

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE  
FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ  
KATEDRA EKOLOGIE

**Využití metody fingerprinting pro identifikaci  
lišejníkového mykobionta rodu *Acarospora***

DILOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jana Kocourková, CSc.  
Diplomant: Bc. Ilona Sommerová

2014

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Katedra ekologie

Fakulta životního prostředí

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Ilona Sommerová

Inženýrská ekologie

Název práce

**Využití metody fingerprinting pro identifikaci lišejníkového mykobionta rodu *Acarospora***

Anglický název

**Using of molecular fingerprinting in identifying *Acarospora* lichen mycobiobiont**

---

### Cíle práce

Cílem práce je naučit se metodu molekulární analýzy v praxi na třech předem zvolených oblastech DNA a využít metodu fingerprinting pro studium mykobiontů rodu *Acarospora* komplexu *Acarospora fuscata*, který je charakterizován saxikolními druhy a obsahem sekundárních metabolitů kyseliny gyroforové a lekanorové ve stélce. Molekulární analýza pomůže prověřit příbuznost druhů skupiny *Acarospora fuscata* v rámci rodu *Acarospora* a zhodnotit fylogenetickou pozici druhu *Acarospora gallica* v rámci komplexu.

### Metodika

1/ Sběr vzorků uvedené skupiny lišejníků na území ČR, jejich preparace a archivace. Pro potřeby analýz budou využity rovněž zapůjčené vzorky z ČR i ze zahraničí.

2/ Provést molekulární analýzu vybraných vzorků: izolace DNA / PCR / sekvenování

3/ Vytvořit fylogenetický strom

**Rozsah textové části**

60 – 80 stran

**Klíčová slova**

A. gallica, A. pseudofuscata, Acarospora fuscata, fylogenetický strom, gyroforová a lekanorová kyselina, saxikolní lišejníky

**Doporučené zdroje informací**

Nash T. H., Gries C. & Burgartz F. (2007): Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region Vol. 3. Lichens Unlimited, Arizona State University, 567pp.

Nash T. H. (2008): Lichen Biology. Cambridge University Press, New York, 486 pp.

Orange A., James P. W. & White F. J. (2001): Microchemical Methods for the Identification of Lichens. British Lichen Society, London, 101pp.

Smith C. W., Aptroot A., Coppins B. J., Fletcher A., Gilbert O. I., James P. W. & Wolseley P. A. (2009): The Lichens of Great Britain and Ireland. British Lichen Society, London, 1046 pp.

Wirth V., Hauck M. & Schultz M. (2013): Die Flechten Deutschlands. Eugen Ulmer GmbH, Stuttgart, 1152 S.

Wirth V. (1995): Flechtenflora: Bestimmung und ökologische Kennzeichnung der Flechten Südwestdeutschlands und angrenzender Gebiete. Eugen Ulmer GmbH, Stuttgart, 661 S.

**Vedoucí práce**

doc. RNDr. Jana Kocourková, CSc.

Elektronicky schváleno dne 29. 10. 2014

**prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.**

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 6. 11. 2014

**prof. Ing. Petr Sklenička, CSc.**

Děkan FŽP ČZU

V Praze dne 08. 12. 2014

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Jany Kocourkové, CSc. (Další informace mi poskytl doc. Mgr. Jan Vondrák, PhD.), a že jsem uvedla všechny literární prameny, ze kterých jsem čerpala.

V Praze 6. 12. 2014

.....

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala za cenné rady při zpracování této práce doc. Mgr. Janu Vondrákovi, PhD., Mgr. Janu Bílému a RNDr. Janu Ponertovi, za zapůjčení vzorků RNDr. Josefu Haldovi, RNDr. Jiřímu Malíčkoví a RNDr. Zdeňkovi Palicemu, za pomoc při jejich určování Kerryemu Knudsenovi a za vedení a motivaci doc. RNDr. Janě Kocourkové CSc.

## **Abstrakt**

Skupina *Acarospora fuscata* zahrnuje pět lišejníkových druhů rodu *Acarospora* – *A. fuscata*, *A. gallica*, *A. pseudofuscata*, *A. thamnina* a *A. umbilicata*, sdružených na základě podobných morfologických znaků, shodných sekundárních metabolitů a ekologických nároků. Jedná se o korovité saxikolní lišejníky s hnědou areolovitou až šupinovitou stélkou, které obsahují jako hlavní sekundární metabolit kyselinu gyroforovou a jejichž habitatem jsou exponovaná stanoviště kyselých křemičitých skal. Morfologická plasticita zástupců této skupiny ztěžuje určování jednotlivých druhů, přičemž může snadno docházet k jejich záměnám. Vzorky těchto pěti morfologicky stanovených druhů sloužily jako modelová skupina pro ověření využitelnosti metod molekulárního fingerprintingu lišejníkového mykobionta. Izoláty získané ze vzorků byly amplifikovány a sekvenovány v lokusech ITS, mtSSU a genu pro  $\beta$ -tubulin. Jednotlivé sekvence byly vyhodnoceny v programu BLAST a v analýzách Neighbor-joining, Maximum likelihood a Maximum parsimony. Na základě získaných výsledků byly zrevidovány herbářové položky, určené na základě morfologických znaků. Fylogenetické analýzy ukázaly, že se v případě výše zmíněných druhů jedná o parafyletickou skupinu a „druhy“ *A. gallica* a *A. umbilicata* jsou pravděpodobně jen morfotypy druhu *A. fuscata*. Molekulární markery byly vyhodnoceny z pohledu jejich využitelnosti pro určování vzorků a taxonomické účely na druhové úrovni. I přes jistá úskalí jsou tyto metody užitečným nástrojem, který ve spojení s morfologickými znaky, může objasnit vztahy uvnitř taxonů, které jsou klasickými metodami jen těžko určitelné.

## **Klíčová slova**

*Acarospora fuscata*, *Acarospora gallica*, *Acarospora pseudofuscata*, kyselina gyroforová a lekanorová, saxikolní lišejníky, fylogenetický strom.

## **Abstract**

The *Acarospora fuscata* complex contains five lichen species of the genus *Acarospora* – *A. fuscata*, *A. gallica*, *A. pseudofuscata*, *A. thamnina* and *A. umbilicata*. The species are associated on the basis of the similar characters, the same secondary metabolites and the same ecological requirements. They are crustose saxicolous lichens with brown areolate to squamulose thallus. Their main secondary metabolite is gyrophoric acid. They occur on exposed sites of acidic rocks. The morphological plasticity among the members of this complex complicates identification and can lead to confusion. Specimens of these morphologically determined species served as a model group for verification that the molecular fingerprinting methods for distinguishing of lichens mycobionts are applicable. Isolates from the specimens were amplified and sequenced in the loci of ITS, mtSSU and gene for  $\beta$ -tubulin. The sequences were evaluated in the program BLAST and in analyses Neighbor-joining, Maximum likelihood and Maximum parsimony. Based on the results obtained the herbarium items were revised. According to the analyses the „species“ *Acarospora gallica* and *Acarospora umbilicata* seem to be morphotypes of the species *A. fuscata*. The molecular markers were evaluated from the perspective of their usability for determination of specimens and taxonomic works on the species level. Despite of some problems these methods are a useful tool. Together with morphological characters they are able to clarify relationships within taxons, that are difficult determinable using classical methods.

## **Key words**

*Acarospora fuscata*, *Acarospora gallica*, *Acarospora pseudofuscata*, gyrophoric acid, lecanoric acid, saxicolous lichens, phylogenetic tree.

## Obsah

1.	ÚVOD.....	9
1.1	Problematika taxonomie a fylogeneze u lišejníků .....	9
1.2	Současná systém lišejníků.....	11
1.3	Vymezení studované skupiny.....	11
1.3.1	Charakteristika rodu <i>Acarospora</i> .....	11
1.3.2	Historie výzkumu rodu <i>Acarospora</i> .....	12
1.3.3	Skupina <i>Acarospora fuscata</i> .....	14
1.4	Molekulární markery v lichenologii a metoda sekvenování DNA.....	21
1.4.1	Typy molekulárních DNA markerů .....	22
1.4.2	Sekvenování DNA a nejčastěji používané lokusy lišejníkové DNA .....	22
1.4.3	Postup metody sekvenování DNA.....	25
1.4.4	Fylogenetické analýzy .....	32
2.	CÍLE PRÁCE .....	34
3.	MATERIÁL A METODY .....	35
3.1	Terénní práce .....	35
3.2	Určování vzorků .....	36
3.3	Molekulární analýza.....	37
3.3.1	Materiál pro molekulární analýzu.....	37
3.3.2	Metody.....	40
3.3.3	Zpracování sekvencí a alignment .....	48
3.3.4	Fylogenetické analýzy .....	48
4.	VÝSLEDKY .....	50
4.1	Získané markery .....	50
4.2	Alignment.....	51
4.3	Molekulární analýzy .....	53
5.	DISKUSE.....	74
5.1	Vyhodnocení molekulárních analýz .....	74
5.2	Posouzení využitelnosti DNA-markerů .....	75
6.	ZÁVĚR.....	77
7.	PŘEHLED LITERATURY A POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	78



## 1. ÚVOD

Lišejníky všeobecně stojí na okraji vědeckého zájmu. Příčinou je pravděpodobně jejich nenápadnost, absence výrazných estetických struktur a omezená využitelnost pro lidskou společnost. Nicméně jejich význam jakožto spolehlivých bioindikátorů a ukazatelů stavu ekosystémů a životního prostředí obecně je nepopiratelný. Rovněž využití jejich sekundárních metabolitů, především ve farmakologii, má velký potenciál.

Pro studium lišejníků nejrůznějšího zaměření, bioindikace i pro inventarizace je nezbytná znalost taxonomie a správné určování druhů. Právě to však může u mnohých taxonomických skupin lišejníků působit potíže. Taxonomie, stanovená pouze na základě morfologických znaků, je dnes již překonaná a molekulární metody vnáší nové světlo do systému lichenizovaných hub. Stále snadnější dostupnost spolehlivých molekulárních metod ukazuje jejich potenciál i pro rutinní identifikaci těžko určitelných exemplářů.

### 1.1 Problematika taxonomie a fylogeneze u lišejníků

V minulosti byly lišejníky považovány za samostatné individuální organismy a jako takové byly též řazeny v taxonomickém systému. V polovině 18. století, kdy C. von Linné zveřejnil svoje dílo *Species Plantarum*, byly lišejníky zařazeny do samostatné systematické jednotky *Lichen*, oddělené od hub a řas. Převratný objev Schwenderera (Schwenderer 1869), odhaluje lišejník jako symbiotické společenství přinejmenším dvou zcela odlišných organismů – heterotrofní houbové složky (mykobionta) a fotosynteticky aktivní složky (fotobionta), kterou může tvořit buď zelená řasa, nebo sinice. V lišejníku, který se na první pohled jeví jako jediný organismus, se tak schází zástupci hned tří říší – houba, řasa a bakterie. Jejich vzájemná koexistence pak vykazuje obrovské rozdíly v míře lichenizace. Někteří zástupci obsahují pouze nemnoho nahodile rozmístěných buněk fotobionta a jejich asociace s mykobiontem je nepříliš intenzivní. Ve většině případů jsou však buňky fotobionta organizované do více méně souvislé vrstvy obklopené houbovou tkání. Ve většině zdrojů je vzájemná koexistence obou složek popisována jako příklad mutualismu. Fotobiont

poskytuje mykobiontovi organické produkty fotosyntézy. Mykobiont pak zajišťuje vhodné prostředí zadržováním vody a ochranou fotobionta před příliš intenzivním slunečním zářením. Takováto forma symbiózy umožňuje lišejníkům osidlovat i habitaty, ve kterých by jak houbová tak i řasová složka nemohly samostatně existovat (Nash 2008). Někteří autoři, jako např. Ahmadjian (1993), popisují lichenizaci spíše jako příklad kontrolovaného parazitismu, neboť mykobiont pravděpodobně profituje ze vzájemné koexistence více a fotobiont roste i ve vhodných podmínkách pomaleji, než by mohl v samostatně žijící formě. Myšlenku kontrolovaného parazitismu podporuje i častý výskyt haustorií, penetrujících do buněk řasy (Ahmadjian 1993). Vzájemný vliv se projevuje i ve formování lišejníkové stélky. Lichenizované houby, pěstované samostatně v kultuře, zůstávaly více méně amorfní. Jakmile však přišly do kontaktu s vhodným fotobiontem, započaly tvorbu typické lišejníkové stélky (Ahmadjian 1993). Ontogenetickou kontrolu fotobionta podporuje rovněž existence fotosymbiodémů – případů, kdy tentýž mykobiont asociuje jak s řasou, tak se sinicí a v obou případech vytváří zcela rozdílné stélky (Armelo et Clerc 1990).

Jednotlivé složky lišejníku jsou samostatnými organismy, nikoli však lišejník jako celek. Ten je daleko spíše možné považovat za miniaturní ekosystém či mikrobiom (Kocourková, úst. sděl.). Z toho vyplývají i specifika taxonomie lišejníků. Ještě dlouho po Schwendenerově objevu v druhé polovině 19. stol. převažovala tendence řadit všechny lišejníky do jedné taxonomické jednotky. Až na konci 20. stol. bylo rozhodnuto včlenit lišejníky do taxonomie hub. Přes svoji vysokou důležitost a ontogenetický vliv je složka fotobionta z hlediska taxonomie zcela opomíjena, a to hned ze dvou důvodů. Za prvé s houbami asociuje pouze malé množství řas a sinic, z nichž pouze nemnohé lze zařadit až na úroveň druhu, neboť jejich systematika na takto podrobné úrovni je dosud nejasná (Nash 2008). Za druhé je pravděpodobné, že lichenizace a delichenizace proběhla během historického vývoje hub několikrát a není tedy společným znakem určujícím monofyletickou skupinu (Gargas et al. 1995, Lutzoni et al. 2001). K této dedukci vede vysoká diverzita lichenizovaných hub a výskyt lišejníků v různých skupinách hub, přičemž v některých skupinách se mohou vyskytovat jak houby lichenizované, tak i nelichenizované.

Zprvu byly pro klasifikaci lišejníků využívány výhradně morfologické znaky. Pozornost byla zaměřena především na morfologii a ontogenezi vrceček.

Nejvýznamnějším znakem pro taxonomii lišejníků na úrovni rodů byl apikální aparát vřecka (Hafellner 1984). Wedin et al. (2005) však považuje mnohé skupiny, rozřazené na základě tohoto znaku, za polyfyletické. V současné genotypové klasifikaci, zdůrazňující příbuznost organismů, se jako nejvhodnější pro stanovení monofyletických skupin na základě jejich fylogeneze jeví využití kombinace molekulárních a morfologických znaků. Koncepty vymezení druhů na základě morfologie, sekundárních metabolitů, způsobu rozmnožování, výběru fotobionta a výskytu v určitém habitatu mohou sloužit jako pracovní hypotézy pro studie, které na základě molekulárních dat ověřují vymezení druhů nebo příbuznost druhů uvnitř určité skupiny (Grube et Kroken 2000).

## 1.2 Současný systém lišejníků

Téměř všechny lichenizované houby náleží do kmene Ascomycota. Pouhých asi 50 druhů se řadí mezi Basidiomycota. V rámci Ascomycetes se lišejníky nacházejí v pěti třídách: Arthoniomycetes, Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Lecanoromycetes a Lichinomycetes. Z toho třída Lecanoromycetes obsahuje téměř výhradně lichenizované houby a naprostá většina všech lišejníků se řadí právě do tohoto taxonu (Printzen 2010).

## 1.3 Vymezení studované skupiny

### 1.3.1 Charakteristika rodu *Acarospora*

Rod *Acarospora* (Ascomycota, Fungi) je jednou z nejméně prozkoumaných skupin lišejníků na světě (Wedin et al. 2009). Vysoká morfologická variabilita stélek zástupců této skupiny způsobuje problémy při stanovení taxonomie i při určování vzorků (Westberg et al. 2011; Wedin et al. 2009). Nejvyšší plasticita morfologických znaků se vyskytuje např. u druhů *A. fuscata*, *A. glaucocarpa*, *A. nitrophila* a *A. smaragdula* (Westberg et al. 2011).

Typovým druhem rodu *Acarospora* je *Acarospora schleicheri* (Ach.) A. Massal. (Knudsen et al. 2010).

Zástupci rodu *Acarospora* jsou korovité lišejníky s krustovitou, areolovitou, squamulózni či plakodiovitou stélkou. Charakteristické pro tento rod jsou polyspóry (více než 50 jednoduchých hyalinních spór ve vřecku), aspicilioidní nebo pseudo-lekanorovitá apothecia, bitunikátní vřeka s neamyloidní apikální částí. Fotobiontem jsou chlorokokální zelené řasy. Neformálně se podle barvy rozdělují na hnědou a žlutou skupinu. Sekundární metabolity buď netvoří vůbec, nebo obsahují kyselinu norstiktovou, gyroforovou, lekanorovou či mastné kyseliny. Žluté druhy vytváří kyselinu rhizokarpovou, někdy spolu s epanorinem (Knudsen 2007).

Magnusson (1929) popisuje rod *Acarospora* jako velmi homogenní. Jako zásadní znaky, spojující jeho zástupce, uvádí apothecia lekanorovitého typu, polysporická vřeka a jednotnou strukturu pyknid a konidií. Reeb et al. (2004) však na základě genetických analýz, navzdory morfologické jednotnosti, nepovažuje rod *Acarospora* za monofyletický.

Zástupci rodu jsou kosmopolitně rozšířeni, vyžadují otevřená stanoviště. Jen na území České republiky uvádí Vězda et Liška (1999) 24 druhů rodu *Acarospora*.

### 1.3.2 Historie výzkumu rodu *Acarospora*

Rod *Acarospora* poprvé definoval Massalongo v roce 1852 a stanovil i typový druh, žlutý lišejník *Acarospora schleicheri* (Ach.) A. Massal. (Knudsen et al. 2010).

Většina studií tohoto rodu vychází z práce švédského lichenologa A. H. Magnussona. Jeho monografie z roku 1929 (Magnusson 1929), ve které uvádí 199 druhů rodu *Acarospora*, je stále stěžejním dílem a pilířem pro výzkum tohoto rodu, a to i pro současné práce využívající nejmodernější metody molekulární analýzy. Většina druhů, které Magnusson v monografii uvádí, však v současné době není mezi lichenology příliš známa.

Od dob Magnussona byl tento rod dlouhou dobu opomíjen. Taxonomii této skupiny na druhové úrovni se v současné době podrobněji věnuje K. Knudsen ve spolupráci s J. Kocourkovou. Ve svých studiích popisuje jednotlivé známé i méně známé druhy jako *Acarospora gallica* (Knudsen et Kocourková 2012), *A. interjecta*, *A. pyrenopsoides* (Knudsen et Kocourková 2010) nebo *A. rosulata* (Knudsen et al.

2010). I v současné době dochází k popisu nových druhů, např. *A. pseudofuscata* (Sipman et Raus 2002). Molekulární metody byly pro studium na druhové úrovni využity při revizi skupiny *A. smaragdula* (Wedin et al. 2009) a druhu *A. rosulata* (Knudsen et al. 2010). Holder et al. (2000) použili Ramanovu spektroskopii s Fourierovou transformací pro vytvoření diagnostického spektra pigmentů a šřavelanu vápenatého u dvou zástupců žluté skupiny rodu *Acarospora*, *A. chlorophana* a *A. oxytona* (v současnosti pojmenované *Pleopsidium chlorophanum* a *Pleopsidium flavum*). Ve své práci předpokládají využitelnost této metody pro studium ekologie druhů i pro taxonomické účely.

Rod *Acarospora* náleží spolu s rody *Sarcogyne*, *Polysporina*, *Pleopsidium* a *Timdalia* do čeledi *Acarosporaceae* (Wedin et al. 2005), Reeb et al. (2004) řadí do této skupiny ještě rod *Thelocarpella*. Dříve byly do této čeledi řazeny rody *Acarospora*, *Biatorella*, *Thelocarpon*, *Maronea* a *Glypholecia* (Zahlbrückner 1907). Rozvoj molekulárních metod v taxonomii si však vyžádal revizi čeledi. Ve světle molekulární genetiky se samotný rod *Acarospora* ukazuje jako parafyletický (Reeb et al. 2004; Wedin et al. 2005). Vzájemné fylogenetické vztahy uvnitř čeledi *Acarosporaceae* zkoumali Crewe et al. (2006) s využitím sekvencí nuITS-LSU a mtSSU. Ve všech provedených analýzách se objevoval monofyletický klad obsahující druhy *A. schleicheri*, *A. fuscata*, *A. nitrophila*, *A. rugulosa*, *A. bullata*, *A. sinopica*, *A. molybdina* a *A. peliscypha*. Druhy *A. smaragdula* a *A. badiofusca* stály v analýzách mimo tento klad. Westberg et al. (2011) navrhli nový rod *Silobia*, do kterého by spadaly druhy skupiny *Acarospora smaragdula*. Roux et Navarro-Rosinés (2011) požadovali uznání rodu *Trimmatothelopsis*, do kterého by byly druhy skupiny *A. smaragdula* zařazeny. To však Westberg et Wedin (2011) vyvrátili. Skupina byla posléze vyčleněna do samostatného rodu *Myriospora* (Arcadia et Knudsen 2012), jak dříve předslali Harris et Knudsen (2006).

Sama čeleď *Acarosporaceae* se ukazuje jako monofyletická (Reeb et al. 2004; Wedin et al. 2005).

Několik studií se věnovalo zařazení čeledi *Acarosporaceae* do taxonomického systému hub. Čeleď *Acarosporaceae* stanovil Zahlbrückner (1907) na základě předpokladu, že rody s nepravidelným apotheciálním diskem a polysporickými vřečky si jsou fylogeneticky příbuzné. Po dlouhou dobu byla zařazena, spolu

s většinou ostatních lišejníků, do řádu Lecanorales (Lecanoromycetes). Hlavním diagnostickým znakem čeledi byla polysporická vřecka produkující více než 100 jednobuněčných spór (Golubkova 1988, Hafellner 1995). Polysporie vzniká mnohonásobnou mitózou následující po meióze (Reeb et al. 2004). Nicméně morfologické odlišnosti jednotlivých zástupců této skupiny, jako např. vývoj stélky (Golubkova 1988), struktura vřecka (Hafellner 1995) nebo ontogeneze apothecia (Vězda 1978), jsou až příliš nápadné. Reeb et al. (2004) usuzují, že pravá polysporie se během evoluce lišejníků vyvinula několikrát nezávisle a není tudíž vhodným diagnostickým znakem monofyletické skupiny.

Na základě molekulárních dat byla čeleď Acarosporaceae v rámci třídy Lecanoromycetes vyčleněna jako samostatná skupina mimo řád Lecanorales (Lutzoni et al. 2001; Miadlikowska et Lutzoni 2004; Reeb et al. 2004; Stenroos et DePriest 1998; Wedin et al. 2005). Byla zavedena nová podtřída Acarosporomycetidae, obsahující jedinou čeleď Acarosporaceae (Miadlikowska et Lutzoni 2004; Reeb et al. 2004). Následné fylogenetické studie potvrdily monofyletismus této nově vzniklé podtřídy (Hofstetter et al. 2007; Miadlikowska et al. 2014).

### 1.3.3 Skupina *Acarospora fuscata*

Skupina *Acarospora fuscata* je neformální taxon, který zahrnuje lišejníky s hnědou korovitou až šupinovitou stélkou obsahující jako sekundární metabolit kyselinu gyroforovou, která reaguje červeně s chlórem (Knudsen 2014 pers. com.).

Do této skupiny se řadí pět druhů – *A. fuscata*, *A. pseudofuscata*, *A. gallica*, *A. thamnina* a *A. umbilicata*. Vzhledem k vysoké morfologické plasticitě skupiny *A. fuscata*, která je běžná na skalních substrátech v oblasti mírného pásma severní polokoule, dochází k problémům při určování výše zmíněných pěti morfologicky definovaných druhů. Není vyloučena ani domněnka, že několik morfologických „druhů“ je ve skutečnosti jedním taxonem na druhové úrovni.

### *Acarospora fuscata*

**Stélka** žlutohnědá, matná, tvořící rozpraskanou areolovitou krustu s víceméně jednotnou morfologií (Knudsen 2007). Naproti tomu Wirth et al. (2013) a Magnusson (1929) připouští větší variabilitu ve tvaru stélky, od squamulózní (šupinovitě), přes subsquamulózní až po areolovitou, i širší škálu barevných variant – hnědá, šedohnědá, červenohnědá (Wirth et al. 2013) nebo světle až tmavě hnědá, červenohnědá či světle hnědožlutá (Magnusson 1929). Celkový vzhled stélky popisuje Magnusson (1929) jako spojitou nebo víceméně rozvolněnou krustu pokrývající větší plochu, případně uspořádanou podél trhlin ve skále. Laloky se mohou překrývat, okrajové laloky někdy odstávají od substrátu, jinak bývají areoly většinou široce přisedlé k podkladu. **Povrch stélky** je podle Smitha (Smith et al. 2009) na rozdíl od Knudsena (Knudsen 2007) více či méně lesklý. Někdy může být na povrchu přítomná pruina (Smith et al. 2009, Wirth et al. 2013). Rozlišovacím znakem je **spodní strana stélky**, která je u neojíněných forem hnědočerná až černá (Wirth et al. 2013). Medula je bílá, tvořená hustě propletenými hyfami. **Gonidiová vrstva** je souvislá a nepřerušovaná (Knudsen 2007).

Autoři se shodují v popisu apothecií a mikroskopických znaků. **Apothecia** se vyskytují většinou po jednom, ale někdy i více v areole, konkávní nebo plochá, zapuštěná nebo ve stejné rovině s povrchem stélky. Zpočátku jsou tečkovitá, později se rozšiřují. Tvar je značně nepravidelný, hranatý až okrouhlý. Velikost se pohybuje od 0,2 do 1 mm. **Disk** je hladký nebo jemně drsný, nikoli zvrásněný. Barva hnědočervená až černavá, vždy tmavší než stélka. Excipulum je výrazné, **hymenium** je hyalinní, vysoké 70–120  $\mu\text{m}$ , parafýzy jsou silné 1,5–2  $\mu\text{m}$  na bázi, apikální konce se rozšiřují na 3  $\mu\text{m}$ , podle Magnussona (1929) až na 5  $\mu\text{m}$ . Knudsen (2007) a Magnusson (1929) uvádí hnědavou pigmentovou čepičku. **Vřečka** mají kyjovitý tvar, 60–80 x 10–17  $\mu\text{m}$ , obsahují více než 100 spor. **Spóry** jsou úzce elipsoidní až cylindrické, velké 4–6 x 1–1,5  $\mu\text{m}$  (Magnusson 1929, Knudsen 2007, Wirth et al. 2013, Smith et al. 2009).

Magnusson (1929) uvádí přítomnost **pyknid** ampulovitého tvaru o hloubce 100  $\mu\text{m}$ . Podle Knudsena (Knudsen 2007) nebyly pyknidy na druhu *Acarospora fuscata* pozorovány a ostatní autoři je též nezmiňují.

Habitatem druhu *Acarospora fuscata* jsou kyselé křemičité horniny na exponovaných stanovištích, intenzivně osluněných a omývaných deštěm. Pravděpodobně se nevyskytuje na vápencích. Většinou pokrývá horizontální i šikmé plochy ve vrcholových partiích skal. Výskyt byl zaznamenán rovněž na zdech, pomnicích, náhrobcích a střešních taškách. Dává přednost stanovištím obohaceným živinami, obzvláště dusíkem. (Magnusson 1929, Smith et al. 2009, Wirth et al. 2013).

Názory autorů se rozcházejí v rozšíření druhu. Zatímco Smith et al. (2009) považuje *A. fuscata* za kosmopolitní druh vyskytující se v Evropě, Makaronézii, Severní i Jižní Americe, Asii, Africe i Austrálii, Magnusson (1929) omezuje oblast rozšíření na severní temperátní zónu a Knudsen (2007) uvádí její výskyt jen v Evropě a Severní Americe.

### ***Acarospora gallica***

*Acarospora gallica* je celkově drobnější než *Acarospora fuscata*. Podle Magnussona (Magnusson 1929) průměr stélky dosahuje asi 1 cm.

**Stélka** žlutohnědá, neojíněná, sestávající z plochých areol seskupených dohromady nebo roztroušených. **Svrchní kůra** je silná 15–35  $\mu\text{m}$ . Velikost areol se pohybuje mezi 0,4–1,4 mm (Wirth et al. 2013). Magnusson (1929) uvádí rozmezí velikosti areol 0,8–1 mm, tloušťku 0,2–0,5 mm. Sousedící areoly jsou odděleny úzkými štěrbinami. Velmi těsně přiléhají k substrátu. Svrchní kůra je silná 15–35  $\mu\text{m}$ , neprůhledná a šedavá, se zřetelnou C+ reakcí. 6–15  $\mu\text{m}$  velké gonidie tvoří souvislou vrstvu s nerovným povrchem o tloušťce 50–100  $\mu\text{m}$ . Medula je většinou průhledná, silná do 120  $\mu\text{m}$ . Často bývá tmavě zabarvena částicemi substrátu. Tlustostěnné medulární hyfy bývají složitě propletené. Spodní kůra chybí a medulární hyfy tak penetrují přímo do substrátu. **Spodní strana** je bělavá až světle hnědá.

Podle Magnussona (Magnusson 1929) druh *Acarospora gallica* netvoří sterilní areoly. Apothecia se vyskytují nejčastěji po 3–6 v areole, přičemž zabývají většinu jejího povrchu. Velmi vzácně se mohou objevovat i soliterně. Disk je více méně okrouhlý, široký 0,1–0,3 mm. Excipulum je nezřetelné, pokud je přítomné, bývá v rozmezí 10–15  $\mu\text{m}$ . Šedavé hypothecium dosahuje výšky 30–65  $\mu\text{m}$ . Hymenium



(výška 80–100  $\mu\text{m}$ ) vykazuje pozitivní reakci s jódem (I+), projevující se tmavě modrým až špinavě zelenohnědým zbarvením. Parafýzy jsou široké 1,5–1,7  $\mu\text{m}$ , jejich vrcholové části se rozšiřují na 3,5–4,5  $\mu\text{m}$  a mají nahnědlé zbarvení. Kyjovitá vřecka mají rozměry 55–80 x 15–27  $\mu\text{m}$ . Drobné spóry (3–6,5 x 1,7–1,9  $\mu\text{m}$ ) jsou úzce eliptické. Jejich počet ve vřecku se pohybuje okolo 200.

*Acarospora gallica* se vyskytuje na granitových křemičitých substrátech, vulkanických horninách i pískovci, kde roste společně se zástupci ostatních nitrofilních druhů (Magnusson 1929).

Druh *Acarospora gallica* byl zrevidován K. Knudsenem a J. Kocourkovou v rámci jejich studie čeledi Acarosporaceae v České republice (Knudsen et Kocourková 2012). Na rozdíl od Magnussona (Magnusson 1929) považují druh *Acarospora gallica* za variabilnější co se makroskopických morfologických znaků týče. Stélka může být tvořena jak areolami, tak laloky. Stupeň vyvinutosti stélky závisí na podmínkách stanoviště. Výskyt tohoto druhu zaznamenal Z. Palice (Palice et Soldán 2004, Knudsen et Kocourková 2012) dokonce i na silně toxickém substrátu ve starých sedimentačních nádržích v areálech Chvaletice a Bukovina ve východních Čechách. V takovýchto podmínkách byla stélka jen slabě vyvinutá, tvořená několika malými areolami s jedním apotheciem. V normálních podmínkách s dostatkem živin jsou areoly větší, často laločnaté či šupinovité a apothecia bývají početnější.

Dvě variety tohoto druhu, které zmiňuje Magnusson (1929), *A. gallica* var. *vinealis* H. Magn. a *A. gallica* var. *devastata* (Eitner) H. Magn., považují Knudsen a Kocourková (2012) za typologické odchylky původního druhu.

*Acarospora gallica* je morfologicky velmi podobná druhu *Acarospora fuscata*, se kterým je pravděpodobně často zaměňována. Knudsen a Kocourková (2012) stanovili několik morfologických znaků, kterými se tyto dva druhy odlišují. *A. gallica* má na rozdíl od *A. fuscata* šupinovité laloky se světlou spodní stranou a v její stélce převažují malé areoly s jedním apotheciem. V případech, kdy je spodní strana stélky zbarvena tmavě z důvodu interakce se substrátem, je dalším odlišovacím znakem dobře vyvinutá báze mycelia, případně se stopkou a laločnatý okraj stélky.

### *Acarospora thamnina*

Magnusson (1929) popisuje stélku tohoto druhu jako malé husté shluky o velikosti 8–15, výjimečně až 25 mm v průměru. Nepravidelně zaoblený až kopulovitý povrch stélky je tvořen množstvím miniaturních, těsně k sobě nahloučených šupinek nepravidelného tvaru, které se různě překrývají a skládají do záhybů. Naspodu přecházejí do stopek, které splývají a vytváří ploché, kořenům podobné útvary. U dobře vyvinutých jedinců mohou tyto shluky dosahovat výšky 10–15 mm. Knudsen (2007) uvádí velikost shluků okolo 2 cm a tloušťku v průměru 1,5 cm. Celkový tvar stélky pak popisuje jako linie kopírující praskliny na skalách a kamenech, často přerůstající i jiné lišejníky. Co se zbarvení stélky týče, lze u tohoto druhu pozorovat širokou škálu odstínů hnědé. Magnusson (1929) zmiňuje častý výskyt šedé až modrošedé pruiny na povrchu stélky, zatímco Knudsen (2007) popisuje povrch stélky jako lesklý, hladký, s četnými trhlinami a neojíněný.

Svrchní kůra tvořená poměrně tlustostěnnými buňkami může dosahovat tloušťky 30–80  $\mu\text{m}$ . Její horní třetina až polovina je hnědožlutá a neprůhledná, vykazuje velmi výraznou C+ reakci, charakteristickou červeným zbarvením. Gonidiová vrstva je souvislá, průměrně 100  $\mu\text{m}$  silná, s rovným povrchem (Magnusson 1929). Podle Knudsen (Knudsen 2007) se s věkem ztenčuje. Autoři se rozcházejí v popisu meduly. Zatímco Knudsen (2007) ji popisuje jako bílou až špinavě hnědou a nepůhlednou, Magnusson (1929) zmiňuje 150–300  $\mu\text{m}$  silnou, průhlednou vrstvu tvořenou volně propletenými hyfami o tloušťce 2–3,5  $\mu\text{m}$ .

Apothecia se vyskytují vzácně. Jsou velmi drobná, asi jen 0,2–0,8 mm v průměru, zanořená. Většinou je jen jedno v areole. Jejich povrch je drsný až rozbrázděný. Okraj apothecia je poměrně silný a výrazně tmavší než stélka. Epithecium je žluté, hypothecium bledé, parafýzy jednoduché a rovné, jejich vrcholky se nerozšiřují. Vřečka mají cylindrický tvar, jsou široká 13–18  $\mu\text{m}$  a 48–55  $\mu\text{m}$  dlouhá. Při kontaktu s jodem se zbarvují nejprve modře, následně vínově červeně a nakonec žlutohnědě. Spóry jsou elipsoidní, o rozměru 0,75–1,25  $\mu\text{m}$  na šířku a 3,3–4,5  $\mu\text{m}$  na délku (Magnusson 1929). Knudsen (2007) popisuje apothecia jako okrouhlá až velmi nepravidelná, dosahující šířky do 0,5 mm, s černým drsným až rozbrázděným diskem. Od Magnussona (Magnusson 1929) se liší v popisu parafýz. Uvádí šířku 1,5–2  $\mu\text{m}$  u báze a rozšiřující se vrcholky na 3–4  $\mu\text{m}$ . Dále zmiňuje sekundární

metabolity. Hlavním sekundárním metabolitem je kyselina gyroforová, v menší míře je přítomna kyselina lekanorová.

*Acarospora thamnina* se vyskytuje na nevápenatých horninách ve velmi slunných podmínkách pouští (Magnusson 1929). Knudsen (2007) popisuje habitat druhu podobně. Jedná se o kyselé, plně osluněné skály v podmínkách kontinentálního klimatu. *Acarospora thamnina* se na stanovišti chová poměrně kompetitivně a často přerůstá stélky jiných saxikolních lišejníků.

### ***Acarospora umbilicata***

Tento druh vytváří souvislou stélku o průměru 5 cm i více, tvořenou areolami či šupinami, vzájemně od sebe více či méně vzdálenými či těsně k sobě přiléhajícími. Povrch bývá často pokrytý pruinou. Její vrstva může být velmi silná a popelavě šedá, jindy může tvořit jen slabý poprašek a barva stélky se pak jeví šedavě hnědá nebo světle kaštanová, za vlhka může mít až červenavě hnědé odstíny. Areoly a laloky jsou v průměru 0,5–1,5 mm široké a 0,2–0,4 mm silné. Areoly jsou oddělené tenkými trhlinami. Laloky mají hlavně na obvodu značně nepravidelný tvar. Povrch stélky je víceméně rovný. Stélka je buď široce přimknuta k substrátu, nebo vytváří „pupek“ (umbilicum), kterým se připojuje k substrátu v jednom místě a hnědá spodní kůra je pak dobře viditelná. Svrchní kůra je 25–50 µm silná, do dvou třetin od povrchu šedavě bílá a neprůhledná, spodní třetina je bezbarvá, amorfni vrstva je tenká a nepravidelná (5–15 µm). Hyfy jsou výrazně svislé, se slabě nahnědlými konci. Gonidie o velikosti 6–20 µm tvoří hustou souvislou vrstvu s rovným povrchem o mocnosti 50–135 µm. Medula je dobře vyvinutá, do 100 µm silná, průhledná, tvořená tenkostěnnými, složitými nebo svisle orientovanými a těsně spojenými hyfami. Spodní kůra je 8–14 µm silná, většinou výrazně tmavě hnědá.

Apothecia se vyskytují hojně. Většinou jsou po 2–3 v areole, výjimečně může být jejich počet až 6 na jednu areolu. Ve stélce se objevují jak fertilní tak sterilní areoly. Disk apothecia je 0,2–0,4 mm široký, vmáčkнутý nebo ve stejné rovině se stélkou. Jeho tvar je okrouhlý nebo hranatý, barva tmavě hnědá až černohnědá, za vlhka s načervenalým odstínem, výjimečně může být i lehce pruinózní. Okraj apothecia chybí. Excipulum je výrazné, 8–15 µm silné, ohraničuje hymenium zřetelnou

nažloutlou linií. Hypothecium je vysoké 20–35  $\mu\text{m}$ , neprůhledné. Hymenium dosahuje výšky 85–135  $\mu\text{m}$ , jeho horní vrstva je žlutavě hnědá a nepravidelná. Reakce s jódem se projevuje zelenomodrým nebo špinavě červeným zbarvením. Parafýzy jsou silné 1,5–1,7  $\mu\text{m}$ , jejich vrcholky se rozšiřují až na 3  $\mu\text{m}$ . Kyjovitá vřecka o rozměrech 70–100 x 12–17  $\mu\text{m}$  nesou 100–200 spór cylindrického tvaru a velikosti 4–6,ř x 1,5–2  $\mu\text{m}$  (Magnusson 1929).

Habitatem druhu *Acarospora umbilicata* jsou granitové skály, břidlice nebo pískovce, často v blízkosti komunikací a dalších civilizovaných oblastí (Magnusson 1929). Wirth (1995) uvádí výskyt druhu v teplých oblastech bohatých na srážky, na vápenatých nebo bazických křemičitých horninách nebo na horninách impregnovaných uhličitánem vápenatým. Vyskytuje se často především na pískovcích, ale i synantropně na zdech, na osluněných a prašných místech. Jedná se o nitrofilní druh.

Magnusson (1929) zmiňuje vysokou variabilitu ve vzhledu stélky, způsobenou přítomností pruiny, a rovněž velkou morfológickou podobnost a snadnou zaměnitelnost s druhy *Acarospora fuscata* a *Acarospora versicolor*. Méně pruinózní druhy jsou nápadně podobné druhu *A. fuscata*. Od té se však odlišuje méně zřetelnou dutinou (lumen) v buňkách cortexu a méně laločnatými areolami. Od druhu *A. versicolor* je odlišitelná rovněž méně nápadnou dutinou v korových buňkách a především pozitivní C reakcí. Sipman et Raus (2002) však uvádějí, že jimi pozorované vzorky měly velmi často negativní C reakci při aplikaci  $\text{CaCl}_2\text{O}_2$  na kortex a medulu. Při chromatografii na tenké vrstvě (TLC) však byla u všech vzorků prokázána přítomnost kyseliny gyroforové a ve stopovém množství i kyseliny lekanorové.

### ***Acarospora pseudofuscata***

*Acarospora pseudofuscata* je asi nejméně známým druhem skupiny *Acarospora fuscata*. Sipman et Raus (2002) popisují tento druh jako korovitý lišejník formující tmavě hnědé kompaktní plošky o šířce 10 cm i více. Velikost areol se pohybuje od 0,2 do 1 mm, tloušťka je většinou do 0,5 mm. Tvar areol je hranatý, lehce konkávní, většinou se zvýšeným stejnobarevným, případně o něco tmavším okrajem. Spodní

strana je černá. Areoly k sobě těsně přiléhají, ale nepřekrývají se. Povrch stélky je lesklý, v jejím středu se často objevuje bílá pruina. Okrajové areoly jsou lehce protažené (cca 1,5 mm), se zaobleným vnějším krajem.

Svrchní kůra je široká 50–100  $\mu\text{m}$ . Je tvořena buňkami s 2  $\mu\text{m}$  silnou buněčnou stěnou a 2–4  $\mu\text{m}$  širokou dutinou. Gonidiová vrstva je rovnoměrná, dosahuje šířky 100  $\mu\text{m}$ . Buňky fotobionta jsou velké 5–10  $\mu\text{m}$ . Medulu tvoří rozvolněné, asi 3  $\mu\text{m}$  široké hyfy, které mohou být pokryté silnou vrstvou krystalů o velikosti 1–5  $\mu\text{m}$  v průměru. 20–50  $\mu\text{m}$  silná spodní kůra je tvořená tlustostěnnými, 0,3  $\mu\text{m}$  širokými, hustě uspořádanými hyfami. Její horní vrstva je tmavě hnědá.

Apothecia se vyskytují nejčastěji po jednom v areole. Jsou zanořená a bez okraje. Zpočátku jsou okrouhlá a drobná, později zralá apothecia vyplňují téměř celou areolu a získávají hranatý tvar. Disk je tmavě hnědý, lehce smáčknutý. Hymenium je vysoké 90–100  $\mu\text{m}$ . Parafýzy jsou široké 1,5–2  $\mu\text{m}$ . Počet spór (4–6 x 2–2,5  $\mu\text{m}$ ) ve vřecku může dosahovat několika stovek.

Sekundárním metabolitem je především kyselina gyroforová. Při TLC byly zaznamenány i stopy kyseliny lekanorové.

Podle Sipmana a Rause (Sipman et Raus 2002) je nejbližším příbuzným a také nepodobnějším druhem *Acarospora fuscata*. Snadno může docházet k jejich záměně. Odlišnosti v morfologii jsou velmi drobné. *A. fuscata* na rozdíl od *A. pseudofuscata* tvoří menší plošky. Povrch stélky je zvlněný až rozbrázděný. Areoly jsou více šupinovité a často se překrývají. Jejich barva je světleji hnědá než u druhu *A. pseudofuscata*. Rozdílná je i C+ reakce na povrchu stélky, která je u druhu *A. fuscata* velmi intenzivní, zatímco u druhu *A. pseudofuscata* je jen velmi málo zřetelná.

#### **1.4 Molekulární markery v lichenologii a metoda sekvenování DNA**

Molekulární metody se využívají při studiu lišejníků zhruba v posledních třech desetiletích. Po nesmělých začátcích nastal v roce 1995 boom v jejich využití. Zpočátku pomáhaly molekulární techniky řešit zejména otázky taxonomie na vyšších hierarchických úrovních. Postupně byly s jejich pomocí revidovány i nižší taxony.

### 1.4.1 Typy molekulárních DNA markerů

Molekulární DNA markery jsou využívány v taxonomii, evoluční biologii, ekologii, šlechtitelství, při studiu biodiverzity a v dalších oborech. Jsou založeny na polymorfismu sekvencí DNA, k jehož detekci se používá celá řada různých molekulárních technik. Obecně je lze rozdělit na:

1. Techniky založené na restričním štěpení a hybridizaci (příkladem je technika RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism – Polymorfismus délky restričních fragmentů), (Šmarda et al. 2010).
2. Techniky založené na metodě PCR (např. AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism – délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů; RAPD – Randomly Amplified Polymorphic DNA – polymorfismus náhodně amplifikované DNA), (Zima et al. 2004).
3. Techniky založené na sekvenování (např. SNP – Single Nucleotide Polymorphism – Jednonukleotidový polymorfismus), (Šmarda 2010).

### 1.4.2 Sekvenování DNA a nejčastěji používané lokusy lišejníkové DNA

Nejčastěji používanou metodou pro studium lichenizovaných hub je sekvenování určitých úseků DNA. Lokusy DNA s předpokládaným polymorfismem sekvencí nukleotidů jsou testovány pro použití v molekulárních analýzách nejrůznějšího zaměření.

#### **Ribozomální jaderná DNA**

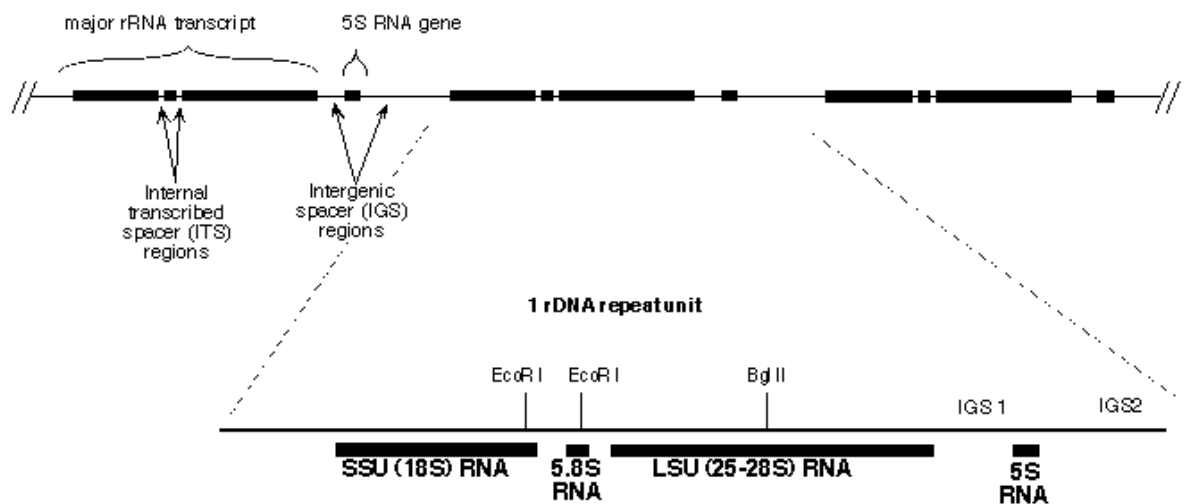
Pro potřeby fylogenetických analýz v botanice a mykologii se pozornost soustředila nejprve na ribozomální DNA (rDNA), u které se předpokládala dostatečná variabilita pro studie na druhové úrovni (Bridge et Hawksworth 1998). Byly vybrány nukleotidové sekvence ze čtyř oblastí rDNA pro studie na různých taxonomických úrovních: a) nuSSU rDNA pro fylogenezi na úrovni oddělení až čeledí, b) nuLSU rDNA na úrovni řádů až druhů a c) nu rDNA ITS pro vymezení druhů a rozlišení populací (DePriest 2004).

Obečně nejpoužívanějším markerem pro molekulární studie hub je sekvence ITS. Internal transcribed spacer (ITS) je oblastí ribozomální DNA, která byla formálně zvolena jako univerzální DNA kód pro molekulární identifikaci hub (Schoch et al. 2012). U hub je tato oblast vysoce variabilní, její délka se pohybuje mezi 450 a 750 bp. Naopak oblasti primerů jsou stabilní. Díky těmto vlastnostem se oblast ITS jeví jako ideální genetický marker pro molekulární analýzy nejrůznějšího zaměření (Blaalid et al. 2013). Pro amplifikaci této oblasti byly původně navrženy „univerzální“ houbové primery ITS 1F (Gardes et Bruns 1993) a ITS 4 (White et al. 1990). Tyto primery jsou používány dodnes, kromě nich však již byla vyvynuta celá řada více specifických primerů.

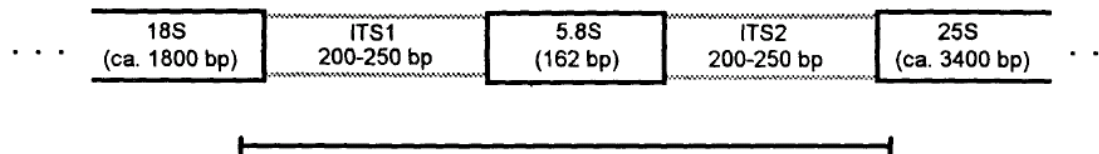
Z pozdějších výzkumů vyplynulo, že jednolokusové studie nemohou s jistotou odlišit jednotlivé druhy (Grube et Kroken 2000). Vhodné je kombinovat alespoň dva, nejlépe tři lokusy.

### **Struktura oblasti ITS**

Oblast ITS se nachází uvnitř jaderných genů ribozomální RNA (strukturální RNA formující ribozom, t.j. nekódující bílkovinu), jejichž sekvence se mnohonásobně opakují. Každá opakující se jednotka (obr. 1) sestává ze sekvencí ribozomálních podjednotek 18S, 5.8S a 25S. Tyto geny jsou konzervativní a mezi blízce příbuznými druhy se liší jen velmi málo. Jsou však odděleny oblastmi ITS (obr. 2), nekódujícími úseky s rychlou evolucí, které vykazují mnohem větší diverzitu. Oblast mezi geny 18S a 5.8S je označována jako ITS1, geny 5.8S a 25S odděluje oblast ITS2. ITS1 a ITS2, společně s genem 5.8S, tvoří celou podjednotku ITS (Ritland 1993). Podjednotky ITS (ITS1 a ITS2) jsou variabilní na úrovni rodů, ale i na vnitrodruhové úrovni. Přitom ITS1 je v průměru variabilnější než ITS2 (Nilsson et al. 2008). Předpokládá se však, že obě podjednotky se vyvíjejí závisle na sobě (Ryberg et al 2008; Mullineux et Hausner 2009). Monard et al. (2013) Doporučuje se analyzovat současně obě oblasti, neboť poskytují odlišné informace, zároveň jsou ale komplementární (Monard et al. 2013, Bazzicalupo et al. 2013).



Obrázek 1: Struktura základní repetitivní jednotky jaderné ribozomální RNA  
 Zdroj: Duke University (<http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>)



Obrázek 2: Oblast ITS jaderné rRNA (Carol 1993)  
 Zdroj: Duke University (<http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>)

## Mitochondriální DNA

DNA v mitochondriích tvoří tzv. mimochromozomální DNA. U hub má cirkulární tvar a počet jejích molekul v jedné mitochondrii je v řádech jednotek až desítek. Mitochondriální DNA kóduje rRNA a tRNA a některé mitochondriální bílkoviny. Evoluce mitochondriální rDNA probíhá jiným způsobem a jinou rychlostí než jaderná rDNA. Jako molekulární marker tedy rozšiřuje rozsah informací pro fylogenetické analýzy (Bruns et Szaro 1992, Zoller et al. 1999). Mitochondriální genom u hub vykazuje značnou délkovou variabilitu díky různému počtu opakujících se identických modulů DNA a velké množství substitucí je vázáno především na introny uvnitř strukturálních genů mtDNA s vysokou mutační rychlostí (Hafez et Hausner 2011). Gonzalez et al. (1997) zmiňuje využití mitochondriálních markerů jako účinného nástroje pro fingerprinting jedinců. Pro molekulární analýzy se



nejčastěji využívají oblasti kódující RNA pro malou podjednotku (mtSSU) a velkou podjednotku (mtLSU) ribozomu. Pro fylogenetické analýzy Hibbett et Donoghue (1995) doporučují malou podjednotku (mtSSU) pro její vyšší variabilitu.

### **Kódující oblasti DNA**

Kódující oblasti DNA (geny) jsou pod selekčním tlakem, což vedlo k předpokladu, že jsou tyto oblasti vysoce konzervativní a invariabilní. Obsahují však variabilní introny a variabilita se vyskytuje i na třetích, neutrálních pozicích kodónů. Begerow et al. (2004) s úspěchem použili sekvence genu pro  $\beta$ -tubulin v rozsáhlé studii Basidiomycet a Ascomycet a Walker et al. (2012) uvádí srovnatelné výsledky fylogenetických analýz na druhové úrovni pro kódující úseky FG1093 a MS204 jako pro klasicky používané markery ITS a  $\beta$ -tubulin. Často používanými markery jsou i největší podjednotky RNA polymerázy II (RPB1 a RPB2) (Lutzoni et al. 2004; Reeb et al. 2004; Hofstetter et al. 2007). Jak uvádí Froslev et al. (2005), vysoce variabilní oblast intronů v genech kódujících podjednotky RNA polymerázy II (RPB1 a RPB2) poskytovaly lepší výsledky pro taxonomické studie komplikované skupiny Basidiomycet než marker ITS.

Na vyšších taxonomických úrovních se často analyzují sekvence aminokyselin na místo DNA, kvůli jejich vyšší konzervovanosti (Aguileta et al. 2008).

Geny mohou být v genomu přítomny v jediné kopii (single-copy) nebo se jejich sekvence v genomu opakují (low-copy a multicopy).

## **1.4.3 Postup metody sekvenování DNA**

### **1.4.3.1 Izolace DNA**

Pro izolaci nukleových kyselin z buněk existuje široká škála metod. Výběr vhodné metody záleží na požadovaném množství a čistotě produktu a na typu buněk, z nichž bude DNA izolována. Neopomenutelnými kritérii volby metody je rovněž její časová a ekonomická náročnost.

Vzhledem k nestabilitě nukleových kyselin musí izolace proběhnout šetrně a podmínky by se měly co nejvíce podobat fyziologickému prostředí buněk (pH, teplota, rozpouštědla). Podstatou všech metod je rozpuštění komplexu DNA-protein a následné odstranění příměsí RNA a bílkovin. K rozrušení membrán a uvolnění buněčného obsahu se používají detergenty. Pletiva rostlin a hub díky přítomnosti buněčné stěny vyžadují předchozí manuální rozdrcení. To se provádí např. protřepáváním na vortexu se skleněnými kuličkami nebo drcením vzorku pletiva ať už čerstvého nebo zmrazeného tekutým dusíkem v třecí misce apod. K takto rozrušenému materiálu se přidává pufovaný roztok, do kterého se z lyzovaných buněk uvolní buněčný obsah včetně nukleových kyselin. V uvolněném buněčném obsahu jsou však přítomny rovněž DNA nukleázy, které by mohly rozštěpením DNA vzorek znehodnotit. Tomuto procesu zabráňuje etylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA), obsažená v pufovaném roztoku, která chelatuje ionty vápníku, působící jako kofaktor nukleáz. Nukleázy bez vápníku nepracují, takže jeho vysrážením ze směsi je zabráněno nežádoucímu štěpení DNA. Rovněž některé detergenty, např. laurylsíran sodný nebo N-laurylsarkosin, mohou být použity jako inhibitory nukleáz. Lyzační roztok může být ještě přečištěn přidáním enzymu proteináza K, jehož působením jsou rozštěpeny bílkoviny včetně histonů, tvořících sekundární strukturu DNA.

Metoda izolace rozhoduje rovněž o množství DNA v lyzačním roztoku. Pokud je následně aplikována polymerázová řetězová reakce (PCR), stačí i velmi malé množství DNA. Amplifikace zvoleného úseku DNA v průběhu PCR však může být ovlivněna kvalitou roztoku. Případné nečistoty mohou působit jako inhibitory polymerázy nebo se mohou sami vázat na templátovou DNA a tím ji znepřístupňovat pro nukleotidy (Aras et Cansaran 2006).

### **Izolace DNA vazbou na silikátovou kolonku**

Často používanou metodou je izolace DNA pomocí adsorpce na silikát. Využívá afinity nukleové kyseliny k silikátovým částicím, na jejichž povrch adheruje v prostředí s vysokou koncentrací chaotropních solí. Na této metodě je založena většina komerčně vyráběných souprav (kitů) pro rutinní izolace DNA. Příkladem takové soupravy je DNeasy Plant Mini Kit, určený pro extrakce z malých vzorků rostlin a hub. Izolace probíhá ve speciálních mikrokolonách. V první koloně dochází

k zachycení proteinů, polysacharidů, detergentu a dalších nečistot, na druhé koloně je zachycena DNA a následně je vymývána elučním roztokem. Každý kit je dodáván s kompletním protokolem. Biologický materiál je nejprve mechanicky rozrušen a poté je k němu přidán lyzační pufr. Během inkubace při teplotě 65 °C dojde k lýze buněk a degradaci RNA. Poté jsou vysráženy proteiny a polysacharidy pomocí solí. Sraženiny a zbytky buněk jsou odfiltrovány ze supernatantu. Vzniklá směs je přenesena do nové kolonky. K ní je přidán eluční pufr a ethanol. V této fázi se DNA naváže na DNeasy membránu. Proces je urychlen stočením v centrifuze. Poslední zbytky proteinů a polysacharidů jsou odstraněny ve dvou následných krocích promývání směsí. Uvolnění DNA z membrány probíhá v pufru s nízkým obsahem solí nebo ve vodě (QIAGEN 2012).

Metoda je pohodlná, vzniklá DNA má dobrou kvalitu. Její nevýhodou je ekonomická náročnost.

### **Fenol – chloroformová metoda izolace DNA**

Podstatou metody je odstranění proteinů a dalších příměsí z lyzátu pomocí směsi fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu. Nukleové kyseliny zůstávají rozpuštěné ve vodném roztoku, se kterým se organické rozpouštědlo chloroform nemísí. Lyzáat se tak rozdělí na dvě fáze – horní vodnou a spodní fenol-chloroformovou. Při intenzivním protřepávání se fáze mísí, přičemž dochází ke srážení bílkovin působením fenolu. Sraženina se usazuje na rozhraní fází. Odstředěním se od sebe obě fáze ještě dokonaleji oddělí. Horní vodná fáze s rozpuštěnými nukleovými kyselinami je přenesena do nové zkumavky. Postup se opakuje tak dlouho, dokud se na rozhraní fází nepřestane vytvářet sraženina. Izoamylalkohol rovněž usnadňuje oddělování fází, krom toho zabraňuje pění roztoku a současně zvyšuje rozpustnost fenolu v chloroformu. Fenol tak zůstává jen v chloroformové fázi a nekontaminuje vodný roztok s nukleovými kyselinami. Jeho přítomnost ve vodné fázi by mohla již při stopovém množství inhibovat PCR. Z vodného roztoku se DNA vysráží pomocí vhodných solí (chlorid sodný, octan sodný apod.) a přidáním málo polárních látek jako je např. etanol nebo izopropanol. Izolovaná DNA se rozpouští v alkalickém pufru (Raclavský 2003).

Někteří autoři zdůrazňují nutnost úpravy protokolu speciálně pro potřeby izolace DNA z hub a lišejníků. Jako hlavní důvod uvádí přítomnost vysokého množství polysacharidů, případně též polyfenolů či taninů v těchto organismech, které by mohly inhibovat následné analýzy, založené na působení enzymů (Armaleo et Clerc 1995; Bruns et al. 1990; Crespo et al. 1997; Cubero et al. 1999; Grube et al. 1995; Landvik et al. 1996; Lee et al. 1988; Lee et Taylor 1990). Jiní autoři nutnost speciálních protokolů pro houby a lišejníky popírají (Martín et Winka 2000).

Výhodou této metody je její nízká cena. Je však poměrně časově náročná a vyžaduje určitou zkušenost, neboť získané výsledky jsou závislé na přesnosti provedení. Uplatnění najde spíše u analýz, u kterých není nutné pracovat s vysokomolekulovou DNA. Většinou lze její pomocí získat pouze kratší fragmenty. Její nevýhodou je rovněž práce se zápachajícími a toxickými látkami.

### **Izolace DNA pomocí NaOH**

Velmi levná a jednoduchá metoda založená na schopnosti NaOH narušovat buněčnou stěnu a denaturovat řetězec DNA. K rozdrčenému biologickému materiálu se přidává 0,5M NaOH. Po centrifugaci se supernatant přepipetuje do nové mikrozkuhavky a může se dále ředit Tris-HCl pufrům nebo vodou (Herbstová et al. 2008).

Výše uvedené přednosti metody jsou na druhé straně vyváženy nižší kvalitou DNA a její poměrně rychlou degradací. Lze ji skladovat při teplotě - 20 °C maximálně 1 měsíc. Kvalita extrahované DNA je dostatečná pro metody založené na PCR (Herbstová et al. 2008).

### **CTAB metoda izolace DNA**

Tato metoda je založena na stejných principech a postupech jako fenol – chloroformová metoda izolace DNA. Navíc využívá schopnosti cetyltrimetylamoniumbromidu (CTAB) tvořit komplex s nukleovými kyselinami. Tento komplex reaguje různě na vysoké či nízké koncentrace solí v roztoku. Při vysoké koncentraci solí (0,7M NaCl) je rozpustný, při nízké koncentraci (0,45M NaCl) tvoří sraženinu. Má detergentní účinky, což se využívá pro uvolnění DNA

z membrán a proteinů. Zároveň ho lze od DNA snadno oddělit díky rozdílné rozpustnosti. Tato metoda poskytuje dostatečné množství kvalitní DNA.

#### **1.4.3.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

Při molekulárních analýzách je většinou nutné pracovat s poměrně velkým množstvím určité části DNA. Málokdy je však možné získat dostatečné množství nukleové kyseliny přímo, pouhou izolací z biologického materiálu. Pro namnožení zvoleného úseku DNA slouží metoda polymerázové řetězové reakce. Její produkt je využíván pro řadu následných analýz jako je např. metoda RFLP – štěpení DNA pomocí restričních enzymů a následné porovnávání vzniklých fragmentů, hybridizace se značenou sondou nebo stanovení pořadí nukleotidů v daném úseku DNA – sekvenování.

Metoda PCR znamenala průlomový objev v molekulární biologii. U většiny molekulárních analýz nahradila dosud jedinou možnou metodu amplifikace DNA, která spočívala ve vnesení zvoleného úseku DNA do bakteriálního plasmidu a jeho klonování. Tato metoda poskytuje velmi kvalitní produkt, proto je stále ještě používána. Je však poměrně složitá a časově náročná a pro většinu analýz není nutný produkt v tak vysoké kvalitě. Naproti tomu metoda PCR umožňuje získat potřebný úsek DNA ve velmi krátkém čase. Její autor, Kary Mullis, získal za svůj objev z roku 1983 Nobelovu cenu.

Metoda PCR je založena na opakované řízené denaturaci DNA a následné renaturaci rozvolněných vláken, ovlivněné oligonukleotidy, které slouží jako primery pro syntézu nového řetězce. Během opakování cyklů střídání teplot, které probíhá v termocycleru, dochází k exponenciálnímu množení daného úseku DNA. V každém cyklu slouží denaturovaná vlákna původního řetězce jako templát pro syntézu nových řetězců. Během jedné PCR reakce se zopakuje 25–35 cyklů. Na jejím konci má každý úsek původní templátové DNA 225–240 kopií – ampliconů (Zima et al. 2004).

Jeden cyklus amplifikace DNA má tři následující kroky:

### 1. Denaturace

DNA je zahřívána na teplotu kolem 94–95 °C. Působením vysoké teploty dochází k rozpadu vodíkových můstků, pojících nukleotidy obou vláken řetězce DNA. Vlákna se od sebe oddělí.

### 2. Hybridizace (annealing)

Fáze nasedání primerů. Teplota je snížena na 50–60 °C. Krátké oligonukleotidy nasedají na komplementární oblasti templátové DNA rychleji, nežli stačí renaturovat dlouhá vlákna. Podmínkou správného průběhu této fáze je dostatečné množství oligonukleotidů, které musí být ve směsi v nadbytku, a optimálně zvolená teplota pro daný pár primerů. Pokud by byla teplota příliš nízká, mohlo by docházet k nasedání primerů i na úseky, které jsou komplementární jen z části, a tím by se vytvářel nespecifický produkt. Naopak příliš vysoká teplota by mohla bránit nasedání primerů.

### 3. Syntéza (elongace)

Při teplotě 65–75 °C je aktivní enzym DNA-polymeráza. Oligonukleotidy, které nasedly na templátovou DNA v předchozí fázi, slouží jako primery, od jejichž 3'-konce začíná polymeráza syntetizovat nový řetězec. Čas, potřebný pro tvorbu 1 000 bazí, je cca 1 min. Pokud je známá délka amplifikovaného úseku, je možné snadno odhadnout dobu trvání této fáze.

Následovat může ještě finální elongace, při které dojde k dokončení syntézy částečných produktů (Zima et al. 2004).

## **Reakční směs:**

### **Templátová DNA**

Požadavky na množství templátové DNA, vyizolované z biologického materiálu pomocí některé z izolačních technik, nejsou vysoké. V podstatě by mohlo stačit několik málo molekul. Větší důraz je kladen na čistotu výchozího materiálu. Kontaminující látky, jako jsou proteiny, polysacharidy, cizorodá DNA nebo rezidua

reagencií, používaných při izolaci, by mohly vést k inhibici DNA-polymerázy nebo tvorbě nespecifických produktů.

### **Primery**

Jedná se o krátké úseky DNA (oligonukleotidy) o délce 17–28 bází, které jsou specifické pro požadovanou oblast DNA a jsou zcela komplementární k úsekům, které tuto oblast ohraničují. Pro amplifikaci části DNA jsou zapotřebí dva primery. Od tzv. forward primeru začíná elongace ve směru transkripce. Opakem je tzv. reverse primer, kterým začíná elongace proti směru transkripce. Tyto dva primery nesmějí být navzájem komplementární, aby nedocházelo k tvorbě dimerů. Další podmínkou je přibližně stejná teplota nasedání na templátovou DNA.

### **DNA – polymeráza**

Enzym, který na základě komplementarity bází přiřazuje volné nukleotidy k templátovému vláknu rozvolněné DNA. Optimálně pracuje při teplotě kolem 72 °C, musí však být dostatečně termostabilní, t.j. schopný odolat i teplotě 98 °C.

Nejčastěji používaná a ekonomicky nejdostupnější je Taq polymeráza, izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Její nevýhodou je poměrně častá chybovost (přibližně 1 chyba na 20 000 bází) a neschopnost chyby opravovat. Kvalitnější polymerázy, připravované metodami rekombinantní genetické manipulace, jsou však zatím finančně příliš náročné.

### **Nukleotidy (dNTP)**

Základní stavební prvky nukleové kyseliny. Ve směsi musí být přítomny všechny čtyři deoxynukleosid trifosfáty (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) zhruba ve stejném množství.

### **PCR pufr**

Udržuje optimální pH a vytváří ideální prostředí pro aktivitu DNA-polymerázy.

### **Soli**

Nejčastěji se používá MgCl<sub>2</sub>. Hořčnaté ionty (Mg<sup>+</sup>) působí ve směsi jako nejdůležitější kofaktor polymerázy.

### 1.4.3.3 Ověření výsledku PCR

Zda proběhla PCR správně, lze ověřit detekcí na gelu. Vzorek směsi z PCR je nanesen na start agarózového nebo polyakrylamidového gelu a vystaven působení elektrické energie. Během elektroforézy putují amplifikované části DNA v gelu od záporného ke kladnému pólu. Úseky stejné velikosti se pohybují v gelu stejnou rychlostí a doputují do stejného místa. To je patrné po následném obarvení gelu a ozáření v UV-transluminátoru. O správném průběhu reakce vypovídá jeden zřetelný proužek v dráze na gelu. Pokud se žádný proužek neobjeví, PCR neproběhla. Pokud se objeví dva a více proužků v jedné dráze, naamplifikovaly se kromě žádaného úseku i nespecifické produkty nebo úseky cizorodé DNA.

### 1.4.4 Fylogenetické analýzy

Fylogenetické analýzy poskytují hypotetické odhady průběhu evoluce pro určitou zvolenou skupinu organismů na základě omezených dat.

Podle přístupu se analýzy rozdělují do dvou skupin, na algoritmické metody, které pomocí jediného algoritmu dospívají k jedinému výslednému fylogenetickému stromu, a metody založené na stanovení kritéria optimálnosti, jež pracují ve dvou krocích. Nejprve jsou porovnávány stromy na základě přiřazeného skóre a poté se pomocí specifického algoritmu pro výpočet hodnoty funkce, znázorňující kritérium optimálnosti, vyhledává strom s nejlepší hodnotou této funkce.

Při výběru metody je vhodné posoudit její výkonnost, neboli rychlost, s jakou je schopna ze zadaných dat vypočítat výsledný strom; sílu, která udává, jak velké množství dat je třeba použít pro získání správného výsledku; konvergenci, jež informuje o pravděpodobnosti, s jakou je s přibývajícimi daty dosaženo správného výsledku; robustnost, která posuzuje odchylky od vstupních předpokladů a jejich vliv na správnost výsledků a falzifikovatelnost, která informuje o tom, jaká odchylka je již natolik závažná, že metodu není vhodné použít (Macholán 2014).

V práci budou použity metody Maximum parsimony, Maximum likelihood a Neighbor-joining.



### **Maximální úspornost (Maximum Parsimony, MP)**

Zástupce metod založených na stanovení kritéria optimálnosti. Vychází z předpokladu minimálního počtu evolučních kroků, společný původ je odvozován na základě společně sdílených stavů znaků. Metoda je relativně výpočetně jednoduchá a tím pádem i rychlá. Nevýhodou je pravděpodobnost chybného výsledku při zpracování většího množství dat (Macholán 2014).

### **Maximální věrohodnost (Maximum Likelihood, ML)**

Metoda založená na stanovení kritéria optimálnosti. Analyzuje data podle předpokládané hypotézy, jejímž jednotlivým parametrům jsou přiřazeny konkrétní hodnoty. Metoda pracuje poměrně přesně a i pro velké množství dat poskytuje správné výsledky. Je však výpočetně náročnější (Macholán 2014).

### **Neighbor-joining**

Algoritmická distanční metoda, jejíž algoritmus vychází z hvězdicového stromu. Je méně přesná, dochází ke ztrátě informací při převodu výchozích dat na matici párových distancí. Délky větví stromu nezobrazují skutečnou evoluci. Má však vysokou rychlost a je užitečná pro analýzy velkých datových souborů (Macholán 2014) a pro rychlý orientační přehled vztahů mezi studovanými daty.

## 2. CÍLE PRÁCE

- Získat sekvence zvolených úseků DNA u vybraných zástupců skupiny *Acarospora fuscata*
- Provést fylogenetické analýzy získaných markerů.
- Porovnat použitelnost jednotlivých markerů a analýz pro DNA-fingerprinting obtížně určitelných vzorků lišejníků.

### Nulové hypotézy

- Skupina *Acarospora fuscata* tvoří přirozený monofyletický taxon.
- Morfologicky definované druhy uvnitř skupiny *Acarospora fuscata* jsou přirozenými monofyletickými taxony.

### Přínosy práce

- Zařazení získaných markerů dosud málo prozkoumaného taxonu lišejníků do databáze Gen Bank pro použití k budoucím analýzám.
- Ujasnění míry příbuznosti zástupců skupiny *Acarospora fuscata* v rámci rodu *Acarospora*.

### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1 Terénní práce

Sběr vzorků lišejníků druhu *Acarospora fuscata* (případně *A. gallica*) probíhal v roce 2013 na předem vytipovaných lokalitách s vhodnými ekologickými podmínkami pro výskyt tohoto druhu. Jednalo se o plně exponované kyselé křemičité skály nebo skalní výchozy. Bylo navštíveno 26 lokalit, na kterých bylo sebráno celkem 36 položek, všechny sběry jsou uloženy v herbáři fakulty životního prostředí ČZU v Praze (Hb. Kryptogamicum Universitatis Bohemiae Agriculturae Scientatis Environmentalis).

Přehled položek:

Česká republika: Hl. město Praha: *A. fuscata*, Praha, PR Zámky, 50°8'43"N, 14°24'11"E, 230 m n. m., břidlicová skála, 8. 5. 2013, I. Sommerová, IS/1; *A. fuscata*, hl. m. Praha, PR Podhoří, 50°7'52" N, 14°24'8" E, 266 m n. m., břidlicová skála, 29. 8. 2013, I. Sommerová, IS/17; *Acarospora* sp., hl. m. Praha, Praha –Trója, PR Podhoří, 50°7'52" N, 14°24'8" E, 266 m n. m., skalní výchozy na pravém břehu Vltavy, 29. 8. 2013, I. Sommerová, IS/29; *Acarospora* sp., hl. m. Praha, PR Divoká Šárka, 50°5'45.701"N, 14°19'26.349"E, 360 m n. m., 29. 9. 2013, I. Sommerová, IS/36.

Západní Čechy: *A. fuscata*, kraj Plzeňský, okr. Rokycany, břidlicové skalní výchozy v obci Kamenec, 49°52'51.813"N, 13°35'46.426"E, 5. 5. 2013, I. Sommerová, IS/2; *A. fuscata*, kraj Plzeňský, okr. Plzeň – sever, PR Zábělá, 49°46'58.497"N, 13°27'3.331"E, břidlicový skalní výchoz nad Berouňkou, 28. 4. 2013, I. Sommerová, IS/3; *A. fuscata*, kraj Plzeňský, okr. Plzeň – sever, u obce Česká Bříza, u koupaliště, 49°50'5.901"N, 13°25'20.947"E, 4. 5. 2014, I. Sommerová, IS/4; *A. fuscata*, kraj Plzeňský, okr. Plzeň – sever, PR Kozelka, u obce Doubravice, 49°59'38"N, 13°9'48"E, 15. 6. 2013, I. Sommerová, IS/5; *A. fuscata*, kraj Plzeňský, okr. Sokolov, PP Dominova skalka, 50°4'17" N, 12°47'5" E, hadcová skála, 15. 6. 2013, I. Sommerová, IS/6; *A. fuscata*, kraj Plzeňský, okr. Karlovy Vary, u obce Hlinky, 50°7'13.862"N, 12°53'52.967"E, 15. 6. 2013, I. Sommerová, IS/7; *A. fuscata*, kraj Plzeňský, okr. Plzeň – sever, zřícenina hradu u obce Nečtiny, 49°58'19.530"N, 13°10'5.113"E, 15. 6. 2013, I. Sommerová, IS/8; *A. fuscata*, kraj Plzeňský, okr. Plzeň – sever, zřícenina hradu u obce Nečtiny, 49°58'19.530"N, 13°10'5.113"E, 15. 6. 2013, I. Sommerová, IS/9; *A. fuscata*, kraj Plzeňský, okr. Klatovy, PP Loupensko, u obce Nezdice, 49°31'11" N, 13°20'27" E, 22. 6. 2013, I. Sommerová, IS/10; *A. fuscata*, kraj Plzeňský, okr. Klatovy, PP Loupensko, u obce Nezdice, 49°31'11" N, 13°20'27" E, 542 m n. m., 22. 6. 2013, I. Sommerová, IS/11; *A. fuscata*, kraj Plzeňský, okr. Rokycany, CHKO Křivoklátsko, PP Lípa, 49°56'15" N, 13°44'31" E, 490 m n. m., 23. 6. 2013, I. Sommerová, IS/12; *A. fuscata*, kraj Plzeňský, okr. Rokycany, CHKO Křivoklátsko, Babí skála u obce Jablečno, 1. 9. 2013, I. Sommerová, IS/13; *A. fuscata*, kraj Plzeňský, okr. Rokycany, CHKO Křivoklátsko, Černá skála u obce Líšná, 49°53'38.828"N, 13°47'12.791"E, 1. 9. 2013, I. Sommerová, IS/14; *A. fuscata*, kraj

Plzeňský, okr. Rokycany, CHKO Křivoklátsko, Černá skála u obce Líšná, 49°53'38.828"N, 13°47'12.791"E, 1. 9. 2013, I. Sommerová, IS/15; *A. fuscata*, kraj Plzeňský, okr. Rokycany, CHKO Křivoklátsko, Černá skála u obce Líšná, 49°53'38.828"N, 13°47'12.791"E, 1. 9. 2013, I. Sommerová, IS/16; *A. fuscata*, kraj Plzeňský, okr. Plzeň – sever, u obce Sedlecko, 100 m od Korečnického mlýna, skála nad Berouňkou, 49°48'53.723"N, 13°31'52.732"E, 15. 9. 2013, I. Sommerová, IS/22; *A. fuscata*, kraj Plzeňský, okr. Plzeň – sever, u obce Sedlecko, 100 m od Korečnického mlýna, skalní útvar nad Berouňkou, 49°48'53.723"N, 13°31'52.732"E, 15. 9. 2013, I. Sommerová, IS/23; *A. fuscata*, kraj Plzeňský, okr. Plzeň – jih, u obce Zdemyslice, 150 m od mlýna, skalní útvar Na babě, 49°36'24.288"N, 13°31'43.494"E, 14. 9. 2013, I. Sommerová, IS/24; *Acarospora* sp., kraj Plzeňský, okr. Klatovy, PP Loupensko, u obce Nezdice, 49°31'11" N, 13°20'27" E, 22. 6. 2013, I. Sommerová, IS/27; *Acarospora* sp., kraj Plzeňský, okr. Rokycany, CHKO Křivoklátsko, PR Lípa, 49°56'15" N, 13°44'31" E, 490 m n. m., 23. 6. 2013, I. Sommerová, IS/28; *Acarospora* sp., kraj Plzeňský, okr. Domažlice, PP Chodovské skály, 49°24'49" N, 12°51'74" E, 500 m n. m., 31. 8. 2013, I. Sommerová, IS/30; *Acarospora* sp., kraj Plzeňský, okr. Plzeň – jih, u obce Zdemyslice, skalní útvar Na Babě, 49°36'24.288"N, 13°31'43.494"E, 14. 9. 2013, I. Sommerová, IS/33;

Severní Čechy: *A. fuscata*, kraj Liberecký, okr. Semily, CHKO Český ráj, PP Trosky, 50°30'57" N, 15°13'53" E, 8. 8. 2013, I. Sommerová, IS/20; *Acarospora* sp., kraj Liberecký, okr. Semily, CHKO Český ráj, PP Trosky, 50°30'57" N, 15°13'53" E, 8. 8. 2013, I. Sommerová, IS/32.

Střední Čechy: *A. fuscata*, kraj Středočeský, okr. Beroun, CHKO Křivoklátsko, skála v obci Svatá, 49°56'17" N, 13°57'32" E, 460 m n. m., 7. 9. 2013, I. Sommerová, IS/18; *A. fuscata*, kraj Středočeský, okr. Beroun, CHKO Křivoklátsko, skála v obci Svatá, 49°56'17" N, 13°57'32" E, 460 m n. m., 7. 9. 2013, I. Sommerová, IS/19; *A. fuscata*, kraj Středočeský, okr. Beroun, CHKO Křivoklátsko, PR Kabečnice, u obce Žloukovice, 50°01'19" N, 13°57'17" E, 365 m n. m., břidlicový skalní výchoz nad Berouňkou, 22. 9. 2013, I. Sommerová, IS/25; *A. fuscata*, kraj Středočeský, Levý Hradec, skalní výchozy nad Vltavou za hřbitovem, 50°10'9.933"N, 14°22'26.832"E, 18. 5. 2013, I. Sommerová, IS/26; *Acarospora* sp., kraj Středočeský, okr. Beroun, CHKO Křivoklátsko, PP Vraní skála, 49°55'40" N, 13°56'95" E, 536 m n. m., bulžňníková skála, 7. 9. 2013, I. Sommerová, IS/31; *Acarospora* sp., kraj Středočeský, okr. Beroun, CHKO Křivoklátsko, PR Kabečnice, u obce Žloukovice, 50°01'19" N, 13°57'17" E, 365 m n. m., břidlicový skalní výchoz nad Berouňkou, 22. 9. 2013, I. Sommerová, IS/35.

Jižní Morava: *A. fuscata*, kraj Jihomoravský, okr. Znojmo, NP Podyjí, Cínová Hora, 48°52'06" N, 16°0'36" E, 16. 9. 2013, I. Sommerová, IS/21; *Acarospora* sp., kraj Jihomoravský, okr. Znojmo, NP Podyjí, Cínová Hora, 48°52'06" N, 16°0'36" E, 16. 9. 2013, I. Sommerová, IS/34.

### 3.2 Určování vzorků

Určování vlastních sběrů a studium zájmových druhů probíhaly na stereomikroskopu Olympus SZ2-ILST a světelném mikroskopu Olympus CX31v laboratoři České zemědělské univerzity. K určování druhů byly využity klíče v odborné literatuře

Smith et al. (2009): The Lichens of Great Britain and Ireland, Wirth V. (1995): Flechtenflora: Bestimmung und ökologische Kennzeichnung der Flechten Südwestdeutschlands und angrenzende Gebiete, Wirth V. et al (2013): Die Flechten Deutschlands, Nash T. H. et al (2007): Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Vol. 3.

### **Bodové barevné testy**

Bodové testy sloužily k ověření přítomnosti kyseliny gyroforové, která je sekundárním metabolitem studovaných druhů a jedním z rozlišovacích znaků charakterizujících skupinu *A. fuscata*. Metodika byla převzata z prací Orange (2001) a Smithe (Smith et al. 2009). Spočívala v aplikaci chlorového vápna  $\text{CaCl}_2\text{O}_2$  (C) nebo hydroxidu draselného KOH (K) a následně s odstupem 1–2 min. opět chlorového vápna (K/C test) na kortex lišejníku. V případě přítomnosti kyseliny gyroforové se objevila přechodná reakce charakteristická červeným zbarvením. U některých vzorků byla reakce natolik nevýrazná, že bylo přistoupeno k metodě aplikace chemikálií na medulu u preparátu ve vodním prostředí. K a následně C byly nanесeny skleněnou kapilárou na podložní sklo pod krycí sklíčko. Reakce byla pozorována pod světelným mikroskopem.

## **3.3 Molekulární analýza**

### **3.3.1 Materiál pro molekulární analýzu**

Část studovaného materiálu pochází z herbáře autorky. Položky byly revidovány J. Kocourkovou a K. Knudsenem. Ostatní materiál byl zapůjčen z českých i zahraničních veřejných a soukromých herbářů (UCR, B, EWU, OPO, NY, Hb. Kryptogamicum Universitatis Bohemiae Agriculturae Scientatis Environmentalis, Hb. Mycologicum J. Kocourková et K. Knudsen, Hb. Z. Palice, Hb. J. Halda, Hb. Jiří Malíček). Zájmové druhy byly rovněž zkoumány ve sbírkách Národního muzea (PRM).

Tabulka 1: Seznam položek použitých pro molekulární analýzu

Číslo položky	Charakteristika položky: Název druhu, stát, geografický celek, lokalita, habitát, zeměpisná poloha, nadmořská výška, datum, sběratel, číslo položky (herbář)
1.	<i>Acarospora fuscata</i> , Česká republika, kraj Plzeňský, okr. Rokycany, CHKO Křivoklátsko, u obce Lišná, skalní útvar Černá skála, 49°53'38.828"N, 13°47'12.791"E, 1. 8. 2013, I. Sommerová, IS/16 (Hb. Kryptogamicum Universitatis Bohemiae Agriculturae Scientatis Environmentalis)
2.	<i>Acarospora fuscata</i> , Česká republika, kraj Liberecký, okr. Semily, CHKO Český ráj, PP Trosky, čedičová skála, 50°30'57" N, 15°13'53" E, 460 m n. m., 8. 8. 2013, I. Sommerová, IS/20 (Hb. Kryptogamicum Universitatis Bohemiae Agriculturae Scientatis Environmentalis)
3.	<i>Acarospora thamnina</i> , USA, Sierra Nevada, Southern Sierra Nevada mountains, Caliente Ranch (Nature Conservancy property), Woodchopper road, 35°22'26"N, 118°29'28"W, Alt.1660 m, 16. 6. 2013, Kerry Knudsen, 15881 (UCR)
4.	<i>Acarospora gallica</i> , Czech Republic, Central Bohemia, distr. Beroun Křivoklátsko Protected Landscape Area, Točník, on S-facing rocky slope below cattle ruins, on porphyritic rocks, 49°53'25"N, 13°53'13"E, alt. 370 m, 6. 7. 1998, J. Kocourková and P. Kocourek, JK/8223 (Hb. Mycologicum J. Kocourková et K. Knudsen)
5.	<i>Acarospora pseudofuscata</i> , Greece, Peloponnese, Attiki: Methana peninsula, along road Makrílogos – Kipseli, Pinus brutia regrowth with volcanic rock outcrops, on rock, 37°36,6'N, 23°22'E, alt. 630 m, 29. 9. 2011, H. Sipman & T. Raus, 60365 (B)
6.	<i>Acarospora fuscata</i> , Česká republika, hl. m. Praha, PR Podhoří, břidlicová skála, 50°07'53" N, 14°24'08"E, 266 m n. m., 29. 8. 2013, I. Sommerová, IS/17 (Hb. Kryptogamicum Universitatis Bohemiae Agriculturae Scientatis Environmentalis)
7.	<i>Acarospora fuscata</i> , Steiermark, Central Alps, Steirisches Randgebirge, Koralpe, Bärenalalm, glacial moraine at the bottom of the cirque, 46°48'45"N, 14°59'45"E, alt. 1700 m, scattered boulders of schistose gneiss in subalpine pasture, on inclined/subvertical rock faces, 21 Sept. 2013, J. Kocourková and J. Hafellner, JK/8277 (Hb. Mycologicum J. Kocourková et K. Knudsen)
8.	<i>Acarospora fuscata</i> , Czech Republic, distr. Beroun, Křivoklátsko protected Landscape Area, Nižbor, ca. 1 km NW of the town, in relic Pinetum on S-facing steep rocky slope above Vůznice brook, on shale, 50°0'36"N, 13°58'57"E, alt. 300 m, 17. 5. 2012, J. Kocourková, JK/8280 (Hb. Mycologicum J. Kocourková et K. Knudsen)
9.	<i>Acarospora umbilicata</i> , Portugal, Penascosa, Castelo Melhor, 15. 5. 2007, J. Marques, ID: 28 (Hb. not listed)
10.	<i>Acarospora thamnina</i> , USA, California, Transverse Range: San Bernardino Mountains: San Bernardino National Forest: near Highway 38 along grade from Big Bear Valley to Onyx Summit, 34°12'12"N, 116°43'57"W, alt. 2501 m, 1. 1. 2013, Kerry Knudsen, 16261

(Herbarium of Kocourková & Knudsen)

11. *Acarospora fuscata*, USA, Washington: Spokane County, Turnbull National Wildlife Refuge, cliff complex in SW part of refuge near outflow from Hale Lakes, low S-facing cliffs shaded by pine forest, on basalt, 47.3909°N, 117.6069°W, alt. 700 m, 20. 4. 2013, J. Hollinger, #5255 (EWU)
12. *Acarospora fuscata*, USA, Washington: Spokane County, Turnbull National Wildlife Refuge, Kepple Lake overlook, pine forested bluff overlooking small lake, on basalt, 47.4407°N, 117.5286°W, alt. 700 m, 17. 4. 2013, J. Hollinger, #5150b (EWU)
13. *Acarospora umbilicata*, Portugal, Castenheiro, Quinta da Ribeira, Muros em afloramentos de xisto, 12. 10. 2011, Joana Marques, 1364 (OPO)
14. *Acarospora gallica*, Czech Republic, W-Bohemia, Český les, okr. Cheb: Železná hůrka, on eutrophicated iron-rich phyllitic boulder, 49°59'29"N, 12°26'42"E, alt. 575 m, 24. 6. 2011, J. Halda, Z. Palice & P. Uhlík, 14298 (Hb. Z. Palice)
15. *Acarospora fuscata*, Czech Republic, W-Bohemia, Český les, distr. Cheb: Železná hůrka, on slightly inclined exposed iron-rich tuff-rock, 49°59'29"N, 12°26'39"E, alt. 575 m, 24. 6. 2011, J. Halda, Z. Palice & P. Uhlík, 14307 (Hb. Z. Palice)
16. *Acarospora fuscata*, Czech Republic, Šumava National Park: Šafářův vršek, boulder scree edged by pines and birches, on granit, 49°06'23"N, 13°35'04"E, alt. 792 m, 25. 8. 2010, Kerry Knudsen, 12329 (Herbarium Mycologicum J. Kocourková et K. Knudsen)
17. *Acarospora pseudofuscata*, Greece, W Aegean, Nomos Evvias, Ep. & Dim. Karistos: S Evvia, hilltop W of Kastri, siliceous shist outcrops in phrygana on hill top, N-exposed, 37°58'90"N, 24°30'20"E, alt. 420 m, 2. 10. 2005, H. Sipman & Th. Raus, 54358 (B)
18. *Acarospora umbilicata*, Czech Republic, Central Bohemia, Bohemian Karst, Svätý Jan pod Skalou, W-facing half-open diabase outcrops (shaded by dispersed Scots-pines and oaks) above the Loděnice / Kačák/ brook, 49°58'42"N, 14°08'27"E, alt. 280–285 m, 29. 3. 2007, Z. Palice, 11080 (Hb. Z. Palice)
19. *Acarospora gallica*, Czech Republic, Central Bohemia: distr. Rakovník, Křivoklátsko Protected Landscape Area, Roztoky, Na Babě Nature Reserve, on steep rocky slope above Berounka river, on rhyolit, MTB 5949 C13, alt. 400 m, 28. 7. 1997, J. Kocourková, JK/8099 (Hb. Mycologicum J. Kocourková et K. Knudsen)
20. *Acarospora gallica*, Czech Republic, Central Bohemia: distr. Rakovník, Křivoklátsko Protected Landscape Area, Roztoky, Na Babě Nature Reserve, on steep rocky slope above Berounka river, on rhyolite, MTB 5949 C13, alt. 400 m, 28. 7. 1997, J. Kocourková, JK/8098 (Hb. Mycologicum J. Kocourková et K. Knudsen)
21. *Acarospora rufescens*, Czech Republic, Slavkovský les, PR Křížky, on boulders, 50°03'55"N, 12°45'02"E, alt. 787 m, 16. 10. 2013, J. Halda, 3690 (Hb. J. Halda)
22. *Acarospora* sp., Czech Republic, Central Bohemia: distr. Praha, Pražská plošina, Nová Ves, Prokopské Valley, Hemrovy rocks, on W-facing slope, above road, on diabas, 50°02'35"N, 14°21'12"E, alt. 265 m, 7. 6. 2009, J. Kocourková, JK/7404 (Hb.

Mycologicum J. Kocourková et K. Knudsen)

23. *Acarospora fuscata*, Greece, nom. Kavala: Thasos island, near antennes on summit Toumba, N-facing rock outcrops, 40°43'08"N, 24°40'01"E, alt. 1050 m, 29. 5. 2010, H. Sipman & T. Raus, 589993 (B)
24. *Acarospora pseudofuscata*, Greece, East Aegean Islands, Nomos Dodekanisou: Kos Island, Kefalos peninsula, c. 6 km S of Kefalos, Agios Mammias chapel near S-tip, dwarfshrub vegetation with siliceous rock outcrops on hill top near the coast, 36°40,7'N, 26°58'E, alt. 200 m, 24. 9. 2000, H. Sipman & Th. Raus, 47132 (B)
25. *Acarospora pseudofuscata*, Greece, W Aegean, Nomos Evvias, Ep. & Dim. Karistos: S Evvia, lower slopes above Metochi, along road to Platanistos, Schist outcrops and boulders in phrygana, 38°00,5'N, 24°28,6'E, alt. 250 m, 24. 9. 2005, H. Sipman & Th. Raus, 53744 (B)
26. *Acarospora gallica*, Czech Republic, Pitkovice: Pitkovická stráň, oak and hardwood forest with scattered pines, 50°01'26"N, 14°34'21"E, alt. 276 m, 21. 9. 2010, K. Knudsen, 12447 (Hb. Mycologicum J. Kocourková et K. Knudsen)
27. *Acarospora fuscata*, Czech Republic, Central Bohemia: distr. Rakovník, Křivoklátsko Protected Landscape Area, Roztoky – U Eremita Nature Reserve, on Fe-enriched schistose rock, 50°00'59"N, 13°51'38"E, alt. 250 m, 5. 6. 2010, J. Malíček, 3217 (Hb. Jiří Malíček)
28. *Acarospora fuscata*, Lendemer, 2418 (NY)
29. *Acarospora fuscata*, Lendemer, 2398 (NY)

### 3.3.2 Metody

Jako nejspolehlivější metoda identifikace neznámých nebo těžko určitelných vzorků byl zvolen soubor molekulárních analýz nukleotidových sekvencí tří vybraných úseků lišejníkové DNA – ITS, mtSSU a genu pro  $\beta$ -tubulin. Produkt byl získán z izolátu pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Amplifikované úseky DNA byly osekvenovány a získané sekvence byly vyhodnoceny pomocí fylogenetických analýz neighbor-joining, Maximum Likelihood a Maximum Parsimony.

#### Izolace DNA

Pro extrakci DNA bylo z každé položky odebráno malé množství lišejníkové stélky. Přednostně byly vybírány areoly obsahující apothecia, ve kterých se nachází největší množství houbové DNA bez příměsí DNA fotobionta. Zvláštní pozornost byla věnována výběru areol, které nejevily známky napadení parazitickou houbou, jejíž DNA by mohla negativně ovlivnit výsledek PCR.



Bylo použito několik nejběžnějších metod izolace DNA pro rostlinný a houbový materiál. Lišejníky skupiny *Acarospora fuscata* vykazovaly značnou rezistenci vůči metodám extrakce DNA. Získání dostatečného množství produktu vyžadovalo experimentální aplikaci několika metod na jednotlivé vzorky, přičemž žádná metoda neměla 100% úspěšnost.

Izolace pomocí DNeasy Plant Mini kitu měla úspěšnost menší než 20% u testovaných vzorků. Vzhledem k její vysoké finanční nákladnosti od ní bylo upuštěno.

Fenol-chloroformová extrakce byla úspěšná v 50% pro všechny tři úseky DNA.

Izolace pomocí NaOH byla úspěšná v 80% pro úsek mtSSU, ale pro ITS byla úspěšnost jen 20% a pro  $\beta$ -tubulin < 10%.

Pomocí CTAB metody bylo vyizolováno 50% testovaných vzorků ve všech třech úsecích.

### **Izolace pomocí DNeasy Plant Mini kitu**

Izolace probíhala podle instrukcí dodavatele kitu.

1. K homogenizované směsi vzorku (max. 100 mg) bylo přidáno 400  $\mu$ l lyzačního pufru AP1 a 4  $\mu$ l RNasy A. Zvortexováno a necháno inkubovat 10 min při teplotě 65 °C. Během inkubace 2–3x promícháno převrácením mikrozkušavky.
2. Přidáno 130  $\mu$ l pufru P3. Promícháno a necháno inkubovat 5 min na ledu.
3. Zcentrifugováno 5 min při otáčkách 20000 x g (14000 rpm).
4. Supernatant opatrně přepipetován do 2ml kolonky QIAshredder a zcentrifugován 2 min při otáčkách 20000 x g (14000 rpm).
5. Proteklý roztok přepipetován do nové 1,5 ml mikrozkušavky a přidán 1,5 x objemový násobek pufru AW1, promícháno pomocí pipety.
6. Vzniklá směs přepipetována (max. 650  $\mu$ l v jednom kroku) do kolonky DNeasy Mini Spin a centrifugována 1 min při otáčkách více než 6000 x g. Tento krok opakován dokud nebyl převeden veškerý vzorek.

7. Kolonka umístěna do nové 2ml zkumavky a přidáno 500  $\mu$ l pufru AW2, centrifugováno 1 min při otáčkách 6000 x g. Proteklý roztok vylit.
8. Přidáno dalších 500  $\mu$ l pufru AW2 a centrifugováno 2 min při otáčkách 20000 x g.
9. Opatrně kyvetou přemístěno do nové 1,5ml mikrozukavky.
10. Přidáno 100  $\mu$ l pufru AE pro eluci DNA, necháno inkubovat 5 min za laboratorní teploty a centrifugováno 1 min při otáčkách nad 6000 x g.
11. Zopakován krok 10.

### **Fenol-chloroformová extrakce**

1. K homogenizovanému biologickému materiálu bylo přidáno 0,8 ml 1X SSC pufru (NaCl, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> (citrát sodný), HCl) a promícháno. Centrifugováno 1 min při otáčkách 12 000 rpm.
2. Přidán 1 ml of 1X SSC pufru, zvortexováno, centrifugováno 1 min, odstraněn všechen supernatant.
3. Přidáno 375  $\mu$ l 0,2M octanu sodného (NaOAc) a promícháno na vortexu. Poté přidáno 25  $\mu$ l 10% SDS a 5  $\mu$ l proteinázy K (20 mg/ml H<sub>2</sub>O), zvortexováno a necháno inkubovat cca 60 min při teplotě 55 °C.
4. Přidáno 120  $\mu$ l fenol : chloroform : isoamyl alkoholu a krátce zvortexováno, poté zcentrifugováno 2 min při 12 000 rpm.
5. Vodná fáze opatrně přepipetována do nové 1,5 ml mikrozukavky Eppendorf, přidán 1 ml vychlazeného 100% ethanolu (z mrazáku), promícháno a inkubováno 15 min při teplotě – 20 °C.
6. Centrifugováno 2 min při 12 000 rpm. Odstraněn supernatant, vysušeno.
7. Přidáno 180  $\mu$ l 10:1 TE pufru (Tris/EDTA pufr), zvortexováno a inkubováno 10 min při teplotě 55 °C.
8. Přidáno 20  $\mu$ l 2M octanu sodného, promícháno. Přidáno 500  $\mu$ l vychlazeného 100% ethanolu, promícháno a centrifugováno 1 min při 12 000 rpm.
9. Odstraněn supernatant. Pelet propláchnutv 1 ml 80% ethanolu. Centrifugováno 1 min při 12 000 rpm.
10. Odstraněn supernatant a pelet vysušen.
11. Pelet rozpuštěn ve 200  $\mu$ l 10:1 TE pufru. Inkubováno přes noc při 55 °C.

### **Izolace DNA pomocí NaOH**

1. K biologickému materiálu do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml přidáno 5  $\mu$ l 0,5M NaOH, manuálně rozdrceno.
2. Přidáno dalších 15  $\mu$ l 0,5M NaOH, drceno 2 min.
3. Centrifugováno 2 min při 13 800 rpm.
4. Ze vzniklé směsi odebrány 2  $\mu$ l do mikrozkušavky o objemu 0,5 ml, přidáno 20  $\mu$ l TRIS pufru, promícháno.
5. Zředěno 100x na pracovní koncentraci.

### **Izolace DNA pomocí NaOH s předchozí aplikací dimethylketonu**

Biologický materiál určený k izolaci byl na několik vteřin ponořen do dimethylketonu (acetonu), který působí jako rozpouštědlo organických látek. Z biologického materiálu byly tímto postupem odstraněny sekundární metabolity – kys. gyroforová a kys. lekanorová, které by mohly inhibovat PCR.

Dimethylketon byl odstraněn a dále bylo postupováno podle předchozího protokolu. Aplikace dimethylketonu však úspěšnost metody žádným způsobem nezvýšila.

### **CTAB metoda izolace DNA**

1. K homogenizovanému materiálu bylo přidáno 800  $\mu$ l CTAB pufru (CTAB s PVP (polyvinylpyrolidon) a 10  $\mu$ l 2-merkptoethanolu (práce probíhala v digestoři)
2. Promícháno na vortexu a inkubováno cca 30 min v termobloku při teplotě 60  $^{\circ}$ C.
3. Poté přidáno 500  $\mu$ l směsi chloroform : isoamylalkohol v poměru 24 : 1 (práce probíhala v digestoři). Promícháno 2–3násobným převrácením zkumavek.
4. Centrifugováno 10 min při 13 800 rpm.
5. Supernatant přepipetován do nových 1,5 ml mikrozkušavek (práce probíhala v digestoři).

6. Přidáno 500  $\mu$ l vychlazeného isopropanolu (z mrazáku). Promícháno 1–2násobným převrácením.
7. Ponecháno cca 30 min při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
8. Centrifugováno 5 min při 13 800 rpm.
9. Odstraněn supernatant (práce probíhala v digestoři). Na dně mikroskopické kumavky byl pozorovatelný malý bílý pelet obsahující DNA.
10. Po vyschnutí mikroskopické kumavky přidáno 400  $\mu$ l vychlazeného 96% ethanolu (z mrazáku). Inkubováno 15 min při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Centrifugováno 5 min při 13 800 rpm.
11. Odstraněn supernatant. Přidáno 200  $\mu$ l vychlazeného ethanolu (z mrazáku), ponecháno stát 5 min. Centrifugováno 5 min při 13 800 rpm.
12. Odstraněn supernatant. Mikroskopické kumavky ponechány otevřené 10–15 min a ještě 1–2 min vysušeny s otevřenými víčky na termobloku při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
13. Vysušený pelet rozpuštěn ve 200  $\mu$ l TE pufru.
14. Inkubováno 30 min na termobloku při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
15. Krátce promícháno na vortexu a stočeno v centrifuze.

Zdroj: [botanika.bf.jcu.cz/laboratory/izolace.html](http://botanika.bf.jcu.cz/laboratory/izolace.html)

### **Měření koncentrace DNA**

Pro stanovení koncentrace DNA ve vyizolovaném roztoku byl nanesen 1  $\mu$ l izolátu na snímací senzor spektrofotometru.

### **Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

#### **Primery**

Primery pro PCR byly zvoleny na základě práce, zabývající se výzkumem blízkého příbuzného druhu *Acarospora smaragdula* (Wedin et al. 2009). Primery dodala česká biotechnologická společnost GENERI BIOTECH. Podle návodu dodavatele byly primery zředěny destilovanou vodou na koncentraci 100 pmol/ $\mu$ l. Část výsledného roztoku byla dále ředěna destilovanou vodou na pracovní koncentraci 5 pmol/ $\mu$ l. Zbytek roztoku byl zmrazen a uchován pro případné další reakce.

Tabulka 2: Seznam použitých primerů

Bt10-LM	5' - TCG GAA GCA GCC ATC ATG TTC TT-3'
Bt3-LM	5' - GAA CGT CTA CTT CAA CGA G-3'
ITS1F	5' - CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3'
LR3	5' - GGT CCG TGT TTC AAG AC-3'
mrSSU3R	5' - ATG TGG CAC GTC TAT AGC CC-3'
mrSSU1	5' - AGC AGT GAG GAA TAT TGG TC-3'

### Reakční směs

Množství pro jeden vzorek:

- 3,3 µl destilované vody
- 5 µl Master Mixu
- 0,6 µl forward primeru
- 0,6 µl reverse primeru
- 0,5 µl vyizolované DNA

Reakční směs byla krátce protřepána na Vortexu a stočena v centrifuze po dobu 3 min. při otáčkách 6000 x g.

Tabulka 3: Program pro amplifikaci ITS a mtSSU v termocycleru

Krok	Teplota	Čas	Opakování
1.	94 °C	5 min	1x
2.	94 °C	30 s	5x
3.	55 °C	30 s	
4.	72 °C	60 s	
5.	94 °C	30 s	30x
6.	52 °C	30 s	
7.	72 °C	60 s	
8.	72 °C	300 s	1x

Tabulka 4: Program pro amplifikaci  $\beta$ -tubulinu v termocyleru

Krok	Teplota	Čas	Opakování
1.	94 °C	5 min	1x
2.	94 °C	30 s	5x
3.	60 °C	30 s	
4.	72 °C	60 s	
5.	94 °C	30 s	30x
6.	55 °C	30 s	
7.	72 °C	60 s	
8.	72 °C	300 s	1x

### Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza sloužila pro ověření úspěšného průběhu PCR.

Příprava gelu:

Nejprve byl připraven zásobní roztok TBE:

Tris-base	108 g
Boric acid	55 g
Na <sub>2</sub> -EDTA	9,3 g
Destil. H <sub>2</sub> O	1000 ml

Zásobní roztok byl následně zředěn destilovanou vodou v poměru 1:9 na pracovní koncentraci.

Pro přípravu gelu bylo odměřeno 80 ml pracovního roztoku TBE a v Erlenmayerově baňce smícháno s 80 mg agarózy. Směs byla povařena v mikrovlnné troubě cca 1 min 15 s. Pokud byla poté v roztoku ještě patrná nerozpuštěná agaróza, byl var prodloužen o 15–30 s. Směs v baňce byla chlazená pod tekoucí vodou na teplotu cca 50 °C (dokud nebylo možné na baňce udržet ruku). Poté byla směs nalita do připravené elektroforetické vany a zasunuty hřebeny pro 16 vzorků. Bublínky vzniklé při nalévání gelu byly odstraněny pomocí špičky. Gel tuhl při pokojové teplotě přibližně půl hodiny. Na zatuhlý gel byl nalit další pracovní roztok TBE po rysku, označenou na elektroforetické vaně. Opatrně byly vysunuty hřebeny, aby nedošlo k poškození gelu.

### **Průběh elektroforézy**

Do jamek v gelu bylo nanášeno po 5 µl od každého vzorku z PCR. Elektroforetická vana byla připojena na zdroj elektrického napětí o síle 80 V. Zhruba po 60 min. byl zdroj odpojen a gel umístěn na 5–10 min do roztoku etidium bromidu. Poté byl opláchnut v čisté vodě. Výsledek byl zkontrolován na UV-transluminátoru.

### **Purifikace PCR produktu**

2 µl PCR produktu (s prokázanou amplifikací požadovaného úseku DNA na elektroforéze) bylo smícháno s 0,6 µl směsi ExoSAP. Purifikace proběhla v termocycleru v následujících třech krocích.

Tabulka 5: Program pro purifikaci PCR produktu v termocycleru

Krok	Teplota	Čas
1.	37 °C	15 min
2.	85 °C	15 min
3.	10 °C	∞

### **Příprava vzorků na sekvenaci**

V mikrozkuhavce typu Eppendorf o objemu 1,5 ml bylo smícháno 5 µl destilované H<sub>2</sub>O, 2,5 µl forward primeru a 2,5 µl purifikovaného PCR produktu.

Jako forward primery byly použity:

- pro oblast ITS primer ITS1F
- pro mitochondriální SSU primer mrSSU1
- pro gen β-tubulinu primer Bt3-LM

### **Sekvence vzorků**

Sekvence vzorků proběhla na zakázku ve firmě SEQme s.r.o., Dobříš, ČR Sangerovou metodou sekvence pomocí sekvenačních kitů BigDye Trminátor

(Applied Biosystems). Výsledky byly k dispozici on-line na stránkách firmy ve formátech .ab1, FASTA a .phd.1.

### 3.3.3 Zpracování sekvencí a alignment

Kontrola sekvencí proběhla v programu BioEdit porovnáním sekvencí s chromatogramy. Chybně přečtené nukleotidy byly manuálně opraveny.

Každá sekvence byla porovnána se sekvencemi v databázi Gen Bank pomocí algoritmu BLAST. Pro následný alignment a analýzy byly v databázi Gen Bank vyhledány sekvence nejbližší příbuzných druhů s nejvyšší procentuální hodnotou překryvu a identity. Pro marker mtSSU bylo do elignmentu a analýz zařazeno 121 sekvencí, z toho 21 sekvencí bylo získáno v rámci této práce. Pro marker ITS bylo zařazeno 111 sekvencí, z toho 11 vlastních. Pro marker  $\beta$ -tubulin bylo z celkového počtu 62 sekvencí 6 vlastních.

V programu BioEdit byl pomocí algoritmu ClustalW (Thompson 1994) pro každý z markerů proveden alignment, který určuje poziční homologie bází v zadaných sekvencích. Získaný alignment byl zkontrolován a ještě manuálně optimalizován. Chybějící data u několika sekvencí v datasetu byly označeny znakem ,n‘.

V alignmentu pro marker  $\beta$ -tubulin byly identifikovány a eliminovány oblasti dvou hlavních intronů pro potřeby převedení alignmentu ze sekvencí nukleotidů na pozice aminokyselin.

### 3.3.4 Fylogenetické analýzy

Fylogenetické analýzy byly provedeny pomocí metody maximální pravděpodobnosti (Maximum Likelihood), metody maximální úspornosti (Maximum parsimony) a metody neighbor-joining.

Fylogenetický strom metodou Maximum likelihood byl vytvořen pomocí webové služby Phylogeny.fr (Dereeper 2008) v pokročilém režimu s nastavením Bootstrappingu: Number of bootstraps: 100, Substituční model: Standardní.



Fylogenetický strom metodou Maximum parsimony byl vytvořen rovněž přes webový servis Phylogeny.fr (Dereeper 2008) v aplikaci TNT se standardním bootstrappingem s počtem replikací 100.

Fylogenetický strom metodou neighbor-joining byl vytvořen v programu BioEdit. Výsledky nejsou zobrazeny, pouze shrnuty v tabulce 2. Metoda je vhodná pro rychlou analýzu dat, ale zpravidla se nepoužívá pro finální analýzy.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Získané markery

Z 29 vzorků, ze kterých byly izolovány markery sekvencí ITS, mtSSU a genu pro  $\beta$ -tubulin, bylo získáno celkem 38 sekvencí, z toho 11 sekvencí ITS, 21 sekvencí mtSSU a 6 sekvencí pro gen  $\beta$ -tubulinu (tab. 6).

Tabulka 6: Seznam získaných sekvencí

Č. položky	Druh	ITS	mtSSU	$\beta$ -tubulin
1.	<i>Acarospora fuscata</i>	x	x	x
2.	<i>Acarospora fuscata</i>			x
3.	<i>Acarospora thamnina</i>	x	x	
4.	<i>Acarospora gallica</i>			
5.	<i>Acarospora pseudofuscata</i>	x	x	
6.	<i>Acarospora fuscata</i>	x	x	x
7.	<i>Acarospora fuscata</i>	x	x	
8.	<i>Acarospora fuscata</i>	x	x	
9.	<i>Acarospora umbilicata</i>		x	
10.	<i>Acarospora thamnina</i>	x	x	x
11.	<i>Acarospora fuscata</i>	x	x	x
12.	<i>Acarospora fuscata</i>			
13.	<i>Acarospora umbilicata</i>		x	
14.	<i>Acarospora gallica</i>	x	x	
15.	<i>Acarospora fuscata</i>		x	
16.	<i>Acarospora fuscata</i>		x	
17.	<i>Acarospora pseudofuscata</i>		x	
18.	<i>Acarospora umbilicata</i>		x	
19.	<i>Acarospora gallica</i>		x	
20.	<i>Acarospora gallica</i>		x	
21.	<i>Acarospora rufescens</i>		x	
22.	<i>Acarospora sp.</i>	x	x	x
23.	<i>Acarospora fuscata</i>			
24.	<i>Acarospora pseudofuscata</i>			
25.	<i>Acarospora pseudofuscata</i>	x	x	
26.	<i>Acarospora gallica</i>			
27.	<i>Acarospora fuscata</i>			
28.	<i>Acarospora fuscata</i>			

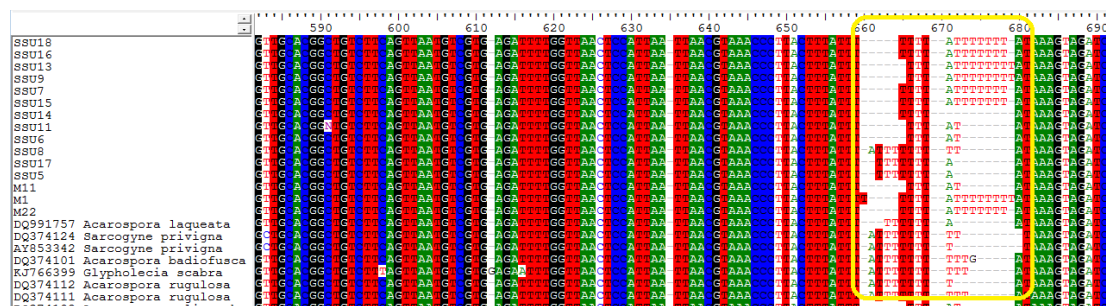
29.	<i>Acarospora fuscata</i>		x	
-----	---------------------------	--	---	--

Ke všem získaným markerům byly v programu BLAST vyhledány nejpodobnější sekvence, uložené v Gen Bank, a následně byly použity pro molekulární analýzy.

## 4.2 Alignment

### Alignment mtSSU

Do alignmentu bylo zařazeno 121 sekvencí. Jako outgroup byly použity 3 sekvence vzdáleněji příbuzných druhů *Pycnora xanthococca* (2 sekvence) a *Pycnora sorophora* (1 sekvence). Ingroup tvořilo 118 sekvencí, z toho 21 sekvencí bylo získáno v rámci této práce, ostatní byly použity z databáze GenBank. Délka alignmentu byla 755 pozic. Variabilita byla zaznamenána na 214 pozicích. Po odebrání outgroupu se variabilita v ingroupu vyskytovala na 118 pozicích. Nejvyšší variabilita byla na konci sekvenovaných úseků mezi pozicemi 710 a 755. Dalšími vysoce variabilními oblastmi byly in-delové úseky mezi pozicemi 14–20 a 660–680 (viz obr. č. 3).

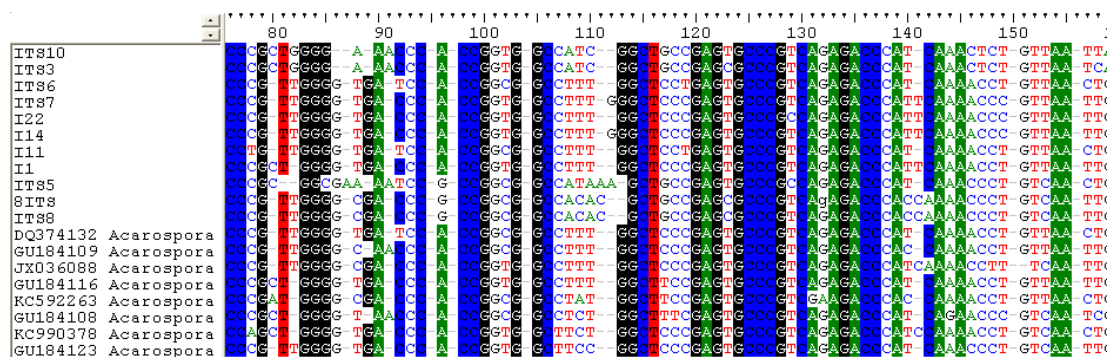


Obrázek 3: Část alignmentu pro mtSSU s variabilní in-delovou oblastí (ve žlutém rámečku). Zdroj: vlastní

### Alignment ITS

Do alignmentu bylo zařazeno 111 sekvencí. Jako outgroup byly použity 2 sekvence vzdáleněji příbuzného druhu *Pycnora xanthococca*. Ingroup tvořilo 109 sekvencí, z toho 11 sekvencí bylo získáno v rámci této práce. Délka alignmentu byla 503 pozic. Variabilita byla zaznamenána na 245 pozicích. Po odebrání outgroupu se variabilita v ingroupu vyskytovala na 239 pozicích. Oblast ITS je tedy variabilnější než mtSSU. Nejvyšší variabilitu vykazovaly úseky 0–195 (ITS1 region – viz obr.4) a 380–503 (ITS2 region). Mezi nimi se vyskytovala 185 bází dlouhá konzervativní

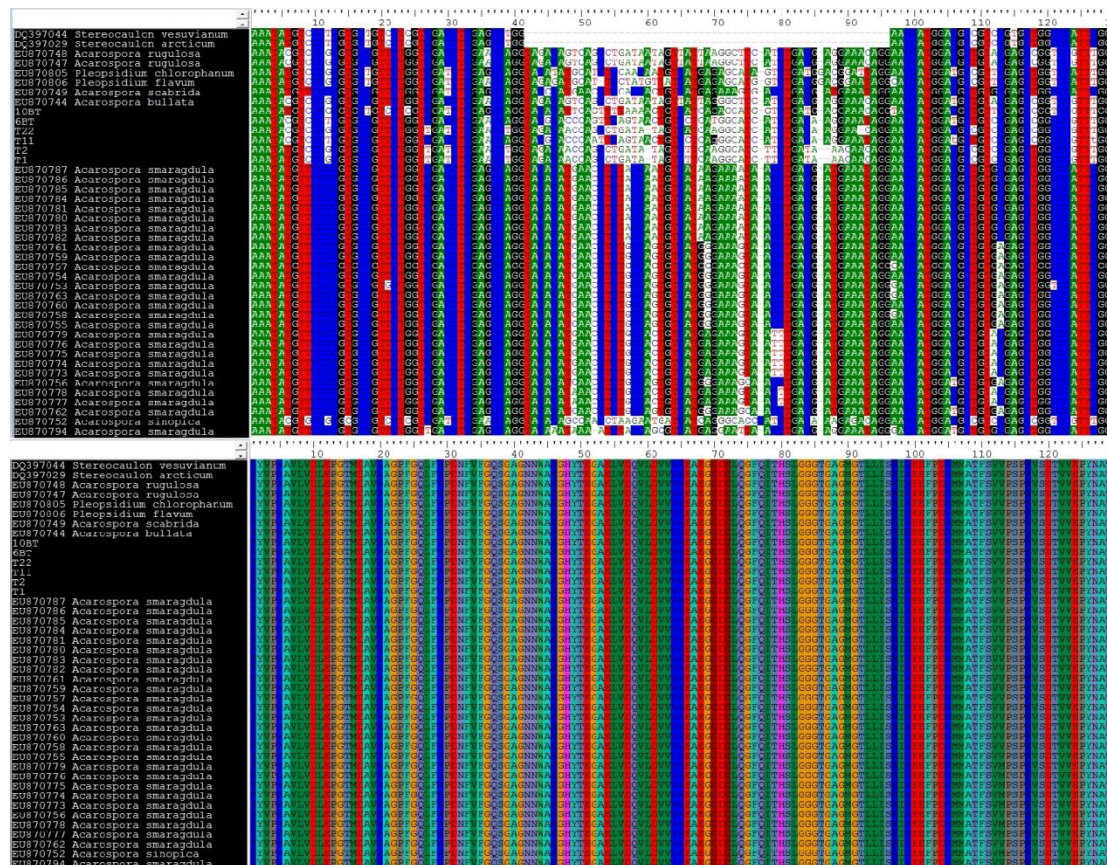
oblast s minimální variabilitou. Inserce a delece nebyly v tomto markeru příliš časté, převážovaly substituce.



Obrázek 4: Část alignmentu ITS (variabilní ITS region). Zdroj: vlastní

### Alignment $\beta$ -tubulinu

Do alignmentu bylo zařazeno 62 sekvencí. Jako outgroup byly použity 2 sekvence vzdáleněji příbuzných druhů *Stereocaulon vesuvianum* a *Stereocaulon arcticum*. Ingroup tvořilo 60 sekvencí, z toho 6 sekvencí bylo získáno v rámci této práce. Délka alignmentu byla 815 pozic. Variabilita byla zaznamenána na 359 pozicích. Po odebrání outgroupu se variabilita v ingroupu vyskytovala na 346 pozicích. Značná variabilita byla soustředěna na třetích pozicích tripletů kódujících jednotlivé aminokyseliny (neutrální variabilita), a ve dvou intronech (pozice 42–96 - viz obr. 5a a 519–554). Po odstranění intronů a následném přepisu sekvencí nukleotidů do pořadí aminokyselin byly získány zcela identické sekvence bílkovin (obr. 5b).

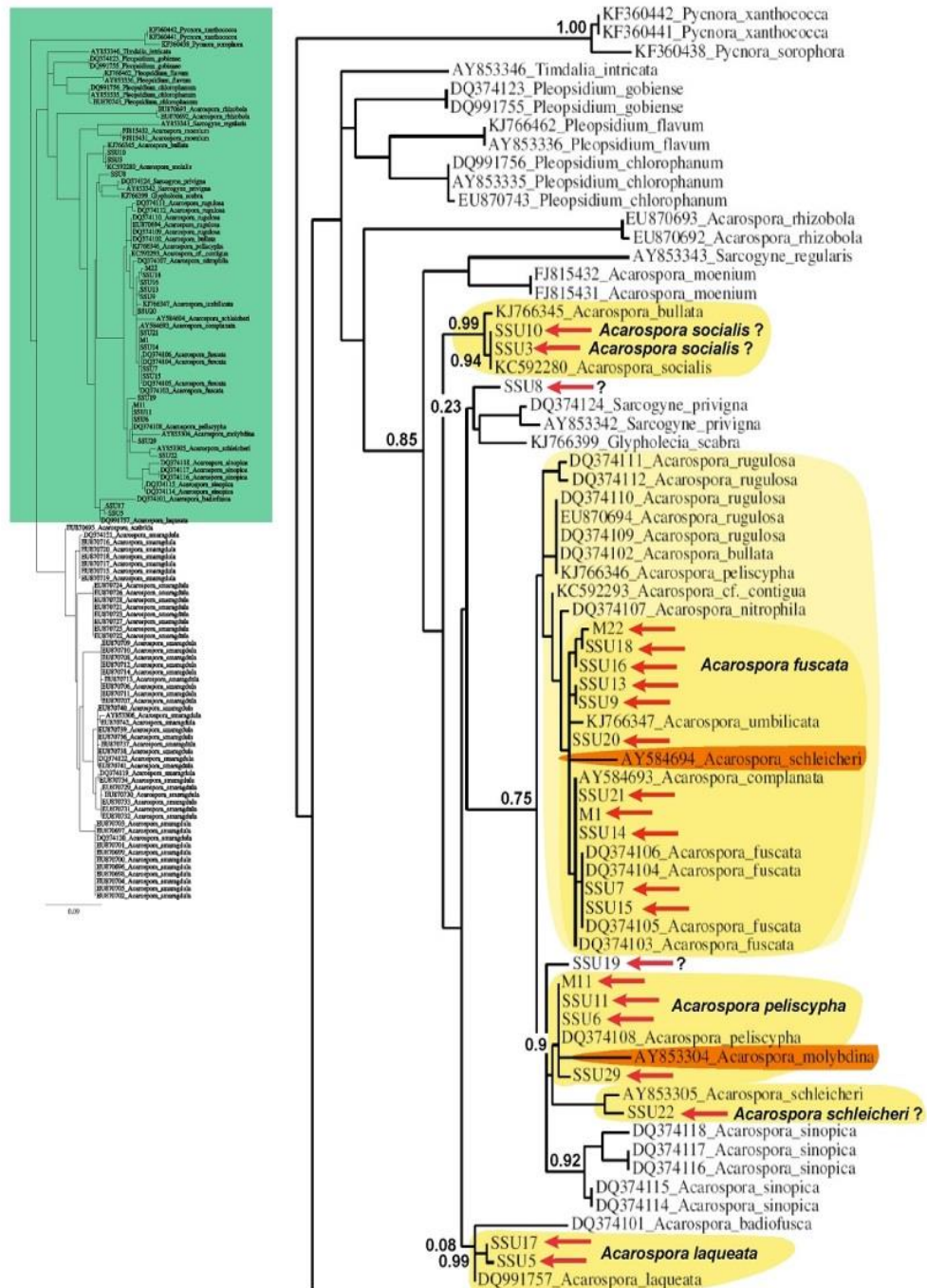


Obrázek 5: Část alignmentu  $\beta$ -tubulinu. A. pořadí nukleotidů s intronem v oblasti 42 – 96. B. Pořadí aminokyselin po odstranění intronů. Zdroj: vlastní

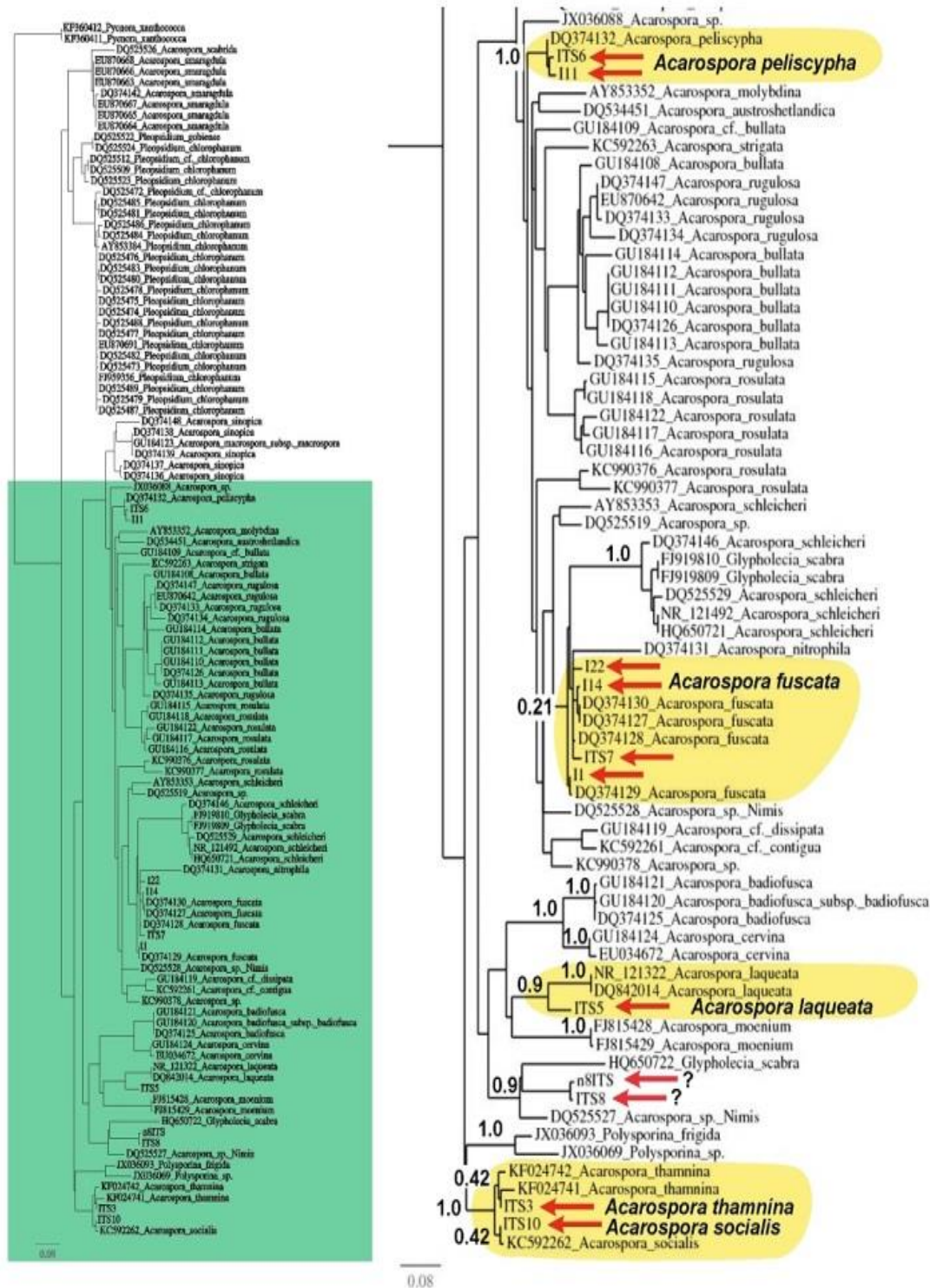
### 4.3 Molekulární analýzy

Pro tři studované markery byly vytvořeny fylogenetické rekonstrukce pomocí tří různých přístupů: Maximum likelihood (obr. 6–8), Maximum parsimony (obr. 9–11) a Neighbour-joining (nezobrazeno). Zvolené přístupy se lišily ve tvaru kostry fylogenetických stromů, ale skupiny na nižších taxonomických úrovních se až na výjimky shodovaly. Výjimkou jsou např. odlišné topologie sekvencí mtSSU22 a mtSSU29 v ML rekonstrukci (obr. 6) a v parsimonické rekonstrukci (obr. 9). Výsledky z jednotlivých analýz a BLASTu jsou shrnuty v tabulce 2. Následné revize použitého herbářového materiálu jsou popsány v tabulce 3.

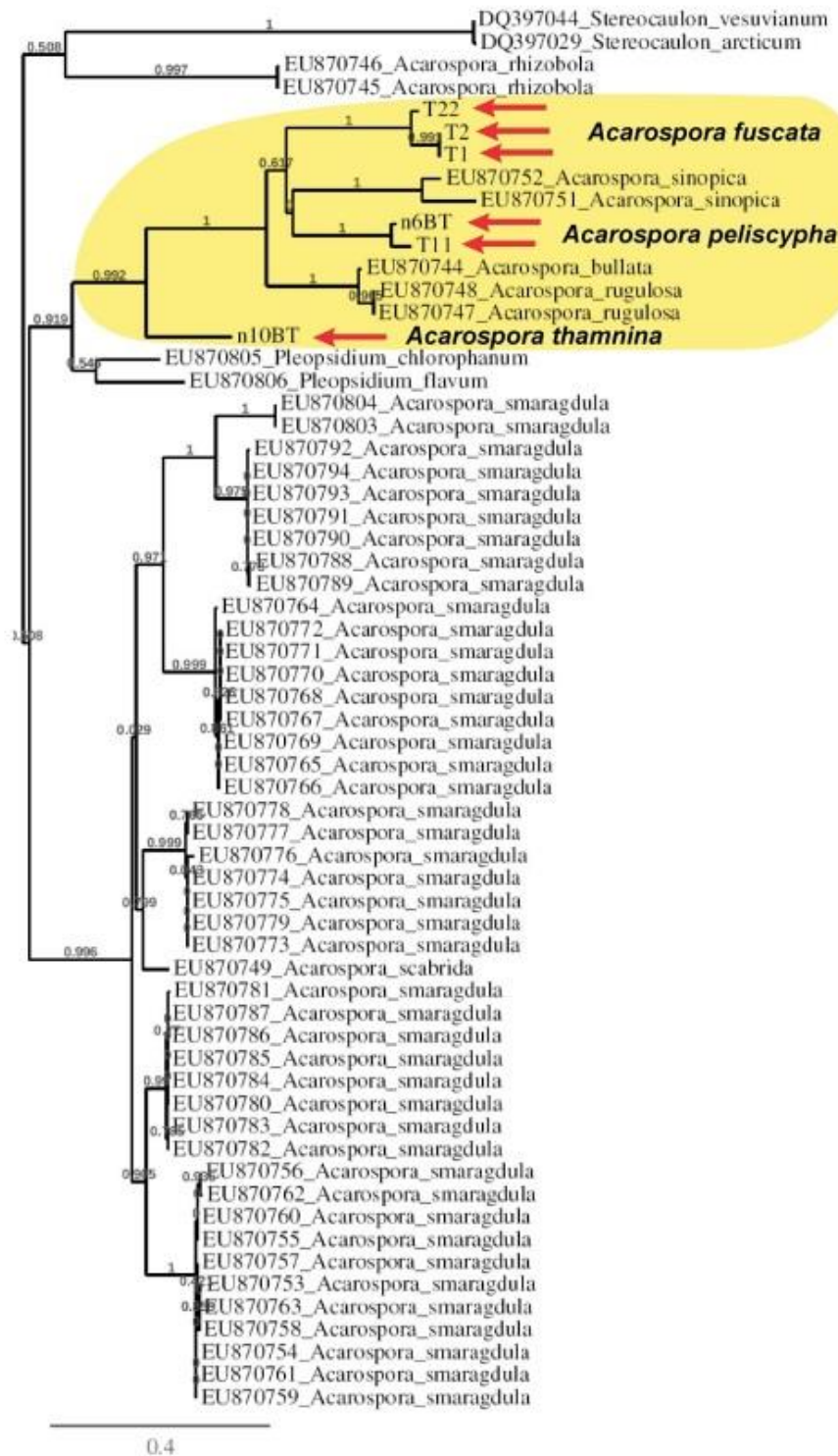
# Maximum likelihood



Obrázek 6: Maximum likelihood pro mtSSU. Vlevo schéma rekonstrukce čeledi Acarosporaceae s vyznačením zájmové části. Bootstrapové podpory jsou uvedeny u vybraných skupin. Nové sekvence jsou označeny šipkami. Zdroj: vlastní



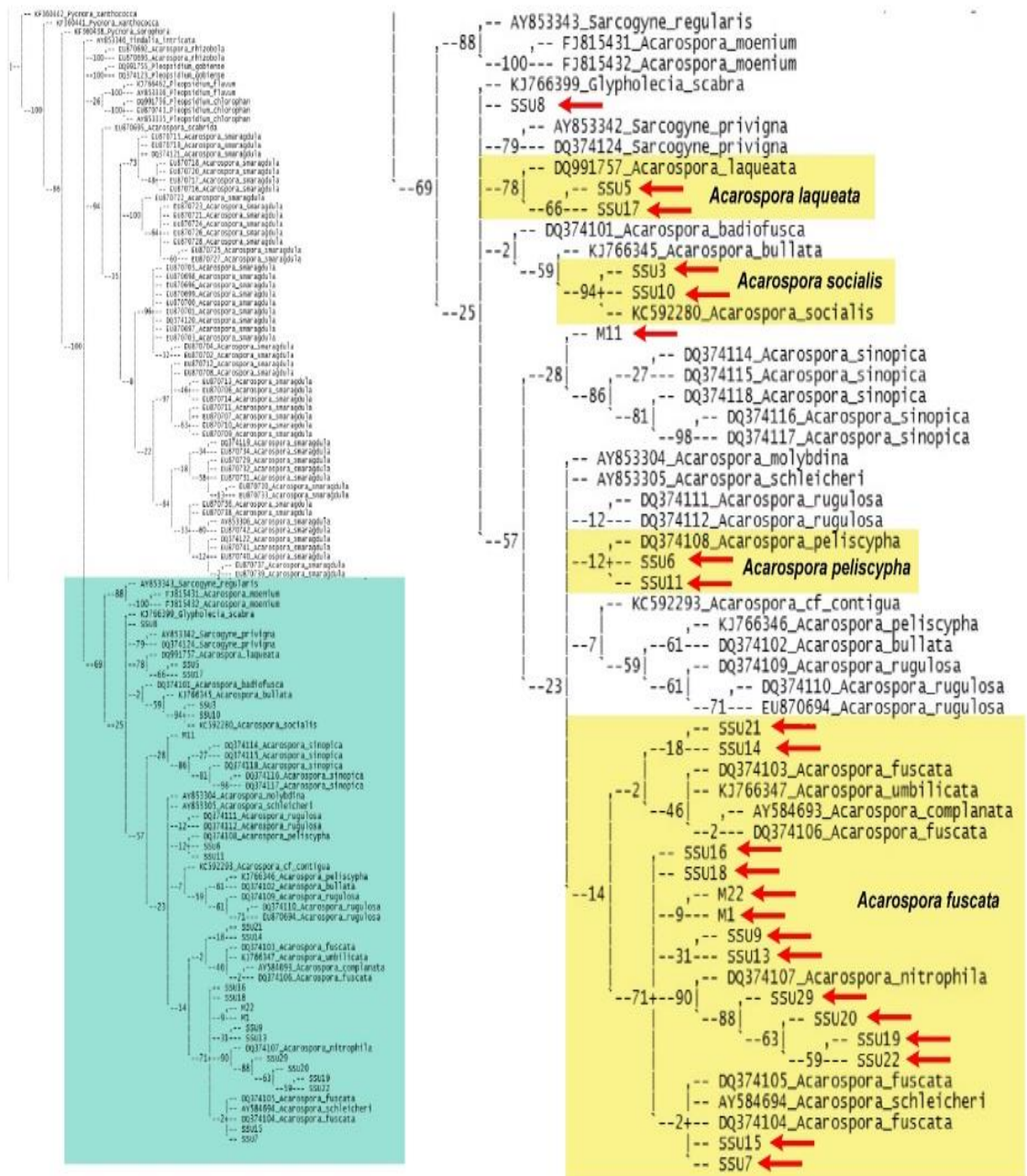
Obrázek 7: Maximum likelihood pro ITS. Vlevo schéma rekonstrukce čeledi Acarosporidae s vyznačením zájmové části. Bootstrapové podpory jsou uvedeny u vybraných skupin. Nové sekvence jsou označeny šipkami. Zdroj: vlastní



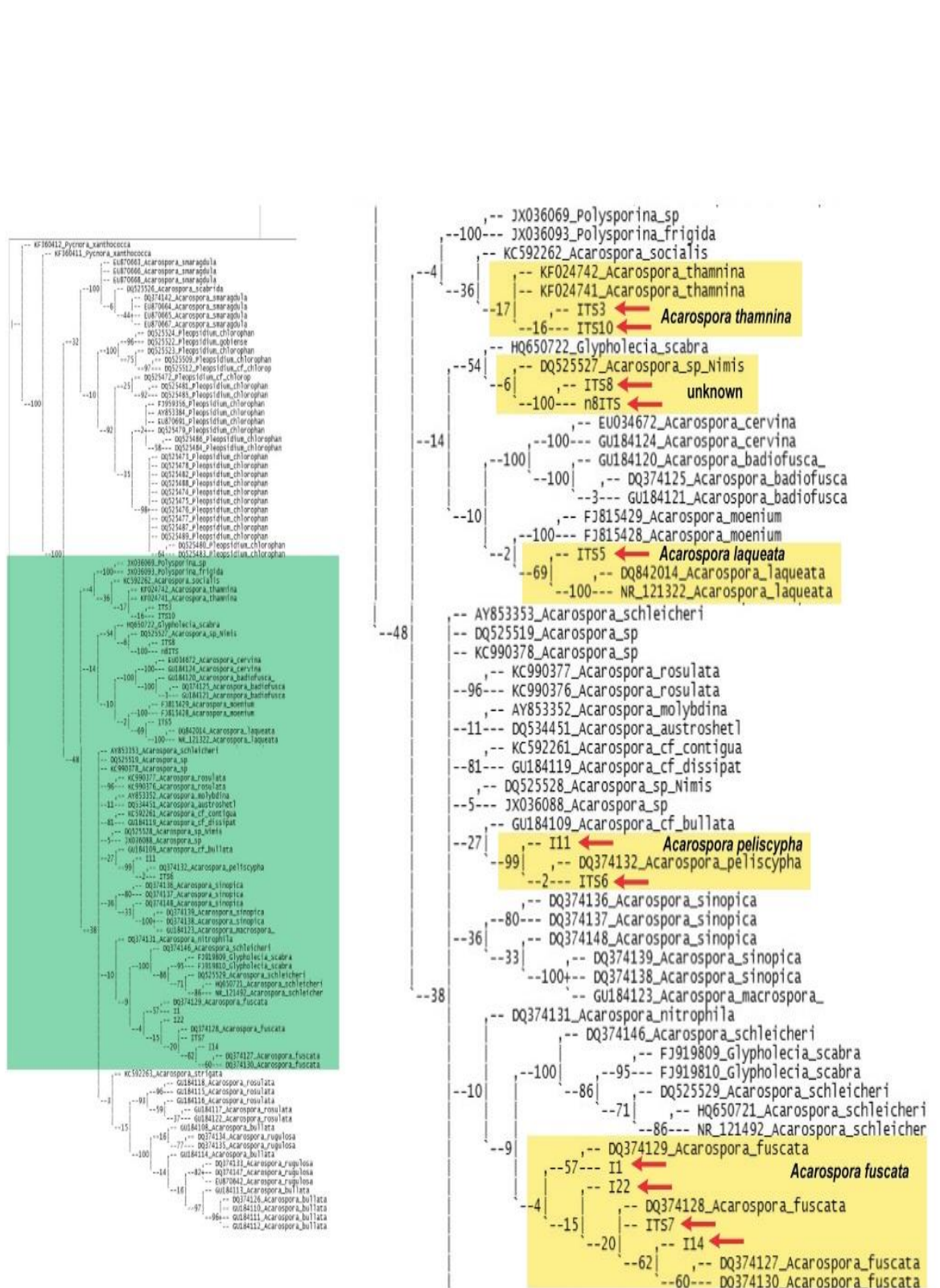
Obrázek 8: Maximum likelihood pro  $\beta$ -tubulin s bootstrapovými podporami. Zdroj: vlastní



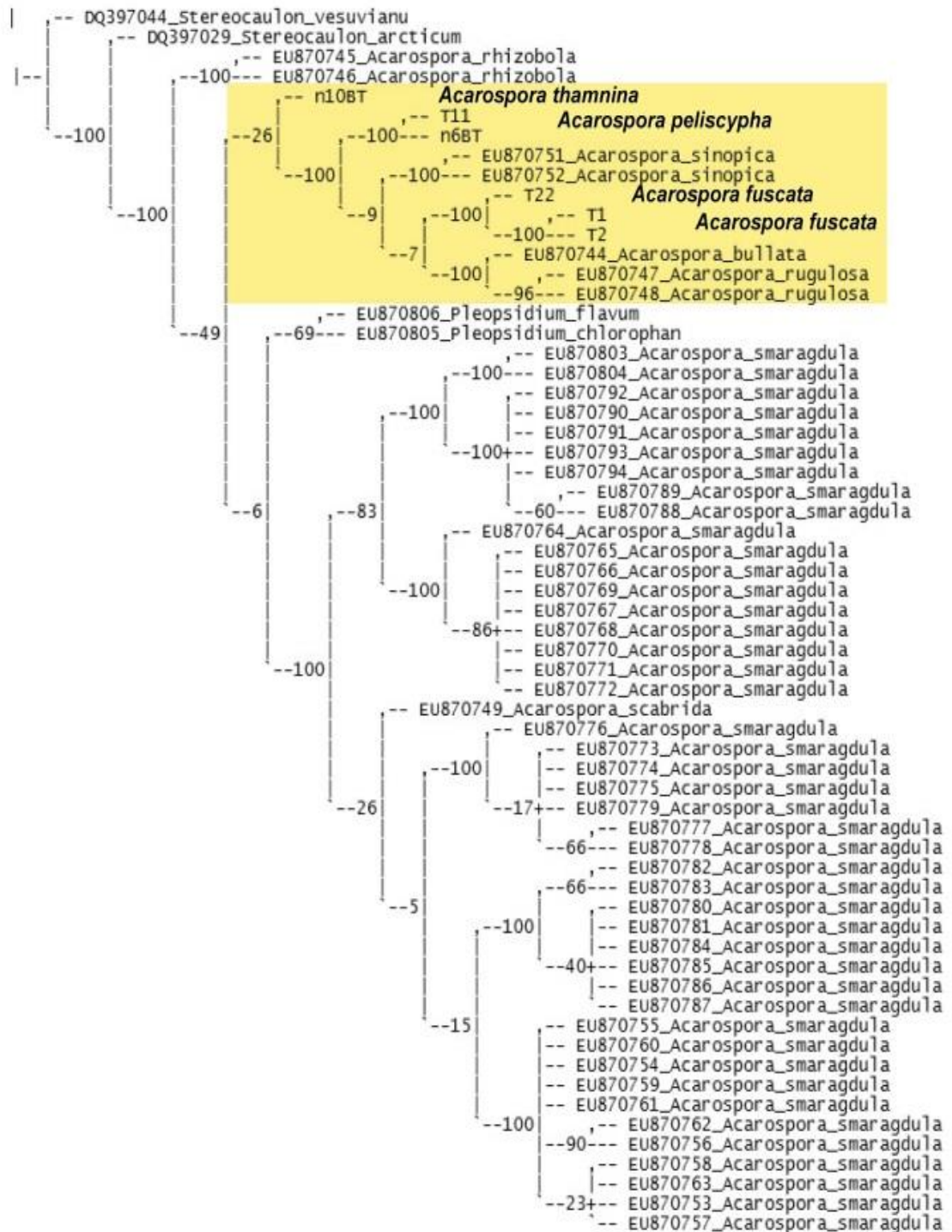
## Maximum parsimony



Obrázek 9: Maximum parsimony pro mtSSU. Vlevo schéma rekonstrukce čeledi Acarosporaceae s vyznačením zájmové části. Bootstrapové podpory jsou uvedeny u vybraných skupin. Nové sekvence jsou označeny šipkami. Zdroj: vlastní



Obrázek 10: Maximum parsimony pro ITS. Vlevo schéma rekonstrukce čeledi Acarosporaceae s vyznačením zájmové části. Bootstrapové podpory jsou uvedeny u vybraných skupin. Nové sekvence jsou označeny šipkami. Zdroj: vlastní



Obrázek 11: Maximum parsimony pro  $\beta$ -tubulin. Bootstrapové podpory jsou uvedeny u vybraných skupin. Zdroj: vlastní

Tabulka 7: Nejbliže příbuzné druhy podle jednotlivých analýz

60

	BLAST	Likelihood	Parsimony	Neighbourjoining
	<b>1. <i>Acarospora fuscata</i>, Česká republika, 2013</b>			
<b>Marker: sekvence mtSSU</b>	<i>Acarospora fuscata</i> (99 / 99)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora umbilicata</i>
	<i>Acarospora fuscata</i> (95 / 99)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	
	<i>Acarospora rugulosa</i> (99 / 98)	<i>Acarospora complanata</i>	<i>Acarospora schleicheri</i>	
<b>Marker: sekvence ITS</b>	<i>Acarospora fuscata</i> (100 / 99)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>
	<i>Acarospora fuscata</i> (100 / 99)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>
	<i>Acarospora fuscata</i> (100 / 99)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>
<b>Marker: sekvence <math>\beta</math>- tubulin</b>	<i>Acarospora rugulosa</i> (96 / 88)	<i>Acarospora sinopica</i>	<i>Acarospora sinopica</i>	<i>Acarospora rugulosa</i>
	<i>Acarospora rugulosa</i> (96 / 88)		<i>Acarospora bullata</i>	<i>Acarospora bullata</i>
	<i>Acarospora bullata</i> (96 / 88)		<i>Acarospora rugulosa</i>	
	<b>2. <i>Acarospora fuscata</i>, Česká republika, 2013</b>			
<b>Marker: sekvence <math>\beta</math>- tubulin</b>	<i>Acarospora rugulosa</i> (97 / 88)	<i>Acarospora sinopica</i>	<i>Acarospora sinopica</i>	<i>Acarospora rugulosa</i>
	<i>Acarospora bullata</i> (97 / 88)		<i>Acarospora bullata</i>	<i>Acarospora bullata</i>
	<i>Acarospora rugulosa</i> (97 / 88)		<i>Acarospora rugulosa</i>	

	BLAST	Likelihood	Parsimony	Neighbourjoining
	<b>3. <i>Acarospora thamnina</i>, USA, 2013</b>			
<b>Marker: sekvence mtSSU</b>	<i>Acarospora socialis</i> (96 / 99)	<i>Acarospora socialis</i>	<i>Acarospora socialis</i>	<i>Acarospora socialis</i>
	<i>Sarcogyne privigna</i> (100 / 98)	<i>Acarospora bullata</i>		
	<i>Sarcogyne privigna</i> (100 / 98)			
<b>Marker: sekvence ITS</b>	<i>Acarospora thamnina</i> (100 / 99)	<i>Acarospora thamnina</i>	<i>Acarospora thamnina</i>	<i>Acarospora thamnina</i>
	<i>Acarospora thamnina</i> (100 / 99)	<i>Acarospora thamnina</i>	<i>Acarospora thamnina</i>	<i>Acarospora thamnina</i>
	<i>Acarospora socialis</i> (79 /99)	<i>Acarospora cosialis</i>	<i>Acarospora cosialis</i>	
	<b>5. <i>Acarospora pseudofuscata</i>, Řecko, 2011</b>			
<b>Marker: sekvence mtSSU</b>	<i>Acarospora laqueata</i> (96 / 99)	<i>Acarospora laqueata</i>	<i>Acarospora laqueata</i>	<i>Acarospora laqueata</i>
	<i>Sarcogyne privigna</i> (100 / 98)			
	<i>Sarcogyne privigna</i> (100 / 98)			
<b>Marker: sekvence ITS</b>	<i>Acarospora laqueata</i> (98 / 95)	<i>Acarospora laqueata</i>	<i>Acarospora laqueata</i>	<i>Acarospora laqueata</i>
	<i>Acarospora laqueata</i> (98 / 95)			
	<i>Acarospora peliscypha</i> (96 / 92)			

	BLAST	Likelihood	Parsimony	Neighbourjoining
<b>6. <i>Acarospora fuscata</i>, Česká republika, 2013</b>				
<b>Marker: sekvence mtSSU</b>	<i>Acarospora peliscypha</i> (100 / 100)	<i>Acarospora peliscypha</i>	<i>Acarospora peliscypha</i>	<i>Acarospora peliscypha</i>
	<i>Acarospora fuscata</i> (100 / 99)			
	<i>Acarospora rugulosa</i> (100 / 99)			
<b>Marker: sekvence ITS</b>	<i>Acarospora peliscypha</i> (100 / 99)	<i>Acarospora peliscypha</i>	<i>Acarospora peliscypha</i>	<i>Acarospora peliscypha</i>
	<i>Acarospora cf. bullata</i> (100 / 94)			
	<i>Acarospora sinopica</i> (100 / 94)			
<b>Marker: sekvence <math>\beta</math>- tubulin</b>	<i>Acarospora bullata</i> (97 / 89)	<i>Acarospora sinopica</i>	<i>Acarospora sinopica</i>	<i>Acarospora sinopica</i>
	<i>Acarospora rugulosa</i> (97 / 89)		<i>Acarospora bullata</i>	<i>Acarospora bullata</i>
	<i>Acarospora rugulosa</i> (97 / 88)		<i>Acarospora rugulosa</i>	<i>Acarospora rugulosa</i>
<b>7. <i>Acarospora fuscata</i>, Rakousko, 2013</b>				
<b>Marker: sekvence mtSSU</b>	<i>Acarospora fuscata</i> (99 / 100)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>
	<i>Acarospora fuscata</i> (100 / 99)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>
	<i>Acarospora fuscata</i> (95 / 100)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora schleicheri</i>	
<b>Marker: sekvence ITS</b>	<i>Acarospora fuscata</i> (84 / 99)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>
	<i>Acarospora fuscata</i> (84 / 99)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>
	<i>Acarospora fuscata</i> (84 / 99)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>

BLAST	Likelihood	Parsimony	Neighbourjoining
-------	------------	-----------	------------------

**8. *Acarospora fuscata*, Česká republika, 2012**

<b>Marker: sekvence mtSSU</b>	<i>Sarcogyne privigna</i> (100 / 98)	?	?	<i>Sarcogyne privigna</i>
	<i>Sarcogyne privigna</i> (100 / 98)	?	?	?
	<i>Glypholecia scabra</i> (98 / 98)	?	?	?
<b>Marker: sekvence ITS</b>	<i>Acarospora sp Nimis</i> (80 / 94)	?	?	?
	<i>Acarospora thamnina</i> (81 / 92)	?	?	?
	<i>Acarospora chlorophanum</i> (81 / 92)	?	?	?

**9. *Acarospora umbilicata*, Portugalsko, 2007**

<b>Marker: sekvence mtSSU</b>	<i>Acarospora fuscata</i> (99 / 99)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>
	<i>Acarospora rugulosa</i> (100 / 99)	<i>Acarospora complanata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora complanata</i>
	<i>Acarospora fuscata</i> (100 / 99)	<i>Acarospora umbilicata</i>	<i>Acarospora schleicheri</i>	<i>Acarospora fuscata</i>

BLAST	Likelihood	Parsimony	Neighbourjoining
-------	------------	-----------	------------------

**10. *Acarospora thamnina*, USA, 2013**

<b>Marker: sekvence mtSSU</b>	<i>Acarospora socialis</i> (96 / 99)	<i>Acarospora socialis</i>	<i>Acarospora socialis</i>	<i>Acarospora socialis</i>
	<i>Sarcogyne privigna</i> (100 / 98)	<i>Acarospora bullata</i>		
	<i>Sarcogyne privigna</i> (100 / 98)			
<b>Marker: sekvence ITS</b>	<i>Acarospora thamnina</i> (100 / 99)	<i>Acarospora thamnina</i>	<i>Acarospora thamnina</i>	<i>Acarospora thamnina</i>
	<i>Acarospora thamnina</i> (100 / 98)	<i>Acarospora thamnina</i>	<i>Acarospora thamnina</i>	<i>Acarospora thamnina</i>
	<i>Acarospora sinopica</i> (99 / 94)	<i>Acarospora cosialis</i>	<i>Acarospora cosialis</i>	
<b>Marker: sekvence <math>\beta</math>- tubulin</b>	<i>Acarospora bullata</i> (99 / 87)	?	?	<i>Acarospora sinopica</i>
	<i>Acarospora rugulosa</i> (99 / 87)	?	?	<i>Acarospora bullata</i>
	<i>Acarospora rugulosa</i> (99 / 87)	?	?	<i>Acarospora rugulosa</i>

**11. *Acarospora fuscata*, USA, 2013**

<b>Marker: sekvence mtSSU</b>	<i>Acarospora peliscypha</i> (95 / 100)	<i>Acarospora peliscypha</i>	<i>Acarospora peliscypha</i>	<i>Acarospora peliscypha</i>
	<i>Acarospora fuscata</i> (95 / 99)			
	<i>Acarospora rugulosa</i> (94 / 99)			
<b>Marker: sekvence ITS</b>	<i>Acarospora peliscypha</i> (100 / 99)	<i>Acarospora peliscypha</i>	<i>Acarospora peliscypha</i>	<i>Acarospora peliscypha</i>
	<i>Acarospora cf. bullata</i> (100 / 95)			
	<i>Acarospora sinopica</i> (100 / 94)			



	BLAST	Likelihood	Parsimony	Neighbourjoining
<b>Marker: sekvence <math>\beta</math>- tubulin</b>	<i>Acarospora bullata</i> (97 / 88)	<i>Acarospora sinopica</i>	<i>Acarospora sinopica</i>	<i>Acarospora sinopica</i>
	<i>Acarospora rugulosa</i> (97 / 88)		<i>Acarospora bullata</i>	<i>Acarospora bullata</i>
	<i>Acarospora rugulosa</i> (97 / 88)		<i>Acarospora rugulosa</i>	<i>Acarospora rugulosa</i>
<b>13. <i>Acarospora umbilicata</i>, Portugalsko, 2011</b>				
<b>Marker: sekvence mtSSU</b>	<i>Acarospora fuscata</i> (99 / 99)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>
	<i>Acarospora rugulosa</i> (100 / 99)	<i>Acarospora complanata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora complanata</i>
	<i>Acarospora fuscata</i> (100 / 99)	<i>Acarospora umbilicata</i>	<i>Acarospora schleicheri</i>	<i>Acarospora fuscata</i>
<b>14. <i>Acarospora gallica</i>, Česká republika, 2011</b>				
<b>Marker: sekvence mtSSU</b>	<i>Acarospora fuscata</i> (100 / 100)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>
	<i>Acarospora complanata</i> (98 / 100)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora umbilicata</i>	<i>Acarospora complanata</i>
	<i>Acarospora peliscypha</i> (100 / 99)	<i>Acarospora complanata</i>	<i>Acarospora complanata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>
<b>Marker: sekvence ITS</b>	<i>Acarospora fuscata</i> (100 / 100)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>
	<i>Acarospora fuscata</i> (100 / 99)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>
	<i>Acarospora fuscata</i> (100 / 99)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>

BLAST	Likelihood	Parsimony	Neighbourjoining
-------	------------	-----------	------------------

15. *Acarospora fuscata*, Česká republika, 2011

Marker:  
sekvence  
mtSSU

*Acarospora fuscata* (99 / 100)

*Acarospora fuscata*

*Acarospora fuscata*

*Acarospora fuscata*

*Acarospora fuscata* (100 / 99)

*Acarospora fuscata*

*Acarospora fuscata*

*Acarospora fuscata*

*Acarospora fuscata* (95 / 99)

*Acarospora fuscata*

*Acarospora schleicheri*

16. *Acarospora fuscata*, Česká republika, 2010

Marker:  
sekvence  
mtSSU

*Acarospora fuscata* (99 / 99)

*Acarospora fuscata*

*Acarospora fuscata*

*Acarospora fuscata*

*Acarospora rugulosa* (100 / 99)

*Acarospora complanata*

*Acarospora fuscata*

*Acarospora complanata*

*Acarospora fuscata* (100 / 99)

*Acarospora umbilicata*

*Acarospora schleicheri*

*Acarospora fuscata*

17. *Acarospora pseudofuscata*, Řecko, 2005

Marker:  
sekvence  
mtSSU

*Acarospora laqueata* (96 / 99)

*Acarospora laqueata*

*Acarospora laqueata*

*Acarospora laqueata*

*Sarcogyne privigna* (100 / 98)

*Glypholecia scabra* (100 / 98)

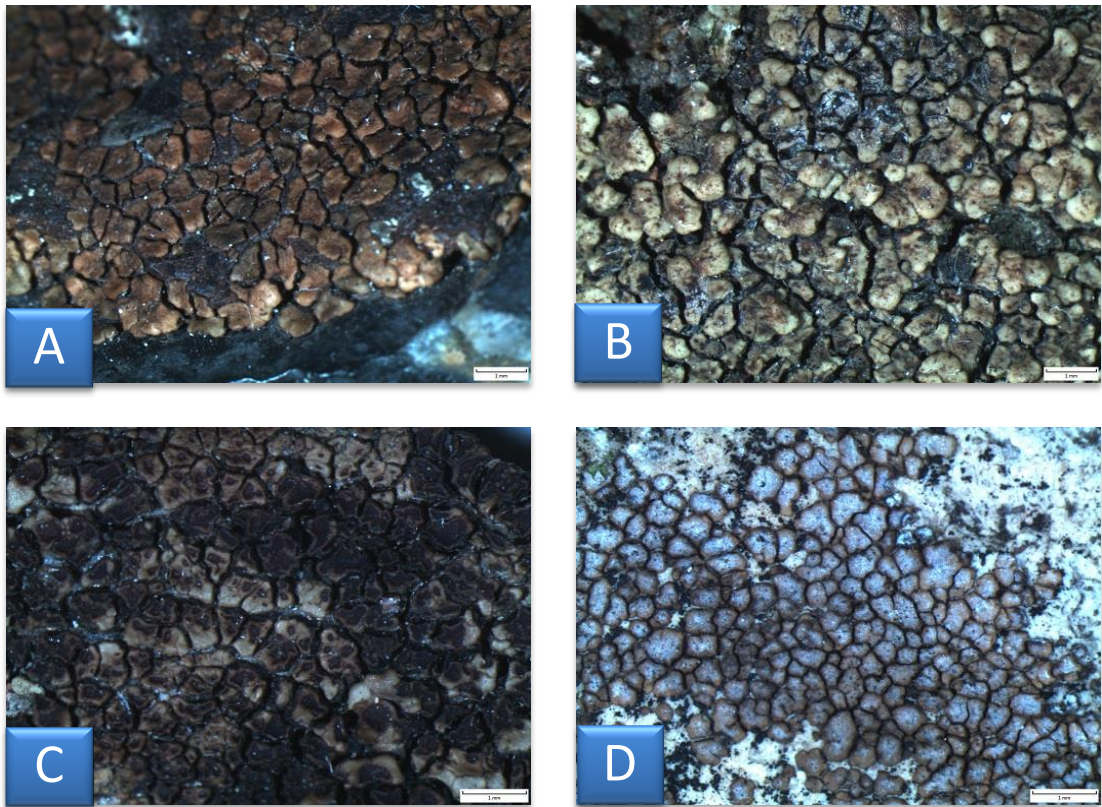
	BLAST	Likelihood	Parsimony	Neighbourjoining
	<b>18. <i>Acarospora umbilicata</i>, Česká republika, 2007</b>			
<b>Marker: sekvence mtSSU</b>	<i>Acarospora fuscata</i> (99 / 99)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora schleicheri</i>
	<i>Acarospora rugulosa</i> (100 / 98)	<i>Acarospora complanata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	
	<i>Acarospora fuscata</i> (100 / 99)	<i>Acarospora umbilicata</i>	<i>Acarospora schleicheri</i>	
	<b>19. <i>Acarospora gallica</i>, Česká republika, 1997</b>			
<b>Marker: sekvence mtSSU</b>	<i>Acarospora umbilicata</i> (97 / 94)	?	<i>Acarospora nitrophila</i>	<i>Acarospora nitrophila</i>
	<i>Acarospora cf. contigua</i> (97 / 94)	?		
	<i>Acarospora peliscypha</i> (97 / 94)	?		
	<b>20. <i>Acarospora gallica</i>, Česká republika, 1997</b>			
<b>Marker: sekvence mtSSU</b>	<i>Acarospora umbilicata</i> (33 / 100)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora nitrophila</i>	<i>Acarospora umbilicata</i>
	<i>Acarospora fuscata</i> (33 / 100)	<i>Acarospora complanata</i>		
	<i>Acarospora fuscata</i> (33 / 100)	<i>Acarospora umbilicata</i>		
	<b>21. <i>Acarospora rufescens</i>, Česká republika, 2013</b>			
<b>Marker: sekvence mtSSU</b>	<i>Acarospora fuscata</i> (100 / 100)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>
	<i>Acarospora complanata</i> (98 / 100)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora umbilicata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>
	<i>Acarospora peliscypha</i> (100 / 99)	<i>Acarospora complanata</i>	<i>Acarospora complanata</i>	<i>Acarospora complanata</i>

	BLAST	Likelihood	Parsimony	Neighbourjoining
	<b>22. <i>Acarospora</i> sp., Česká republika, 2009</b>			
<b>Marker: sekvence mtSSU</b>	<i>Acarospora fuscata</i> (99 / 99)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora schleicheri</i>
	<i>Acarospora rugulosa</i> (98 / 99)	<i>Acarospora complanata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	
	<i>Acarospora fuscata</i> (95 / 99)	<i>Acarospora umbilicata</i>	<i>Acarospora schleicheri</i>	
<b>Marker: sekvence ITS</b>	<i>Acarospora fuscata</i> (98 / 98)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>
	<i>Acarospora fuscata</i> (98 / 98)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>
	<i>Acarospora fuscata</i> (98 / 98)	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>
<b>Marker: sekvence <math>\beta</math>- tubulin</b>	<i>Acarospora rugulosa</i> (99 / 88)	<i>Acarospora sinopica</i>	<i>Acarospora sinopica</i>	<i>Acarospora rugulosa</i>
	<i>Acarospora bullata</i> (99 / 88)		<i>Acarospora bullata</i>	<i>Acarospora bullata</i>
	<i>Acarospora rugulosa</i> (99 / 88)		<i>Acarospora rugulosa</i>	
	<b>29. <i>Acarospora fuscata</i></b>			
<b>Marker: sekvence mtSSU</b>	<i>Acarospora fuscata</i> (100 / 97)	<i>Acarospora peliscypha</i>	<i>Acarospora nitrophila</i>	?
	<i>Acarospora fuscata</i> (100 / 97)			<i>Acarospora molybdina</i>
	<i>Acarospora fuscata</i> (100 / 97)			

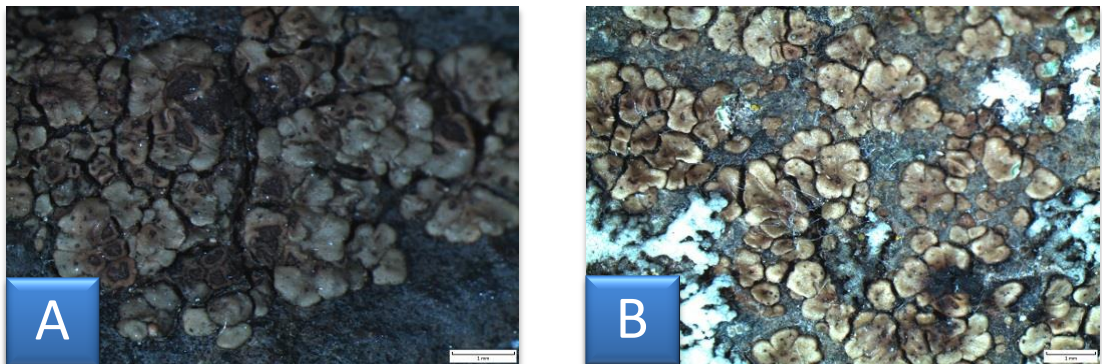
Tabulka 8: Revize položek na základě molekulárního fingerprintingu.

Č. vzorku	Herbářové jméno	Revidované jméno	Poznámka
1.	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	Jednoznačná pozice ve všech markerech
2.	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	Jednoznačná pozice v $\beta$ -tubulinu
3.	<i>Acarospora thamnina</i>	<i>Acarospora thamnina</i>	Jednoznačná pozice v mtSSU a ITS. <i>Acarospora socialis</i> je rovněž blízký taxon, ale zásadně se liší morfologicky žlutou stélkou
5.	<i>Acarospora pseudofuscata</i>	<i>Acarospora</i> aff. <i>Laqueata</i>	Možná jde o samostatný druh bez dat v GenBank, ale <i>A. laqueata</i> je nejpříbuznější taxon z GenBank databáze (podle ITS a mtSSU).
6.	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora peliscypha</i>	Jednoznačná pozice ve všech markerech.
7.	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	Jednoznačná pozice v mtSSU a ITS.
8.	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora</i> sp.	V GenBank databázi nejsou příbuzné taxony. Vzorek s jistotou nepředstavuje druh <i>Acarospora fuscata</i> .
9.	<i>Acarospora umbilicata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	Pozice v mtSSU uvnitř <i>A. fuscata</i> . <i>Acarospora umbilicata</i> možná představuje pouze bíle pruhozrnitý morfortyp druhu <i>Acarospora fuscata</i> .
10.	<i>Acarospora thamnina</i>	<i>Acarospora thamnina</i>	Jednoznačná pozice v mtSSU a ITS. <i>Acarospora socialis</i> je rovněž blízký taxon, ale zásadně se liší morfologicky žlutou stélkou
11.	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora peliscypha</i>	Jednoznačná pozice ve všech markerech.
13.	<i>Acarospora umbilicata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	Pozice v mtSSU uvnitř <i>A. fuscata</i> . <i>Acarospora umbilicata</i> možná představuje pouze bíle pruhozrnitý morfortyp druhu <i>Acarospora fuscata</i> .
14.	<i>Acarospora gallica</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	Pozice v mtSSU a ITS uvnitř <i>A. fuscata</i> . <i>Acarospora gallica</i> možná představuje pouze morfortyp druhu <i>Acarospora fuscata</i> .
15.	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	Jasná pozice v mtSSU.
16.	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	Jasná pozice v mtSSU.
17.	<i>Acarospora pseudofuscata</i>	<i>Acarospora</i> aff. <i>Laqueata</i>	Možná jde o samostatný druh bez dat v GenBank, ale <i>A. laqueata</i> je nejpříbuznější taxon z GenBank databáze (podle ITS i mtSSU).
18.	<i>Acarospora umbilicata</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	Pozice v mtSSU uvnitř <i>A. fuscata</i> . <i>Acarospora umbilicata</i> možná představuje pouze bíle pruhozrnitý morfortyp druhu <i>Acarospora fuscata</i> .
19.	<i>Acarospora gallica</i>	<i>Acarospora</i> sp.	mtSSU sekvence leží vně <i>Acarospora fuscata</i> s. lat. v ML stromě, ovšem uvnitř <i>A. fuscata</i> v parsimonyckém stromě.

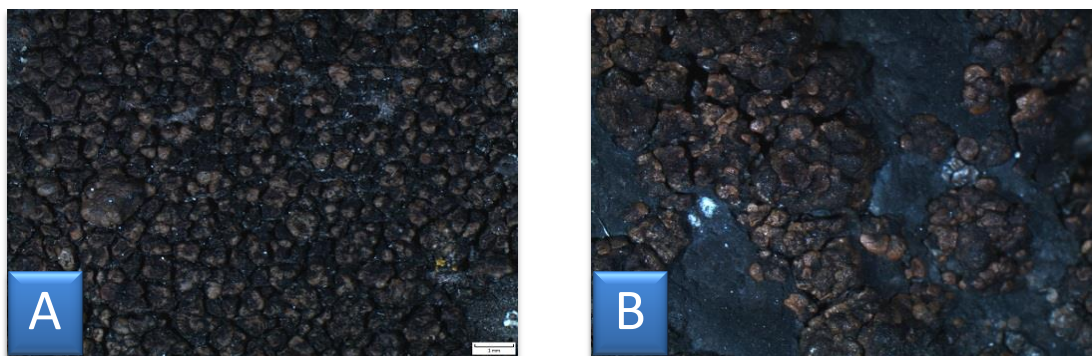
20.	<i>Acarospora gallica</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	Pozice v mtSSU uvnitř <i>A. fuscata</i> . <i>Acarospora gallica</i> možná představuje pouze morfotyp druhu <i>Acarospora fuscata</i> .
21.	<i>Acarospora rufescens</i>	<i>Acarospora fuscata</i>	Jasná pozice v mtSSU.
22.	<i>Acarospora</i> sp.	<i>Acarospora fuscata</i>	Jasná pozice ve všech markerech.
29.	<i>Acarospora fuscata</i>	<i>Acarospora</i> sp.	mtSSU sekvence se sdružuje s <i>A. peliscypha</i> (BS 0,9), ale přitom se nachází v kládu <i>A. fuscata</i> v parsimonyckém stromě.



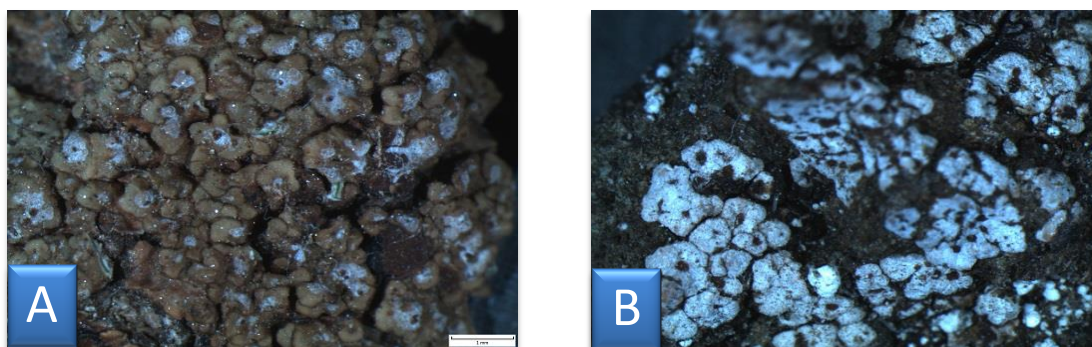
Obrázek 12: vzorky druhu *Acarospora fuscata*: A. vzorek č. 1, B. vzorek č. 2, C. vzorek č. 7, D. vzorek č. 22. Morfologická plasticita druhu *Acarospora fuscata*. Zdroj: vlastní



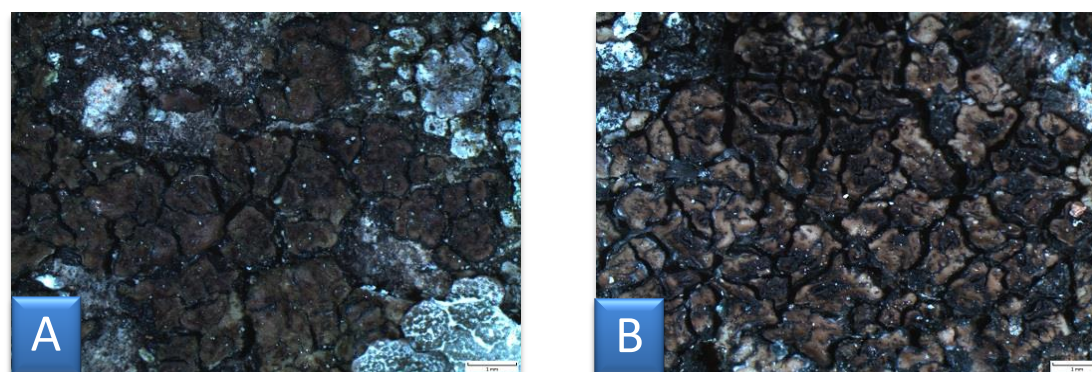
Obrázek 13: vzorky druhu *Acarospora peliscypha*: A. vzorek č. 6, B. vzorek č. 11. Vzorky morfologicky určené jako *A. fuscata*, po revizi molekulárním fingerprintem zařazeny jako *A. peliscypha*. Zdroj: vlastní



Obrázek 14: vzorky druhu *Acarospora fuscata*: A. vzorek č. 19, B. vzorek č. 20. Oba vzorky byly původně na základě morfologických znaků určeny jako *A. gallica*. Vzorek č. 19 (A) nebylo možné molekulárními metodami s jistotou identifikovat. Vzorek č. 20 (B) byl identifikován jako *A. fuscata*. Zdroj: vlastní

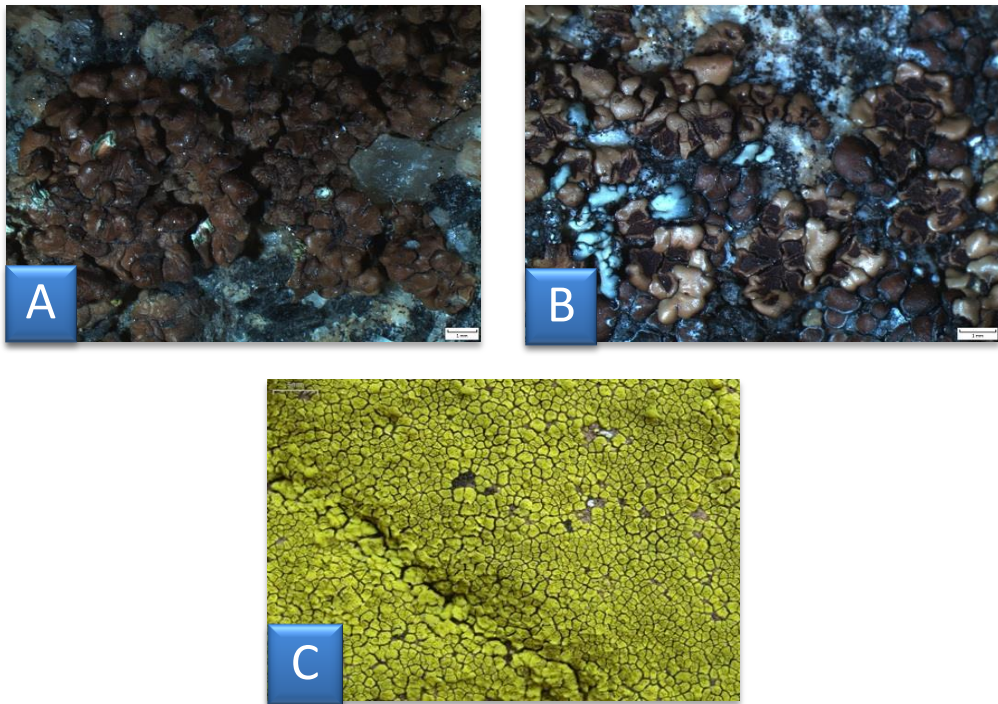


Obrázek 15: vzorky druhu *Acarospora fuscata*: A. vzorek č. 13, B. vzorek č. 18. Oba vzorky byly na základě morfologie určeny jako *A. umbilicata*. Molekulárním fingerprintingem byly identifikovány jako druh *A. fuscata*. Zdroj: vlastní

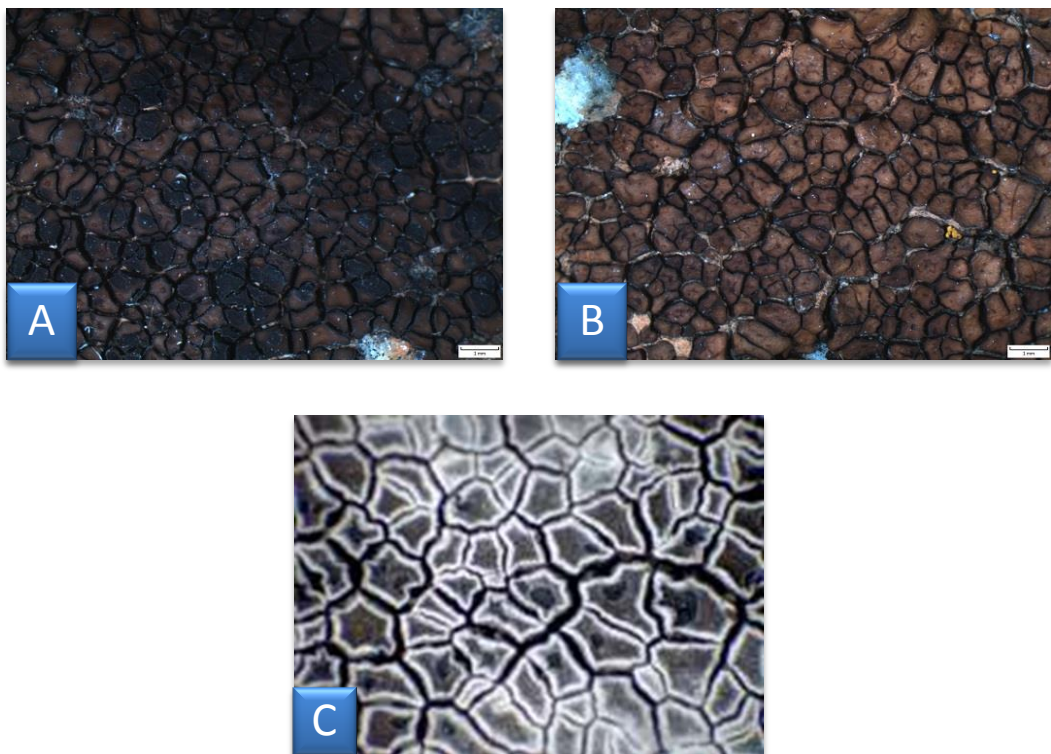


Obrázek 16: vzorky druhu *Acarospora fuscata*: A. vzorek č. 8, B. vzorek č. 21. Vzorek č. 8 (A), původně určený jako *A. fuscata* se nepodařilo pomocí molekulárních metod spolehlivě určit. Vzorek č. 21 (B), morfologicky určený jako *A. rufescens*, byl molekulárním fingerprintingem určen jako *A. fuscata*. Zdroj: vlastní





Obrázek 17: vzorky druhu *Acarospora thamnina*: A. vzorek č. 3, B. vzorek č. 10, C. druh *A. socialis* Zdroj: <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Acarospora+socialis>. Vzorky byly na základě morfologických znaků určeny jako druh *A. thamnina*. Molekulární fingerprinting toto určení potvrdil. Nejbližším příbuzným druhem se jeví *A. socialis*. Zdroj: vlastní



Obrázek 18: vzorky druhu *Acarospora* aff. *laqueata*: A. vzorek č. 5, B. vzorek č. 17 Zdroj: vlastní, C. druh *A. laqueata* Zdroj: <http://dbiodbs.univ.trieste.it/italic/italic42?specie=20&us=admin>. Vzorky č. 5 (A) a 17 (B), určené morfologicky jako *A. pseudofuscata*, stály v molekulárních analýzách nejbližším druhu *A. laqueata*.

## 5. DISKUSE

### 5.1 Vyhodnocení molekulárních analýz

Všechny analýzy (obr. 6–11) shodně ukazují na to, že skupina *Acarospora fuscata*, v současném pojetí, charakteristická obsahem kyseliny gyroforové, je silně parafyletická. Někteří zástupci jsou blízce příbuzní hnědým taxonům bez obsahu gyroforové kyseliny (např. *A. nitrophila*). Jiní jsou dokonce blízcí žlutým druhům obsahujícím kyselinu rhizokarpovou (*A. schleicheri* a *A. socialis*). Tento fakt zpochybňuje význam sekundárních metabolitů jako signifikantního znaku pro identifikaci skupiny.

Zkoumané vzorky druhu *Acarospora thamnina* se v analýzách sdružují se sekvencemi tohoto druhu a druhu *Acarospora socialis* z databáze GenBank (obr. 17). V obou případech se jedná o severoamerické druhy s podobnou ekologií, ale velmi rozdílnou morfologií. Zatímco *Acarospora thamnina* patří mezi hnědé zástupce rodu s kyselinou gyroforovou, *Acarospora socialis* se vyznačuje žlutou stélkou a velkou morfologickou variabilitou. Oba druhy se vyskytují na stanovištích se suchým klimatem, kde se chovají poměrně kompetitivně a často přerůstají stélky jiných druhů.

*Acarospora pseudofuscata* je nedávno určený druh (Sipman et Raus 2002), jehož sekvence zatím nebyly do databáze GenBank zaneseny. Ve fylogenetických stromech tvoří poměrně dobře ohraničený klád se sekvencí nazvanou *Acarospora laqueata*. Tento druh neobsahuje kyselinu gyroforovou a liší se ekologií. Zatímco u druhu *Acarospora laqueata* uvádí Magnusson (1929) habitat vápenaté skály, *Acarospora pseudofuscata* je známa zatím jen z Řeckých ostrovů, kde se vyskytuje na křemičitých skalách (Sipman et Raus 2002). Je možné, že sekvence pojmenovaná *A. laqueata* v GenBank je ve skutečnosti *A. pseudofuscata*.

Všechny markery ukazují v analýzách kompaktní, dobře odlišenou skupinu *Acarospora fuscata*, která obsahuje zkoumané druhy *Acarospora umbilicata* (vzorky 9, 13 a 18), (obr. 15), *Acarospora gallica* (vzorky 14, 19 a 20), (obr. 14) a *Acarospora fuscata* (1, 7, 15, 16, 21, 22), (obr. 12). Rozlišení těchto taxonů na druhové úrovni použité markery nepodporují, možná se jedná o morfotypy jednoho druhu. *Acarospora complanata*, *A. nitrophila*, *A. schleicheri*, *A. contigua*, *A.*

*peliscypha*, *A. bullata* a *A. rugulosa* jsou blízce příbuzné k *A. fuscata*, což odpovídá výsledkům výzkumu Crewe et al. (2006).

Vzorky 6 a 11 (obr. 13), původně určené jako *Acarospora fuscata* se v analýzách přiřadily k sekvenci druhu *Acarospora peliscypha*. Oba druhy obsahují kyselinu gyroforovou a mají podobnou morfologii a ekologii – jedná se o acidofilní, heliofilní a nitrofilní druhy osidlující exponovaná stanoviště na křemičitých skalách (Wirth 1995).

Alignment a molekulární analýzy rodu *Acarospora* budí dojem, že v některých skupinách se hromadí genotypová a fenotypová variabilita, přičemž nedochází ke speciacím. Např. *Acarospora fuscata* s. lat., zahrnující morfologicky definované taxony *A. complanata*, *A. gallica*, *A. nitrophila* a *A. umbilicata*, čítá velké množství haplotypů (genotypová variabilita) a fenotypových variant, ovšem fenotypové znaky jsou zpravidla v konfliktu s genotypovými daty. Vysvětlení je možné hledat v podobné ekologii všech zahrnutých populací, které se trvale vyskytují na stejných stanovištích, kde rostou v těsném kontaktu a dochází mezi nimi pravděpodobně k neustálému genetickému toku, který brání speciacím.

## 5.2 Posouzení využitelnosti DNA-markerů

Markery pro molekulární analýzu byly zvoleny na základě práce, zabývající se blízce příbuzným druhem *Acarospora smaragdula* (Wedin 2009). Byly vybrány ze tří rozdílných oblastí genomu tak, aby dávaly pokud možno nezávislý signál. ITS je nekódující součást jaderného ribozomálního RNA genu, který se v genomu vyskytuje v mnoha kopiích. B-tubulin je kódující low-copy jaderný gen obsahující introny (v případě studovaného data setu dva introny). MtSSU je mitochondriální ribozomální RNA multi-copy gen.

B-tubulin je některými autory zatracován (Hubka 2011; Keeling et al. 2000) hned z několika důvodů: 1. rychlá mutační rychlost v třetích pozicích kodónů může vést k saturaci, t. j. ke zpětným mutacím do původního stavu (např. T → A → T). 2. Výskyt pseudogenů či paralogů, které představují významný problém pro studium molekulární evoluce a systematické práce (Cotton 2005). Pro studovaný dataset se zdá β-tubulin být naopak vhodným markerem, který, jako jediný z použitých,

rozlišuje taxony okolo *Acarospora fuscata* se 100% bootstrapovou podporou (obr. 8). Saturace zřejmě neohrožuje signál tohoto markeru, jestliže pracujeme na relativně nízké taxonomické úrovni (úroveň čeledi, rodu, druhu). Výskyt paralogů nelze vyloučit, ovšem pseudogeny se ve studovaném datasetu nevyskytly, což ukazuje přepis do bílkoviny (identické sekvence aminokyselin, obr. 5). Nevýhoda  $\beta$ -tubulinu pro fingerprinting je nedostatečné množství dat v GenBank. To je vidět v tabulce 7, kde BLASTové hodnoty podobnosti s nejbližšími sekvencemi z GenBank většinou nedosahují 90%, což znamená, že jde o jiné taxony.

ITS a mtSSU mají přibližně podobnou topologii jako  $\beta$ -tubulin. Jednotlivé fylogenetické rekonstrukce se však silně liší kostrou stromů. Také podpory skupin na úrovni druhů jsou u těchto dvou markerů nižší. Výhodou těchto markerů oproti  $\beta$ -tubulinu je vyšší počet sekvencí v databázi GenBank, což umožňuje prosté BLASTové srovnávání.

V naprosté většině případů zvolené přístupy potvrzují výsledky, získané z aplikace BLAST ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)). Dá se tedy říct, že prosté srovnávání sekvencí pomocí algoritmu BLAST je v případě zkoumaného datasetu dostatečně přesné pro identifikaci sekvencí (molekulární fingerprinting). Doporučuje se však ověřovat výsledky z BLASTu některým typem molekulárních analýz. Pro studovaný dataset je nejvhodnější Maximum likelihood, protože poskytuje fylogenetické rekonstrukce s dobře rozlišenou kostrou a celkem dobré podpory zájmových skupin (obr. 6, 7, 8).

## 6. ZÁVĚR

- Podařilo se získat sekvence tří lokusů DNA (11 sekvencí ITS, 21 sekvencí mtSSU a 6 sekvencí  $\beta$ -tubulinu)
- Byly provedeny fylogenetické analýzy studovaných lokusů - Neighbour-joining, Maximum likelihood (obr. 6,7,8), Maximum parsimony (obr. 9, 10, 11).
- V případě zkoumaného datasetu poskytují Maximum likelihood a Maximum parsimony podobné fylogenetické rekonstrukce, ovšem Maximum likelihood lépe rozlišuje vnitřní strukturu fylogenetického stromu a jednotlivé skupiny jsou lépe podpořeny bootstrapovou analýzou.
- Analýza  $\beta$ -tubulinu nejlépe rozlišuje morfologicky definované taxony, ovšem jeho nevýhoda pro molekulární fingerprinting je nedostatek sekvencí v databázi GenBank. Rekonstrukce fylogeneze ITS a mtSSU mají podobnou topologii jako  $\beta$ -tubulin, ovšem morfologicky definované skupiny jsou zde slabě podpořené. ITS je nejvhodnější marker z hlediska množství sekvencí dostupných v databázi GenBank.
- Na základě molekulárního fingerprintingu byla provedena revize herbářových položek (tab. 8) původně určených na základě fenotypových znaků.

### Nulové hypotézy

- Skupina *Acarospora fuscata* tvoří přirozený monofyletický taxon.

Diagnostické znaky skupiny *Acarospora fuscata* (přítomnost kyseliny gyroforové, hnědá stélka) necharakterizují jedinou fylogeneticky podpořenou skupinu, ale vyskytují se v různých částech fylogenetických stromů. Skupina *Acarospora fuscata* není přirozeným monofyletickým taxonem.

- Morfologicky definované druhy uvnitř skupiny *Acarospora fuscata* jsou přirozenými monofyletickými taxony.

Nebylo získáno dostatečné množství dat pro smysluplné testování této hypotézy, nicméně ukazuje se, že sekvence morfologicky definovaných druhů *A. gallica* a *A. umbilicata* netvoří monofyletické skupiny, ale jsou rozptýleny uvnitř kládu *Acarospora fuscata*. Rovněž sekvence druhů *Acarospora pseudofuscata*, *A. peliscypha* a *A. thamnina* tuto hypotézu vyvracejí. *Acarospora pseudofuscata* a *A. thamnina* tvoří klády s morfologicky odlišnými druhy (obr. 17, 18), které ve fylogenetických stromech stojí mimo skupinu *A. fuscata*. *Acarospora peliscypha* se v analýzách vyskytuje uvnitř skupiny *A. fuscata*, zároveň ale zaujímá i jiné pozice mimo tento klád.

## 7. PŘEHLED LITERATURY A POUŽITÝCH ZDROJŮ

AGUILETA G., MARTHEY S., CHIAPELLO H., LEBRUN M. H., RODOLPHE F., FOURNIER E., GENDRAULT-JACQUEMARD A. et GIRAUD T. (2008): Assessing the Performance of Single-Copy Genes for Recovering Robust Phylogenies. *Systematic Biology* 57: 613–627.

AHMADJIAN V. (1993): *The Lichen Symbiosis*. New York: John Wiley.

ARAS S. et CANSARAN D. (2006): Isolation of DNA for Sequence Analysis from Herbarium Material of Some Lichen Specimens. *Turkish Journal of Botany* 30: 449–453.

ARCADIA L. et KNUDSEN K. (2012): The name *Myriospora* is available for the *Acarospora smaragdula* group. *Opuscula Philolichenum*, 11: 19–25.

ARMALEO D. et CLERC P. (1990): Lichen chimeras: DNA analysis suggests that one fungus forms two morphotypes. *Experimental Mycology* 15: 1–10.

ARMALEO D. et CLERC P. (1995): A rapid and inexpensive method for the purification of DNA from lichens and their symbionts. *Lichenologist* 27: 207–213.

BAZZICALUPO A. L., BÁLINT M. et SCHMITT I. (2013): Comparison of ITS1 and ITS2 rDNA in 454 sequencing of hyperdiverse fungal communities. *Fungal Ecology* 6: 102–109.

BEGEROW D., JOHN B. et OBERWINKLER F. (2004): Evolutionary relationships among  $\beta$ -tubulin gene sequences of basidiomycetous fungi. *Mycological Research* 108: 1257–1263.

BLAALID R., KUMAR S., NILSSON R. H., ABARENKOV K., KIRK P. M. et KAUSERUD H. (2013): ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Molecular Ecology Resources*, volume 13: 218–224.

BRIDGE P. D. et HAWKSWORTH D. L. (1998): What Molecular Biology has to Tell us at the Species Level in Lichenized Fungi. *The Lichenologist* 30: 307–320.

BRUNS T. D. et SZARO T. M. (1992): Rate and mode differences between nuclear and mitochondrial small-subunit rRNA genes in mushrooms. *Molecular Biology and Evolution* 9: 836–855.

BRUNS T. D., FOGEL R. et TAYLOR J. W. (1990): Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. *Mycologia* 82: 175–184.

COTTON J. A. (2005): Analytical methods for detecting paralogy in molecular datasets. *Methods in Enzymology* 395: 700–724.

CRESPO A., BRIDGE P. D. et HAWKSWORTH D. L. (1997): Amplification of fungal rDNA-ITS regions from non-fertile specimens of the lichen-forming genus *Parmelia*. *Lichenologist* 29: 275–282.

CREWE A. T., PURVIS O. W. et WEDIN M. (2006): Molecular phylogeny of *Acarosporaceae* (Ascomycota) with focus on the proposed genus *Polysporinopsis*. — *Mycological Research* 110: 521–526.

CUBERO O., CRESPO A., FATEHI J. et BRIDGE P. D. (1999): DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized and other fungi. *Plant systematics and Evolution* 216: 243–249.

DE PRIEST P. (2004): Early molecular investigations of lichen-forming symbionts: 1986–2001. *Annual Review of Microbiology* 58: 273–301.

DEREEPER A., GUIGNON V., BLANC G., AUDIC S., BUFFET S., CHEVENET F., DUFAYARD J. F., GUINDON S., LEFORT V., LESCOT M., CLAVERIE J. M., GASCUEL O. *Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist*. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jul 1;36(Web Server issue):W465-9. Epub 2008 Apr 19. (PubMed)

FROSLEV T. G., MATHENY P. B. et HIBBETT D. S. (2005): Lower level relationships in the mushroom genus *Cortinarius* (Basidiomycota, Agaricales): A comparison of RPB1, RPB2, and ITS phylogenies. *Molecular phylogenetics and evolution* 37: 602–618.

GARDES M. et BRUNS T. D. (1993): ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113–118.

GARGAS A., DE PRIEST P. T., GRUBE M. et TEHLER A. (1995): Multiple origins of lichen symbiosis in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. *Science* 268: 1492–1495.

GOLUBKOVA N. S. (1988): *Lishajniki semejstva Acarosporaceae Zahlbr. V SSSR*. Nauka, Leningrad, 132 pp.

GONZALEZ P., BARROSO G. et LABARERE J. (1997): DNA sequence and secondary structure of the mitochondrial small subunit ribosomal RNA coding region including a group-IC2 intron from the cultivated basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *Gene* 184: 55–63.

GRUBE M. et KROKEN S. (2000): Molecular approaches and the concept of species and species complexes in lichenized fungi. *Mycological Research* 104: 1284–1294.

GRUBE M., DE PRIEST P. T., GARGAS A. et HAFELLNER J. (1995): DNA isolation from lichen ascomata. *Mycological Research* 99: 1321–1324.

- HAFELLNER J. (1984): Studien in Richtung einer naturlicheren Gliederung der Sammelfamilien Lecanoraceae und Lecideaceae. Beitrage zur Lichenologie. Festschrift J. Poelt. Beihefte zur Nova Hedwigia 79: 241–371.
- HAFELLNER J. (1995): Towards a better circumscription of the Acarosporaceae (Lichenized Ascomycotina, Lecanorales). Cryptogamic Botany 5, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 99–105 pp.
- HAFEZ M. et HAUSNER G. (2011): The highly variable mitochondrial small-subunit ribosomal RNA gene of *Ophiostoma minus*. Fungal Biology 115: 1122–1137.
- HARRIS R. C. et KNUDSEN K. (2006): The Genus Myriospora. Opuscula Philolichenum 3: 1–3.
- HIBBETT D. S. et DONOGHUE M. J. (1995): Progress toward a phylogenetic classification of the Polyporaceae through parsimony analysis of mitochondrial ribosomal DNA sequences. Canadian Journal of Botany 73: 853–861.
- HOLDER J. M., WYNN-WILLIAMS D. D., RULL PEREZ F. et EDWARDS H. G. (2000): Raman spectroscopy of pigments and oxalates *in situ* within epilithic lichens: *Acarospora* from the Antarctic and Mediterranean. — New Phytologist 145: 271–280.
- HOFSTETTER V., MIADLIKOWSKA J., KAUFF F. et LUTZONI F. (2007): Phylogenetic comparison of protein-coding versus ribosomal RNA-coding sequence data: A case study of the Lecanoromycetes (Ascomycota). Molecular Phylogenetics and Evolution 44: 412–426.
- HUBKA V. (2011): Geny  $\beta$ -tubulinových paralogů u rodu *Aspergillus*: taxonomický význam a markery použitelné v jejich rozlišení. Nепublikováno, dep.: Repozitář závěrečných prací Univerzity Karlovy.
- KEELING, P. J., M. A. LUKER et J. D. PALMER (2000): Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. Molecular Biology and Evolution 17: 23–31.
- KNUDSEN K. (2007): *Acarospora*. In: NASH T. H., GRIES C. et BURGARTZ F.[eds], Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region Vol. 3., Lichens Unlimited, Arizona State University, 567 pp.
- KNUDSEN K. et KOCOURKOVÁ J. (2010): Lichenological notes 1: *Acarosporaceae*. Mycotaxon 112: 361–366.
- KNUDSEN K., REEB V., WESTBERG M., SRIKANTHA R. et BHATTACHARYA D. (2010): *Acarospora rosulata* in Europe, North America and Asia. The Lichenologist 42: 291–296.



- KNUDSEN K. et KOCOURKOVÁ J. (2012): Lichenological notes 4: a revision of *Acarospora gallica* (*Acarosporaceae*). *Mycotaxon* 119: 373–380.
- LANDVIK S., SHAILER N. F. J. et ERIKSSON O. (1996): SSU rDNA sequence support for a close relationship between the Elaphomycetales and the Eurotiales and Onygenales. *Mycoscience* 37: 237–241.
- LEE S. B., MILGROOM M. G. et TAYLOR J. W. (1988): A rapid, high-yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Genetics Newsletter* 35: 23–24.
- LEE S. B. et TAYLOR J. W. (1990): Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* (INNIS M. A., GELFAND J. J., SNINSKY, WHITE T. J.[eds]), San Diego, Academic Press: 282–287.
- LUTZONI F., PAGEL M. et REEB V. (2001): Major fungal lineages are derived from lichen symbiotic ancestors. *Nature* 411: 937–940.
- LUTZONI F., KAUFF F., COX C. J., McLAUGHLIN D., CELIO G., DENTINGER B., PADAMSEE M., HIBBETT D., JAMES T. Y., BALOCH E., GRUBE M., REEB V., HOFSTETTER V., SCHOCH C., ARNOLD A. E., MIADLIKOWSKA J., SPATAFORA J., JOHNSON D., HAMBLETON S., CROCKETT M., SCHOEMAKER R., SUNG G. H., LÜCKING R., LUMBSCH T., O'DONNELL K., BINDER M., DIEDERICH P., ERTZ D., GUEIDAN C., HANSEN K., HARRIS R. C., HOSAKA K., LIM Y-W., MATHENY B., NISHIDA H., PFISTER D., ROGERS J., ROSSMAN A., SCHMITT I., SIPMAN H., STONE J., SUGIYAMA J., YAHR R. et VILGALYS R. (2004): Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany* 91: 1446–1480.
- MAGNUSSON A. H. (1929): A monograph of the genus *Acarospora*. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar*.
- MACHOLÁN M. (2014): *Základy fylogenetické analýzy*. Brno: Masarykova univerzita, 289 s. ISBN978-80-210-6363-1. DOI: 10.5817/CZ.MUNI.M210-6363-2014.
- MARTÍN M. P. et WINKA K. (2000): Alternative methods of extracting and amplifying DNA from lichens. *Lichenologist* 32: 189–196.
- MIADLIKOWSKA J. et LUTZONI F. (2004): Phylogenetic classification of peltigerelean fungi (Peltigerales, Ascomycota) based on ribosomal RNA small and large subunits. *American Journal of Botany* 91: 449–464.

MIADLIKOWSKA J., KAUFF F., HÖGNABBA F., OLIVER J. C., MOLNÁR K., FRAKER E., GAYA E., HAFELLNER J., HOFSTETTER V., GUEIDAN C., OTÁLORA M. A. G., HODKINSON B., KUKWA M., LÜCKING R., BJÖRK C., SIPMAN H. J. M., BURGAZ A. R., THELL A., PASSO A., MYLLYS L., GOWARD T., FERNÁNDEZ-BRIME S., HESTMARK G., LENDEMER J., LUMBSCH H. T., SCHMULL M., SCHOCH C., SÉRUSIAUX E., MADDISON D. R., ARNOLD A. E., LUTZONI F. et STENROOS S. (2014): A multigene phylogenetic synthesis for the class Lecanoromycetes (Ascomycota): 1307 fungi representing 1139 infrageneric taxa, 317 genera and 66 families. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 79: 132–168.

MONARD C., GANTER S. et STENLID J. (2013): Utilizing ITS1 and ITS2 to study environmental fungal diversity using pyrosequencing. *Federation of European Microbiological Societies – Microbiology Ecology* 84: 165–175.

MULLINEUX T. et HAUSNER G. (2009): Evolution of rDNA ITS1 and ITS2 sequences and RNA secondary structures within members of the fungal genera *Grosmannia* and *Leptographium*. *Fungal Genetics and Biology* 46: 855–867.

NASH T. H. [ed] (2008): *Lichen Biology*. Cambridge University Press, 486 p.

NIELSSON R. H., KRISTIANSSEN E., RYBERG M. et al. (2008): Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics* 4: 193–201.

ORANGE A., JAMES P. W. et WHITE F. J. (2001): *Microchemical Methods for the Identification of Lichens*. British Lichen Society, 101 pp.

PRINTZEN C. (2010): Lichen Systematics: The Role of Morphological and Molecular Data to Reconstruct Phylogenetic Relationships. *Progress in Botany* 71: 233–275.

REEB V., LUTZONI F. et ROUX C. (2004): Contribution of RPB2 to multilocus phylogenetic studies of the Pezizomycotina (Eurascomycetes, Fungi) with special emphasis on the lichenforming Acarosporaceae and evolution of polyspory. *Molecular Phylogenetics and evolution* 32: 1036–1060.

RITLAND C. E., RITLAND K. et STRAUS N. A. (1993): Variation in the Ribosomal Internal Transcribed Spacers (ITS1 and ITS2) among Eight Taxa of the *Mimulus guttatus* Species Complex. *Molecular Biology and Evolution* 10(6): 1273–1288.

ROUX C. et NAVARRO-ROSINÉS P. (2011): *Trimmatothelopsis* (Acarosporaceae, Ascomycota lichenisati), the legitimate name of *Silobia*. *Bull. Soc. linn. Provence* 65: 167–187.

RYBERG M., KRISTIANSOON E., SJÖKVIST E. et NILSSON R. H. (2008): An outlook on the fungal internal transcribed spacer sequences in GenBank and the introduction of a web-based tool for the exploration of fungal diversity. *New Phytologist* 181: 471–477.

SCHOCH C. L., SEIFERT K. A., HUHDORF S., ROBERT V., SPOUGE J. L., LEVESQUE C. A., CHEN W., BOLCHACOVA E., VOIGT K., CROUS P. W. et al. (2012): Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 6241–6246.

SCHWENDENER S. (1869): *Die Algentypen der Flechtengonidien*. Basel: Schultze.

SIPMAN H. J. M. et RAUS T. (2002): An inventory of the lichen flora of Kalimnos and part of Kos (Dodecanisos, Greece). *Willdenowia* 32: 351–392.

SMITH C. W., APTROOT A., COPPINS B. J., FLETCHER A., GILBERT O. L., JAMES P. W. et WOLSELEY P. A. [eds.] (2009): *The Lichen Flora of Great Britain and Ireland*. British Lichen Society, London, 1046 pp.

STENROOS S. K. et DEPRIEST P. T. (1998): SSU rDNA phylogeny of cladoniiform lichens. – *American Journal of Botany* 85: 1548–1559.

ŠMARDA J., DOŠKAŘ J., PANTŮČEK R., RŮŽIČKOVÁ V. et KOPTÍKOVÁ J. (2010): *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno, 188 pp.

THOMPSON J. D., HIGGINS D. G. et GIBSON T. J. (1994): CLUSTA W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680.

VĚZDA A. (1978): Neue oder wenig bekannte Flechten in der Tschechoslowakei II. – *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica*, Vol. 13, Springer, 397–420.

VĚZDA A. et LIŠKA J. (1999): *Katalog lišejníků České republiky*. Botanický ústav ČSAV, Průhonice, 283 s.

WALKER D. M., CASTLEBURY L. A., ROSSMAN A. Y. et WHITE J. F. Jr. (2012): New molecular markers for fungal phylogenetics: two genes for species-level systematics in the Sordyriomycetes (Ascomycota). *Molecular Phylogenetic Evolution* 64: 500–512.

WEDIN M., WIKLUND E., CREWE A., DORING H., EKMAN S., NYBERG A., SCHMITT I. et LUMBSCH H. T. (2005): Phylogenetic relationships of *Lecanoromycetes* (Ascomycota) as revealed by analyses of mtSSU and nLSU rDNA sequence data. *Mycological research*: 159–172.

WEDIN M., WESTBERG M., CREWE A. T., TEHLER A. et PURVIS W. O. (2009): Species delimitation and evolution of metal bioaccumulation in the lichenized *Acarospora smaragdula* (Ascomycota, Fungi) complex. *Cladistics* 25: 161–172.

WESTBERG M. et WEDIN M. (2011): The identity of *Trimmathothelopsis versipellis* (Nyl.) Zschacke. *The Lichenologist* 43: 373–375.

WESTBERG M., CREWE A. T., PURVIS W. O. et WEDIN M. (2011): *Silobia*, a new genus for the *Acarospora smaragdula* complex (Ascomycota, *Acarosporales*) and a revision of the group in Sweden. *The Lichenologist* 43: 7–25.

WIRTH V. (1995): Die Flechten Baden-Württembergs, Teil 1. Eugen Ulmer GmbH & Co. Stuttgart, 527 pp.

WIRTH V., HAUCK M. et SCHULTZ M. (2013): Die Flechten Deutschlands. Band 1. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 1244 pp.

WHITE T. J., BRUNS T., LEE S. et TAYLOR J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. – In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White), New York, Academic Press: 315–322.

ZAHLBRÜCKNER A. (1907): Lichens, Spezieller Teil. In: ENGLER A. et PRANTL K. [Eds.], *Die natürlichen Pflanzenfamilien I.*, Verlag von W. Engelmann, Leipzig, 49–249 pp.

ZIMA J., MACHOLÁN M., MUNCLINGER P. et PIÁLEK J. (2004): Genetické metody v zoologii. Univerzita Karlova, Praha, 239 s.

ZOLLER S., SCHEIDEGGER CH. et SPERISEN CH. (1999): PCR primers for the amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of lichen-forming Ascomycetes. *Lichenologist* 31: 511–516.

#### **Internetové zdroje:**

Duke University – Department of Biology, Durham, USA: rDNA primer sequences for fungal sequencing. <http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm> [10. 11. 2013]

HERBSTOVÁ M., KOUTECKÝ P. et KOŠNAR J. (2008): *Metody molekulární biologie v rostlinné ekologii a systematice*. Přírodovědecká fakulta JCU, České Budějovice, [botanika.bf.jcu.cz/laboratory/doc/NavodyPraktikum.pdf](http://botanika.bf.jcu.cz/laboratory/doc/NavodyPraktikum.pdf) [21. 11. 2013]

PřF JCU: *Metody izolace DNA*. Laboratoř molekulární biologie rostlin PřF JU, České Budějovice, [botanika.bf.jcu.cz/laboratory/izolace.html](http://botanika.bf.jcu.cz/laboratory/izolace.html) [16. 11. 2013]

QIAGEN (2012): DNeasy Plant Mini Kit and DNeasy Plant Maxi Kit Handbook.  
<http://www.qiagen.com/resources/resourcedetail?id=95dec8a9-ec37-4457-8884-5dedd8ba9448&lang=en> [1. 9. 2014]

RACLAVSKÝ V. (2003): Metody molekulární genetiky.  
<http://biologie.upol.cz/metody/> [1. 9. 2014]