

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Bc. Helena Bestová

Fylogenetická struktura společenstev krásivek
The phylogenetic structure of desmid communities

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Pavel Škaloud, Ph.D.

Praha, 2012

Prohlášení:

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

V Praze 7. května 2012

.....
Bc. Helena Bestová

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem členům algologického pracoviště PřF UK za příjemné pracovní prostředí, především pak svému školiteli Pavlovi Škaloudovi za jeho optimismus, schopnost člověka nadchnout do práce a nezměrnou trpělivost. Své rodině velmi děkuji za podporu při studiu.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá procesy formujícími rašeliništní společenstva krásivek. K zodpovězení otázky, jakými procesy jsou společenstva utvářena, využívá studia fylogenetické struktury těchto společenstev. Právě fylogenetická struktura propojuje ekologii společenstev a informace o evoluční historii druhů tato společenstva tvořících.

Celkem bylo analyzováno 89 rašeliništních společenstev krásivek. Většina společenstev byla fylogeneticky strukturovaná, což svědčí o tom, že jsou strukturovaná klasickými nikovými procesy, jako jsou například kompetice a environmentální filtrování. Použití informace o environmentálních parametrech lokalit odhalilo vliv pH na jejich strukturu. Nízké pH představuje pro krásivková společenstva silný stres a filtruje společenstvo ve prospěch blíže příbuzných druhů. Při vyšším pH tento environmentální filtr povolí a společenstva jsou strukturovaná kompeticí, která eliminuje blízké příbuzné druhy. Výsledkem je vytvoření fylogeneticky rozptýlených společenstev. Jiné faktory jako například konduktivita a geografická vzdálenost neměly na fylogenetickou strukturu společenstev vliv.

Klíčová slova: fylogenetická struktura, krásivky, Desmidiáles, environmentální filtrování, pH

Abstract

This diploma thesis focuses on processes that structure desmid communities. Phylogenetic structure of communities helps to reveal those processes. Phylogenetic structures links ecology of communities and evolutionary history of species in those communities.

Totally I analysed 89 desmid communities. Most of them were phylogenetically structured, which agrees with the hypothesis that communities are structured by classical niche-related processes, such as competition and environmental filtering. Usage of environmental information showed the influence of pH on the community structure. Low pH acts as a strong environmental filter. Under the influence of this filter communities are composed of closely related species. In the absence of this filter communities are structured by competition. Localities with higher pH host communities of distantly related species – phylogenetically overdispersed. There was found no influence of conductivity and geographical distance on phylogenetic structure of desmids communities.

Key words: phylogenetic structure, desmids, Desmidiatales, environmental filtering, pH

Obsah

1	Úvod.....	7
1.1	Procesy formující společenstva	7
1.1.1	Niková teorie	7
1.1.2	Neutrální procesy	8
1.2	Fylogenetická struktura společenstev	8
1.2.1	Nenáhodná fylogenetická struktura.....	9
1.2.2	Náhodná fylogenetická struktura	11
1.2.3	Fylogenetická struktura napříč gradientem	11
1.3	Krásivky	12
2	Materiál a metody.....	15
2.1	Odběry vzorků a postup určování.....	15
2.2	Analýza DNA	15
2.2.1	Metody izolace kultur a kultivace	15
2.2.2	Izolace DNA, PCR, přečišťování	15
2.2.3	Zpracování sekvencí.....	16
2.3	Analýza fylogenetické struktury.....	17
2.3.1	Měřítka fylogenetické struktury	17
2.3.2	Jednorozměrné statistické analýzy	19
2.3.3	Mnohorozměrné statistické analýzy.....	19
3	Výsledky.....	21
3.1	Charakteristika odběrů.....	21
3.2	Fylogeneze Desmidiales	23
3.2.1	Vyizolované taxony.....	23
3.2.2	Fylogenetická analýza	23
3.3	Fylogenetická struktura	31
3.3.1	Fylogenetická struktura a prostředí	31
3.3.2	Fylogenetická struktura a geografická vzdálenost	33
3.3.3	Fylogenetická struktura a sezónnost	33
4	Diskuze.....	35
4.1	Charakteristika odběrů.....	35
4.2	Fylogeneze Desmidiales	36
4.3	Fylogenetická struktura	37
4.3.1	Celková fylogenetická struktura.....	37
4.3.2	Fylogenetická struktura a environmentální parametry.....	38
4.3.3	Fylogenetická struktura a geografická vzdálenost, sezóna	40
5	Závěr.....	41
6	Literatura	42
	Přílohy.....	46

1 Úvod

1.1 Procesy formující společenstva

Otázka, jak jsou formována společenstva, je centrální téma ekologie společenstev. Porozumění procesům, vytvářejícím variaci v diverzitě a abundanci společně se vyskytujícími druhů je jeden z hlavních cílů ekologie společenstev. Lokální společenstva jsou podmnožinou většího počtu potenciálních členů společenstva - *species pool* (Kraft et al., 2007). Na to, jaké faktory určují složení těchto lokálních společenstev, jsou dva základní pohledy (Cavender-Bares et al., 2009). První, tzv. klasické nikové zdůrazňují roli kompetitivního vyloučení a abiotických faktorů působících v podobě environmentálních filtrů (Elton, 1946; Weiher & Keddy, 1995). Druhý pohled považuje druhy za ekologicky ekvivalentní a složení společenstva určují procesy neutrální. Tato teorie je nazývána neutrální teorie biodiverzity a biogeografie (Hubbell, 2001).

1.1.1 Niková teorie

Klasické studie ukázaly, že druhy se mohou lišit ve využívání zdrojů, schopnosti kolonizace a odpovědích na fluktuace prostředí. Teorie niky byla zformulována Hutchinsonem (1957) a nika definována jako n -rozměrný hyperprostor, který shrnuje faktory potřebné k udržení pozitivní růstové rychlosti druhu (Hutchinson, 1957; Emerson & Gillespie, 2008). Tato teorie staví na základu principu kompetitivního vyloučení (Gause, 1934), žádné dva druhy se stejnou nikou nemohou trvale koexistovat. Totožné niky způsobují, že druhy limitují vlastní populaci více než populace ostatních druhů čímž podporují koexistenci rozdílných druhů (Chesson, 2000). U koexistujících druhů je limitující velikost přesahu nik (Hutchinson, 1957). To, že se ekologicky příbuzné druhy navzájem vylučují ze stejných společenstev pomocí kompetice, vede k „zakázaným“ kombinacím druhů (Diamond, 1975).

Darwin (1859) ve své práci *Origin of Species* navrhl jednu z prvních evolučních hypotéz zakládajících se na kompetici - „souboj“ mezi blízkce příbuznými druhy je větší než mezi vzdáleně příbuznými. V dnešní době se tento princip nazývá limitující fylogenetická podobnost - *phylogenetic limiting similarity*. Vychází z předpokladu, že blízkce příbuzné druhy pravděpodobně sdílejí podobné niky. Větší podobnost nik mezi příbuznými druhy se odráží v častějším kompetitivním vyloučení (Violle et al., 2011). Blízkce příbuzné druhy ovšem také sdílejí ekologické nároky, a proto se budou vyskytovat společně v habitatech, kde tyto nároky budou splněny (Helmus et al., 2007b).

1.1.2 Neutrální procesy

Neutrální teorie biodiverzity a biogeografie předpokládá, že druhy jsou funkčně ekvivalentní. To znamená, že druhy na stejné trofické úrovni mají stejnou fitness. Její autor Hubbell (2001) se zaměřuje na roli šíření, disturbance a stochastických procesů ve strukturování ekologických společenstev. Nepochybuje o tom, že existují mezidruhové rozdíly v nikách. Jen si klade otázku, jak moc jsou tyto rozdíly podstatné při vytváření společenstev (Hubbell, 2005). Ekologická společenstva jsou podle Hubbella otevřená, neustále se měnící, nerovnovážná seskupení druhů. Druhy jsou si ekologicky rovny a rozdíly mezi nimi neurčují výsledek kompetice. Náhodná speciace, extinkce, limitace šířením a ekologický drift jsou procesy určující složení společenstva.

Případ, že by společenstva byla tvořena pouze neutrálními procesy, je nepravděpodobný. Klíčovou otázkou tedy je, do jaké míry je pozorovaná druhová bohatost způsobena silnými „stabilizačními“ mechanismy (nikovými) překonávajícími velké rozdíly ve fitness anebo slabými stabilizačními mechanismy působícími na druhy se stejnou fitness (neutralita) (Adler et al., 2007).

1.2 Fylogenetická struktura společenstev

Typicky jsou ekologie společenstev a evoluční biologie studovány samostatně v relativní vzájemné izolaci (Johnson & Stinchcombe, 2007) i když spojení mezi taxonomií a ekologií společenstev byla rozpoznána již Darwinem. Základním principem propojení ekologie a evoluce je, že druhy interagují na základě fenotypových rozdílů a podobností. Ty mají základy v jejich evoluční historii (Webb et al., 2002). Tradičně však byla pro ekologické analýzy používána data o přítomnosti a abundanci druhů a parametrech prostředí. V posledních letech se začíná ukazovat výhoda zapojení fylogenetických dat (tj. dat o vzájemné genetické příbuznosti jednotlivých druhů) do studia složení společenstev. Tato data nám mohou pomoci osvětlit procesy formující společenstva (Hardy, 2008). Fylogeneze přináší nepřímou informaci o společném původu, adaptacích a potenciální kompetici mezi druhy (Webb & Pitman, 2002). Z počátku byly tyto principy používány ve studiích ekologie společenstev analýzou poměru druhů ku rodům (Elton, 1946; Coesel, 1982). Elton zdůvodňoval, že nižší poměr druhů ku rodům v Británii je důkaz kompetitivního vyloučení ekologicky podobných příbuzných v lokálních společenstvech. Problém použití této metody je, že taxonomie jen velmi málo odpovídá skutečné příbuznosti organismů. Nedávný rozvoj molekulární fylogenetiky a statistických metod dovoluje hlubší vyměření průniku mezi evoluční historií a současnými ekologickými interakcemi ve formování společenstev (Webb

et al., 2002). Fylogeneze druhů nám umožňují brát druhovou příbuznost jako kontinuum (Kraft et al., 2007). Fylogenetická analýza složení společenstev může odhalit rozdíly mezi společenstvy, které jiné analýzy pracující pouze s diverzitou nebo abundancí neodhalí (Martin, 2002).

Zásadní pro rozvoj používání fylogenetické informace v ekologických studiích přinesla práce Webb et al. (2002), kde přirovnávají fylogenetickou informaci k lepidlu, které může spojit ekologické a evoluční studie. Zahrnutí fylogenetické informace do výzkumu ekologických společenstev umožní lépe pochopit jejich strukturu a utváření (Swenson et al., 2006; Emerson & Gillespie, 2008; Kembel, 2009). Je to nástroj pro zodpovězení otázek týkajících se vlivu procesů (biotických a abiotických) na strukturu společenstev (Swenson et al., 2006), obzvláště pak určení role neutrálních versus nikových procesů (Cavender-Bares et al., 2009).

1.2.1 Nenáhodná fylogenetická struktura

Podle klasické nikové teorie záleží společný výskyt druhů na vlastnostech, které určují jejich interakce s prostředím a s ostatními druhy. A protože jsou tyto vlastnosti fylogeneticky děděné, předpokládáme, že se složení společenstev budou odrážet ve fylogenetickém vzorci společenstva - s příbuznými druhy více či méně se spolu nacházejícími na stanovišti (Ives & Helmus, 2011). Ve skutečnosti mnoho společenstev vykazuje nenáhodnou strukturu evoluční příbuznosti mezi společně vyskytujícími se druhy (Webb & Pitman, 2002). Tomuto jevu se říká fylogenetická struktura. Rozlišujeme dvě základní nenáhodné fylogenetické struktury (Obr. 1) - fylogenetické shlukování (*phylogenetic clustering*) a fylogenetický rozptyl (*phylogenetic overdispersion/repulsion*) (Webb, 2000).



Obr. 1 Nenáhodné fylogenetické struktury, převzato z (Cavender-Bares et al., 2004)

Nenáhodná fylogenetická struktura se vysvětluje dvěma způsoby: environmentální filtrováním a mezidruhovou kompeticí (Pausas & Verdu, 2010). Environmentální filtr je množina abiotických a biotických faktorů (mimo kompetice), které musí organismus

tolerovat, aby byl schopen dokončit životní cyklus (Emerson & Gillespie, 2008). Druhy, které projdou environmentálním filtrem, budou sdílet společné charakteristiky, a oproti tomu působí kompetice, která působí silněji na blízkce příbuzné druhy (Mouillot et al., 2005). Oba mechanismy pracují najednou, takže otázkou vždy je, který má větší vliv na strukturu společenstev (Carranza et al., 2011).

Studie, ve kterých bylo prokázáno fylogenetické shlukování, vyzdvihují roli environmentálního filtrování. Druhy spolu koexistují, protože sdílejí vlastnosti vhodné pro přežití v určitém prostředí (Johnson & Stinchcombe, 2007). Například Helmus et al. (2010) dokázal, že disturbance (chemická, biologická i fyzikální) má za následek společenstva tvořená blíže příbuznými druhy zooplanktonu. Fylogenetické shlukování bylo identifikováno mimo jiné u krytosemenných rostlin v deštném pralese na Borneu (Webb, 2000), parazitech rodu *Dactylogyrus* (Mouillot et al., 2005), či bakteriálních společenstvech (Horner-Devine & Bohannan, 2006).

Kompetice a jiné negativní hustotně závislé procesy mohou způsobit, že ve společenstvu se budou nacházet druhy vzdáleněji příbuzné (Johnson & Stinchcombe, 2007). Kompetitivní vyloučení a nepřímé interakce mezi příbuznými druhy zprostředkované například predátory, parazity nebo patogeny mohou vytvořit fylogeneticky rozptýlenou strukturu společenstva (Kembel & Hubbell, 2006). Takováto fylogenetická struktura byla odhalena například u dubů v lesích Floridy (Cavender-Bares et al., 2004), či u krytosemenných rostlin v Mexiku (Valiente-Banuet & Verdu, 2007). Některé studie upozorňují na fakt, že rozptýlená fylogenetická struktura může být způsobena i jinými procesy než kompeticí (Emerson & Gillespie, 2008). Například facilitace (pozitivní mezidruhové interakce) probíhá mezi nepříbuznými druhy, takže vede k fylogeneticky rozptýlené struktuře společenstva (Verdu et al., 2009). Vliv kompetice na utváření společenstev se nejlépe ověří pomocí experimentálních testů. Violle et al. (2011) experimenty prováděnými na ciliátech podpořili teorii limitující fylogenetické podobnosti (*phylogenetic limiting similarity*). Kompetitivní vyloučení v experimentálních mikrokosmech se častěji a rychleji vyskytovalo mezi blízkce příbuznými druhy. Podobné výsledky ukázali Maherali a Klironomos (2007) ve společenstvech arbuskulárně mykorrhizních hub. Na počátku experimentu byly kořeny jitrocele naočkovány stejným počtem druhů, na konci experimentu měla nejnižší druhovou bohatost společenstva vytvořena z blízkce příbuzných druhů. Těmito experimenty se potvrdila teorie, že fylogenetická informace se dá použít jako užitečný prediktor výsledku kompetice v ekologických společenstvech. Některé studie našly kombinace obou typů fylogenetické struktury v závislosti na typu habitatu, prostorovém,

fylogenetickém či časovém měřítku (Kembel & Hubbell, 2006; Swenson et al., 2006; Verdu & Pausas, 2007). Na velkých měřítcích – v rámci kontinentu – fylogenetická struktura odráží spíše biogeografické procesy než ekologické. Na měřítku společenstev se druhy rozdělují do habitatů na základě intenzity environmentálního filtrování a kompetice (Webb & Pitman, 2002).

1.2.2 Náhodná fylogenetická struktura

Fylogenetická struktura společenstva může pomoci odhalit roli neutrálních procesů (Cavender-Bares et al., 2009). Pokud jsou společenstva formována neutrálními procesy, fylogenetická struktura by neměla být odlišitelná od náhodné (Kraft et al., 2007; Hardy, 2008). Značná část studií nebyla schopna zamítnout nulovou hypotézu náhodné fylogenetické struktury (Mouillot et al., 2005). Důvodem toho může být, že mezidruhové interakce jsou neutrální, protože druhy jsou si ekologicky rovny. Společenstva jsou náhodnými shluky vytvořenými stochastickými procesy. Kompetitivní vyloučení nenastává častěji mezi blízkce příbuznými druhy (Hubbell, 2001). Neschopnost zamítnout nulovou hypotézu o náhodné struktuře společenstva může být ale také způsobena zvoleným měřítkem, případně existencí jiných mechanismů, které zeslabují kompetitivní vyloučení (Mouillot et al., 2005). Náhodná struktura společenstva může také vzniknout, pokud hustotně závislé procesy a environmentální procesy jsou v rovnováze (Kembel & Hubbell, 2006). Fylogeneticky nestrukturovaná byla například společenstva ještěřů rodu *Anolis* na Kubě (Losos et al., 2003), či luční společenstva cévnatých rostlin (Silvertown et al., 2001). Je možné, že právě v těchto společenstvech hrají neutrální procesy dominantní úlohu při jejich formování.

1.2.3 Fylogenetická struktura napříč gradientem

Z výsledků některých studií (Horner-Devine & Bohannan, 2006; Helmus et al., 2007a) je patrné, že fylogenetická struktura společenstva se může měnit podél environmentálního gradientu. Bylo zjištěno, že míra fylogenetického shlukování společenstev bakterií se snižuje s rostoucí produktivitou prostředí. Z tohoto bylo usuzováno, že produktivita prostředí působí jako silný environmentální filtr a prostředí s nízkou produktivitou jsou pro bakterie více stresující (Horner-Devine & Bohannan, 2006). Také u společenstev tropických stromů se fylogenetická struktura lišila mezi habitaty, což ukazuje, že se buď relativní důležitost ekologických procesů, evoluční historie funkčních vlastností, nebo spojení s habitatem musí lišit podél environmentálního gradientu (Kembel & Hubbell, 2006). Společenstva mravenců vykazovala rozptýlenou fylogenetickou strukturu v nízkých nadmořských výškách a ve

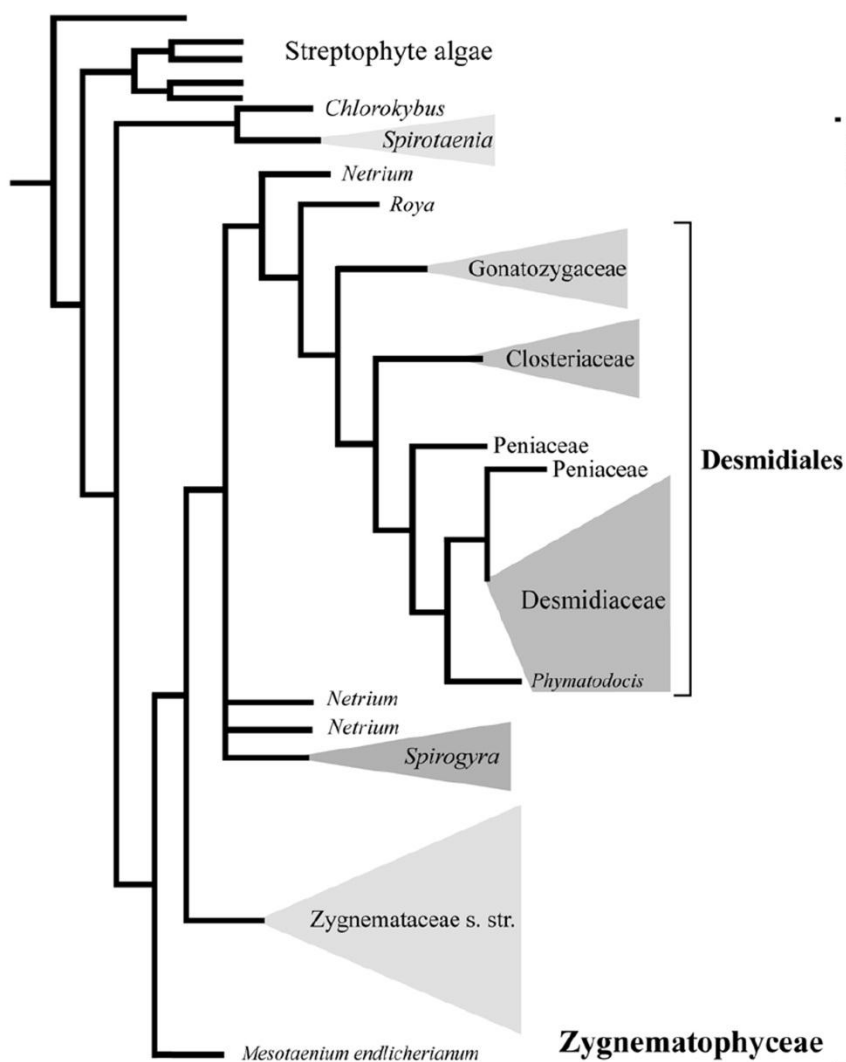
vyšších naopak strukturu shluknutou. Autoři studie to vysvětlují působením environmentálního filtru v podobě nízkých teplot (Machac et al., 2011). V případě strukturace společenstev nějakým silným environmentálním filtrem (například disturbance ohněm) budou společenstva fylogeneticky shlukovaná. Při absenci tohoto filtru budou společenstva formována jinými procesy – například: kompetitivní interakce, neutralismus, facilitace (Verdu & Pausas, 2007). Webb et al. (2002) navrhuje, že právě studie zkoumající fylogenetickou strukturu podél gradientu by mohly přinést zajímavé výsledky. Porozumění změnám fylogenetické struktury podél gradientu prostředí nám poskytuje důležitý vhled na organizaci společenstev (Thompson et al. 2001). Root a Nelson (2011) zjistili, že použití fylogenetické vzdálenosti mezi druhy přináší do studia struktury společenstev lepší rozlišení environmentálního gradientu než pouze použití standardních měřítek podobnosti.

Studie fylogenetické struktury se zaměřují především na společenstva cévnatých rostlin. Studií na mikrobiálních organismech je zatím málo (Anderson et al., 2004; Horner-Devine & Bohannan, 2006; Maherali & Klironomos, 2007; Helmus et al., 2010).

1.3 Krásivky

Krásivky patří mezi zelené řasy, které jsou řazeny do vývojové linie Streptophytae, do skupiny Zygnematophyceae (Obr. 2), jež je charakterizována spájením jako formou sexuálního rozmnožování. Do této skupiny patří dva řády Zygnematales a krásivky – Desmidiiales. Do řádu Desmidiiales náleží převážně jednobuněčné fototrofní organismy. Na základě struktury buněčné stěny se řád Desmidiiales označuje jako *plactoderm desmids* („pravé krásivky“). Buněčnou stěnu mají tvořenou ze dvou či více segmentů a je ornamentovaná (Coesel & Meesters, 2007).

Většina z 32-35 rodů řádu Desmidiiales byla popsána již během 19. století. Jednotlivé druhy se rozlišovaly pomocí morfologie buněk, jako je tvar buňky v bočním a svrchním pohledu, stupeň organizace buňky (jednobuněčné, vláknité, koloniální), ornamentace buněčné stěny atd. Zatím bylo platně popsáno kolem 2 500 druhů pouze z čeledi Desmidiaceae, k tomu tato i jiné čeledi obsahují mnoho další infraspecifických taxonů (subspecie, variety a formy). Opravdová taxonomická bohatost není jistě známa. (Gontcharov & Melkonian, 2011).



Obr. 2 Souhrnný fylogenetický strom Zygnematophyceae, převzato z (Gontcharov, 2008)

Monofylie řádu Desmidiiales je silně podpořena molekulárními daty (Denboh et al., 2001). Tradičně byl na základě vlastností buněčné stěny a organizace buněk řád Desmidiiales rozdělen do čtyř čeledí (Kouwets & Coesel, 1984). Toto rozdělení bylo nedávno podpořeno molekulárními metodami. Hall et al. (2008) použili dva chloroplastové a jeden mitochondriální gen a řád Desmidiiales rozdělili do tří monofyletických skupin (čeledí) Gonatozygaceae, Closteriaceae a Desmidiaceae, a jedné parafyletické čeledi Peniaceae. Hodnocení druhového konceptu pomocí molekulárních metod v poslední době odhalilo, že většina tradičních druhů je polyfyletických (Gontcharov & Melkonian, 2011).

Krásivky jsou dominantní složkou společenstev mikrofyto-bentosu ve sladkovodních kyselých mokřadech. Rostou hlavně na dně mělkých tůní a v metafytonu. Největší druhové bohatství je v mezotrofních vodách (pH 5-6,5). V eutrofních lokalitách krásivky nejsou schopny kompetovat jiným řasám (chlorokokálním, rozsivkám a sinicím), kvůli své nižší

růstové rychlosti. Nesnesou trvale vysokou hladinu pH a vyšší rychlosti toku vody (Coesel & Meesters, 2007). Krásivky jsou díky svým specifickým ekologickým nárokům vhodné pro charakterizaci sladkovodních lentických habitatů (Coesel et al., 1978; Coesel, 2001). Složení krásivkových společenstev úzce koreluje s pH a konduktivitou (Coesel, 1982).

Krásivky jsou vhodné pro studium fylogenetické struktury z několika důvodů:

- Ve společenstvech fyto bentosu rašelinišť často tvoří dominantu.
- Determinace krásivek je usnadněna značnou morfologickou variabilitou tvaru a struktury buněčné stěny, dále pak dlouhou tradicí studia těchto organismů a z ní vyplývajícím dostatkem kvalitní literatury pro determinaci.
- Informace o fylogenezi krásivkových druhů jsou, i přes své nedostatky, značné. V databázích je k dispozici velké množství publikovaných sekvencí.

Primárně se zaměřím na fylogenetickou strukturu krásivkových společenstev podél gradientu pH. Hodnota pH byla několikrát jmenována jako nejdůležitější faktor určující strukturu mikrofyto bentosu (Neustupa et al., 2012).

V následující práci jsem si stanovila tyto cíle:

Hlavním cílem práce je rozšíření poznatků o procesech formujících společenstva krásivek. Fylogenetická struktura společenstva reflektuje tyto procesy, díky ní budu moci odpovědět na následující otázky:

- Jsou společenstva krásivek v rašeliništích formována neutrálními nebo ekologickými procesy?
- Liší se role a intenzita těchto procesů podél gradientu pH a konduktivity?
- Pokud hrají důležitější roli ekologické procesy, je pH silným environmentálním filtrem pro krásivková společenstva?
- Liší se fylogenetická struktura v závislosti na geografické vzdálenosti společenstev?

2 Materiál a metody

2.1 Odběry vzorků a postup určování

Odběry vzorků probíhaly na třech různých geografických územích – Čechy, Švédsko a Irsko. Odběry v Čechách byly uskutečněny ve třech termínech září/říjen 2010, květen 2011 a září 2011, odběry ve Švédsku v dubnu 2011 a v Irsku září/říjen 2011. Z jednotlivých odběrových míst byly sesbírány vzorky bentických společenstev na ploše přibližně 100 cm². Část odebraného vzorku byla fixována 2-4% roztokem formaldehydu. Zbytek byl ponechán bez fixace za účelem izolace kultur. Při odběrech byly zároveň měřeny tyto parametry prostředí: pH, konduktivita, teplota. Měření bylo prováděno pomocí WTW 340i. Dále byla zaznamenána přibližná hloubka odběrového místa.

Ve fixovaných vzorcích jsem určovala jednotlivé druhy krásivek pomocí světelného mikroskopu Olympus CX 31 a odborné literatury (Lenzenwerger, 1996, 1997, 1999, 2003; Coesel & Meesters, 2007; John & Williamson, 2009). Pro stanovení abundance jednotlivých druhů bylo v každém vzorku počítáno prvních 200 nalezených buněk.

2.2 Analýza DNA

2.2.1 Metody izolace kultur a kultivace

Monoklonální kultury byly izolovány pomocí skleněné pipety vytažené v kapiláru. Pod světelným mikroskopem nebo binokulární lupou byla buňky několikrát přenesena do kapky čistého sterilního média, a nakonec umístěny do komůrky tkáňové kultivační destičky. Médium použité pro kultivaci bylo modifikované DY IV (<http://botany.natur.cuni.cz/algo/caup-media.html#DY4>) s pufrem MES, který udržuje kyselé pH. Médium mělo pH mezi 5,5-6,5. V komůrkách byly kultury pěstovány, dokud nedosáhly množství potřebného pro izolaci DNA (přibližně dva měsíce).

2.2.2 Izolace DNA, PCR, přečišťování

Narostlé kultury byly pomocí sterilní pipety přeneseny do dvoumilitrových eppendorfek a mechanicky rozdraceny pomocí skleněných kuliček. Byl přidán Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitex, Berlin, Germany) a dle pokynů výrobce byla vyizolována genomická DNA. Metodou PCR byl amplifikován úsek chloroplastové DNA *rbcL*, použité primery jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1 Primery použité při PCR amplifikaci rbcL

název primeru	sekvence	citace
rbcL-Pleurot-F	GGTTAAAGATTATAGACTTAC	vlastní
rbcL-Pleurot-R	CCTTGACGAGCAAGATCACG	
MaGo1F	ATGTCACCACAAACNGAAAC	(Gontcharov et al., 2004)
MaGo3R	GTATCRATHGTWTCAAATTC	

Postup PCR probíhal dle zavedené metodiky laboratoře (Neustupa & Škaloud, 2007). Všechny PCR reakce byly provedeny v objemu 20 μ l (13,1 μ l sterilní Milli-Q vody, 2 μ l PCR Gold Buffer (Applied biosystems), 0,4 μ l dNTP [10 μ M], 0,25 μ l primerů [25 pmol/ml], 2,4 μ l Mg₂Cl [25 mM], 0,6 μ l 360 GC Enhancer, 0,2 μ l AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied biosystems) [5U/ μ l], 1 μ l DNA [7-20 ng/ μ l]). PCR reakce probíhala v termocykléru Touchgene gradient cycler (Techne, Cambridge, UK). Pomocí gradientového pokusu byly optimalizovány jednotlivé teploty cyklu. Dále se pro reakce používal tento optimalizovaný cyklus: denaturace: 94°C po dobu 10min; 35cyklů: 94°C – 1 min, 48°C – 1min, 72°C – 2,5min; závěrečná elongace: 72°C po dobu 10min. PCR byly přečištěny JetQuick PCR Purification Kit (Genomer, Löhne, Germany) podle pokynů výrobce. Sekvenaci provedla firma Macrogen Inc.

2.2.3 Zpracování sekvencí

Pomocí programu SeqAssem (SequentiX) byla ze sekvence forward a reverse primeru vytvořena konsenzuální sekvenec. Z takto získaných sekvencí (celkem 30) a sekvencí (338) z databáze NCBI GenBank byl vytvořen alignment v programu MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011) pomocí algoritmu ClustalW. V programu PAUP 4 (Swofford, 2003) a MrModeltest 2.3 (Nylander, 2008) byl zvolen nejvhodnější model evoluce pomocí testu Akaike information criterion (AIC). Tento model byl GTR s gamma korekcí a proporcí invariabilních pozic (GTR+G+I).

Fylogenetický strom byl vytvořen pomocí metody Bayesovské inference v programu MrBayes verze 3.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Byly použity dva paralelní Monte Carlo Markovovy řetězce (MCMC). Analýza běžela 5,3 miliónu generací každá s jedním studeným a dvěma horkými řetězcy. Stromy a parametry byly zaznamenány každých 100 generací. Konvergence studených a teplého řetězce a burn-in byly určeny pomocí příkazu "sump". Analýzy bootstrapové podpory linií byly stanoveny pomocí metody ML (maximum likelihood) a MP (maximální parsimonie). Bootstrapová ML analýza (100 replikací) byla

provedena v programu GARLI (Zwickl, 2006). Bootstrapy MP (1000 replikací) byly stanoveny v programu PAUP (Swofford, 2003).

2.3 Analýza fylogenetické struktury

2.3.1 Měřítko fylogenetické struktury

Pro testování fylogenetické struktury společenstva je nutné mít co nejúplnější údaje o fylogenezi u všech druhů ze společenstva. Jsou dvě možnosti, jak se vypořádat s chybějícími daty. První je odebrat ze společenstva druh, pro které tyto údaje nemáme (Root & Nelson, 2011). Druhá možnost je nahradit chybějící data informací z příbuzného druhu (příbuznost podle fylogeneze jiného genu) nebo druhu morfologicky podobného (Helmus et al., 2007a). Samozřejmě obě metody způsobují zkreslení výsledných dat, se kterým musíme při interpretaci výsledků počítat. Pro svoje data jsem zvolila druhou možnost, seznam použitých sekvencí viz. přílohy Tab. I - 4.

Nejprve jsem testovala fylogenetickou strukturu společenstev. Spočítala jsem několik indexů (měřítek) fylogenetické struktury. První sérii měřítek jsem spočítala podle postupu navrženého ve studiích Webb & Pitman (2002). Prvním z nich je průměrná párová distance (MPD), spočítaná jako průměr fylogenetických vzdáleností mezi všemi párovými kombinacemi druhů nacházejících se ve společenstvu. Druhým je průměrná vzdálenost od nejbližšího souseda (MNND), je definována jako průměrná fylogenetická distance k nejbližšímu příbuznému pro všechny druhy nacházející se ve společenstvu (Webb, 2000; Webb & Pitman, 2002). MPD a MNND jsem vážila abundancí druhů. Pro testování, zda se fylogenetická struktura společenstev liší od náhodné, jsem porovnávala pozorované fylogenetické struktury s fylogenetickou strukturou tisíce společenstev vygenerovaných podle určitého nulového modelu (Kembel & Hubbell, 2006). Zvolila jsem si nulový model použitý (Kembel & Hubbell, 2006) při studiu fylogenetické struktury společenstev tropických stromů. V tomto nulovém modelu jsou druhy ve vzorku randomizovány pomocí mechanismu, který náhodně přiděluje do vzorku druhy, které se nacházejí alespoň v jednom vzorku ze všech pozorování. Přitom zachovává druhovou bohatost jednotlivých vzorků (Webb et al., 2008; Ulrich & Gotelli, 2010). Jednotlivé vzorky jsou signifikantně fylogeneticky strukturované na hladně $\alpha=0,05$, pokud se pozorované hodnoty MPD a MNND nacházejí v horních nebo spodních 2,5% hodnot zjištěných v nulových společenstvech. Vygenerovaná nulová společenstva byla použita pro stanovení *net relatedness index* (NRI) a *the nearest taxon index* (NTI), které jsou standardizovanými měřítky pozorované fylogenetické struktury mezi druhy

nacházejícími se v každém vzorku, relativně k distribuci distancí spočítaných pro nulová společenstva (Kembel & Hubbell, 2006). NRI je definovaný jako $[-(\text{MPD} - \text{MPD}_{\text{null}}) / \text{SD}(\text{MPD}_{\text{null}})]$, kde MPD je průměrná párová fylogenetická distance mezi druhy ve vzorku, MPD_{null} je průměrná MPD pro 1000 nulových společenstev a $\text{SD}(\text{MPD}_{\text{null}})$ je směrodatná odchylka MPD 1000 nulových společenstev. NTI je definovaný podobně jako NRI, ale za použití MNND a jeho směrodatné odchylky pro 1000 nulových společenstev (Webb et al., 2002; Webb & Pitman, 2002; Kembel & Hubbell, 2006). Uvedené výpočty jsem prováděla pomocí programu PHYLOCOM (Webb et al., 2008).

Druhá série měřítek fylogenetické struktury, která jsem použila, byla navrhnutá Helmusem et al. (2007a). Jimi navrhnutá měřítka fylogenetické druhové variability shrnují stupeň, jakým jsou si druhy ve společenstvu příbuzné. Jsou definována pomocí variance hypotetické neutrální vlastnosti, která se vyvíjí náhodně a samostatně mezi oddělenými fylogenetickými liniemi. Maximum variability je v situaci, kdy fylogeneze druhů je „hvězdovitá“ a druhy ve společenstvu jsou nepříbuzné. Celková fylogenetická druhová variabilita (*phylogenetic species variability* - PSV) je měřena jako variance v neutrální vlastnosti mezi druhy. I když je PSV definovaná pomocí hypotetické neutrální vlastnosti, pro její spočítání je zapotřebí pouze informace o fylogenetické příbuznosti druhů, které společenstvo obsahuje (Helmus et al., 2007b). Maximální hodnota PSV je rovna jedné a odpovídá situaci, kdy jsou druhy ve společenstvu nepříbuzné. Další z indexů vycházejících z PSV je fylogenetická druhová vyváženost (*phylogenetic species evenness* PSE) (Helmus et al., 2007b). Výhoda PSE je zahrnutí informace o abundancích druhů. V případě, že se všechny druhy nachází se stejnou abundancí, je PSE rovna PSV. Pomocí permutačního testu jsem zjišťovala, zda se hodnota indexů PSV, PSE liší od hodnot vytvořených pomocí dvou nulových modelů. První odpovídá nulovému modelu použitému při testování MPD a MNND (viz. výše) a zachovává druhovou bohatost vzorku – (null1). Druhý randomizuje matici druhů v rámci druhů a zachovává frekvenci, s jakou se druh celkově ve společenstvech nachází – (null2). Tyto nulové modely odpovídají modelům SIM3 a SIM2 z práce (Ulrich & Gotelli, 2010). Pro každou hypotézu jsem vytvořila 1000 nulových společenstev. Ze všech vzorků (případně rozdělených na regiony, nebo jiné části) jsem spočítala průměrné hodnoty PSV a PSE. Stejně jako u stanovení signifikance MPD a MNNT jsou vzorky signifikantně fylogeneticky strukturované na hladině $\alpha = 0,05$, pokud se pozorované průměrné hodnoty PSV a PSE nacházejí v horních nebo spodních 2,5 % průměrných hodnot zjištěných v nulových společenstvech (Helmus et al., 2007a; Helmus et al., 2007b). Pro výpočty jsem

používala funkce v package "picante" (Kembel et al., 2010) v programu R (R Development Core Team, 2010).

Dalším způsobem, jak inkorporovat informaci o příbuznosti druhů do studie společenstev, je fylogenetická bohatost (*phylogenetic diversity* - PD) (Nipperess et al., 2010). Je založena na Bray-Curtisově indexu podobnosti a spojuje údaje o fylogenezi druhů ve společenstvu a jejich abundance. Počítá párovou podobnost ekologických společenstev. Počítala jsem ji v programu R pomocí skriptu "phylosim" (Nipperess et al., 2010).

2.3.2 Jednorozměrné statistické analýzy

Pro testování normálního rozdělení v rámci skupin jsem použila Shapirův-Wilkův test normality. Při nedodržení předpokladu normálního rozdělení jsem použila pro testování nulové hypotézy, že v každé skupině je stejné rozdělení studované veličiny, Mann-Whitneyho test pro testování dvou výběrů. Pro testování více výběrů bez normálního rozložení jsem použila Kruskal-Wallisův test s Bonferroniho korekcí (Zvára, 2006).

Závislost indexů fylogenetické struktury na naměřených parametrech prostředí jsem testovala za použití lineární regrese metodou nejmenších čtverců a polynomiální (kvadratické) regrese.

Pro testování hypotézy jak se liší fylogenetická struktura lokalit s nízkým pH a lokalit s vyšším pH jsem všechny lokality rozdělila na dvě skupiny vzorků. Jednu skupinu tvořily vzorky, jejichž hodnota pH byla nižší než 5 (celkem 53 vzorků) a druhou pak vzorky, jejichž hodnota pH byla vyšší nebo rovna 5 (celkem 36 vzorků). Testovala jsem, zda se indexy fylogenetické struktury liší mezi těmito dvěma skupinami lokalit.

2.3.3 Mnohorozměrné statistické analýzy

Analýzou similarity (ANOSIM) jsem testovala, zda rozdíl mezi dvěma či více skupinami je signifikantní. Při testování korelace dvou matic podobnosti jsem použila Mantelův test (Mantel, 1967).

Data o parametrech prostředí jsem standardizovala odečtením průměrné hodnoty a následným vydělením směrodatnou odchylkou (Legendre & Legendre, 2003; Neustupa et al., 2012). Matici vzdáleností jednotlivých odběrových míst jsem vytvořila z GPS koordinát pomocí package "geosphere" v programu R. Vzájemnou druhovou podobnost lokalit jsem vyjádřila Bray-Curtisovým indexem pro data o abundancích druhů a Diceovým indexem pro data o prezencích-absencích druhů.

Uvedené analýzy jsem prováděla pomocí programů PAST (Hammer et al., 2001) a R (R Development Core Team, 2010)

3 Výsledky

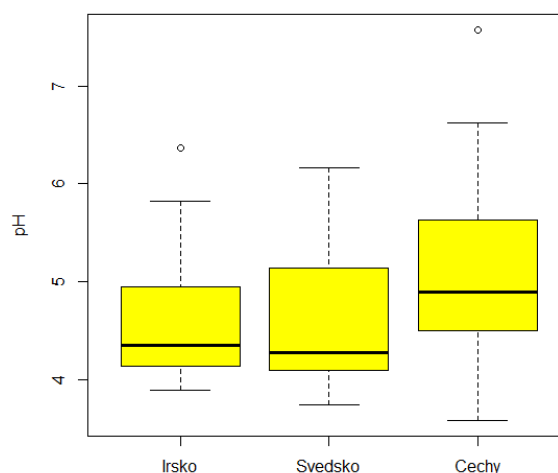
3.1 Charakteristika odběrů

Celkem jsem odebrala 89 vzorků rašeliništních společenstev mikrofyto bentosu. Tyto vzorky jsou ze tří různých oblastí – Česká republika (57 vzorků), Švédsko (13 vzorků) a Irsko (19 vzorků). Seznam vzorků a naměřených environmentálních parametrů je viz. přílohy Tab. I - 1. Hodnota pH jednotlivých odběrových míst byla v rozmezí 3,59 – 7,57. Průměrná hodnota pH byla 4,91. Konduktivita se pohybovala mezi 8 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 217 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Průměrná hodnota konduktivity byla 67 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Hodnoty pH se významně lišily mezi Irskem a Čechami (Obr. 3).

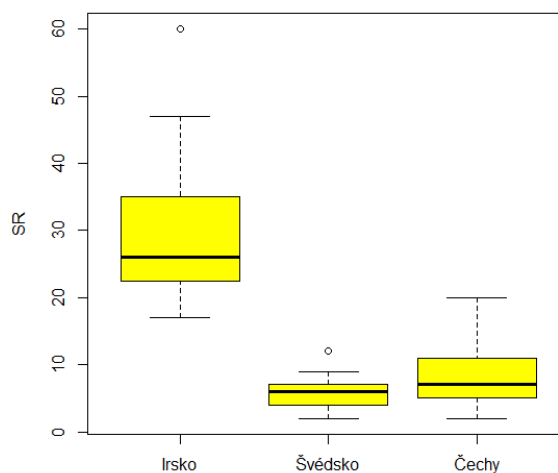
Celkem jsem v 89 vzorcích identifikovala 277 taxonů krásivek (ukázka identifikovaných taxonů viz. přílohy Obr. I - 1). Seznam druhů viz. přílohy, Tab I – 2 a Tab I – 3. Počet taxonů na jedné lokalitě se pohyboval mezi 2 a 60. Druhová bohatost se lišila mezi jednotlivými regiony. Irská společenstva byla druhově bohatší než společenstva ostatních regionů (Tab. 2; Obr. 4).

Tab. 2 Kruskal-Wallisův test druhové bohatosti jednotlivých regionů, p hodnoty s Bonferroniho korekcí.

	Irsko	Švédsko	Čechy
Irsko	0		
Švédsko	6,945E-06	0	
Čechy	3,56E-10	0,3603	0



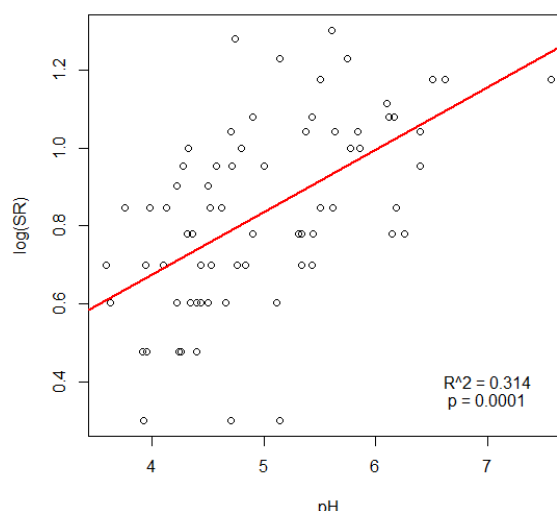
Obr. 3 Krabicové diagramy hodnot pH. Kruskal-Wallisův test $p < 0.01$; signifikantní rozdíl je pouze mezi Irskem a Čechami.



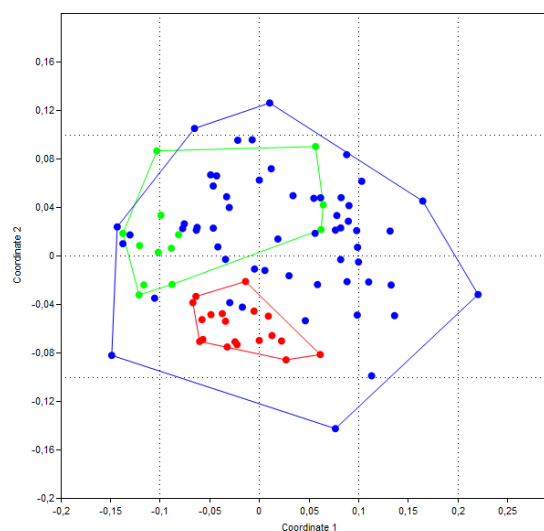
Obr. 4 Krabicové diagramy druhové bohatosti jednotlivých regionů, Kruskal-Wallisův test $p < 0.001$

Lineární regrese závislosti druhové bohatosti vzorků na hodnotě pH neprokázala signifikantní vztah mezi těmito veličinami ($R^2 = 0,03$; $p = 0,063$). Toto může být způsobeno výrazně vyšší druhovou bohatostí Irských lokalit. Tento předpoklad se potvrdil odebráním Irských vzorků z analýzy ($R^2 = 0,314$; $p = 0,0001$) (Obr. 5).

Pomocí analýzy similarity (ANOSIM) se jednotlivé regiony od sebe lišily v druhovém složení ($p < 0,001$). Tyto rozdíly jsou znázorněny na ordinačním diagramu (Obr. 6). NMDS diagram vysvětluje 48% variability v datech a jeho hodnota stresu byla 0,32.



Obr. 5 Lineární regrese druhové bohatosti vzorků na hodnotě pH pro Čechy a Švédsko.



Obr. 6 NMDS ordinační diagram, prezenze/absence druhů; červená – Irsko, zelená – Švédsko, modrá – Čechy. stress=0,32; R^2 1.osa=0,36; 2.osa=0,12

3.2 Fylogeneze Desmidiales

3.2.1 Vyizolované taxony

Podářilo se mi vyizolovat monoklonální kultury, extrahovat DNA a získat sekvenci plastidového genu *rbcL* u následujících taxonů:

Tab. 3 Vyizolované taxony

taxon	lokalita
<i>Cosmarium pyramidatum</i>	B02
<i>Cosmarium ralfsii</i>	B13
<i>Cosmarium discrepans</i>	B02
<i>Cosmarium cf. orthopunculatum</i>	B22
<i>Cosmarium excavatum</i>	I03
<i>Closterium diana</i>	B10
<i>Closterium abruptum</i>	B19
<i>Desmidium coarctatum</i>	B21
<i>Closterium stiolatum</i>	PR Dvořiště 28.06.2011
<i>Euastrum insigne</i>	B13
<i>Euastrum cunneatum</i>	B13
<i>Euastrum ampulaceum</i>	I02
<i>Euastrum inerme</i>	I02
<i>Haplotaenium rectum</i>	I13
<i>Staurastrum hirsutum</i>	B19
<i>Staurastrum histrix</i>	B24
<i>Staurastrum cf. boreale</i>	Švédsko - Storemosse
<i>Staurastrum teliferum</i>	B21
<i>Staurastrum furcatum</i>	B11
<i>Staurastrum arachne</i>	I12
<i>Staurastrum inconspicuum</i>	I17
<i>Staurodesmus connatus</i>	I02
<i>Staurodesmus incus</i>	B24
<i>Tetmemorus leavis</i>	S11
<i>Tetmemorus granulatus</i>	Swamp 31.07.2011

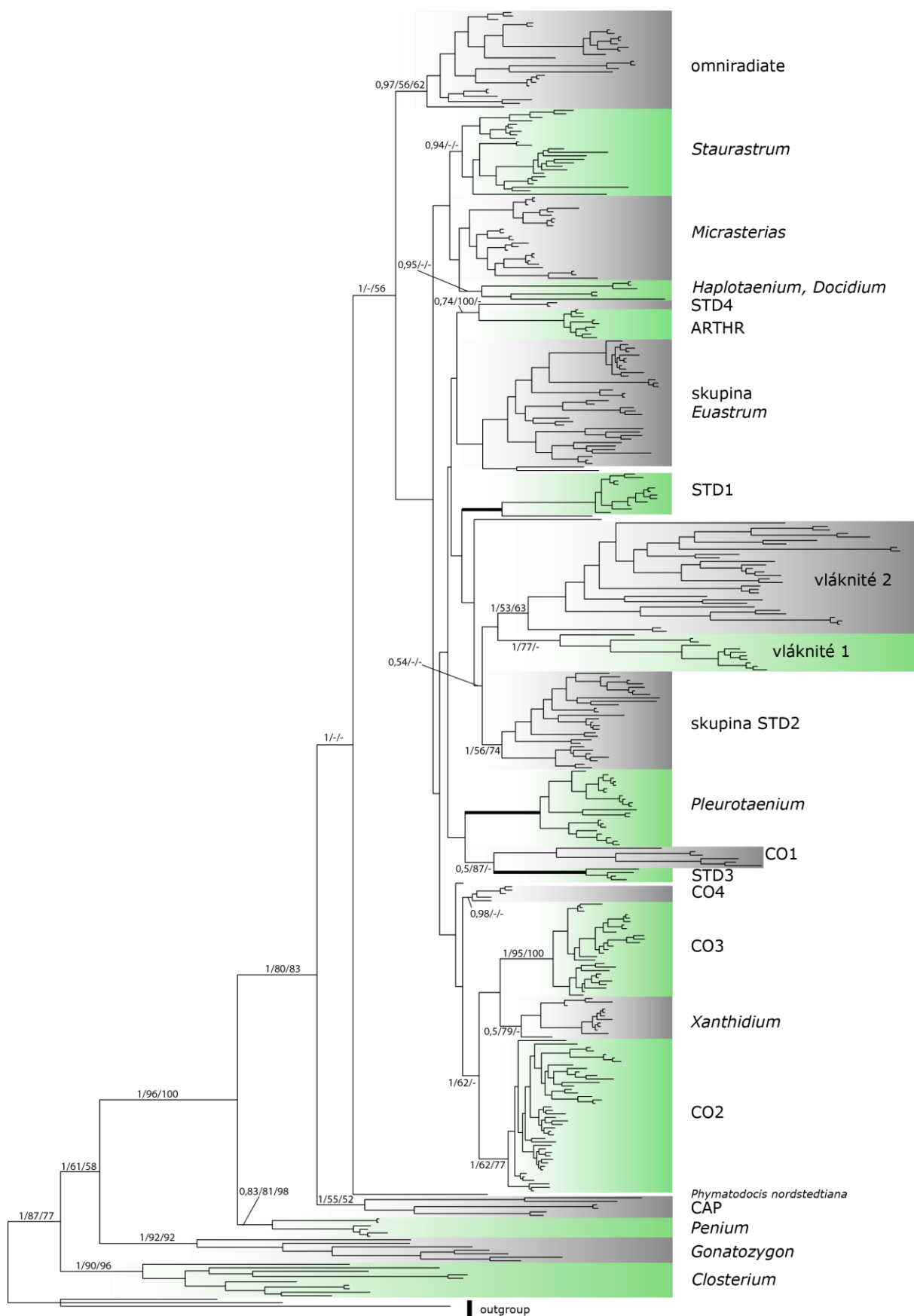
3.2.2 Fylogenetická analýza

Fylogenezi řádu Desmidiales jsem vytvořila porovnáním 368 unikátních sekvencí *rbcL* 25 tradičních krásivkových rodů (30 vlastních sekvencí, 338 z databáze GenBank). Jako outgroup jsem zvolila rody *Netrium* (2 sekvence) a *Spirogyra* (1 sekvence), které patří do řádu Zygnematales. Fylogenetický strom zkonstruovaný pomocí metody Bayesovské inference je přehledově znázorněn na Obr. 7. Detailní zobrazení vnitřního členění je na: Obr. 9; Obr. 10; Obr. 11. Celkem bylo možno rozlišit 28 hlavních linií v rámci řádu Desmidiales - názvy podle Gontcharova & Melkoniana, (2011): Closteriaceae, Gonatozygonaceae, *Penium*,

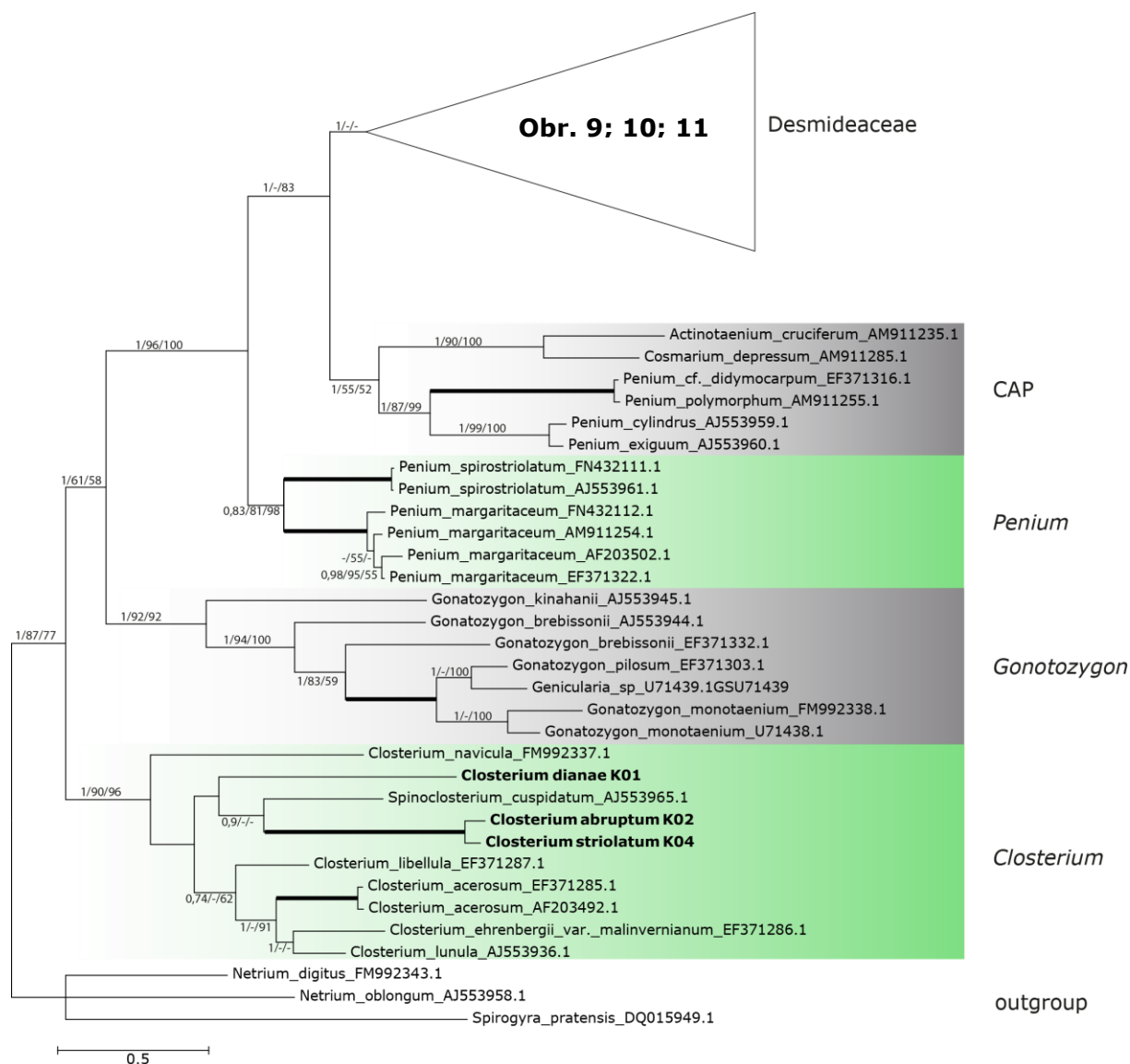
CAP, "omniradiate", *Staurastrum*, *Micrasterias*, *Haplotaenium*, *Docidium*, STD 1-4, CO 1-3, CO 5, ATRHR, *Euastrum*1, *Euastrum*2, *Euastrum pectinatum*, *Cosmarium pyramidatum*, *Tetmemorus*, *Pleurotaenium*, *Actinotaenium cucurbita*, "vláknité" (vláknité1, vláknité2) a *Xanthidium*. Linie *Penium*, CAP, "omniradiate", *Staurastrum*, *Docidium*, "vláknité", STD2, CO1-2 a *Xanthidium* měly slabou podporu signifikance (< 90 % BP - bootstrapových procent a < 0,98 PP - posteriorní pravděpodobnosti). Ostatní linie vykazovaly dobrou podporu (Tab. 4). Linie CO4 byla parafyletická.

Tab. 4 Přehled podpory linií z různých analýz (BI/ML/MP), 100=1,00/100/100

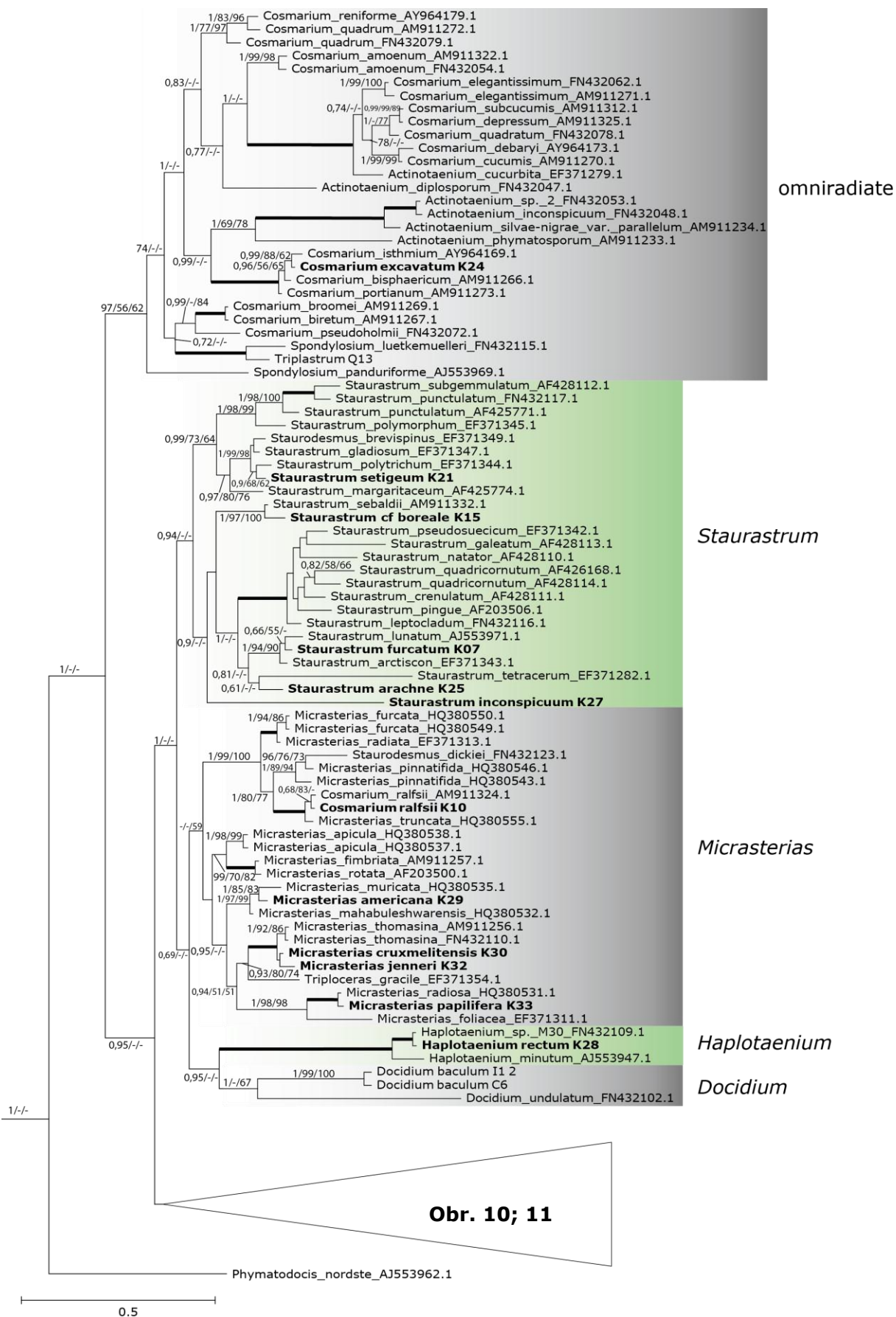
linie - skupina	podpory	počet taxonů
Closteriaceae	1/90/96	10
Gonatozygonaceae	1/92/92	7
<i>Penium</i>	0,83/81/98	6
CAP	1/55/52	6
"omniradiate"	97/56/62	28
<i>Staurastrum</i>	0,94/-/-	25
<i>Micrasterias</i>	-/-/59	24
<i>Haplotaenium</i>	100	3
<i>Docidium</i>	1/-/67	3
ARTHR	100	9
skupina <i>Euastrum</i>	-/-/-	
<i>Euastrum 2</i>	100	11
<i>Actinoteanium cucurbita</i>	100	3
<i>Cosmarium pyramidatum</i>	100	3
<i>Tetmemorus</i>	1/100/75	5
<i>Euastrum pectinatum</i>	1/98/100	2
<i>Euastrum 1</i>	1/91/90	11
STD4	100	2
"vláknité"	-/-/-	
"vláknité 1"	1/53/63	11
"vláknité 2"	1/77/84	33
skupina STD2	1/56/74	
CO5	1/99/100	7
STD2	1/68/55	19
<i>Actinotaenium curtum</i>	100	2
STD1	1/53/100	12
<i>Pleurotaenium</i>	100	22
CO1	1/87/72	6
STD3	100	4
CO4	0,98/-/-	6
CO3	1/95/100	27
<i>Xanthidium</i>	0,5/79/-	11
CO2	1/62/77	44



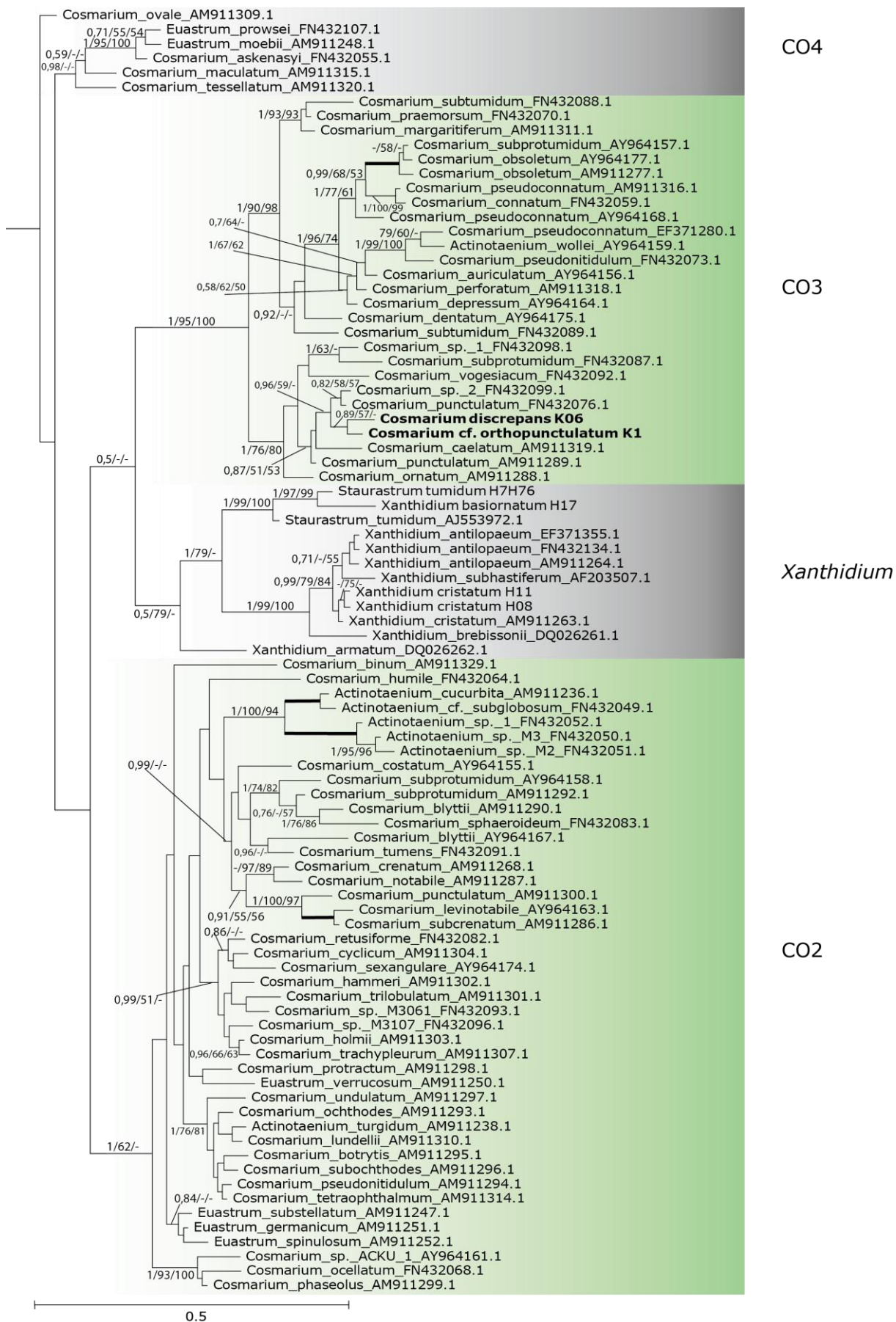
Obr. 7 Přehled fylogeneze Desmidiales (Zygnematophyceae) založené na 368 sekvencích *rbcL*. Strom vytvořen pomocí BI. Podpory větví znázorněny BI/ML/MP; podpora 1/100/100 znázorněna tučně



Obr. 8 První část detailního zobrazení fylogeneze Desmidiaceae, mnou sekvenované taxony jsou vyznačeny tučně. Podpory větví znázorněny BI/ML/MP, podpora 1/100/100 znázorněna tučně



Obr. 9 Druhá část detailního zobrazení fylogeneze Desmidiaceae



Obr. 11 Čtvrtá část část detailního zobrazení fylogeneze Desmidiaceae

Nepodpořená linie *Micrasterias* v sobě obsahuje sekvence *Cosmarium ralfsii*, *Staurodesmus dickiei* a *Triploceras gracile*. První dva byly nedávno na základě multigenové studie formálně přeřazeny do rodu *Micrasterias* a přejmenovány na *Micrasterias ralfsii* a *Micrasterias dickiei* (Škaloud et al., 2011). Linie *Staurastrum* získala pouze nízkou podporou v BI (0,94 PP), ale obsahovala 25 z 29 analyzovaných sekvencí určených jako rod *Staurastrum*. Zbylé tři sekvence byly zařazeny do jiných linií - dvě sekvence *Staurastrum tumidum* ve slabě podpořené (pouze BI a ML) linii *Xanthidium* a dvě sekvence *Staurastrum orbiculare* do linie STD 2.

U 6 taxonů se nepodařilo zjistit žádný bližší vztah k některé z linií: *Phymatodocis nordste*, *Cosmarium messikommerii*, *Cosmarium ovale*, *Cosmarium binoculatum*, *Cosmarium decedens*, *Sturodesmus bulnheimii* a *Staurodesmus incus* K13. Tyto taxony tvoří samostatné větve fylogramu.

Nejpočetnější linie byly CO2, "vláknité2", "omniradiate" a CO3. Nejvíce zastoupený rod *Cosmarium* se nacházel ve 12 podpořených a jedné nepodpořené linii. Vláknité a koloniální krásivky byly rozděleny do dvou slabě podpořených linií ("vláknité1" a "vláknité2"). Přidáním nových sekvencí rodu *Docidium* do analýzy vytvořit novou linii tvořenou třemi sekvencemi tohoto rodu, ale pouze se slabou podporou (1/-/67).

Téměř všechny mnou nově sekvenované taxony byly analýzou zařazeny do linií k morfologickým podobným taxonům. Pouze u *Staurodesmus incus* K13 nebyl zjištěn vztah k žádné linii a spolu se *Staurodesmus bulnheimii* tvoří samostatnou větev. Nově sekvenované druhy *Closterium striolatum* a *Closterium abruptum* byly analýzou zařazeny do linie Closteriaceae. Do této linie bylo také zařazeno *Closterium diana*e. *Staurastrum setigeum*, *S. cf. boreale*, *S. furcatum*, *S. arachne* a *S. inconspicuum* byly podle fylogenetické analýzy zařazeny do linie *Staurastrum*. *Micrasterias americana*, *M. cruxmelitensis*, *M. jenneri*, *M. papilifera* a *Cosmarium (Micrasterias) ralfsii* do linie *Micrasterias*. *Haplotaenium* bylo zařazeno s podporou 1/100/100 do linie *Haplotaenium*. *Euastrum inerme*, *E. ampulaceum*, *E. insigne*, *E. cunneatum*, *Euastrum crassum* var. *microcephalum* do linie *Euastrum*. *Cosmarium pyramidatum* s podporou 1/100/100 ke dvěma sekvencím *C. pseudopyramidatum*. *Desmidium coarctatum* do linie "vláknité 2". *Staurodesmus connatus* do linie STD2. *Cosmarium discrepans* a *C. cf. orthopunctulatum* do linie CO3.

3.3 Fylogenetická struktura

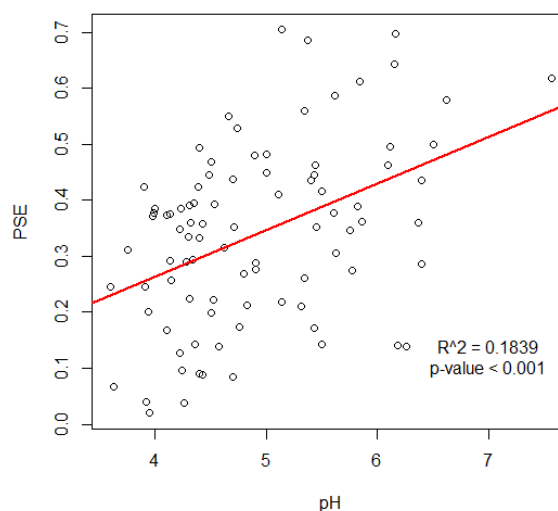
Pro hodnocení fylogenetické struktury společenstev jsem použila následující měřítka a indexy: MPD (mean phylogenetic distance), MNND (mean nearest taxon distance), NTI (nearest taxon index), NRI (net relatedness index), PSV (phylogenetic species variability), PSE (phylogenetic species evenness), PD (phylogenetic diversity).

Většina společenstev vykazovala nenáhodnou fylogenetickou strukturu. Fylogenetický rozptyl byl identifikován u 46 vzorků (NRI a NTI < 0) a fylogenetické shlukování ve 20 vzorcích (NRI a NTI > 0). Signifikantní fylogenetická struktura však byla prokázána pouze u dvou vzorků S04 a B21. U obou byl prokázán fylogenetický rozptyl. Průměrná párová vzdálenost (MPD) těchto společenstev byla v dolních 2,5 % MPD nulových společenstev. Vzorek B21 byl signifikantně shlukovaný i na základě indexu MNND.

Permutační testy odhalily, že společenstva krásivek jsou při použití nulového modelu, který zachovává druhovou bohatost druhů (null1), rozptýlená a při použití nulového modelu, který zachovává frekvenci druhů (null2), fylogeneticky shluknutá (meanPSV_{obs} = 0.579, meanPSV_{null1} = 0.452, meanPSV_{null2} = 20.608). Stejně výsledky byly i při použití indexu PSE.

3.3.1 Fylogenetická struktura a prostředí

Závislost fylogenetické struktury na hodnotě pH odběrových míst je znázorněna na Obr. 12. Při nižších hodnotách pH společenstva prokazují větší míru fylogenetického shlukování. Hodnota koeficientu determinace je pro závislost hodnoty index PSE na pH 0,184 ($p < 0,001$). Pro index PSV, který pracuje s prezencemi-absencemi druhů je závislost na pH obdobná ($R^2 = 0,186$, $p < 0,001$). Při zkoumání závislosti pH odběrových míst a indexů fylogenetické struktury byla signifikantní závislost indexu NRI ($R^2 = 0.151$, $p < 0,001$). Závislost hodnot indexu NTI na pH nebyla signifikantní, tento index je měřítko shlukování na koncových částech fylogenetického stromu. Na druhou stranu NRI odráží shlukování v hlubších částech fylogenetického stromu



Obr. 12 Lineární regrese metodou nejmenších čtverců.

(Webb & Pitman, 2002). I přes dlouhý gradient pH (3,59-7,57) nepřinesla polynomiální (kvadratická) regrese lepší výsledky závislosti indexů fylogenetické struktury na pH (pro PSE $R^2 = 0,185$, $p < 0,001$), z čehož lze usuzovat, že vztah fylogenetické struktury a pH je lineární, alespoň na mnou hodnoceném měřítku. Hodnoty determinačních koeficientů těchto regresí jsou nízké. Pokud společenstva rozdělíme do skupin podle regionů, pH vysvětlí větší procento variability v některých z indexů fylogenetické struktury (Tab. 5).

Tab. 5 Hodnoty koeficientů determinace lineárních indexů fylogenetické struktury na pH.
*** $p < 0,001$; ** $0,001 < p < 0,01$; * $0,1 < p < 0,05$; n.s. $p > 0,05$

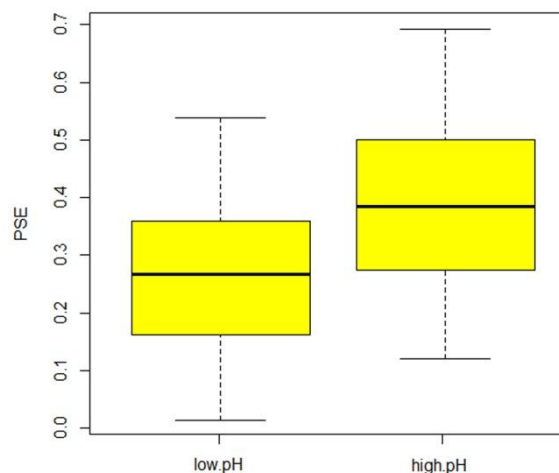
	PSV	PSE	NRI	NTI
pH Irsko	0,502 ***	n.s.	n.s.	n.s.
pH Švédsko	0,847 ***	0,346 *	n.s.	n.s.
pH Čechy	0,068 *	0,241 ***	0,133 **	n.s.

Ani u žádného regionu nepřinesla polynomiální regrese výrazně lepší rozlišení vztahu pH a indexů fylogenetické struktury. Závislost hodnot indexů fylogenetické struktury společenstev na konduktivitě odběrových míst není průkazná.

Dále jsem testovala, zda se určitá podmnožina dat signifikantně liší v hodnotách indexů fylogenetické struktury od jiného. Lokality jsem rozdělila na základě pH na ty s pH menším než 5 a lokality s pH větším než 5. Tyto dvě podmnožiny vzorků se od sebe signifikantně liší (Obr. 13). Skupina vzorků s nižším pH se na základě PSV jeví signifikantně fylogeneticky shluknutá (null model 2 – frequency, $\text{meanPSV}_{\text{obs}} = 0,446$;

$\text{meanPSV}_{\text{null2}} = 0,454$; $p < 0,05$) a

odběry s vyšším pH jsou signifikantně fylogeneticky rozptýlené se stejným nulovým modelem ($\text{meanPSV}_{\text{obs}} = 0,588$; $\text{meanPSV}_{\text{null2}} = 0,580$; $p < 0,05$). Stejně výsledky přinesl i druhý nulový model zachovávající frekvence druhů.

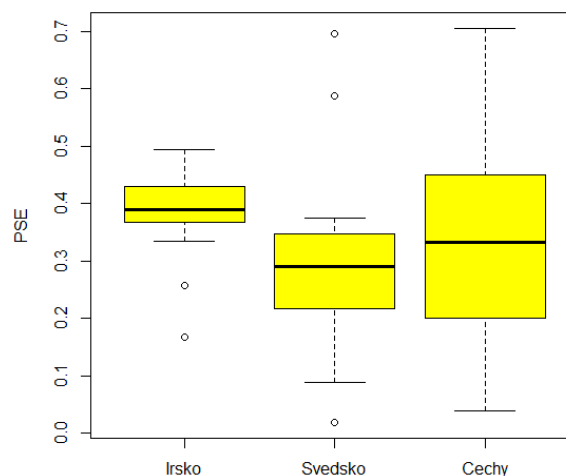


Obr. 13 Krabicové diagramy průměrných PSV lokalit s $\text{pH} < 5$ a $\text{pH} > 5$; Kruskal-Wallisův test $p < 0,001$

3.3.2 Fylogenetická struktura a geografická vzdálenost

Na základě rozdílů indexu fylogenetické struktury PSE (*phylogenetic species evenness*) pro jednotlivé odběrové regiony lze od sebe signifikantně odlišit odběry z oblasti Irska a Švédska (Obr. 14), ale celkově byly rozdíly neprůkazné (Kruskal-Wallis, $p = 0,089$). Tento index počítá s abundancemi druhů ve vzorcích. Rozdíl mezi oblastmi nebyl signifikantní ani při použití indexu PSV, který pracuje pouze s prezencemi/absencemi.

Signifikantně také nebyla prokázána jakákoli korelace mezi PD (fylogenetická bohatost) a geografickou vzdáleností mezi jednotlivými společenstvy (Mantel test; $p = 0,076$).

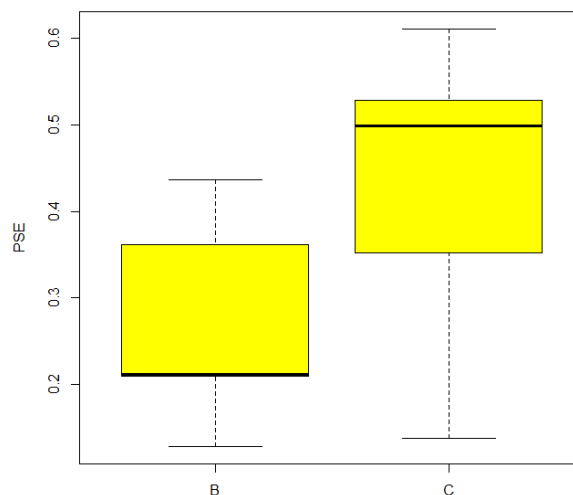


Obr. 14 Krabicové diagramy PSE hodnot; Kruskal-Wallisův test $p=0,089$, pouze rozdíl mezi Irskem a Švédskem vyšel signifikantní

3.3.3 Fylogenetická struktura a sezónnost

Na krabicových diagramech je zřetelné, že se místa lišila ve fylogenetické struktuře na jaře a na podzim. Na podzim měla společenstva vyšší hodnoty indexu PSE a byla méně fylogeneticky shluknutá. Mann-Whitneyův, ale test nepotvrdil, že by se sezóny signifikantně lišily ($p = 0,201$). To může být dáno velmi malým počtem vzorků, pro které mám data jak z jarních odběrů, tak z podzimu (celkem pouze 5 vzorků).

Trend změny fylogenetické struktury během sezóny se ukázal při porovnání dat z podzimu 2010 a jara 2011, tyto odběry jsem ale neprováděla na totožných lokalitách (Mann-Whitneyův test $p=0,047$). V jarních odběrech 2011 byly hodnoty indexu PSV menší než v podzimních odběrech 2012. Při použití indexu PSE, který pracuje s abundancemi druhů, se tento vztah nepodařilo prokázat. Rozdíly



Obr. 15 Krabicové digramy hodnoty indexu PSE, B – 6 jarních lokalit, C - totožné lokality na podzim, Mann-Whitneyův test $p=0,21$

v hodnotách PSV ale mohou být způsobeny tím, že odběry A a B nebyly prováděny na identických lokalitách. Na rozlišení vlivu sezóny na fylogenetickou strukturu společenstev by bylo zapotřebí jiný design odběrů.

4 Diskuze

4.1 Charakteristika odběrů

Mnou identifikovaných 277 taxonů krásivek velmi pravděpodobně nepostihuje kompletní diverzitu pozorovaných společenstev. Při počítání a identifikaci prvních 200 nalezených buněk je pravděpodobné, že velmi vzácné druhy nebyly objeveny. Heino & Soininen (2010) ale ukazují, že nezachycení kompletní diverzity lokalit není pro studie ekologie společenstev zásadní problém. Dle jejich výsledků 25 % nejhojnějších druhů dostatečně postihuje změny ve struktuře společenstev podél prostorových a environmentálních gradientů. Toto také podporuje studie (Neustupa et al., 2012), ve které autoři dosáhli stejných výsledků s použitím redukováných dat, do kterých zahrnuli pouze čtvrtinu nejhojnějších druhů, jako při použití kompletního druhového seznamu. Určování prvních 200 buněk ve vzorku je tedy dostatečné na postihnutí struktury společenstev. Irské vzorky měly vyšší druhovou bohatost než vzorky z Čech a Švédska. Celkový počet taxonů krásivek známý ze západního Irska je kolem 1200 (John & Williamson, 2009), oproti tomu v České republice pouhých 526 taxonů (Šťastný, 2010). Důvodů, proč je Západní Irsko bohaté, co se týče diverzity krásivek, je několik. Jedním z nich je fakt, že tato oblast je považována za nejpůvodnější a nejmíň člověkem ovlivněnou část Britských ostrovů. Také klimatické podmínky Irska jsou velmi příhodné pro formování rašelinišť a geologické podloží je tvořeno převážně kyselými metamorfovanými horninami, což vytváří vhodné pH lokalit (John & Williamson, 2009). Otázkou je, proč mají jižní části Švédska oproti Irsku nižší druhovou bohatost krásivek, když jsou ještě méně ovlivněna člověkem. Myslím, že by to mohlo být způsobeno klimatickými poměry. Irsko má oproti Švédsku mnohem příznivější klimatické podmínky. Ve Švédsku (údaje pro meteorologickou stanici Almhult) je průměrně po 175 dní teplota pod bodem mrazu, v Irsku (Galway) to je pouhých 27 dní (údaje z meteorologického serveru <http://www.weatherbase.com>). To pro krásivky znamená delší vegetační sezónu. Také počet deštivých dnů a celkový úhrn srážek je výrazně vyšší v Irsku (294 dní a 1120 mm v Irsku a 66 dní a 820 mm srážek ve Švédsku). Druhová bohatost krásivkových společenstev (v Čechách a Švédsku) je pozitivně korelovaná s pH. To je v souladu se zjištěními z jiných studií, že kyselější lokality mají nižší druhovou bohatost (Neustupa et al., 2009; 2012). Jednotlivé regiony se mezi sebou také lišily ve druhovém složení krásivek.

4.2 Fylogeneze Desmidiales

Stejně jako předchozí studie i moje data potvrdila, že většina tradičních krásivkových rodů je polyfyletických (Gontcharov et al., 2004; Moon et al., 2005; Gontcharov & Melkonian, 2008, 2011). Mnou identifikované linie odpovídají liniím, které definovali Gontcharov a Melkonian (2011). Jedinou výjimku tvoří linie *Docidium*, která byla v přechozí studii identifikována jako samostatná větev. Díky dalším datům ji moje analýza určila jako samostatnou linii se slabou podporou (1/-/67) a Bayesovská inference ji zařadila jako sesterskou linii k podpořené linii *Haplotaenium*.

Mnou vyizolované *Cosmarium ralfsii* K10 bylo s dobrou podporou zahrnutu do linie *Micrasterias*, potvrzuje to zařazení tohoto druhu do rodu *Micrasterias* Škaloudem et al. (2011).

Do linie "omniradiální" bylo zařazeno *Cosmarium excavatum* K24, což odpovídá jeho morfologii. Z vrchního pohledu je téměř kruhové (Coesel & Meesters, 2007). Původně byla linie "omniradiální" tvořená právě druhy s kruhovým průřezem (Gontcharov et al., 2003). Po přidání dalších sekvencí Gontcharovem (2011) byly do linie zařazeny i další taxony s odlišnými morfologiemi a taxonomický status této bazální linie Desmidiales zůstává nejasný. Gontcharov (2011) navrhuje, že by tato linie v budoucnosti mohla být rozdělena na několik nových rodů. *Cosmarium excavatum* K24 s dalšími třemi druhy rodu *Cosmarium* tvoří v rámci "omniradiální" linie s podporou 1/100/100. Všechny čtyři taxony mají podobnou morfologii – velikost, tvar buněk a buněčnou stěnu s výraznými granulemi. V budoucnu by bylo možné popsat tuto linii jako separátní rod.

Tradičně se rod *Closterium* dělí na dvě skupiny podle schopnosti vytvářet na buněčných stěnách při dělení tzv. pravé opasky "girdle bands" (Coesel & Meesters, 2007). Určení, zda druh má či nemá opasky je prvním krokem v určovacích klíčích pro rod *Closterium*. Mnou izolované *Closterium striolatum* a *Closterium abruptum* při dělení tyto opasky vytvářejí. Získala jsem vůbec první sekvence druhů vytvářejících opasky. Nepotvrdila se hypotéza, že se rod *Closterium* rozpadá na dvě části. Druhy vytvářející opasky analýza zařadila dovnitř linie *Closterium*. Tímto se potvrdila již dříve zjištěná monofýlie rodu *Closterium* (Denboh et al., 2001).

Rozlišení bylo v hlubších částech stromu slabší, což je dáno použitím pouze jednoho genu. Multigenové studie přinesly lepší podpory hlubších částí stromu (Gontcharov & Melkonian, 2011).

Téměř všechny mnou nově vyizolované taxony byly analýzou zařazeny do předpokládaných linií k taxonům s podobnou morfologií. Jedinou výjimku tvoří *Staurodesmus incus* K13, který tvoří spolu se *Sturodesmus bulnheimii* samostatnou větev. Ze 30 taxonů byla pozice 29 dobře předpověditelná. Dle mého názoru to ospravedlňuje použití zástupné sekvence podobného organismu pro taxony, které sekvenci *rbcL* v databázi GenBank nemají, při analýze fylogenetické struktury společenstva.

4.3 Fylogenetická struktura

4.3.1 Celková fylogenetická struktura

I když většina společenstev vykazovala nenáhodnou fylogenetickou strukturu (46 vzorků fylogenetický rozptyl a 20 vzorků fylogenetické shlukování), pouze dvě společenstva z 89 byla signifikantně nenáhodně strukturovaná. Obě společenstva byla fylogeneticky rozptýlená. To, že většina vzorků neměla signifikantní nenáhodnou fylogenetickou strukturu, může být způsobeno relativní rovnováhou mezi kompeticí a environmentálním filtrováním na malém měřítku (Helmus et al., 2007b). Tento výsledek by také mohla vysvětlit hypotéza, že na mikroměřítku 10x10 cm jsou společenstva ovlivněna procesy spojenými s rozšířením jako je kolonizace nebo vymření (Neustupa et al., 2012). Tuto variantu neutrálního modelu Hardy (2008) nazývá "lokálně neutrální model". Společenstva se podle něj mohou na malém měřítku chovat neutrálně, což ale nemusí platit pro vyšší stupně (regionální pool společenstev). Pro ověření platnosti této hypotézy by však byl zapotřebí jiný design odběrů. Při situaci, kdy byla většina společenstev fylogeneticky strukturovaná (i když ne signifikantně) se spíše přikláním k hypotéze, že na tomto měřítku 10x10 cm dochází k balancování vlivu environmentálních filtrů a kompetice.

Při testování fylogenetické struktury všech vzorků dohromady jsem získala dva rozdílné výsledky. Statistický test podle nulového modelu zachovávajícího druhovou bohatost vzorků (null1) ukázal, že jsou společenstva celkově tvořena relativně nepříbuznými druhy (signifikantně fylogeneticky rozptýlená). Druhý použitý nulový model zachovávající frekvenci druhů (null2) odhalil, že společenstva jsou tvořena relativně příbuznými druhy (signifikantně fylogeneticky shluknutá). První test předpokládá, že společenstva jsou náhodná seskupení druhů vybraných z celkového poolu všech druhů, fylogenetická struktura je tedy skrytá v prevalencích druhů, nebo ve složení společenstev. Fylogenetický rozptyl tedy podle null1 vypovídá, že nejčastěji se vyskytující druhy jsou relativně nepříbuzné, nebo že jsou společenstva celkově tvořena relativně nepříbuznými druhy. Fylogenetické shlukování při

druhém nulovém (null2) modelu značí, že fylogeneticky příbuzné druhy se často nacházejí ve stejných lokalitách, po odečtení rozdílů v prevalenci (Helmus et al., 2007a; Helmus et al., 2007b). To, že průměrná hodnota PSV u nulových společenstev nulového modelu zachovávající frekvenci druhů (null2) je blíže k průměrné pozorované hodnotě PSV, než průměrná hodnota PSV nulového modelu (null1) svědčí o tom, že nejvíce variability ve fylogenetické struktuře krásivkových společenstev je způsobeno rozdíly v prevalenci mezi druhy (Helmus et al., 2007a). Nejrozšířenější krásivkové druhy jsou relativně nepříbuzné. Stejný pattern našli i Anderson et al. (2004) u společenstev kvasinek na kaktusech. Opačným příkladem, kdy nejrozšířenější druhy jsou relativně blízce příbuzné, jsou společenstva ryb ve Wisconsinu (Helmus et al., 2007a). To, že podle různých nulových modelů vyšly různé výsledky ve skutečnosti, ale znamená, že společenstva celkově nejsou nijak fylogeneticky strukturovaná (Helmus et al., 2007b). To může být způsobeno tím, že je některá skupina vzorků fylogeneticky shlukovaná a některá rozptýlená. Všechny dohromady potom neodrážejí žádný fylogenetický pattern. Z toho vyplývá, že mnou pozorovaná společenstva nebyla strukturována stejným procesem - není jeden převládající vliv, který by určoval strukturu všech mnou pozorovaných společenstev.

4.3.2 Fylogenetická struktura a environmentální parametry

Použití informace o environmentálních parametrech lokalit přineslo vysvětlení toho, proč celkově nejsou společenstva fylogeneticky strukturovaná. Moje výsledky podporují hypotézu, že pH působí jako silný environmentální filtr, který selektuje společenstva blízce příbuzných druhů. Pozitivní korelace mezi hodnotou pH a mírou fylogenetického shlukování byla prokázána napříč všemi lokalitami a pro všechny indexy až na NTI. To, že závislost NTI na pH nebyla prokázána jako signifikantní, může být způsobeno tím, že NTI reflektuje fylogenetické shlukování na okrajích fylogenetického stromu (Webb & Pitman, 2002). Tento index je lepším ukazatelem u společenstev strukturovaných kompeticí (Kraft et al., 2007). Index NTI také mohl být značně ovlivněn tím, že u některých druhů jsem chybějící informaci o fylogenezi nahradila informací morfologicky podobného nebo příbuzného druhu (porovnáním údajů z fylogenezí na základě jiných genů než *rbcL*). Index NRI zase odráží fylogenetickou strukturu na úrovni hlubších částí stromu a je silnější ukazatel struktury u společenstev ovlivněných environmentálním filtrem (Kraft et al., 2007).

Společenstva lokalit s nízkými hodnotami pH měla větší míru fylogenetického shlukování. Tato závislost se zdá na mnou hodnoceném gradientu lineární. Optima krásivkové diversity jsou v mírně kyselých biotopech ($6,5 > \text{pH} > 5$), v kyselejších nebo alkalických

prostředích diverzita klesá (Coesel, 2001). Dá se předpokládat, že pokud by byl analyzovaný gradient delší, mohlo by vysoké pH působit jako environmentální filtr a fylogenetická struktura společenstev by byla opět shlukovaná. Společenstva krásivek v lokalitách s $\text{pH} < 5$ byla signifikantně fylogeneticky shlukovaná a v lokalitách s $\text{pH} > 5$ signifikantně fylogeneticky rozptýlená. Toto rozdělení odpovídá rozdělení rašelinišť na ombotrofní a minerotrofní (Rydin & Jeglum, 2006). Verdu a Pasaus (2007) zjistili, že v přítomnosti stresu (v jejich případě časté frekvence požárů) jsou společenstva fylogeneticky shlukovaná. Na místech s nízkou frekvencí stresu byla společenstva fylogeneticky rozptýlená – byla strukturovaná kompeticí. Stejný pattern jsem našla i ve svých datech – při vyšších hodnotách pH poklesne environmentální stres a společenstva jsou strukturovaná převážně kompeticí. Toto je v souladu s hypotézou, že nízké pH vytváří stresové podmínky, které limitují výskyt většiny krásivkových druhů (Neustupa, et al., 2009). V kyselých lokalitách ($\text{pH} < 4$) se nacházejí krásivky jednodušších válcovitých tvarů. Složitě a ornamentované tvary jako má rod *Micrasterias* jsou nalézány v prostředích $\text{pH} > 5$ (Coesel, 1982). Buňky v nízkém pH pravděpodobně potřebují upravit (snížit) poměr povrchu ku objemu, aby minimalizovali stres, který působí vnikání H^+ iontů do cytoplasmy. Řasy, které mají pevnou buněčnou stěnu, musí zjednodušovat svoji morfologii, aby mohly manipulovat s poměrem povrchu ku objemu. Tyto změny spojené se zjednodušováním morfologie byly identifikovány u krásivek *Euastrum binale* var. *gutwinskii* a *Sturastrum hirsutum* experimentálně kultivovaných při nízkém pH (Černá & Neustupa, 2010). Všechny výše uvedené studie dokazují, že pH silně působí na krásivková společenstva.

Zjištění, že pH je silný environmentální filtr pro krásivková společenstva, může být důležité pro hodnocení vlivu disturbancí. Helmus et al. (2010) při studiu efektu různých disturbancí na společenstva zooplanktonu zjistili, že společenstva, na která působil nějaký environmentální filtr (byla fylogeneticky shlukovaná), byla následnou disturbancí ovlivněna daleko více než společenstva fylogeneticky rozptýlená.

Dalším potenciálním environmentálním filtrem by mohla být vysoká trofie. Měřila jsem její nepřímý ukazatel konduktivitu. I když některé studie prokázaly vliv konduktivity na složení krásivkových společenstev (Mataloni, 1998; Štepanková et al., 2008), v mých datech se neprojevil žádný signifikantní vliv konduktivity na fylogenetickou strukturu společenstev.

4.3.3 **Fylogenetická struktura a geografická vzdálenost, sezóna**

Pomocí indexu PSE lze odlišit vzorky z Irska a Švédska, ale celkově se jednotlivé lokality od sebe nedají odlišit (ani za použití jiných indexů). Fakt, že jsem nenašla žádnou korelaci mezi fylogenetickou strukturou společenstev a jejich geografickou vzdáleností, svědčí o tom, že druhy ve společenstvu nejsou limitovány šířením. Společenstva limitovaná tím, zda jsou druhy schopné se v nich uchytit, budou mít ekologicky podobnější druhy, a rozdíl v diverzitě bude záležet hlavně na environmentálních faktorech (Jabot, Etienne, & Chave, 2008). To jenom podtrhává roli nikových procesů ve společenstvech krásivek.

Jarní odběry byly více fylogeneticky shlukované než pozimní. Může to být způsobeno disturbancí, kterou způsobuje zimní zamrznutí lokalit. Tyto výsledky podporuje studie Machové-Černé et al. (2009), kde zjistili, že sezónní změna složení fyto bentosu se projevovala na jaře sníženou druhovou bohatostí a zvýšenou dominancí. Tento pokles diverzity vysvětlovali právě silnou zimní disturbancí. V rozporu s tím však Svoboda (2011) ve svých datech o sezónní struktuře fyto bentosu rašelinišť neprokázal žádnou sezónní variabilitu co se týče diverzity, druhové bohatosti ani druhového složení. Rozdíl v hodnotách PSV mezi podzimem 2010 a jarem 2011 může být způsoben tím, že tyto dva datové soubory nebyly sbírané na stejných lokalitách. Taky počet jednotlivých vzorků se lišil. Na malém datasetu 6 totožných vzorků z jara 2011 a podzimu 2011 nebyl nalezen signifikantní rozdíl v hodnotách indexů fylogenetické struktury. Z krabicových diagramů (výsledky - Obr. 15) se však zdá, že na podzim měla společenstva větší míru fylogenetického rozptylu. Je to však testované na velmi omezeném počtu vzorků a na rozlišení sezonní dynamiky fylogenetické struktury fyto bentosu by byl potřeba odlišný design odběrů

5 Závěr

V této studii jsem se zabývala fylogenetickou strukturou krásivkových společenstev na rašeliništích.

I když celkově nebyla společenstva krásivek fylogeneticky strukturovaná, většina vzorků nenáhodnou strukturu vykazovala (i když ne signifikantní). To svědčí o tom, že společenstva krásivek jsou strukturována spíše ekologickými procesy spojenými s rozdílnými nikami druhů. Prokázala jsem silný vliv pH na strukturu společenstev. Nízké pH působilo jako silný environmentální filtr. V lokalitách s pH menším než 5 byla společenstva signifikantně fylogeneticky shlukovaná. V prostředí s vyšším pH se díky uvolnění environmentálního filtrování ukázal vliv kompetice, která limitovala koexistenci příbuzných druhů, a společenstva tak byla fylogeneticky rozptýlená. Zjištění silného vlivu pH na krásivková společenstva je v souladu se zjištěními jiných ekologických studií. Zahnutí fylogenetické informace do studia přineslo nové poznatky roli o kompetice ve vyšších hodnotách pH. Zjištění, že pH působí jako environmentální filtr, je důležité také kvůli hodnocení vlivu disturbancí. Společenstva fylogeneticky shluknutá díky nějakému environmentálnímu filtru bývají více ovlivněna disturbancí než společenstva, ve kterých je převažujícím strukturujícím procesem kompetice.

Nepodařilo se mi prokázat žádný vliv konduktivity a geografické vzdálenosti na strukturu společenstev.

Data naznačují, že během sezóny se fylogenetická struktura společenstev mění, odběrový pattern však nebyl navrhnout tak, aby se vliv sezóny dal přesněji hodnotit.

6 Literatura

- ADLER, P. B., J. HILLERISLAMBERS, & J. M. LEVINE. 2007. A niche for neutrality. *Ecology Letters* 10: 95-104.
- ANDERSON, T. M., M. A. LACHANCE, & W. T. STARMER. 2004. The relationship of phylogeny to community structure: The cactus yeast community. *American Naturalist* 164: 709-721.
- CARRANZA, A., O. DEFEO, & M. ARIM. 2011. Taxonomic relatedness and spatial structure of a shelf benthic gastropod assemblage. *Diversity and Distributions* 17: 25-34.
- CAVENDER-BARES, J., D. D. ACKERLY, D. A. BAUM, & F. A. BAZZAZ. 2004. Phylogenetic overdispersion in Floridian oak communities. *American Naturalist* 163: 823-843.
- CAVENDER-BARES, J., K. H. KOZAK, P. V. A. FINE, & S. W. KEMBEL. 2009. The merging of community ecology and phylogenetic biology. *Ecology Letters* 12: 693-715.
- CHESSON, P. 2000. Mechanisms of maintenance of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31: 343-366.
- COESEL, P. F. M. 1982. Structural Characteristics and Adaptations of Desmid Communities. *Journal of Ecology* 70: 163-177.
- _____. 2001. A method for quantifying conservation value in lentic freshwater habitats using desmids as indicator organisms. *Biodiversity and Conservation* 10: 177-187.
- COESEL, P. F. M., & K. MEESTERS. 2007. Desmids of the Lowland. KNNV Publiushing, Zeist, the Netherland. 351pp.
- COESEL, P. F. M., R. KWAKKESTEIN, & A. VERSCHOOR. 1978. Oligotrophication and Eutrophication Tendencies in Some Dutch Moorland Pools, as Reflected in Their Desmid Flora. *Hydrobiologia* 61: 21-31.
- ČERNÁ, K., & J. NEUSTUPA. 2010. The pH-related morphological variations of two acidophilic species of Desmidiaceae (Viridiplantae) isolated from a lowland peat bog, Czech Republic. *Aquatic Ecology* 44: 409-419.
- DARWIN, C. 1859. *The Origin of Species by Means of Natural Selection*. Murray, London.
- DENBOH, T., D. HENDRAYANTI, & T. ICHIMURA. 2001. Monophyly of the genus Closterium and the order Desmidiaceae (Charophyceae, Chlorophyta) inferred from nuclear small subunit rDNA data. *Journal of Phycology* 37: 1063-1072.
- DIAMOND, J. M. 1975. *Assembly of species communities*, Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA, Ecology and evolution of communities. pp. 342-444.
- ELTON, C. 1946. Competition and the Structure of Ecological Communities. *Journal of Animal Ecology* 15: 54-68.
- EMERSON, B. C., & R. G. GILLESPIE. 2008. Phylogenetic analysis of community assembly and structure over space and time. *Trends in Ecology & Evolution* 23: 619-630.
- GAUSE, G. F. 1934. *The struggle for existence*. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- GONTCHAROV, A. A. 2008. Phylogeny and classification of Zygnematophyceae (Streptophyta): current state of affairs. *Fottea* 8: 87-104.
- GONTCHAROV, A. A., & M. MELKONIAN. 2008. In search of monophyletic taxa in the family Desmidiaceae (Zygnematophyceae, Viridiplantae): The genus Cosmarium. *American Journal of Botany* 95: 1079-1095.
- _____. 2011. A Study of Conflict between Molecular Phylogeny and Taxonomy in the Desmidiaceae (Streptophyta, Viridiplantae): Analyses of 291 rbcL Sequences. *Protist* 162: 253-267.
- GONTCHAROV, A. A., B. MARIN, & M. MELKONIAN. 2003. Molecular phylogeny of conjugating green algae (Zygnematophyceae, Streptophyta) inferred from SSU rDNA sequence comparisons. *Journal of Molecular Evolution* 56: 89-104.

- _____. 2004. Are combined analyses better than single gene phylogenies? A case study using SSU rDNA and rbcL sequence comparisons in the Zygnematophyceae (Streptophyta). *Molecular Biology and Evolution* 21: 612-624.
- HALL, J. D., K. G. KAROL, R. M. MCCOURT, & C. F. DELWICHE. 2008. Phylogeny of the conjugating green algae based on chloroplast and mitochondrial nucleotide sequence data. *Journal of Phycology* 44: 467-477.
- HAMMER, Ø., D. A. T. HARPER, & P. D. RYAN. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 9.
- HARDY, O. J. 2008. Testing the spatial phylogenetic structure of local communities: statistical performances of different null models and test statistics on a locally neutral community. *Journal of Ecology* 96: 914-926.
- HEINO, J., & J. SOININEN. 2010. Are common species sufficient in describing turnover in aquatic metacommunities along environmental and spatial gradients? *Limnology and Oceanography* 55: 2397-2402.
- HELMUS, M. R., T. J. BLAND, C. K. WILLIAMS, & A. R. IVES. 2007a. Phylogenetic measures of biodiversity. *American Naturalist* 169: E68-E83.
- HELMUS, M. R., K. SAVAGE, M. W. DIEBEL, J. T. MAXTED, & A. R. IVES. 2007b. Separating the determinants of phylogenetic community structure. *Ecology Letters* 10: 917-925.
- HELMUS, M. R., W. KELLER, M. J. PATERSON, N. D. YAN, C. H. CANNON, & J. A. RUSAK. 2010. Communities contain closely related species during ecosystem disturbance. *Ecology Letters* 13: 162-174.
- HORNER-DEVINE, M. C., & B. J. M. BOHANNAN. 2006. Phylogenetic clustering and overdispersion in bacterial communities. *Ecology* 87: S100-S108.
- HUBBELL, S. P. 2001. *The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography*. Princeton University Press, New Jersey. 480 pp.
- _____. 2005. Neutral theory in community ecology and the hypothesis of functional equivalence. *Functional Ecology* 19: 166-172.
- HUTCHINSON, G. E. 1957. Concluding remark, 415-427, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.
- IVES, A. R., & M. R. HELMUS. 2011. Generalized linear mixed models for phylogenetic analyses of community structure. *Ecological Monographs* 81: 511-525.
- JABOT, F., R. S. ETIENNE, & J. CHAVE. 2008. Reconciling neutral community models and environmental filtering: theory and an empirical test. *Oikos* 117: 1308-1320.
- JOHN, D. M., & D. B. WILLIAMSON. 2009. *A Practical Guide to the Desmids of the West of Ireland*. National University of Ireland, Galway, Ireland. 196 pp.
- JOHNSON, M. T. J., & J. R. STINCHCOMBE. 2007. An emerging synthesis between community ecology and evolutionary biology. *Trends in Ecology & Evolution* 22: 250-257.
- KEMBEL, S. W. 2009. Disentangling niche and neutral influences on community assembly: assessing the performance of community phylogenetic structure tests. *Ecology Letters* 12: 949-960.
- KEMBEL, S. W., & S. P. HUBBELL. 2006. The phylogenetic structure of a neotropical forest tree community. *Ecology* 87: S86-S99.
- KEMBEL, S. W., P. D. COWAN, M. R. HELMUS, W. K. CORNWELL, H. MORLON, D. D. ACKERLY, S. P. BLOMBERG, et al. 2010. Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics* 26: 1463-1464.
- KOUWETS, F. A. C., & P. F. M. COESEL. 1984. Taxonomic revision of the Conjugatiphycean family Peniaceae on the basis of call wall ultrastructure. *Journal of Phycology* 20: 555-562.
- KRAFT, N. J. B., W. K. CORNWELL, C. O. WEBB, & D. D. ACKERLY. 2007. Trait evolution, community assembly, and the phylogenetic structure of ecological communities. *American Naturalist* 170: 271-283.

- LEGENDRE, P., & L. LEGENDRE. 2003. Numerical Ecology. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands. pp 139-141
- LENZENWERGER, R. 1996. Desmidiaceen flora von Österreich, Teil 1. 120 pp.
- _____. 1997. Desmidiaceen flora von Österreich, Teil 2. J. Cramer Verlag, Stuttgart. 153 pp.
- _____. 1999. Desmidiaceen flora von Österreich, Teil 3. J. Cramer Verlag, Stuttgart. 158 pp.
- _____. 2003. Desmidiaceen flora von Österreich, Teil 4. J. Cramer Verlag, Stuttgart. 63 pp.
- LOSOS, J. B., M. LEAL, R. E. GLOR, K. DE QUEIROZ, P. E. HERTZ, L. R. SCETTINO, A. C. LARA, et al. 2003. Niche lability in the evolution of a Caribbean lizard community. *Nature* 424: 542-545.
- MACHAC, A., M. JANDA, R. R. DUNN, & N. J. SANDERS. 2011. Elevational gradients in phylogenetic structure of ant communities reveal the interplay of biotic and abiotic constraints on diversity. *Ecography* 34: 364-371.
- MACHOVÁ-ČERNÁ, K., & J. NEUSTUPA. 2009. Spatial Distribution of Algal Assemblages in a Temperate Lowland Peat Bog. *International Review of Hydrobiology* 94: 40-56.
- MAHERALI, H., & J. N. KLIRONOMOS. 2007. Influence of Phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Science* 316: 1746-1748.
- MANTEL, N. 1967. Detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- MARTIN, A. P. 2002. Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3673-3682.
- MATALONI, G. 1998. Ecological studies on algal communities from Tierra del Fuego peat bogs. *Hydrobiologia* 391: 157-171.
- MOON, M. B. R., L. A. SUK, A. J. HYUN, P. J. H. PARK, & L. OK-MIN. 2005. Phylogenetic Study of Genera *Staurastrum* and *Stauroidesmus* (Zygnemophyceae, Streptophyta) Inferred from *atpB* Sequences. *Algae* 20: 261-270.
- MOUILLOT, D., A. SIMKOVA, S. MORAND, & R. POULIN. 2005. Parasite species coexistence and limiting similarity: a multiscale look at phylogenetic, functional and reproductive distances. *Oecologia* 146: 269-278.
- NEUSTUPA, J., & P. ŠKALOUŠ. 2007. Geometric morphometrics and qualitative patterns in the morphological variation of five species of *Micrasterias* (Zygnemophyceae, Viridiplantae). *Preslia* 79: 401-417.
- NEUSTUPA, J., K. ČERNÁ, & J. ŠŤASTNÝ. 2009. Diversity and morphological disparity of desmid assemblages in Central European peatlands. *Hydrobiologia* 630: 243-256.
- _____. 2012. Spatio-temporal community structure of peat bog benthic desmids on a microscale. *Aquatic Ecology* in press.
- NIPPERESS, D. A., D. P. FAITH, & K. BARTON. 2010. Resemblance in phylogenetic diversity among ecological assemblages. *Journal of Vegetation Science* 21: 809-820.
- NYLANDER, J. A. A. 2008. MrModeltest v2.3. Readme [<http://www.abc.se/~nylander>].
- PAUSAS, J. G., & M. VERDU. 2010. The Jungle of Methods for Evaluating Phenotypic and Phylogenetic Structure of Communities. *Bioscience* 60: 614-625.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2010. R: a language and environment for statistical computing. [<http://www.R-project.org>].
- RONQUIST, F., & J. P. HUELSENBECK. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- ROOT, H. T., & P. R. NELSON. 2011. Does phylogenetic distance aid in detecting environmental gradients related to species composition? *Journal of Vegetation Science* 22: 1143-1148.
- RYDIN, H., & J. JEGLUM. 2006. The Biology of Peatlands. Oxford University Press, Oxford. pp. 139-163.
- SILVERTOWN, J., M. DODD, & D. GOWING. 2001. Phylogeny and the niche structure of meadow plant communities. *Journal of Ecology* 89: 428-435.

- SVOBODA, P. 2011. Rozšíření, diverzita a ekologie krásivek na lokálním prostorovém měřítku, poster, 52. konference České algologické společnosti, Praha.
- SWENSON, N. G., B. J. ENQUIST, J. PITHER, J. THOMPSON, & J. K. ZIMMERMAN. 2006. The problem and promise of scale dependency in community phylogenetics. *Ecology* 87: 2418-2424.
- SWOFFORD, D. L. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- ŠKALOUD, P., K. NEMJOVÁ, J. VESELÁ, K. ČERNÁ, & J. NEUSTUPA. 2011. A multilocus phylogeny of the desmid genus *Micrasterias* (Streptophyta): Evidence for the accelerated rate of morphological evolution in protists. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 933-943.
- ŠTEPANKOVÁ, J., J. VAVRUŠKOVÁ, P. HAŠLER, P. MAZALOVÁ, & A. POULÍČKOVÁ. 2008. Diversity and ecology of desmids of peat bogs in the Jizerske hory Mts. *Biologia* 63: 895-900.
- ŠŤASTNÝ, J. 2010. Desmids (Conjugatophyceae, Viridiplantae) from the Czech Republic; new and rare taxa, distribution, ecology. *Fottea* 10: 1-74.
- TAMURA, K., D. PETERSON, N. PETERSON, G. STECHER, M. NEI, & S. KUMAR. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- THOMPSON, J. N., O. J. REICHMAN, P. J. MORIN, G. A. POLIS, M. E. POWER, R. W. STERNER, C. A. COUCH, et al. 2001. Frontiers of ecology. *Bioscience* 51: 15-24.
- ULRICH, W., & N. J. GOTELLI. 2010. Null model analysis of species associations using abundance data. *Ecology* 91: 3384-3397.
- VALIENTE-BANUET, A., & M. VERDU. 2007. Facilitation can increase the phylogenetic diversity of plant communities. *Ecology Letters* 10: 1029-1036.
- VERDU, M., & J. G. PAUSAS. 2007. Fire drives phylogenetic clustering in Mediterranean Basin woody plant communities. *Journal of Ecology* 95: 1316-1323.
- VERDU, M., P. J. REY, J. M. ALCANTARA, G. SILES, & A. VALIENTE-BANUET. 2009. Phylogenetic signatures of facilitation and competition in successional communities. *Journal of Ecology* 97: 1171-1180.
- VIOLLE, C., D. R. NEMERGUT, Z. C. PU, & L. JIANG. 2011. Phylogenetic limiting similarity and competitive exclusion. *Ecology Letters* 14: 782-787.
- WEBB, C. O. 2000. Exploring the phylogenetic structure of ecological communities: An example for rain forest trees. *American Naturalist* 156: 145-155.
- WEBB, C. O., & N. C. A. PITMAN. 2002. Phylogenetic balance and ecological evenness. *Systematic Biology* 51: 898-907.
- WEBB, C. O., D. D. ACKERLY, & S. W. KEMBEL. 2008. Phylcom: software for the analysis of phylogenetic community structure and trait evolution. *Bioinformatics* 24: 2098-2100.
- WEBB, C. O., D. D. ACKERLY, M. A. MCPEEK, & M. J. DONOGHUE. 2002. Phylogenies and community ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33: 475-505.
- WEIHER, E., & P. A. KEDDY. 1995. The assembly of experimental wetland plant communities. *Oikos* 73: 323-335.
- ZVÁRA, K. 2006. Biostatistika. Nakladatelství Karolinum, Praha. 2013 pp.
- ZWICKL, D. J. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin.