na buňce umístěn větší počet semilandmarků. Semilandmarky jsou charakteristické posouváním mezi dvěma sousedními body v průběhu superimpozice, což umožňuje lépe znázornit křivky tvaru (Zelditch et al. 2004). Landmarkové metody umožňují definovat tvar a jeho variabilitu po odfiltrování nežádoucích vlivů (způsobené odlišnou rotací, velikostí a orientací objektů). Aby se zabránilo těmto vlivům, je nutné provést Prokrustovskou superimpozici (*Generalized Procrustes Analysis*, GPA). Jedná se o překlad všech objektů (jejich centroidů) na sebe a změnu jejich konfigurace tak, aby se minimalizovaly rozdíly sumy čtverců mezi odpovídajícími landmarky (Adams et al. 2004). V programech TpsUtil, ver. 1.47, TpsRelw, ver. 1.49 (Rohlf 2010b), Microsoft Office Excel 2007, Poznámkový blok systému Windows7 a PAST 2.08 (Hammer et al. 2001) byla provedena Prokrustovská superimpozice objektů podle (Zelditch et al. 2004) standardizující a optimalizující rotaci a překlopení schráněk.

Protože *Frustulia rhomboides* je téměř biradiálně symetrická (není u ní možné rozpoznat pravou a levou stranu a zároveň ani horní a dolní část), bylo nutné provést dvojí symetrizaci podle studie (Savriama & Klingenberg 2011). To zahrnovalo vytvoření zrcadlové kopie objektů (vynásobením x-ových a y-ových souřadnic všech landmarků konstantou -1) a přeznačení souřadnic landmarků (podle os symetrie). Po superimpozici původních a zrcadlových objektů bylo nutné zprůměrovat jejich konfigurace. Tímto způsobem byly získány souřadnice landmarků odpovídající biradiálně souměrným objektům. V této práci byly symetrizovány dva datové soubory zvlášť. První soubor obsahoval souřadnice landmarků všech dat, včetně sezónních, dohromady (tedy 960 buněk



Obr. 3.1: Rozmístění pevných landmarků (modře) a semilandmarků (červeně) po obvodu frustuly

komplexu *F. rhomboides*) a v druhém souboru byla symetrizována pouze data bez zahrnutí sezonních vzorků, tj. 24 vzorků (tedy 720 buněk komplexu *F. rhomboides*).

Výše zmíněným postupem vznikala matice standardizovaných morfometrických dat (tvarových proměnných), se kterými se dále operovalo ve statistických analýzách. Jednalo se vždy o tvarové proměnné dat z různých lokalit, sezónních dat nebo o jejich kombinaci.

3.3 Analýza dat

Analýza tvarové variability *F. rhomboides*

Ze všech Prokrustovských dat byla provedena mnohorozměrná analýza hlavních komponent (PCA) s použitím datasetu vygenerovaného při analýze relativních warpů (RWA) v TpsRelw, ver. 1.49 (Rohlf 2010b). Tyto dvě ordinační analýzy jsou analogické, takže pozice na PCA osách odpovídá pozicím RWA. Pro lepší názornost tvarové odlišnosti buněk byl zhotoven graf reprezentující středy shluků buněk různých skupin (neboli centroidů buněk zastupující jednotlivá odběrová místa, příp. sezóny odběru), který byl vytvořen průměrnými hodnotami souřadnic skóru první a druhé osy PCA na vzorek (= odběrové místo). Deformační mřížky charakteristických morfotypů byly vytvořeny v TpsRelw, ver. 1.49. PCA analýza byla provedena v programu PAST 2.08 (Hammer et al. 2001).

Míra tvarové variability (morfologická disparita) křemičitých schránek druhového komplexu byla vyjádřena pomocí Prokrustovských vzdáleností získaných programem TpsSmall, ver. 1.20 (Rohlf 2003). Pro výpočet celkové disparity (MD) mezi lokalitami jsem použila vzorec

$$MD = \frac{\sum_{i=1}^N (D_i^2)}{(N - 1)}$$

kde N je počet objektů (schránek) a D_i je Prokrustovská vzdálenost mezi jednotlivými objekty a konsenzuálním tvarem skupiny (= lokalita/30 schránek).

Hodnoty parciální disparity (PD), které byly použity pro grafické znázornění formou box plotů, jsem získala dle vzorce

$$PD = \frac{D_i^2}{(N - 1)}$$

podle (Foote 1993, Zelditch et al. 2004).

Box ploty byly vytvořeny v programu PAST 2.08. Signifikance box plotů byly ověřovány Kruskal-Wallis případně Mann-Whitney testem s Bonferroniho korekcí (Legendre & Legendre 1998) v programu PAST 2.08.

Analýza velikosti *F. rhomboides*

Pomocí krabicových diagramů byla vyjádřena centroidová velikost (*centroid size*) pro znázornění celkové velikosti buněk. *Centroid size* je definována jako odmocnina součtu umocněných vzdáleností vedoucích od každého landmarku do středového bodu (centroidu) u každého objektu (Zelditch et al. 2004). Hodnoty centroidové velikosti byly vygenerovány v programu TpsRelw, ver. 1.49 (Rohlf 2010b). Všechny box ploty pro porovnání velikosti mezi typem lokalit a mezi ročními obdobími byly vytvořeny v programu PAST 2.08 (Hammer et al. 2001). Signifikance box plotů byly ověřovány neparametrickým Kruskal-Wallis případně Mann-Whitney testem s Bonferroniho korekcí (Legendre & Legendre 1998) v programu PAST 2.08.

V návaznosti na sezónní výzkum velikostní variability buněk byla provedena analýza vlivu sezóny na celkovou morfologickou variabilitu pomocí neparametrické permutační MANOVy v programu R, ver. 2.15.2. (balíček *vegan*; R Development Core Team 2012, Oksanen et al. 2011). Tato analýza implementovaná programovací funkcí *adonis* testuje a určuje procentuální podíl variability (tvarových) dat vysvětlený různými proměnnými (např. vlivem lokality či pH) zvlášť nebo/a celkovou variabilitu vysvětlenou společným vlivem proměnných. Jako vysvětlovaný soubor s maticí tvarových dat byly použity RW skóry (symetrizovaných tvarových sezónních dat) prvních patnácti os vysvětlujících nejvíce variability (99,5 %). Vysvětlující soubor obsahoval proměnné se standardizovanými naměřenými hodnotami pH a konduktivity (= proměnná „environment“), dále informace o odběrovém místě (= proměnná „místo“ kódovaná písmeny A/B) a informace o době odběru (= proměnná „čas“ kódovaná jak písmeny J, L, P, Z označujícími určitou sezónu, tak roky odběrů). Při analýze variance byly využity Euklidovské vzdálenosti. Signifikance byla ověřena testy založenými na 999 permutacích.

Dále byla mnohorozměrnou regresí v programu TpsRegr, ver. 1.38 (Rohlf 2011) zjišťována závislost tvaru a velikosti. Jako výchozí testovaný soubor byly použity Prokrustovské souřadnice (matice symetrizovaných tvarových dat nezahrnujících sezónní data) a jako nezávislá proměnná hodnoty centroidových velikostí. Signifikance modelu byla ověřena permutačním testem (1000 permutací).

Následně bylo zkoumáno rozložení tvaroprostorových dat po odstranění vlivu alometrie. V programu R, ver. 2.15.2. (R Development Core Team 2012) byla provedena mnohorozměrná regrese Prokrustovských souřadnic na velikost (*centroid size*). Na reziduálech těchto souřadnic jsem provedla analýzu PCA, ze které byl poté vytvořen centroidový graf v souladu s již výše zmíněným postupem.

Analýzy testující vztah tvaru *F. rhomboides* a parametrů prostředí

Mnohorozměrnou regresí v programu TpsRegr, ver. 1.38 (Rohlf 2011) byla ověřována závislost variability tvaru na určitém environmentálním parametru. Jako výchozí testovaný soubor byly použity Prokrustovské souřadnice (matice symetrizovaných tvarových dat nezahrnujících sezónní data) a jako nezávislá proměnná naměřené hodnoty pH, konduktivity a nadmořské výšky. Signifikance regresních modelů byla ověřena permutačním testem (1000 permutací).

Neparametrická mnohorozměrná analýza variance (MANOVA) byla provedena v programu R, ver. 2.15.2. (balíček *vegan*; R Development Core Team 2012, Oksanen et al. 2011). Jako vysvětlovaný soubor s maticí tvarových dat byly použity RW skóry (symetrizovaných tvarových dat nezahrnujících sezónní data) prvních patnácti os vysvětlujících nejvíce variability (99,99 %). Vysvětlující soubor obsahoval proměnné se standardizovanými naměřenými hodnotami pH, konduktivity a nadmořské výšky. Do souboru s vysvětlujícími proměnnými byly také zahrnuty informace o geografické poloze odběrových míst v podobě distanční matice a o typu biotopu odběrových míst (kódován písmenem „M“ pro minerotrofní místa nebo „O“ pro ombrotrofní místa). Distanční matice byla vytvořena podle následujícího postupu. Z GPS koordinát (vyjádřených desetinným číslem) byly v programu PAST 2.08 (Hammer et al. 2001) vypočítány distanční geografické indexy podobnosti. Na této podobnostní matici byla provedena PCoA (analýza hlavních koordinát), přičemž skóry prvních 12-ti os PCoA (vysvětlujících nejvíce variability) byly použity jako vstupní prostorová matice, pro permutační MANOVu, vypovídající o geografických vzdálenostech mezi odběrovými místy. Při výsledné neparametrické mnohorozměrné analýze variance byly využity Euklidovské vzdálenosti. Signifikance byla ověřena testy založenými na 999 permutacích.

Analýza společenstev rozsivek

Kromě analýzy tvarové variability druhového komplexu *F. rhomboides* bylo studováno druhové bohatství rozsivek ve vzorcích. Druhy byly zaznamenávány z celkem 24 vzorků (ze všech lokalit vyjma sezónních odběrových míst) z celé plochy trvalého preparátu zastupujícího vždy unikátní odběrové místo.

Informace o druhovém složení byly registrovány formou binární matice: druhy přítomné resp. nepřítomné ve vzorku byly označeny číslem 1 resp. 0. V programu Microsoft Office Excel 2007 byl z binárních dat vytvořen graf frekvencí výskytu jednotlivých druhů rozsivek. Všechny nalezené druhy jsou obsaženy v příloze 2. Z důvodu zaznamenávání dat o prezenci a absenci druhů byla odběrová místa porovnávána na základě druhové podobnosti pomocí Jaccardova indexu similarity (data viz příloha 2).

K explorativní analýze binární matice druhových dat byla použita metoda PCA a NMDS (*non-metric multidimensional scaling*). Výstupem PCA analýzy byl diagram vytvořený v programu PAST 2.08 (Hammer et al. 2001).

Vliv prostředí na druhové složení rozsivkových společenstev byl testován neparametrickou mnohorozměrnou analýzou variance (MANOVA) v programu R, ver. 2.15.2. (balíček *vegan*; R Development Core Team 2012, Oksanen et al. 2011). Tato analýza byla provedena v souladu s postupem uvedeným výše, tj. při testování vztahu tvaru *F. rhomboides* a parametrů prostředí, s tím rozdílem, že vstupní vysvětlovaný soubor obsahoval binární matici druhových dat a namísto Euklidovských vzdáleností byly aplikovány Jaccardovy. Vysvětlující soubor obsahoval stejné, resp. stejným způsobem vyjádřené a standardizované, proměnné (pH, konduktivita, nadmořská výška, typ biotopu a geografické vzdálenosti) jako v případě předchozího využití MANOVy.

Analýza vztahu rozsivkových společenstev a tvaru *F. rhomboides*

V programu PAST 2.08 (Hammer et al. 2001) byla dále testována korelace sumární disparity *F. rhomboides* a druhové bohatosti a korelace tvarové variability *F. rhomboides* a druhové bohatosti na odběrových místech. Tvarová variabilita byla v tomto případě vyjádřena součtem absolutních hodnot souřadnic PCA skóre první a druhé osy na odběrové místo. PCA skóre byly vytvořené z datasetu vygenerovaného při analýze relativních warpů (viz analýza tvarové variability *F. rhomboides*).

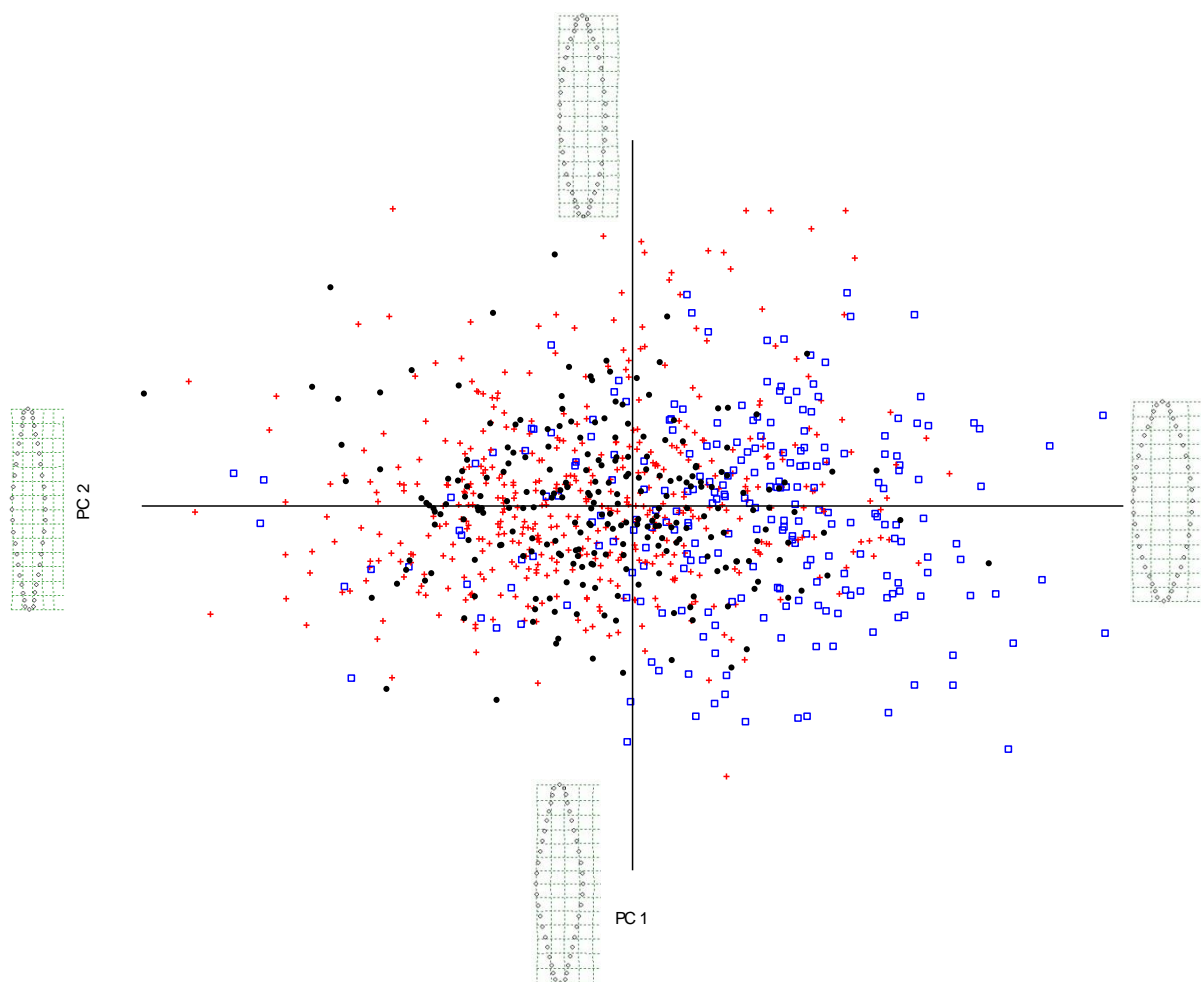
Poloha odběrových míst v ordinačním prostoru založená na variabilitě tvaru druhového komplexu *F. rhomboides* byla porovnána s ordinací odběrových míst provedenou na základě druhového složení společenstev rozsivek vyskytujících se na lokalitě. Vzájemná

poloha obou ordinací byla testována permutačním Prokrustovým testem (založeným na 9 999 náhodných permutacích) v programu R ver. 2.15.2. (balíček *vegan*; R Development Core Team 2012, Oksanen et al. 2011). K analýze v programu R je nejprve potřeba vytvořit NMDS ordinace obou souborů (s porovnávanými daty) zvlášť. Prokrustova analýza implementovaná funkcí *procrustes* vyhodnotí kongruenci těchto NMDS ordinací. Tato funkce provádí asymetrickou Prokrustovskou superimpozici, která minimalizuje mocninové rozdíly obou ordinací. Já jsem jako vstupní soubory použila morfometrická (tvarová) data (průměr RW skóre buněk na lokalitě) a data o druhovém složení (absence/prezence druhu ve vzorku). Z těchto souborů byly vytvořeny (3D) NMDS ordinace v programu PAST 2.08, které byly následně transformovány do textové předlohy vstupující do programu R. U morfometrických dat byla NMDS analýza aplikována s použitím Euklidovských vzdáleností, u dat o druhové podobnosti byl použit Jaccardův index. Program R poté vyhodnotil shodu těchto dvou ordinací. Výsledný graf tedy indikuje míru kongruence/inkongruence mezi tvarem modelového organismu a strukturou společenstev rozsivek na lokalitách.

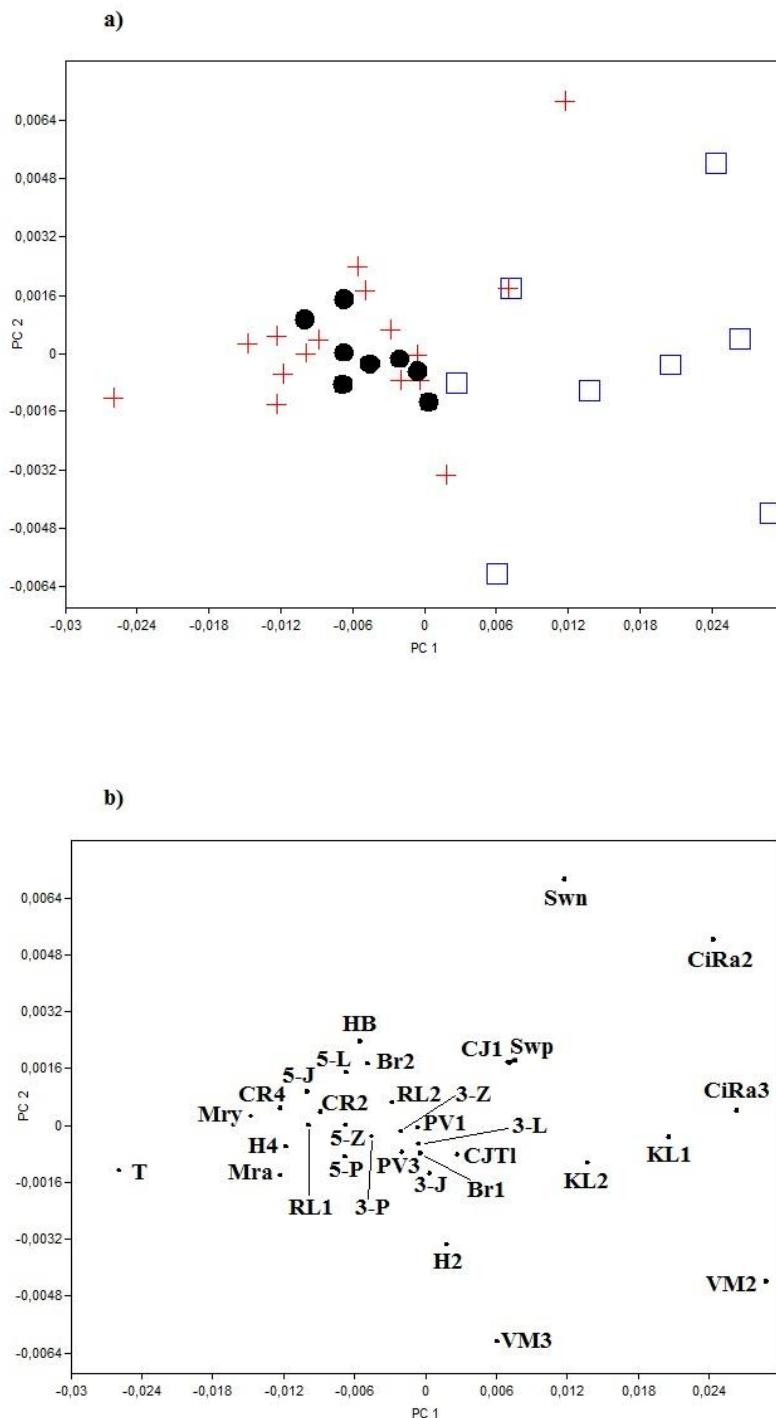
4 Výsledky

4.1 Analýza tvarové variability *F. rhomboides*

Celková variabilita tvaru v ordinačním prostoru byla popsána pomocí analýzy hlavních komponent (obr. 4.1), která ukazuje hlavní morfologické trendy celého souboru čítajícího 960 buněk modelového organismu. První osa (PC 1) vysvětlila 91,54 % variability, druhá (PC 2) 4,3 % variability a zbývajících 84 os vysvětlilo dohromady 4,15 % variability. Změnu tvaru ukazují deformační mřížky. Podél první osy se buňky zakulacují a ztlušťují, druhá osa popisuje změnu tvaru konců (hlaviček) a zakulacení či zploštění středu frustuly.



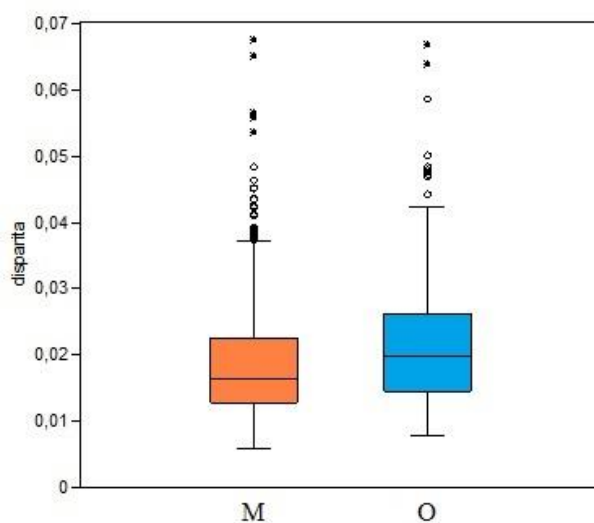
Obr. 4.1: PCA analýza všech symetrizovaných buněk; čtverečky a křížky označují data jednorázového odběru (□ ombrotrofní vrchoviště, + minerotrofní rašeliniště), tečky označují data sezónního odběru minerotrofního rašeliniště. Deformační mřížky zobrazují tvarové trendy v krajních hodnotách os.



Obr. 4.2: Poloha centroidů odběrových míst; graf **a)** čtverečky a křížky označují data jednorázového odběru (□ ombrotrofní vrchoviště, + minerotrofní rašeliniště), puntíky označují data sezónního odběru minerotrofního rašeliniště; a totožný graf **b)** s označením lokalit: Br1, Br2 – Břehyně, PV1, PV3 – Přebuzské vřesoviště, CR2, CR4 – Černý rybník, HB – Horní Blatná, T – Ostrov u Tisé, RL1, RL2 – Rybí loučky, H2, H4 – Hliniň, Swp, Swn – Swamp, Mra, Mry – Mariánský rybník, VM2, VM3 – Velký močál, CJ1, CJT1 – Černá jezírka, KL1, KL2 – Klečové louky, CiRa2, CiRa3 – Cínovecké rašeliniště; sezónní odběry (Swamp) místo 5: 5-J (jaro), 5-L (léto), 5-P (podzim), 5-Z (zima); místo 3: 3-J (jaro), 3-L (léto), 3-P (podzim), 3-Z (zima)

Pro větší názornost je tvarová variabilita vyjádřena polohou centroidů v ordinačním prostoru vycházejícím z původní PCA (obr. 4.2). Z grafu na obr. 4.2a lze vypočítat, že sezónní data odebraná na dvou minerotrofních místech (v diagramu černé puntíky) mají oproti tvarům z různých lokalit výrazně menší průměrnou tvarovou variabilitu a shlukují se společně s minerotrofními lokalitami. Buňky vyskytující se na ombrotrofních místech mají odlišnou morfologii než buňky na místech minerotrofních a zároveň buňky vyskytující se na různých ombrotrofních resp. minerotrofních místech jsou si vzájemně podobnější.

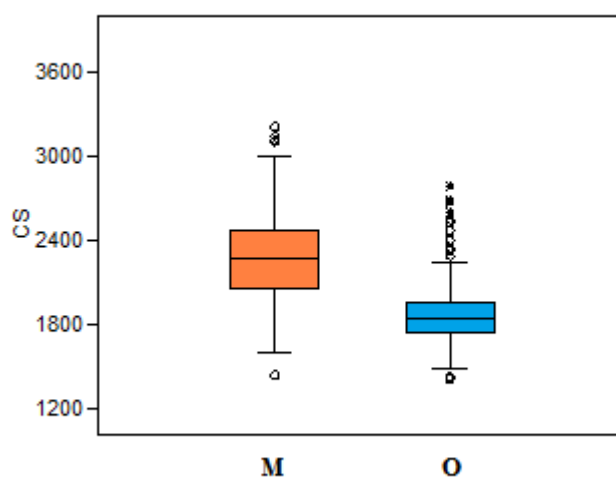
Dále byla tvarová variabilita vyjádřena také pomocí Prokrustovských vzdáleností, tzv. disparity. Největší morfologická variabilita (disparita) byla zaznamenána na odběrovém místě RL2 (na lokalitě Rybí loučky), hodnota sumární disparity vyšla $1,17 \cdot 10^{-3}$. Vysoké hodnoty (okolo $0,75 \cdot 10^{-3}$) se vyskytovaly především u buněk z ombrotrofních lokalit (např. Velký močál, Klečové louky, Černá jezírka). Na obrázku 4.3 je ilustrováno srovnání disparit buněk v prostředí s odlišnou trofíí. Graf je statisticky průkazný (Kruskal-Wallis test: $p < 0,001$).



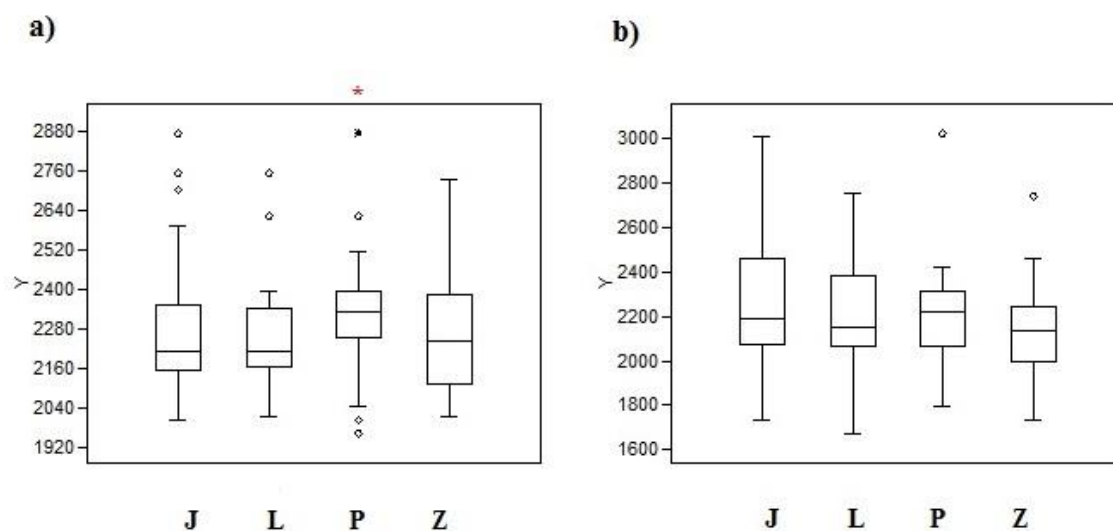
Obr. 4.3: Disparita buněk *F. rhomboides*; M – minerotrofní místa, O – ombrotrofní místa, Kruskal – Wallis test: $p < 0,001$

4.2 Analýza velikosti *F. rhomboides*

Velikosti frustul komplexu *F. rhomboides* (obr. 4.4) s ohledem na specifické biotopy (minerotrofní vs. ombrotrofní) se signifikantně lišily (Kruskal-Wallis test: $p < 0,001$). Buňky žijící v ombrotrofních místech mají menší centroidové velikosti na rozdíl od těch, které se přirozeně vyskytují v minerotrofních rašeliništích. Velikost schránek byla měřena také během sezón na dvou minerotrofních odběrových místech v rámci NPR Swamp (obr. 4.5). Frustuly z odběrového místa č. 5 (obr. 4.5a) byly signifikantně odlišné pouze na podzim (Mann-Whitney test: $p < 0,05$). Na rozdíl od ostatních období na tomto místě byly podzimní schránky mírně větší. Na odběrovém místě č. 3 (obr. 4.5b) je patrné rovnoměrné rozložení velikostních skupin během čtyř ročních období na dvou různých odběrových místech. Analýza není statisticky průkazná (Mann-Whitney test: $p > 0,05$). Lze tedy shrnout, že velikost není klíčovým parametrem, který by výrazně ovlivňoval morfologii buněk během roku. Vyloučení vlivu sezóny (a časové heterogenity obecně) na tvar modelového organismu bylo dále podpořeno rozkladem morfologické variability buněk sezónních odběrových míst mezi časovou, prostorovou a environmentální proměnnou pomocí analýzy permutační MANOVA. Celkem bylo třemi proměnnými vysvětleno 4,7 % variability. Z výsledků (příloha 5) je patrné, že čas nemá na morfologii buněk statisticky průkazný vliv ($p > 0,05$), zatímco charakter odběrového místa tvoří signifikantně největší podíl vysvětlené variability (3,1 %; $p < 0,01$). Testován byl také vliv podmínek prostředí, tj. pH a konduktivity, jejichž hodnoty se mění během roku v závislosti na konkrétním ročním období. Podmínky prostředí vysvětlily relativně velkou část variability (cca 2 %), avšak jejich působení v rámci sezónních odběrů nebylo signifikantní ($p > 0,05$).

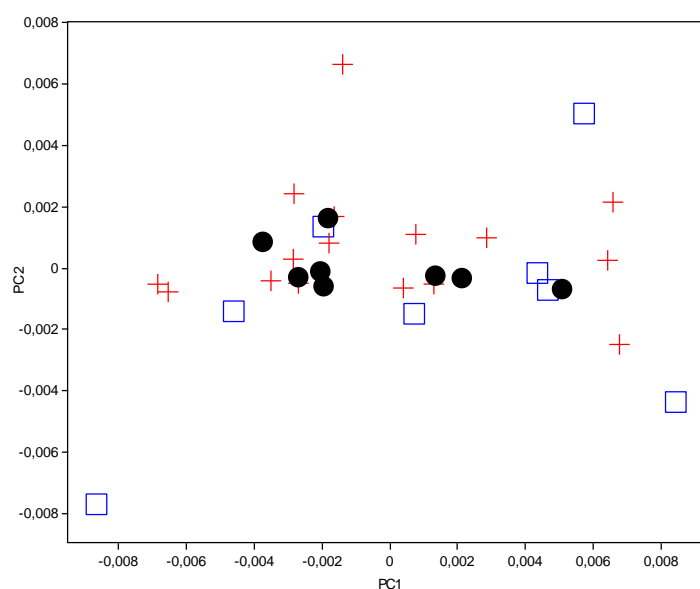


Obr. 4.4: Velikost buněk *F. rhomboides* (centroid size) na minerotrofních (M) a ombrotrofních (O) místech; CS - hodnoty centroidové velikosti; Kruskal-Wallis test: $p < 0,001$



Obr. 4.5: Různé velikostní skupiny buněk *F. rhomboides* během sezón (J - jaro, L - léto, P - podzim, Z - zima) na dvou odběrových místech; na ose y jsou zobrazeny hodnoty centroidové velikosti **a)** odběrové místo 5; velikost buněk na podzim se signifikatně liší od ostatních sezón (P*); Mann-Whitney test: $p < 0,05$ **b)** odběrové místo 3; Mann-Whitney test: $p > 0,05$

Závislost tvaru na velikosti buněk ze všech lokalit byla testována mnohorozměrnou regresí. Velikost vysvětlila 26,05 % tvarové variability ($p < 0,001$). Vzhledem k poměrně velkému procentu vysvětlené variability bylo ověřováno rozložení lokalit na základě tvarových dat v mnohorozměrném prostoru po odstranění vlivu alometrie. To je znázorněno v centroidovém grafu vytvořeném v rámci PCA analýzy na obr. 4.6. První osa (PC 1) vysvětluje 79,66 % variability, druhá osa (PC 2) 9,71 %. Rozložení lokalit po odstranění alometrického vlivu se velmi liší od původní ordinace (obr. 4.2a) a není u něho zjevné odlišení lokalit podle typů biotopu. Je tedy evidentní, že tvar zbavený změn korelovaných s velikostí nemá signifikantní ekologický význam.



Obr. 4.6: Graf centroidů PCA po odstranění vlivu alometrie; čtverečky a křížky označují data jednorázového odběru (□ ombrotrofní vrchoviště, + minerotrofní rašeliniště), puntíky označují data sezónního odběru z minerotrofního rašeliniště

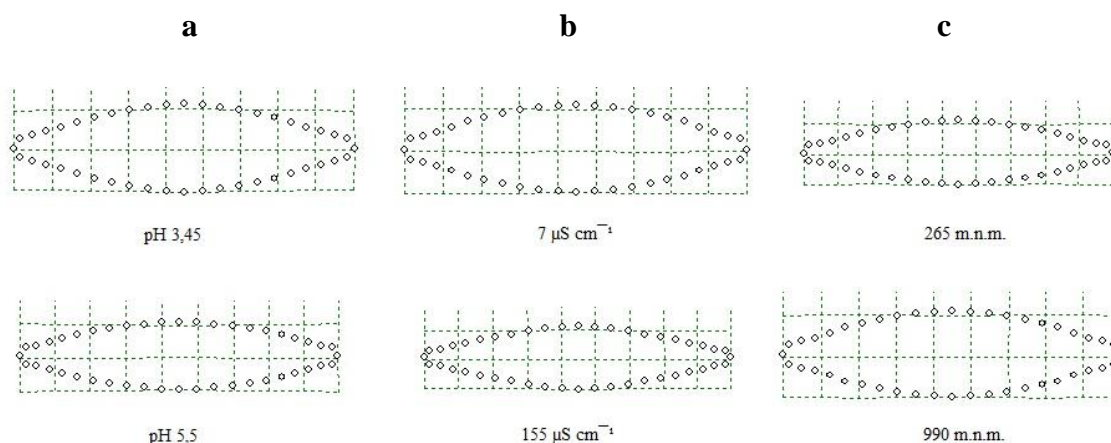
4.3 Vztah tvaru *F. rhomboides* a parametrů prostředí

Při následujících analýzách bylo operováno se stanovovanými parametry prostředí: pH, konduktivita, nadmožská výška, typ lokality a geografická poloha. Vliv těchto parametrů prostředí na tvar buněk komplexu *F. rhomboides* byl zjišťován regresním modelem a rozkladem tvarové variability mezi environmentální proměnné.

Regresní model závislosti tvaru modelového organismu na pH vysvětlil 2,48 % variability ($p < 0,001$). Konduktivita vysvětlila 5,02 % variability ($p < 0,001$) a nadmožská

výška 8,93 % ($p < 0,001$). Změny tvaru jsou vizualizované na obr. 4.7. Celkový tvar buňky je úzce protáhlý se zvyšujícím se pH, vyšší konduktivitou a snižující se nadmořskou výškou. Naopak v nízkém pH v prostředí s nižší vodivostí a zároveň ve větší nadmořské výšce, což vystihuje podmínky na ombrotrofních vrchovištích, je obrys buňky kulatější.

Protože na tvar může mít vliv více faktorů dohromady, je vhodné zabývat se rozkladem variability tvaru mezi jednotlivými proměnnými. Právě toto rozložení variability umožňuje analýza permutační MANOVA. V tabulce 4.1 je znázorněn celkový vliv jednotlivých proměnných, resp. vždy vliv konkrétního parametru společně s ostatními faktory, které jsou s tímto parametrem korelované. Dále čistý efekt, tedy vliv konkrétního parametru po odfiltrování vlivu kovariantních faktorů. Působení env. faktorů je vyjádřeno procentem vysvětlené variability tvaru. Největší vliv měla jednoznačně lokalita (ať už vyjádřená typem biotopu nebo geografickou polohou). Lokalita, pokud byla kódována podle trofie na příslušném odběrovém místě (viz tab. 4.1, „lokalita (O/M)“), vysvětlila 19,5 % tvarové variability při spolupůsobení několika faktorů. Čistý efekt této proměnné byl ovšem už jen 2,5 %, nicméně stále signifikantní. V případě kódování vzorků na základě geografických distancí (viz tab. 4.1, „prostor“) bylo signifikantně vysvětleno touto proměnnou téměř 17,5 % celkové variability. Statisticky průkazný byl také čistý efekt této proměnné, který vysvětlil 7,4 % tvarové variability *F. rhomboides*. Druhým faktorem vysvětlujícím nejvíce morfologické variability buněk modelového organismu bylo pH, jehož celkový efekt se vyšplhal téměř na 6,5 %. Působení nadmořské výšky mělo nejmenší vliv na tvar buněk, při společném vlivu s jinými sledovanými proměnnými vysvětlila necelé 3 % variability. Nutno podotknout, že v přírodních podmínkách je kovariance působících faktorů významná, což se odráží i v této analýze. Pokud je totiž tato kovariance odseparována, působení daného faktoru mnohdy přestává být signifikantní. Příkladem může být čistý efekt proměnné „pH“ nebo „konduktivita“ zjištěný v této práci. Při spolupůsobení s ostatními faktory průkazně vysvětlují tyto proměnné téměř 11,5 %, avšak při samostatném působení klesá jejich signifikance a zároveň vysvětlují méně variability. Celkem všechny stanovované faktory vysvětlily 27,5 % morfologické variability komplexu *F. rhomboides*.



Obr. 4.7: Rekonstrukce změny tvaru *F. rhomboides* zobrazená deformačními mřížkami v závislosti na a) pH b) konduktivitě c) nadmořské výšce. Míra deformace je třikrát zvýrazněna.

Tab. 4.1: Vysvětlená variabilita tvaru *F. rhomboides* různými environmentálními proměnnými; permutační MANOVA; „lokalita (O/M)“ = ombrotrofní/minerotrofní typ biotopu, „prostor“ = geografická vzdálenost; míra signifikance (p): ‘****’ $p < 0,001$ ‘***’ $p < 0,01$ ‘*’ $p < 0,05$

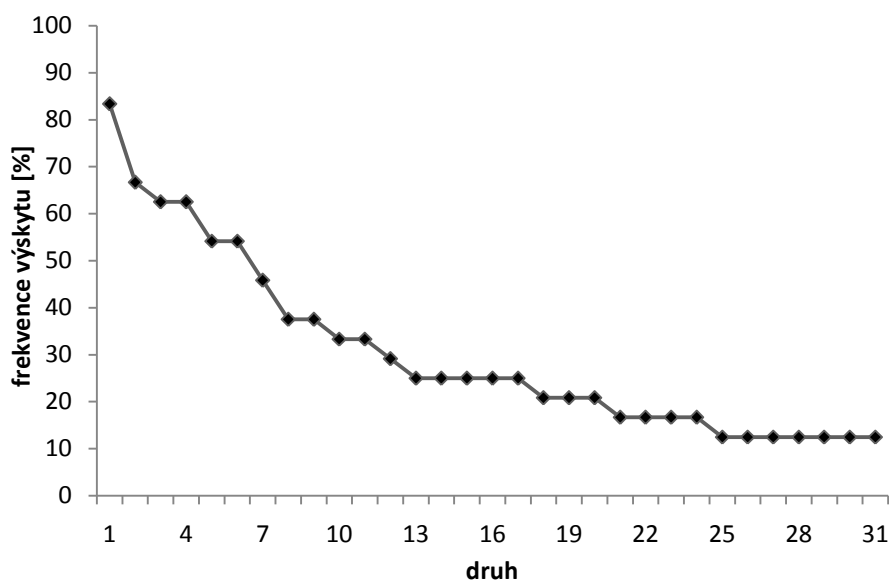
	celkový vliv [%]	p	čistý efekt [%]	p
pH	6,473	***	0,535	*
konduktivita	4,913	***	0,647	*
nadmořská výška	2,923	***	0,801	**
lokalita (O/M)	19,538	***	2,53	***
prostor	17,467	***	7,379	***
reziduál	72,564			

4.4 Společenstva rozsivek

Celkem bylo ve 24 vzorcích jednorázového letního odběru nalezeno 71 taxonů rozsivek. Počty druhů ve vzorcích (uvedené v příloze 1) se pohybovaly v rozmezí od 6 (Swamp) do 24 (tůňka u Ostrovského rybníka). Průměrně se nacházelo v jednom vzorku 12 druhů. Rašeliniště, z důvodu extrémních podmínek, představují ekosystémy s nižší diverzitou rozsivek ve srovnání s eutrofními rybníky nebo řekami. Přesto ale v těchto biotopech bentické rozsivky (spolu s krásivkami) dominují nad ostatními druhy řas (Watanabe et al. 2000, Borics et al. 2003). Většina nalezených druhů preferuje oligotrofní habitaty a jejich výskyt na rašeliništích je v ČR poměrně běžný (Pouličková et al. 2004, Pouličková et al. 2013). O běžnosti a vzácnosti druhů částečně vypovídá frekvence výskytu daných druhů (obr. 4.8) ve vzorcích. Druhový komplex *E. bilunaris* se ukázal být nejrozšířenějším rozsivkovým taxonem, jedinci se vyskytovaly v 83,3 % vzorků. Ve více než polovině

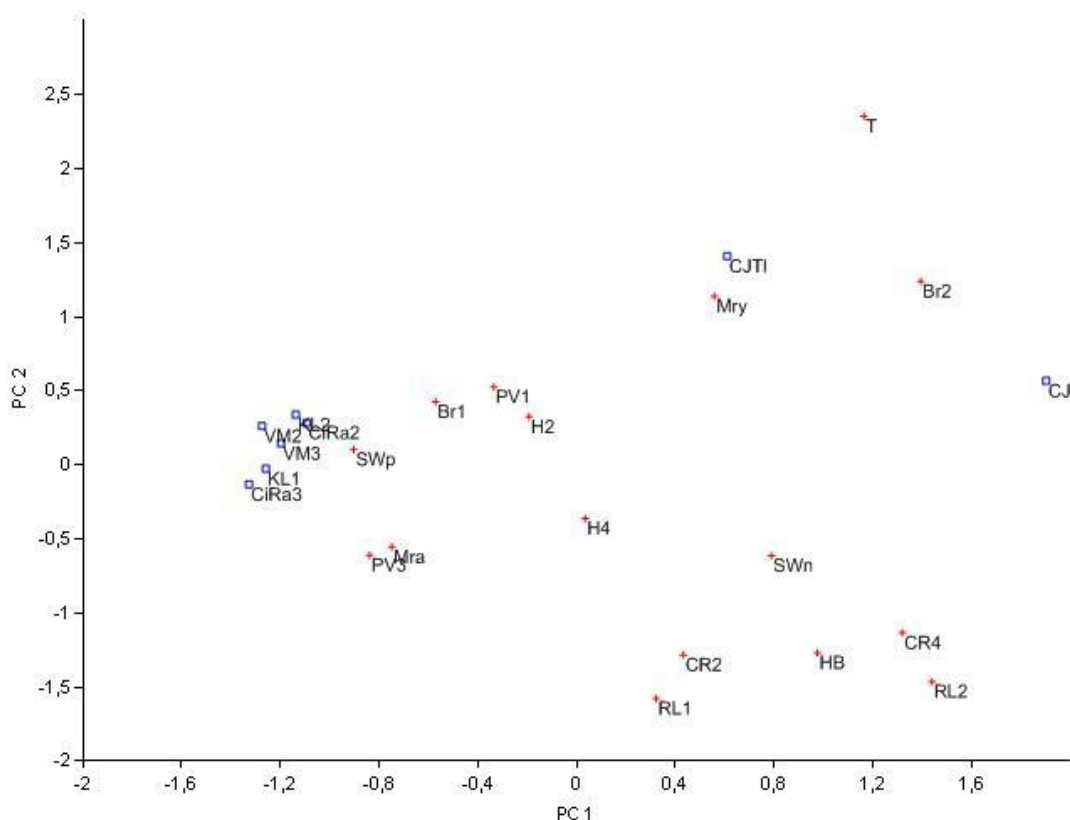
vzorků byly identifikovány také taxony *Pinnularia subcapitata*, *P. subcapitata* var. *elongata*, *Eunotia paludosa*, *P. viridiformis* a *E. exigua*. 27 druhů rozsivek (např. *P. borealis*, *E. subherkinensis*, *Stauroneis phoenicenteron*) se našlo pouze v jednom vzorku. Vzácně se vyskytující druhy mohou vypovídat o unikátnosti odběrového místa. Kompletní přehled nalezených taxonů s informacemi o prezenci/absenci na odběrových místech je v příloze 2.

K analýze podílu společných druhů v různých habitatech (v tomto případě na různých odběrových místech) byly na základě Jaccardova indexu zhodnoceny vzorky podle druhové podobnosti. Z analýzy vyplynulo, že Černý rybník a Klečové louky jsou lokality druhově zcela odlišné. Nebyl zde nalezený žádný společný druh, hodnota v tabulce (viz příloha 3) je tedy rovná nule. Naopak za nejvíce podobná byla označena místa v rámci lokality Rybí loučky, konkrétně odběrová místa RL1 a RL2. Druhově podobné jsou také lokality rašeliniště u Horní Blatné a Rybí loučky. Protože se v obou případech jedná o prameniště, dal by se očekávat výskyt podobných druhů. Odběrové místo s názvem PV3 nacházející se na lokalitě Přebuzské vřesoviště se nejvíce lišilo svým druhovým složením od ostatních míst.



Obr. 4.8: Frekvence výskytu [%] jednotlivých druhů rozsivek ve vzorcích (druhy s výskytem nižším než 10% nejsou do grafu zahrnuty); 1. *Eunotia bilunaris* 2. *Pinnularia subcapitata* 3. *P. subcapitata* var. *elongata* 4. *E. paludosa* 5. *P. viridiformis* 6. *E. exigua* 7. *P. rupestris* 8. *P. interrupta* 9. *Tabellaria flocculosa* 10. *Kobayasiella subtilissima* 11. *E. soleirolii* 12. *P. microstauron* 13. *P. subgibba* 14. *E. rhomboidea* 15. *E. glacialis* 16. *Brachysira seriens* 17. *B. brebissonii* 18. *E. nymanianna* 19. *Nitzschia* cf. *gracilis* 20. *E. tenella* 21. *P. gibba* 22. *Navicula cryptotenella* 23. *Encyonopsis* sp. 24. *Eunotia mucophila* 25. *E. arcus* 26. *Gomphonema parvulum* 27. *P. viridiformis* (morfortyp 2) 28. *P. gibbiformis* 29. *E. minor* 30. *P. macilenta* 31. *Neidium iridis*

Pomocí PCA analýzy bylo možné vizualizovat data o druhovém složení na odběrových místech (obr. 4.9). První osa (PC 1) vysvětluje 13,8 % variability, druhá (PC 2) 12,2 %. Lokality označené dle typu biotopu se částečně překrývají, přesto lze ale vypočítat hlavní trendy. Společenstva odebraná na ombrotrofních lokalitách mají tendenci tvořit samostatnou skupinu dat rozkládajících se převážně v levé části grafu. Jejich podobnost na základě druhového složení může poukazovat na velmi nízké hodnoty pH, které jsou schopny tolerovat jen specifické druhy. Na ombrotrofní lokalitě Černá jezírka (CJ1 a CJT1) byla naměřena relativně vyšší hodnota pH (viz příloha 1), to může odpovídat vyššímu počtu zde nalezených druhů (viz příloha 1, 2) a její poloze v grafu mezi minerotrofními místy. Rozložení lokalit založené na podobnosti druhů bylo testováno také analýzou NMDS (*non-metric multidimensional scaling*). Hodnota signifikance (*Kruskal's stress*) byla ale příliš vysoká na to, aby se data dala tímto způsobem interpretovat.



Obr. 4.9: PCA analýza druhového složení na lokalitách; □ ombrotrofní vrchoviště, + minerotrofní rašeliniště (Br1, Br2 – Břehyně, PV1, PV3 – Přebuzské vřesoviště, CR2, CR4 – Černý rybník, HB – Horní Blatná, T – Ostrov u Tisé, RL1, RL2 – Rybí loučky, H2, H4 – Hliníř, Swp, Swn – Swamp, Mra, Mry – Mariánský rybník, VM2, VM3 – Velký močál, CJ1, CJT1 – Černá jezírka, KL1, KL2 – Klečové louky, CiRa2, CiRa3 – Cínovecké rašeliniště)

Působení různých faktorů prostředí na společenstva rozsivek bylo vyjádřeno neparametrickou analýzou variance (permutační MANOVA). Vliv všech stanovovaných faktorů vysvětlil dohromady 72,7 % variability rozsivek, nicméně téměř každý dílčí vliv nebyl signifikantní (tab. 4.2). Statisticky průkazný byl ovšem vliv pH a typu biotopu (tj. vysvětlovaná proměnná v tabulce 4.2 s názvem „lokalita (O/M)“) při spolupůsobení ostatních proměnných (celkový vliv). Tyto dvě proměnné vysvětlily dohromady cca 17 % variability. Signifikantní byl ještě čistý efekt typu biotopu, který vysvětlil něco přes 6 % variability ve druhovém složení rozsivek. Největší procento variability vysvětlila proměnná „prostor“, tedy geografická poloha. Bohužel analýza neprokázala významnost jejího vlivu. Lze tedy shrnout, že nejvýznamnějšími faktory ovlivňujícími složení rozsivek je lokalita a pH.

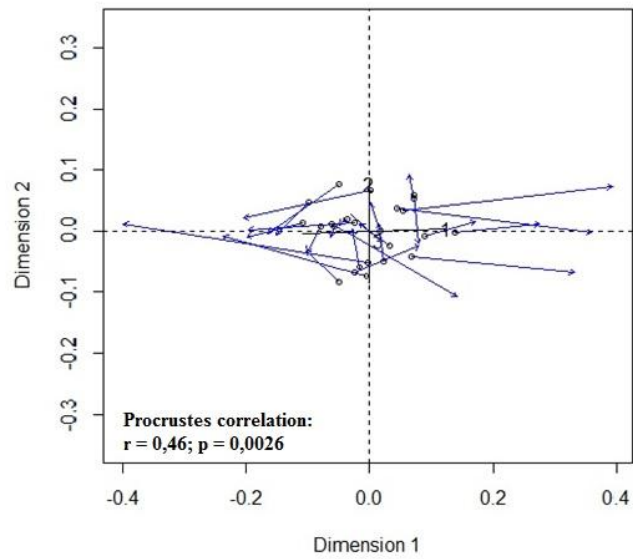
Tab. 4.2: Působení různých environmentálních proměnných na rozložení druhů rozsivek; permutační MANOVA; „lokalita (O/M)“ = ombrotrofní/minerotrofní typ biotopu, „prostor“ = geografická vzdálenost; míra signifikance (p): ‘***’ $p < 0,001$ ‘**’ $p < 0,01$ ‘*’ $p < 0,05$

	celkový vliv [%]	p	čistý efekt [%]	p
pH	7,943	**	3,292	0,67
konduktivita	4,973	0,161	4,874	0,191
nadmořská výška	3,977	0,471	5,158	0,131
lokalita (O/M)	9,274	**	6,124	*
prostor	53,184	0,168	47,307	0,474
reziduál	27,257			

4.5 Vztah společenstev rozsivek a tvaru *F. rhomboides*

Ke zjištění vztahu rozsivkových společenstev a tvarové variability modelového organismu byla provedena korelační analýza druhové bohatosti a disparity komplexu *F. rhomboides*, dále také druhové bohatosti a tvarové variability *F. rhomboides* vyjádřené absolutními hodnotami RW skóru (viz kapitola 3.3), nicméně výsledky nebyly ani v jednom případě statisticky průkazné.

Prokrustovská analýza NMDS ordinací tvarových dat *F. rhomboides* a druhových dat (obr. 4.10) demonstruje jejich nenáhodné rozložení. Výstupní diagram této analýzy je statisticky průkazný (korelační koeficient $r = 0,46$; míra signifikance $p = 0,0026$), ale velké reziduální vzdálenosti mezi odběrovými místy NMDS ordinací (délka šipek v grafu) naznačují poměrně velkou vzdálenost odpovídajících si míst obou ordinací.



Obr. 4.10: Prokrustovská analýza dvou NMDS ordinací: 1. NMDS ordinační diagram odběrových míst je založený na druhovém složení (puntíky) a 2. NMDS diagram na tvarových datech *F. rhomboides* (konce šipek)

5 Diskuze

Tato práce vychází z předpokladu překrývající se morfologie tradičních druhů v rámci komplexu *F. rhomboides* s. l. (Siver & Baskette 2004), která zároveň nekoreluje s morfologií charakteristickou pro jednotlivé linie komplexu (Veselá et al. 2012). Bylo zjištěno, že v určitých případech vykazují jednotlivé morfotypy rozsivek odlišné ekologické preference (Potapova & Hamilton 2007). V této práci je zkoumáno, zda u jedinců přírodních populací *F. rhomboides* lze rozlišovat charakteristické morfotypy a zda tyto morfotypy reflektují podmínky prostředí.

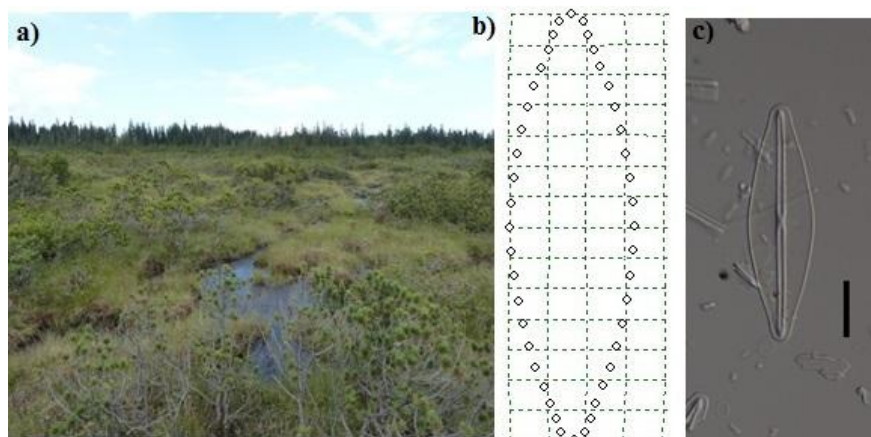
5.1 Morfologická variabilita *F. rhomboides*

Hlavní morfologické trendy

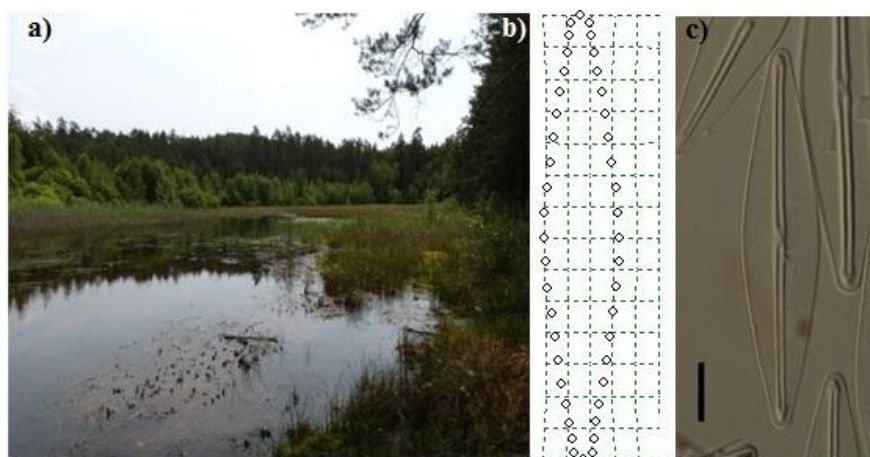
Landmarkové metody v kombinaci s mnohorozměrnými statistickými analýzami odhalily v souboru standardizovaných dat přítomnost dvou hlavních tvarových trendů (obr. 5.1, 5.2) v celém souboru buněk (tj. 960). Tyto trendy popisuje první osa PCA analýzy vysvětlující nejvíce variability (91,54 %). „Morfotyp 1“ (obr. 5.1b) rozlišený statistickými analýzami zastupuje kulatější, spíše eliptické buňky se zřetelně oddělenými kapitálními částmi. „Morfotyp 2“ (obr. 5.2b) disponuje zcela odlišnými tvarovými trendy (tj. výrazně kopinatý obrys buňky, relativně úzká valva bez zřetelných kapitálních částí).

Ačkoliv se tyto hlavní tvarové trendy ve tvaroprostoru částečně překrývají, byly u nich nalezeny specifické ekologické preference k odlišným typům biotopu (obr. 4.1, 4.2). „Morfotypy 1“ se vyskytovaly převážně v ombrotrofních rašeliništích, zatímco „morfotypy 2“ vykazovaly preference k minerotrofním rašeliništím (obr. 5.1, 5.2). Je známo, že druhy uvnitř komplexu *F. rhomboides* se vyskytují v přírodě v úzkém propojení (Lange-Bertalot & Jahn 2000). Pouličková et al. (2013) poukazují na vikarianci druhu *Frustulia saxonica* v závislosti na gradientu živin a pH. Je tedy pravděpodobné, že entity komplexu *F. rhomboides* mohou být ekologicky diferenciované, ale zároveň mohou sympatricky koexistovat.

Při testování vlivu environmentálních parametrů na morfologii modelového organismu mnohorozměrnou regresí se ukázalo, že dílčí podmínky prostředí významně ovlivňují tvar buněk, jehož výsledná rekonstrukce odpovídá opět různým typům rašeliniště (biotopu).



Obr. 5.1: Ombrotrofní biotop (a) s charakteristickým tvarovým trendem „morfortyp 1“ (deformační mřížka, b) v porovnání s odpovídajícím reálným vzhledem určitého jedince *F. rhomboides* (c); měřítko 10µm



Obr. 5.2: Minerotrofní biotop (a) s charakteristickým tvarovým trendem „morfortyp 2“ (deformační mřížka, b) v porovnání s odpovídajícím reálným vzhledem určitého jedince *F. rhomboides* (c); měřítko 10µm

Stejná ekologická diferenciacce (relace k typu biotopu) byla nalezena u různých velikostních skupin; relativně menší buňky komplexu *F. rhomboides* se vyskytují v rašeliništích s nízkou trofíí, na rozdíl od větších buněk, které preferují úživnější prostředí. Neustupa et al. (2013) konstatují, že malé druhy řas převládají v oligotrofních vodách. Je to pravděpodobně způsobeno jejich výhodným (malým) poměrem povrchu k objemu (S/V) buňky, díky kterému jsou schopny efektivně využívat nutriční limity prostředí (Bellinger 1977, Neustupa et al. 2013, Winder et al. 2009). Je tedy pochopitelné, že větší druhy naopak dosahují vyšších abundancí v eutrofnějším prostředí.

Podobně jako velikost se dala také hodnotit disparita, tedy míra morfologické variability druhového komplexu v závislosti na přirozeném biotopu morfotypů. Signifikantní výsledky, které naznačují větší disparitu buněk pocházejících z horských vrchovišť a naopak menší disparitu buněk z minerotrofních rašelinišť, se shodují s výsledky studie (Neustupa et al. 2009). Největší hodnota disparity byla naměřena na prameništi Rybí loučky. Tuto hodnotu lze označit za velmi odlehlou v porovnání s ostatními celkovými disparitami buněk z jednotlivých odběrových míst s relativně vyšší trofíí. Je to nejspíše způsobeno větším počtem buněk procházejícím sexuální fází životního cyklu. Během této fáze je možné pozorovat jak nejmenší buňky, tak velké postiniciální buňky s odlišnou morfologií (Pouličková & Mann 2006). Velkou disparitu buněk žijících v ombrotrofních podmínkách lze také vyzorovat z diagramu na obr. 4.2a, kde jsou patrné větší vzdálenosti mezi odběrovými místy zastupující populace z horských vrchovišť oproti vzdálenostem mezi místy minerotrofními.

Je tedy zřejmé, že existuje vztah mezi morfologií buněk komplexu *F. rhomboides* a prostředím, konkrétně typem rašeliniště. Relativně malé buňky s variabilnější morfologií pocházejí z horských ombrotrofních vrchovišť, zatímco větší buňky z rašelinišť s vyšší trofíí mají obvykle menší disparitu. To de facto znamená, že velikost souvisí do jisté míry s tvarovou variabilitou, která odpovídá podmínkám prostředí. Nejedná se tedy pravděpodobně o významnou změnu velikosti podmíněnou ontogenezí rozsivek. Ačkoli je prokázáno, že zmenšování rozsivek během životního cyklu způsobuje určitou část tvarové variability (Round et al. 1990, Mann 1999), v této práci byly velikostní rozdíly frustul během roku nepatrné a časová heterogenita neměla statisticky významný vliv na tvarovou variabilitu schránek (více viz dále). Nutno ovšem podotknout, že další podrobný průzkum v oblasti míry korelace velikosti schránky s prostředím a velikosti způsobené rozmnožováním je nezbytný vzhledem k velice obtížné rozlišitelnosti obou uvedených příčin různé velikosti schránek.

Vliv sezóny

Sezónní variabilita ve velikosti a tvaru modelového organismu se ukázala být zanedbatelnou složkou celkové morfologické variability komplexu *F. rhomboides*. Existují studie (Bellinger 1977, Davey 1987, Cerino et al. 2005) dokládající změny velikosti a tvaru rozsivek během sezóny, avšak tento fenomén je prokázán pouze u planktonních rozsivek. V této práci bylo zjištěno, že sezónní morfologická variabilita zaujímá poměrně kompaktní část celkového tvaroprostoru, narozdíl od variability napříč

lokalitami. Není překvapivé, že buňky ze sezónních odběrových míst se v PCA diagramu (obr. 4.1 a 4.2) shlukují mezi buňky z minerotrofních rašelinišť, protože sezónní místa byla stanovena v rámci minerotrofního rašeliniště Swamp. NPR Swamp je komplexem heterogenních rašelinišť lišících se vzájemně nejen trofí (Neustupa et al. 2011, Svoboda 2012). Zjištěná velká morfologická variabilita populací *F. rhomboides* vyskytujících se v rámci této rezervace (viz obr. 4.2b), konkrétně vzorky s názvy Swp, Swn a sezónní vzorky označené číslem odběrového místa a příslušným ročním obdobím, dokládá působení různorodých podmínek panujících na lokalitě Swamp na morfologii buněk. Sezónní odběry byly pro robustnější signál koncipovány na dvou environmentálně odlišných a poměrně vzdálených místech, což se přesně promítlo ve výsledcích analýzy. Na diagramech 4.2a,b lze vysledovat shlukování vzorků podle odběrového místa, resp. buňky odebrané na místě č. 5 jsou si morfologicky podobnější a zároveň odlišnější než buňky z místa č. 3. To samé platí i naopak.

V rámci sezónního výzkumu byly na jednom odběrovém místě (č. 5) prokázány signifikantně větší hodnoty velikosti podzimních schránek. To může být způsobeno shromažďováním většího množství živin a koncentrací olejů v buňce (Bellinger 1977) coby zásobních látek na nepříznivé zimní období. Zvýšený obsah rozpuštěných živin ve vodním sloupci dokládá také naměřená konduktivita (viz příloha 4), která představovala na tomto místě největší hodnotu během celého roku. Tato skutečnost odpovídá již výše zmíněnému tvrzení o výskytu relativně větších buněk v prostředí s relativně vyšší vodivostí. Bellinger (1977) také zmiňuje výskyt největších buněk v podzimním období. Jelikož se ale zabýval především planktonními rozsivkami, skutečnost odůvodňuje změnami souvisejícími se sedimentací buněk. Zatímco Cerino et al. (2005) připisují velké velikostní rozpětí buněk během sezóny příčinám pramenících z ontogeneze nebo špatné identifikaci modelového organismu, který v jeho nejmenších velikostech lze snadno zaměnit s jiným druhem.

Působení faktorů prostředí

Při rozkladu morfologické variability mezi parametry prostředí v této studii se ukázalo, že největší vliv na tvar a velikost schránek modelového organismu má lokalita (resp. typ biotopu a zeměpisná poloha), nicméně působení všech ostatních faktorů bylo také signifikantní. Podobné výsledky shledala i Kreidlová (2012), která se ve své práci zabývala morfologickou variabilitou křemičitých šupin chrysomonád. Nejvíce variability ve tvaru šupin bylo vysvětleno lokalitou, variabilita vysvětlená environmentálními

parametry tvořila pouze necelá procenta. V této práci vysvětlily parametry prostředí několik procent tvarové variability křemičitých schránek rozsivek (celkový vliv pH, konduktivity a nadmořské výšky vysvětlil téměř 14,5 %). Reynolds (1998) podotýká, že trofický gradient (v tomto případě zastoupený proměnnou „lokalita“) nelze považovat za jeden faktor prostředí, nýbrž za několik dílčích spolupůsobících environmentálních proměnných. V předkládané práci je prokázán poměrně velký celkový vliv lokality, naopak její čistý vliv je výrazně nižší. To znamená, že působení lokality nabývá na efektu ve vzájemné vazbě s dalšími faktory.

Je prokázáno, že rozsivky reagují na faktory prostředí (např. salinita, teplota, světlo, pH, živiny, atd.) velmi citlivě a různě silné působení těchto parametrů se může podepisovat na křemičité schránce (Schmid 1979). V přírodních populacích se lze často setkat s fenotypickou plasticitou, která vyjadřuje genetickou diverzitu v rámci druhu regulovanou přirozeným tlakem selekce. Některé druhy rozsivek jsou schopné adaptovat se na mírné změny prostředí, pokud jsou ale vystaveny stresovým podmínkám, mohou vznikat i tzv. teratogenní formy, které nemají genetický základ. Ty se projevují abnormálním celkovým vzhledem frustuly a její nezvyklou ornamentací. Tyto modifikace mohou způsobit mylnou identifikaci druhu, a ještě hůře chybné popisování nových druhů (Falasco et al. 2009).

Já jsem zjistila, že z environmentálních parametrů má na morfologii buněk modelového organismu největší celkový vliv pH. Vrieling et al. (1999) ve své studii konstatují, že pH je velmi důležitá složka pro tvorbu a rozpustnost křemíku, jehož koncentrace v buněčné stěně rozsivek mohou ovlivňovat výslednou morfologii.

V algologii jsou běžně užívané ekologické proměnné jako je pH, vodivost, teplota a průhlednost, které jsou zároveň nejsnáze monitorovatelné (Štěpánková et al. 2008, Šťastný 2010, Neustupa et al. 2011, Poulíčková et al. 2013). V rašeliništních biotopech jsou naměřené hodnoty teploty mnohdy zavádějící, protože teplota mělkých tůní se může během dne rychle měnit. Co se týče průhlednosti, je to parametr relevantní spíše v hlubších stojatých vodách. V některých ekologických pracích (Pan et al. 1996, Neustupa et al. 2009) se lze setkat s měřením trofického statusu vodního sloupce pomocí některých živin, např. celkový dusík, celkový fosfor atd. Tyto proměnné ale mnohdy nemají velkou vypovídající hodnotu (Pan et al. 1996, Kreidlová 2012) a navíc jsou obtížně měřitelné. Proto jsem se ve své práci zaměřila mimo jiné na hodnocení na základě autekologických vlastností biologických organismů, společenstev rozsivek.

5.2 Společenstva rozsivek

Co se týče počtu druhů nalezených ve vzorcích, dalo by se konstatovat, že nevykazuje žádný obecný trend v závislosti na prostředí a měřených parametrech. Nebyla prokázána signifikantní korelace mezi druhovou bohatostí a pH ani konduktivitou, jako např. ve studii (Neustupa et al. 2009, Neustupa et al. 2013). Počty druhů neodráží ani typ biotopu v závislosti na jeho odlišné trofii. Dala by se očekávat menší druhová bohatost na ombrotrofních místech, nicméně průměrný počet druhů na těchto místech byl překvapivě větší (o 0,7 druhu) než na minerotrofních biotopech. To je nejspíše způsobeno velkým počtem nalezených druhů (17 a 23) na ombrotrofní lokalitě Černá jezírka, kde byly naměřeny relativně vyšší hodnoty pH (okolo 5). Větší počet druhů na mírně kyselých stanovištích je způsoben pravděpodobně překryvem nik acidofilních i acidotolerantních organismů. Počty druhů se výrazně lišily dokonce i v rámci jedné lokality, tedy mezi dvěma odběrovými místy. Například na lokalitě Břehyně-Pecopala bylo nalezeno na dvou poměrně blízkých odběrových místech 7 (vzorek s názvem Br1) a 19 (vzorek Br2) druhů. To může být způsobeno heterogenitou mikrohabitátů, která obecně přispívá k větší diverzitě společenstev v prostředí (Krejci & Lowe 1986, Veselá 2009).

V případech konkrétně identifikovaných taxonů rozsivek lze ovšem vypočítat trendy související s jejich distribucí a faktory prostředí. Všechny nalezené druhy měly víceméně podobné autekologické vlastnosti reflektující biotopy jako jsou rašeliniště. Nejvíce zaznamenaných druhů v této práci patří do rodu *Eunotia* a *Pinnularia*. Jedná se o epifytické či epipelické rozsivky dominující v kyselých, oligo-dystrofních vodách s nízkým množstvím elektrolytů (Sládeček 1986, Gaiser & Johansen 2000, Borics et al. 2003, Lerín & Sánchez 2007). Protože v této práci není hlavním cílem floristický průzkum, nebudu se zde dopodrobna věnovat charakteristikám jednotlivých nalezených druhů. Podobné rašeliništní taxony jsou diskutovány např. ve studiích (Pouličková et al. 2004, Kulikovskii 2008, Kulikovskiy 2009). Pozoruhodný je však nález subaerické rozsivky *Pinnularia borealis* (vzorek PV3) na lokalitě Přebuzské vřesoviště. Tato lokalita je vysychavá, proto je zde možné nalézt některé subaerické taxony, což možná také souvisí s tím, že se ukázala být nejvíce odlišná od ostatních lokalit na základě druhového složení. Vysychání může výrazně ovlivňovat strukturu řas (Neustupa et al. 2011). Na základě Jaccardova indexu podobnosti byly lokality Černý rybník a Klečové louky vyhodnoceny jako zcela nepodobné. Fakt, že nesdílely ani jeden společný druh, naprosto vystihuje jejich protikladné charakteristiky prostředí. Rašeliniště Černého rybníka je typicky

minerotrofní, geograficky níže položené stanoviště, na rozdíl od ombrotrofního vrchoviště, kterým je přírodní rezervace Klečové louky. Je tedy pochopitelné, že v natolik rozdílných biotopech se budou vyskytovat odlišné druhy. Velký efekt trofie na společenstva rozsivek byl zaznamenán i ve výstupu neparametrické analýzy variance. Vliv trofického gradientu na strukturu bentických rozsivek byl prokázán také ve studii (Potapova & Charles 2002).

Na otázku, zda diverzita rozsivek nalezených v této práci odpovídá morfologické variabilitě schránek modelového organismu, bylo odpovězeno formou Prokrustovské analýzy. Výsledek této analýzy byl signifikantní, což znamená, že lze objektivně srovnávat druhové složení spoluvyskytujících se rozsivek s morfologickou variabilitou komplexu *F. rhomboides* v přírodních vzorcích.

Na závěr si dovoluji shrnout, že ačkoli jsou rozsivky často využívány jako bioindikátory a jejich složení odráží základní parametry prostředí jako je pH a typ biotopu (Potapova & Charles 2002, Pan et al. 1996, Weckström & Korhola 2001, Antoniadis et al. 2005, Pouličková et al. 2004), což se potvrdilo i v této práci, je jejich klasifikace mnohdy nejednoznačná, jak již bylo zmíněno v úvodu. Recentní problémy se synonymy a překrývající se morfologií mezi tradičními druhy (Mann 1999) se odráží v různé determinační literatuře. Identifikace je tedy ve velké míře subjektivní. Přesné určení druhu na základě morfologie pozorovatelné mikroskopickou technikou je někdy svízelné i pro oko zkušeného diatomologa. Proto doporučuji metody geometrické morfometriky jako objektivní hodnocení téměř nerozlišitelných morfologických rozdílů křemičitých schránek rozsivek. Geometrická morfometrika sice nemusí vždy jednoznačně stanovit přesné hranice mezi druhy (Potapova & Hamilton 2007), nicméně definuje morfotypy a ty lze brát spolu s jejich případnou ekologickou diferenciací jako samostatné entity. Existuje mnoho přístupů, které pomáhají řešit podobné taxonomické otázky (druhový koncept) a nástroje geometrické morfometriky představují technicky snadnější přístup než např. křížící pokusy (biologický druhový koncept) a zároveň levnější přístup než molekulární metody.

Morfologický druhový koncept je u protistních organismů používán už více než 200 let. Přirozený výběr a dynamika ekosystémů mají tendenci vytvářet diferenciované skupiny organismů (druhů) s odlišnými sadami fenotypových vlastností. Identifikace druhu je primárně založená na jeho morfologii. Introdukce molekulárních markerů způsobila velké zmatky v oblasti taxonomie. Na jejich základě byla prokázána větší druhová diverzita. Tvrdí se, že molekulární metody podporují objektivní klasifikaci druhů,

ale jedním z důvodů obrovské genotypové rozmanitosti může být například velké množství selektivně neutrálních mutací, které se nahromadily s postupem času. Dalším důvodem pochybnosti molekulární fylogenetiky jsou potenciální problémy způsobené algoritmy užívanými při rekonstrukci fylogenetických stromů. Občasná kontradikce molekulárních metod a morfologie tedy může pramenit z těchto případných nedostatků genových analýz (Finlay 2004, Fenchel & Finlay 2006).

V této práci je podporován ekologický pohled na morfologii organismů. Je známo, že morfotypy poskytují velké množství informací o prostředí (Finlay et al. 2006, Potapova & Hamilton 2007, Pouličková et al. 2008). Biotické a abiotické interakce v přirozených podmínkách se mnohdy podepisují na fenotypu organismu. Rozsivky coby morfologicky bohatá skupina mají ekologicky velkou vypovídající hodnotu (Smol & Stoermer 2010). I kdyby neměla morfologie genetický základ a byla by pouze výsledkem fenotypické plasticity, přesto lze hodnotit tvarovou variabilitu skrz podmínky prostředí, což dokládá výzkum v této práci. V praxi to znamená, že podle biotopu, ve kterém se organismus vyskytuje, lze odvodit jeho morfologii a naopak.

6 Závěr

V předkládané diplomové práci byla pomocí landmarkové geometrické morfometriky analyzována morfologická variabilita 960 křemičitých schránek bentického rašeliništního druhového komplexu *F. rhomboides*. Byly identifikovány hlavní trendy tvarové variability, které odráží působení podmínek prostředí. Ukázalo se, že velikost a alometrické tvarové změny jsou u přírodních populací důležitou součástí celkové morfologické variability, která reflektuje parametry prostředí, zejména typ biotopu z hlediska gradientu trofie. Na tvar schránek modelového organismu má ale také signifikantní vliv pH, vodivost, nadmořská výška a geografická vzdálenost.

Během sezóny nebyly prokázány významné změny ve velikosti a tvaru buněk *F. rhomboides* ve srovnání s variabilitou mezi lokalitami. Dá se tedy předpokládat, že tvarová dynamika schránek způsobená změnami během životního cyklu přírodních populací rozsivek není příliš markantní.

Jednotlivé druhy nalezených rozsivek projevovaly autekologické vlastnosti odpovídající specifickým typům rašeliniště. Na společenstva rozsivek měly statisticky významný vliv proměnné: pH a typ lokality (tj. typ biotopu). Nebyla ovšem pozorována signifikantní korelace druhového bohatství a přírodních podmínek.

Bylo také testováno, zda lze srovnávat strukturu společenstev rozsivek a morfologickou variabilitu schránek komplexu *F. rhomboides* na lokalitách pomocí ordinačních metod. Průkaznost testu ukázala, že ano, nicméně rozložení lokalit na základě obou posuzovaných souborů dat je poměrně rozdílné.

Nástroje geometrické morfometriky umožnily v této práci objektivně interpretovat morfologickou variabilitu křemičitých schránek rozsivek, která u *F. rhomboides* koreluje s ekologickými daty. Informativní hodnota morfotypů je velmi důležitá například při environmentálním posuzování. Na morfologicko-ekologický vztah by tedy měl být při definování druhů kladen větší důraz.

7 Literatura

- Adams, D. C., Rohlf, F. J. & Slice, D. E. (2004): Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology*, 71(1): 5-16.
- Aerts, R., Wallen, B. & Malmer, N. (1992): Growth-limiting nutrients in *Sphagnum*-dominated bogs subject to low and high atmospheric nitrogen supply. *Journal of Ecology*, 80(1): 131-140.
- Alverson, A. J. (2008): Molecular systematics and the diatom species. *Protist*, 159(3): 339-53.
- Amato, A., Orsini, L., D'Alelio, D. & Montresor, M. (2005): Life cycle, size reduction patterns, and ultrastructure of the pennate planktonic diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae) 1. *Journal of Phycology*, 41(3): 542-556.
- Antoniades, D., Douglas, M. S. V. & Smol, J. P. (2005): Benthic diatom autecology and inference model development from the Canadian High Arctic Archipelago. *Journal of Phycology*, 41(1): 30-45.
- Babanazarova, O. V., Likhoshway, Y. V. & Sherbakov, D. Y. (1996): On the morphological variability of *Aulacoseira baicalensis* and *Aulacoseira islandica* (Bacillariophyta) of Lake Baikal, Russia. *Phycologia*, 35(2): 113-123.
- Battarbee, R., Jones, V., Flower, R., Cameron, N., Bennion, H., Carvalho, L. & Juggins, S. (2002) Diatoms. Tracking environmental change using lake sediments (eds. J. Smol, H. J. Birks, W. Last, R. Bradley & K. Alverson), Springer Netherlands.
- Beier, T. & Lange-Bertalot, H. (2007): A synopsis of cosmopolitan, rare and new *Frustulia* species (Bacillariophyceae) from ombrotrophic peat bogs and minerotrophic swamps in New Zealand. *Nova Hedwigia*, 85(1): 73-91.
- Bellinger, E. G. (1977): Seasonal size changes in certain diatoms and their possible significance. *British Phycological Journal*, 12(3): 233-239.
- Beszteri, B., Ács, É. & Medlin, L. (2005): Conventional and geometric morphometric studies of valve ultrastructural variation in two closely related *Cyclotella* species (Bacillariophyta). *European Journal of Phycology*, 40(1): 89-103.
- Borics, G., Tóthmérész, B., Grigorszky, I., Padisák, J., Várbíró, G. & Szabó, S. (2003): Algal assemblage types of bog-lakes in Hungary and their relation to water chemistry, hydrological conditions and habitat diversity. *Hydrobiologia*, 502(1-3): 145-155.
- Borowitzka, M. A., Chiappino, M. L. & Volcani, B. E. (1977): Ultrastructure of a chain-forming diatom *Phaeodactylum tricornutum* 1. *Journal of Phycology*, 13(2): 162-170.
- Borowitzka, M. A. & Volcani, B. E. (1978): The polymorphic diatom *Phaeodactylum tricornutum*: Ultrastructure of its morphotypes 1,2. *Journal of Phycology*, 14(1): 10-21.

-
- Cerino, F., Orsini, L., Sarno, D., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L. & Zingone, A. (2005): The alternation of different morphotypes in the seasonal cycle of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia galaxiae*. *Harmful Algae*, 4(1): 33-48.
- Cox, E. J. (2010): Morphogenetic information and the selection of taxonomic characters for raphid diatom systematics. *Plant Ecology and Evolution*, 143(3): 271-277.
- Créach, V., Ernst, A., Sabbe, K., Vanelslander, B., Vyverman, W. & Stal, L. J. (2006): Using quantitative PCR to determine the distribution of a semicryptic benthic diatom, *Navicula Phyllepta* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 42(5): 1142-1154.
- Damman, A. W. H. (1978): Distribution and movement of elements in ombrotrophic peat bogs. *Oikos*, 30(3): 480-495.
- Davey, M. C. (1987): Seasonal variation in the filament morphology of the freshwater diatom *Melosira granulata* (Ehrenb.) Ralfs. *Freshwater Biology*, 18(1): 5-16.
- De Martino, A., Meichenin, A., Shi, J., Pan, K. & Bowler, C. (2007): Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions 1. *Journal of Phycology*, 43(5): 992-1009.
- Falasco, E., Bona, F., Badino, G., Hoffmann, L. & Ector, L. (2009): Diatom teratological forms and environmental alterations: a review. *Hydrobiologia*, 623(1): 1-35.
- Fenchel, T. & Finlay, B. J. (2006): The diversity of microbes: resurgence of the phenotype. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1475): 1965-1973.
- Finlay, B. J. (2004): Protist taxonomy: an ecological perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359(1444): 599-610.
- Finlay, B. J., Esteban, G. F., Brown, S., Fenchel, T. & Hoef-Emden, K. (2006): Multiple cosmopolitan ecotypes within a microbial eukaryote morphospecies. *Protist*, 157(4): 377-90.
- Foote, M. (1993): Contributions of individual taxa to overall morphological disparity. *Paleobiology*, 19(4): 403-419.
- Fránková, M., Poulíčková, A., Neustupa, J., Pichrtová, M. & Marvan, P. (2009): Geometric morphometrics - a sensitive method to distinguish diatom morphospecies: a case study on the sympatric populations of *Reimeria sinuata* and *Gomphonema tergestinum* (Bacillariophyceae) from the River Bečva, Czech Republic. *Nova Hedwigia*, 88(1): 81-95.
- Gaiser, E. E. & Johansen, J. (2000): Freshwater diatoms from Carolina bays and other isolated wetlands on the atlantic coastal plain of South Carolina, U.S.A., with descriptions of seven taxa new to science. *Diatom Research*, 15(1): 75-130.

-
- Gilbert, D., Amblard, C., Bourdier, G. & Francez, A. J. (1998) Short-term effect of nitrogen enrichment on the microbial communities of a peatland. *Oceans, Rivers and Lakes: Energy and Substance Transfers at Interfaces* (eds J. C. Amiard, B. Rouzic, B. Berthet & G. Bertru), Springer Netherlands.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2013) AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. URL: <http://www.algaebase.org>
- Hájková, P., Hájek, M., Rybníček, K., Jiroušek, M., Tichý, L., Králová, Š. & Mikulášková, E. (2011): Long-term vegetation changes in bogs exposed to high atmospheric deposition, aerial liming and climate fluctuation. *Journal of Vegetation Science*, 22(5): 891-904.
- Hammer, O., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. (2001): PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1): 9 pp. (<http://folk.uio.no/ohammer/past>)
- Harold, F. M. (1990): To shape a cell: an inquiry into the causes of morphogenesis of microorganisms. *Microbiological reviews*, 54(4): 381-431.
- Harrison, P. J., Conway, H. L., Holmes, R. W. & Davis, C. O. (1977): Marine diatoms grown in chemostats under silicate or ammonium limitation. III. Cellular chemical composition and morphology of *Chaetoceros debilis*, *Skeletonema costatum*, and *Thalassiosira gravida*. *Marine Biology*, 43(1): 19-31.
- Hodač, L. (2007): Geometrická morfometrika při studiu populační dynamiky a ekologie rodu *Pediastrum* v eutrofních vodních nádržích. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta UK, Praha.
- Holmes, R. W. & Reimann, B. E. F. (1966): Variation in Valve Morphology During the Life Cycle of the Marine Diatom *Coscinodiscus concinnus*. *Phycologia*, 5(4): 233-244.
- Hubbell, S. P. (2001) The unified neutral theory of biodiversity and biogeography. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. In: Vanellander, B., Créach, V., Vanormelingen, P., Ernst, A., Chepurnov, V. A., Sahan, E., Muyzer, G., Stal, L. J., Vyverman, W. & Sabbe, K. (2009): Ecological Differentiation between Sympatric Pseudocryptic Species in the Estuarine Benthic Diatom *Navicula Phyllepta* (Bacillariophyceae)1. *Journal of Phycology*, 45(6): 1278-1289.
- Joosten, H. & Clarke, D. (2002) Wise use of mires and peatlands. International mire conservation group and international peat society, Finland.
- Kociolek, J. P. & Stoermer, E. F. (2010): Variation and polymorphism in diatoms: the triple helix of development, genetics and environment. A review of the literature. *Vie et milieu - Life and environment*, 60(2): 75-87.
- Kooistra, W. H. C. F., Sarno, D., Balzano, S., Gu, H., Andersen, R. A. & Zingone, A. (2008): Global diversity and biogeography of *Skeletonema* species (Bacillariophyta). *Protist*, 159(2): 177-193.

-
- Krammer, K. (2000) Diatoms of Europe : diatoms of the European inland waters and comparable habitats, Vol.1. The genus *Pinnularia*. Gantner, Ruggell.
- Krammer, K. & Lange-Bertalot, H. (1986) Bacillariophyceae, 1. Teil: Naviculaceae. In: Ettl H., Gerloff J., Heynig H., Mollenhauer D. (eds.) Siisswasserflora von Mitteleuropa, Band 2. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag
- Kreidlová, J. (2012): *Synura echinulata* (Synurales)-tvarová variabilita křemičitých šupin přírodních populací závislá na faktorech prostředí; doprovodné druhy křemičitých chrysomonád. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta UK, Praha.
- Krejci, M. E. & Lowe, R. L. (1986): Importance of Sand Grain Mineralogy and Topography in Determining Micro-Spatial Distribution of Epipsammic Diatoms. *Journal of the North American Benthological Society*, 5(3): 211-220.
- Křísa, B. & Prášil, K. (1994) Sběr, preparace a konzervace rostlinného materiálu. Přírodovědecká fakulta UK, Praha.
- Kubát, K., Hrouda, L., Chrtěk, J. jun., Kaplan, Z., Kirschner, J. & Štěpánek, J. (eds., 2002) Klíč ke květeně České republiky, Academia, Praha
- Kulikovskii, M. S. (2008): The species composition and distribution of diatoms in sphagnum bogs of European Russia: Ecosystems of the Volga Upland. *Inland Water Biology*, 1(4): 347-355.
- Kulikovskiy, M. S. (2009): The species composition and distribution of diatom algae in sphagnum bogs in European Russia: The Polistovo-Lovatskii land tract. *Inland Water Biology*, 2(2): 135-143.
- Lange-Bertalot, H. (2001) Diatoms of Europe : diatoms of the European inland waters and comparable habitats, Vol.2. *Navicula* sensu stricto, 10 genera separated from *Navicula* sensu lato, *Frustulia*. Gantner, Ruggell.
- Lange-Bertalot, H., Bak, M., Witkowski, A. & Tagliaventi, N. (2011) Diatoms of Europe: diatoms of the European inland waters and comparable habitats, Vol. 6. *Eunotia* and some related genera. Gantner, Ruggell.
- Lange-Bertalot, H. & Jahn, R. (2000): On the Identity of *Navicula* (*Frustulia*) *rhomboides* and *Frustulia saxonica* (Bacillariophyceae). *Systematics and Geography of Plants*, 70(2): 255-261.
- Legendre, P. & Legendre, L. (1998) Numerical Ecology. Elsevier, Amsterdam.
- Lerín, R. O. & Sánchez, J. C. (2007): Distribution and taxonomic notes on *Eunotia* Ehrenberg 1837 (Bacillariophyceae) in rivers and streams of Northern Spain. *Limnetica*, 26(2): 415-434.
- Lürling, M. (2009): Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 39(2): 85-101.

- Mann, D. G. (1999): The species concept in diatoms. *Phycologia*, 38(6): 437-495.
- Mann, D. G. & Droop, S. J. M. (1996): Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms. *Hydrobiologia*, 336(1-3): 19-32.
- Mann, D. G., McDonald, S. M., Bayer, M. M., Droop, S. J. M., Chepurnov, V. A., Loke, R. E., Ciobanu, A. & du Buf, J. M. H. (2004): The *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyceae): morphometric analysis, ultrastructure and mating data provide evidence for five new species. *Phycologia*, 43(4): 459-482.
- Mayr, E. (1942) Systematics and the origin of species. Columbia University Press, New York.
- Natura 2000. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR. © 2006 URL: <http://www.nature.cz/natura2000-design3/hp.php>
- Neustupa, J., Černá, K. & Št'astný, J. (2009): Diversity and morphological disparity of desmid assemblages in Central European peatlands. *Hydrobiologia*, 630(1): 243-256.
- 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.
- Neustupa, J. & Hodač, L. (2005): Changes in shape of the coenobial cells of an experimental strain of *Pediastrum duplex* var. *duplex* (Chlorophyta) reared at different pHs. *Preslia, Praha*, 77(4): 439-452.
- Neustupa, J., Veselá, J. & Št'astný, J. (2013): Differential cell size structure of desmids and diatoms in the phytobenthos of peatlands. *Hydrobiologia*, 709(1): 159-171.
- Oksanen, J., Blanchet, G.F., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, R.B. (2011) Vegan: Community Ecology Package, R package version. URL http://cran.rproject.org/web/checks/check_summary.html
- Pan, Y., Stevenson, R. J., Hill, B. H., Herlihy, A. T. & Collins, G. B. (1996): Using diatoms as indicators of ecological conditions in lotic systems: A regional assessment. *Journal of the North American Benthological Society*, 15(4): 481-495.
- Pappas, J. L. & Stoermer, E. F. (2003): Legendre shape descriptors and shape group determination of specimens in the *Cymbella cistula* species complex. *Phycologia*, 42(1): 90-97.
- Potapova, M. & Hamilton, P. B. (2007): Morphological and ecological variation within the *Achnantheidium minutissimum* (Bacillariophyceae) Species Complex. *Journal of Phycology*, 43(3): 561-575.
- Potapova, M. G. & Charles, D. F. (2002): Benthic diatoms in USA rivers: distributions along spatial and environmental gradients. *Journal of Biogeography*, 29(2): 167-187.

-
- Pouličková, A., Bergová, K., Hnilica, R. & Neustupa, J. (2013): Epibryic diatoms from ombrotrophic mires: diversity, gradients and indicating options. *Nova Hedwigia*, 96(3): 351-365.
- Pouličková, A., Hájková, P., Křenková, P. & Hájek, M. (2004): Distribution of diatoms and bryophytes on linear transects through spring fens. *Nova Hedwigia*, 78(3-4): 411-424.
- Pouličková, A. & Mann, D. G. (2006): Sexual reproduction in *Navicula cryptocephala* (Bacillariophyceae)1. *Journal of Phycology*, 42(4): 872-886.
- Pouličková, A., Špačková, J., Kelly, M. G., Duchoslav, M. & Mann, D. G. (2008): Ecological variation within *Sellaphora species* complexes (Bacillariophyceae): specialists or generalists? *Hydrobiologia*, 614(1): 373-386.
- Pouličková, A., Veselá, J., Neustupa, J. & Škaloud, P. (2010): Pseudocryptic diversity versus cosmopolitanism in diatoms: a case study on *Navicula cryptocephala* Kutz. (Bacillariophyceae) and morphologically similar taxa. *Protist*, 161(3): 353-69.
- R Development Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Reynolds, C. S. (1998): What factors influence the species composition of phytoplankton in lakes of different trophic status? *Hydrobiologia*, 369-370(0): 11-26.
- Rhode, K. M., Pappas, J. L. & Stoermer, E. F. (2001): Quantitative analysis of shape variation in type and modern populations of *Meridion* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 37(1): 175-183.
- Rodriguez, F., Derelle, E., Guillou, L., Le Gall, F., Vaultot, D. & Moreau, H. (2005): Ecotype diversity in the marine picoeukaryote *Ostreococcus* (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Environ Microbiol*, 7(6): 853-9.
- Rohlf, F.J. (2003) TpsSmall, ver. 1.20. – Department of Ecology and Evolution, State University New York at Stony Brook, New York.
- Rohlf, F.J. (2010a) TpsDig2, ver. 2. 16
(2010b) TpsRelw, ver. 1.49.
(2010c) TpsUtil, ver. 1.47 – Department of Ecology and Evolution, State University New York at Stony Brook, New York.
- Rohlf, F.J. (2011) TpsRegr, ver. 1. 38. – Department of Ecology and Evolution, State University New York at Stony Brook, New York.
- Round, F. E., Crawford, R. M. & Mann, D. G. (1990) The diatoms: the biology and morphology of the genera. Cambridge University Press.
- Rydin, H. & Jeglum, J. (2006) The biology of peatlands. Oxford University Press.

- Savriama, Y. & Klingenberg, C. P. (2011): Beyond bilateral symmetry: geometric morphometric methods for any type of symmetry. *BMC Evol Biol*, 11: 280.
- Schmid, A.-M. (1979): Influence of environmental factors on the development of the valve in diatoms. *Protoplasma*, 99(1-2): 99-115.
- Siver, P. A. & Baskette, G. (2004): A morphological examination of *Frustulia* (Bacillariophyceae) from the Ocala National Forest, Florida, USA. *Canadian Journal of Botany*, 82(5): 629-644.
- Sládeček, V. (1986): Diatoms as Indicators of Organic Pollution. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 14(5): 555-566.
- Smol, J. P. & Stoermer, E. F. (2010) The diatoms: applications for the environmental and earth sciences. Cambridge University Press.
- Stojanovski, P. & Kalina, T. (1989): Diatom flora and syntaxonomy of an oligotrophic-dystrophic algal community in a nature reservation Swamp (Doksy, Northern Bohemia). *Preslia*, 61: 97-105.
- Svoboda, P. (2012): Rozšíření, diverzita a ekologie bentických krásivek na lokálním prostorovém měřítku. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta UK, Praha.
- Št'astný, J. (2009): The desmids of the Swamp Nature Reserve (North Bohemia, Czech Republic) and a small neighbouring bog: species composition and ecological condition of both sites. *Fottea*, 9(1): 135-148.
- Št'astný, J. (2010): Desmids (Conjugatophyceae, Viridiplantae) from the Czech Republic; new and rare taxa, distribution, ecology. *Fottea*, 10(1): 1-74.
- Štěpánková, J., Vavrušková, J., Hašler, P., Mazalová, P. & Pouličková, A. (2008): Diversity and ecology of desmids of peat bogs in the Jizerské hory Mts. *Biologia*, 63(6): 895-900.
- Tesson, B., Gaillard, C. & Martin-Jézéquel, V. (2009): Insights into the polymorphism of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Botanica Marina*, 52(2): 104-116.
- Trobajo, R., Clavero, E., Chepurnov, V. A., Sabbe, K., Mann, D. G., Ishihara, S. & Cox, E. J. (2009): Morphological, genetic and mating diversity within the widespread bioindicator *Nitzschia palea* (Bacillariophyceae). *Phycologia*, 48(6): 443-459.
- Vanelslander, B., Créach, V., Vanormelingen, P., Ernst, A., Chepurnov, V. A., Sahan, E., Muyzer, G., Stal, L. J., Vyverman, W. & Sabbe, K. (2009): Ecological differentiation between sympatric pseudocryptic species in the estuarine benthic diatom *Navicula phyllepta* (Bacillariophyceae)1. *Journal of Phycology*, 45(6): 1278-1289.
- Vanormelingen, P., Chepurnov, V. A., Mann, D. G., Sabbe, K. & Vyverman, W. (2008): Genetic divergence and reproductive barriers among morphologically heterogeneous sympatric clones of *Eunotia bilunaris* sensu lato (Bacillariophyta). *Protist*, 159(1): 73-90.

-
- Vartanian, M., Descles, J., Quinet, M., Douady, S. & Lopez, P. J. (2009): Plasticity and robustness of pattern formation in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *New Phytol*, 182(2): 429-42.
- Veselá, J. (2009): Spatial heterogeneity and ecology of algal communities in an ephemeral sandstone stream in the Bohemian Switzerland National Park, Czech Republic. *Nova Hedwigia*, 88(3-4): 531-547.
- Veselá, J., Neustupa, J., Pichrtová, M. & Poulíčková, A. (2009): Morphometric study of *Navicula* morphospecies (Bacillariophyta) with respect to diatom life cycle. *Fottea*, 9(2): 307-316.
- Veselá, J., Urbánková, P., Černá, K. & Neustupa, J. (2012): Ecological variation within traditional diatom morphospecies: diversity of *Frustulia rhomboides* sensu lato (Bacillariophyceae) in European freshwater habitats. *Phycologia*, 51(5): 552-561.
- Vrieling, E. G., Gieskes, W. W. C. & Beelen, T. P. M. (1999): Silicon deposition in diatoms: control by the pH inside the silicon deposition vesicle. *Journal of Phycology*, 35(3): 548-559.
- Watanabe, M., Mayama, S., Hiroki, M. & Nozaki, H. (2000): Biomass, species composition and diversity of epipelagic algae in mire pools. *Hydrobiologia*, 421(1): 91-102.
- Weckström, J. & Korhola, A. (2001): Patterns in the distribution, composition and diversity of diatom assemblages in relation to ecoclimatic factors in Arctic Lapland. *Journal of Biogeography*, 28(1): 31-45.
- Winder, M., Reuter, J. E. & Schladow, S. G. (2009): Lake warming favours small-sized planktonic diatom species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1656): 427-435.
- Zahradnický, J. & Mackovčín, P. (2004) Plzeňsko a Karlovarsko. In: Mackovčín P. & Sedláček M. (eds.): Chráněná území ČR, svazek XI. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR a Eko Centrum Brno, Praha.
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, H. D. & Fink, W. L. (2004) Geometric morphometrics for biologist: A primer, Elsevier Academic Press, New York.

8 Přílohy

Seznam příloh

Příloha 1: Tabulka s údaji o podmínkách prostředí na jednotlivých odběrových místech

Příloha 2: Seznam všech nalezených taxonů rozsivek s informacemi o prezenci/absenci (1/0) na odběrových místech

Příloha 3: Tabulka znázorňující podobnost odběrových míst na základě druhového složení společenstev rozsivek (Jaccardův index podobnosti)

Příloha 4: Tabulka s naměřenými hodnotami parametrů prostředí na sezónních odběrových místech

Příloha 5: Tabulka s hodnotami vysvětlené variability tvaru sezónně odebraných buněk *F. rhomboides* různými proměnnými