

**Univerzita Hradec Králové**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra biologie**

**Izolace DNA z plodnic lišejníků rodu *Lecidea*  
pomocí různých izolačních technik a analýza  
sekvencí ITS regionu pomocí primerů ITS1 a  
ITS4**

Diplomová práce

Autor: Bc. Karolína Havlová  
Studijní program: N0588A030001  
Studijní obor: Systematická biologie a ekologie –  
specializace biologie rostlin  
Vedoucí práce: RNDr. Josef Halda, PhD.

Hradec Králové

květen 2022



## Zadání diplomové práce

**Autor:** Karolína Havlová

**Studium:** S20BI001NP

**Studijní program:** N0588A030001 Biologie a ekologie

**Studijní obor:** Biologie rostlin

**Název diplomové práce:** **Izolace DNA z plodnic lišejníků rodu *Lecidea* pomocí různých izolačních technik a analýza sekvencí ITS regionu pomocí primerů ITS1 and ITS4**

**Název diplomové práce AJ:** DNA isolation from lichen ascomata of the genus *Lecidea* using various isolation kits and a sequence analysis of the ITS region using primers ITS1 and ITS4

### **Cíl, metody, literatura, předpoklady:**

Cílem práce bude zjistit mezidruhové genetické vztahy morfologicky obtížně rozlišitelných druhů lišejníků rodu *Lecidea* (šálečka) ze vzorků nasbíraných na území ČR pomocí sekvencí získaných izolací DNA různými izolačními postupy. Výstupem bude kladogram vzájemných vztahů jednotlivých druhů.

Rod šálečka je ve střední Evropě obecně málo známým rodem a determinace působí odborníkům problémy. Analýza sekvencí a studium mezidruhových vztahů je přínosným tématem.

Čurn V., Tonka T., Křížová L. & Jozová E. (2019): Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů u hub. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta, 5. S., ISBN: 978-80-7394-781-1

Grube M., DePriest P.T. Gargas A. & Hafellner J. (1995): DNA isolation from lichen ascomata. - *Mycological Research*, 99(11): 1321-1324.

McCune B., Timdal E. & Bendiksby M. (2016): *Rhizocarpon quinonum*, a new anthraquinone-containing species from the Alaska Peninsula. - *Lichenologist*, 48(5): 367-375.

Ruprecht U., Lumbsch H.T., Brunauer G., Green T.G.A. & Türk R. (2010): Diversity of *Lecidea* (*Lecideaceae*, *Ascomycota*) species revealed by molecular data and morphological characters. - *Antarctic Science*, 22(6): 727-741.

Schmull M., Miadlikowska J., Pelzer M., Stocker-Wörgötter E., Hofstetter V., Fraker E., Hodgkinson B.P., Reeb V., Kukwa M., Lumbsch H.T., Kauff F. & Lutzoni F. (2011): Phylogenetic affiliations of members of the heterogeneous lichen-forming fungi of the genus *Lecidea* sensu Zahlbruckner (*Lecanoromycetes*, *Ascomycota*). - *Mycologia*, 103(5): 983-1003.

**Garantující pracoviště:** Katedra biologie,  
Přírodovědecká fakulta

**Vedoucí práce:** RNDr. Josef Halda, Ph.D.

**Datum zadání závěrečné práce:** 23.1.2020

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, ze kterých jsem čerpala.

V Hradci Králové dne

Karolína Havlová

## **PODĚKOVÁNÍ**

V první řadě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé práce RNDr. Josefovi Haldovi, PhD. Za odborné vedení, cenné rady, vstřícnost a trpělivost, kterou měl při vedení mé práce. Dále bych chtěla poděkovat Univerzitě Hradec Králové, která mi poskytla zázemí. V neposlední řadě patří velký dík mě rodinně a nejbližším přátelům, kteří mě při psaní práce a během celého studia podporovali.



## **ANOTACE**

HAVLOVÁ, K., 2022: *Izolace DNA z plodnic lišejníků rodu Lecidea pomocí různých izolačních technik a analýza sekvencí ITS regionu pomocí primerů ITS1 and ITS4*. Hradec Králové, 2022. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové.

Ve své diplomové práci se zabývám izolací DNA a zjištěním mezidruhových genetických vztahů druhů lišejníků rodu *Lecidea* (šálečka) ze vzorků, které byly nasbírány v horských oblastech České republiky. Teoretická část obsahuje charakteristiku druhu a lišejníků obecně. Dále se zde věnuji principům vybraných izolačních postupů a blíže popisuji ITS region a primery ITS 1, ITS 4. V průběhu práce jsem se také rozhodla využít i region mtSSU s primery mrSSU1, mrSSU3R. Praktická část obsahuje metodiku odběru a zpracování vzorků dle jednotlivých izolačních postupů, jednotlivé výsledky sekvenace DNA a souhrnné výsledky vyznačené v kladogramu.

### **Klíčová slova:**

*Lecidea*, šálečka, DNA barcoding, primery ITS1, ITS4, mrSSU1, mrSSU3R

## **ANNOTATION**

HAVLOVÁ, K., 2022: *DNA isolation from lichen ascomata of the genus Lecidea using various isolation kits and a sequence analysis of the ITS region using primers ITS1 and ITS4*. Hradec Králové, 2022. Diplomová práce na Fakultě vědy Univerzity v Hradci Králové.

My diploma thesis is focusing on DNA isolation and describing interspecific genetic relationships of lichen species of the genus *Lecidea* from samples collected in the mountain areas of the Czech Republic. The theoretical part contains characteristics of the species and lichens in general. Furthermore, I dealt with the principles of the chosen isolation procedures and described in more detail the ITS and mtSSU region and primers ITS 1, ITS 4. During the work, I also decided to use the mtSSU region with primers mrSSU1, mrSSU3R. The practical part contains the methodology of sampling and processing according to individual isolation procedures, individual results of DNA sequencing and summary results marked in the cladogram.

### **Key words:**

*Lecidea*, šálečka, DNA barcoding, primers ITS1, ITS4, mrSSU1, mrSSU3R

# Obsah

1	Úvod.....	9
1.1	Cíle práce.....	10
2	Teoretická část.....	11
2.1	Charakteristika lišejníků .....	11
2.1.1	Mykobiont.....	11
2.1.2	Fotobiont.....	12
2.1.3	Chemismus lišejníků.....	12
2.1.4	Anatomie stélky .....	13
2.1.5	Morfologie stélky .....	13
2.1.6	Rozmnožování.....	14
2.1.7	Výskyt a význam lišejníků .....	14
2.2	Rod Šálečka ( <i>Lecidea</i> ).....	15
2.2.1	Studované druhy r. <i>Lecidea</i> .....	17
2.3	Identifikace rodu <i>Lecidea</i> pomocí DNA .....	18
2.3.1	DNA-barcoding .....	19
2.3.2	Metody používané pro získání DNA-barcode .....	20
2.3.3	Region ITS.....	22
3	Metodika.....	24
3.1	Odběr lišejníkových položek .....	24
3.2	Metody.....	25
3.2.1	Izolace DNA metodou CTAB .....	25
3.2.2	Izolace DNA pomocí QIAamp DNA KITu.....	26
3.2.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR) s následnou elektroforézou .....	28
3.2.4	Sekvenování .....	29
3.2.5	Tvorba alignmentů s následným vytvořením kladogramu .....	29
4	Výsledky .....	31

4.1	PCR a elektroforéza .....	31
4.2	Molekulární analýzy a navazující rekonstrukce kladogramů .....	32
4.2.1	Sekvence ITS úseku .....	32
4.2.2	Chybně určené druhy dle anatomických a morfologických znaků odhalené analýzou ITS .....	34
4.2.3	Sekvence mtSSU úseku .....	37
4.2.4	Chybně určené druhy dle anatomických a morfologických znaků odhalené analýzou mtSSU .....	38
5	Diskuse .....	41
6	Závěr .....	45
	Literatura .....	46
	Internetové zdroje .....	51
	Přílohy .....	52
	Příloha č. I .....	52

## 1 Úvod

Rod *Lecidea* s. lat. (šálečka) patří mezi lišejníky k druhově nejpočetnějším rodům (1200 druhů, SCHMULL et al., 2011). V současném systematickém pojetí (HERTEL, 1995) obsahuje rod *Lecidea* mnoho druhů obtížně determinovatelných tradičními metodami. Tyto metody jsou založené na rozdílech anatomických a morfologických znaků (HERTEL, 2009) a jsou pro začátečníka v oboru lichenologie málo použitelné. Proto jsem se rozhodla k determinaci vzorků lišejníků r. *Lecidea* použít metodu DNA barcoding (HALICI & KAHRAMAN, 2021). Metoda se v současné době používá nejen v mykologii, ale i v botanice (VERE et al., 2015) a zoologii (PURTY et CHATTERJEE, 2016) v případech, kdy je systematické zařazení taxonů obtížné nebo nemožné za pomoci běžných metod.

## 1.1 Cíle práce

Hlavním cílem mé diplomové práce je zjistit mezidruhové genetické vztahy morfologicky obtížně rozlišitelných druhů lišejníků rodu *Lecidea* z herbářovaných a čerstvých vzorků nasbíraných v horských oblastech ČR analýzou DNA sekvencí ITS regionu pomocí primerů ITS1 a ITS4. Pomocí kladogramu sestaveného ze získaných sekvencí přiblížit vzájemné vztahy jednotlivých druhů rodu *Lecidea*. V neposlední řadě si osvojit postup izolace DNA různými izolačními technikami.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Charakteristika lišejníků

Lišejníky se řadí k nejstarším organismům na Zemi. Jejich fosilní pozůstatky jsou staré až 400 milionu let (BEIMFORDE et al., 2014) a podílely se také na tvorbě kyslíkaté atmosféry. Jedná se spíše o dlouhověké organismy, jejichž stélky mohou dosahovat věku až tisíc let (MATTHEWS et TRENBIRTH, 2011). V tomto případě jde především o skalní lišejníky žijící v nevlídných podmínkách. Existují ovšem i druhy s rychlým životním cyklem, kdy celý cyklus proběhne během jednoho roku a poté zanikají (HALDA & KUČERA, 2016). Jsou to symbiotické organismy, které se skládají ze složky obsahující houbu (tzv. mykobiont) a složky obsahující nejčastěji zelenou řasu či sinici (tzv. fotobiont, fykobiont či cyanobiont). Můžeme se ovšem setkat i s lišejníky, které obsahují dva a více fotobiontů. Soužití těchto dvou složek je označováno pojmem symbióza, ovšem povaha symbiózy lišejníků je stále velmi nejasná. Někteří autoři označují tento vztah jako mutualistický, kdy oba partneři mají ze svého soužití užitek (NASH, 2008). Fotobiont zajišťuje díky fotosyntéze pro organismus organické látky, zatímco mykobiont dodává vodu a látky anorganické (KALINA & VÁŇA, 2005). Někdy je tento vztah uváděn jako typ kontrolovaného parazitismu, jelikož mykobiont dobře profituje, zatímco u fotobionta může docházet k pomalejšímu růstu v lichenizované podobě, než kdyby rostl separovaně. V posledním případě může jít o komenzalismus, kdy mykobiont čerpá z fotosyntézy organické látky a má tak z koexistence větší prospěch, avšak zároveň fotobionta nijak nepoškozuje (NASH, 2008). Ve většině případů lišejníkové stélky převládá mykobiont a obvykle určuje i její morfologický tvar. Výjimečně pak dochází k rovnováze obou složek či je vzhled stélky dán fotobiontem (KALINA & VÁŇA, 2005). Vědecké názvy lišejníků jsou poté odvozeny od houbové složky, zatímco řasová složka má svůj samostatný název. Klasifikace je celkově založena na mykobiontech a vytvořený lišejník nemá specifický název (SMITH et al., 2009). V současné době se počet zaznamenaných druhů lišejníků pohybuje kolem 13 až 17 tisíc a setkat s nimi můžeme od mořských pobřeží až po hory (NASH, 2008).

#### 2.1.1 Mykobiont

Mykobiontem bývá většinou zástupce z vřekovýtrusných hub (*Ascomycetes*), méně potom stopkovýtrusná houba (*Basidiomycetes*) (KREMER & MUHLE, 1998). Houba bývá více dominantní a určuje morfologii stélky. Navíc také vytváří plodnice, které jsou velmi

důležitým determinačním znakem (AHMADJIAN, 1993). Dříve se uvádělo, že každý lišejník je tvořen mykobiontem, který je vázaný pouze na jednoho fotobionta. V současné době však víme, že některé mykobionty jsou schopné tvořit lišejníkové stélky, které se od sebe morfologicky liší (morfortypy) (ARMALEO et CLERCK, 1991) nebo obsahují různé fotobionty. Existují i lišejníky, kdy u morfologicky nerozlišené stélky je přítomno více fotobiontů a není zde mykobiont, který by určoval její tvar (KALINA & VÁŇA, 2005).

### 2.1.2 Fotobiont

Existuje přibližně 40 rodů řas a sinic, které se vyskytují jako fotobionti u lišejníků (NASH, 2008). Nejvíce zástupců spadá do zelených řas a asi v 8 % jde o sinice (KALINA & VÁŇA, 2005). Nejčastěji se vyskytují rody *Trebouxia* (zelené řasy), *Trentepohlia* (zelené řasy) a *Nostoc* (sinice) (NASH, 2008). Zatímco mykobionti jsou jen ve výjimečných případech schopni samostatně existovat, fotobionti patří k řasám a sinicím, které se vyskytují i nezávisle. Vzhledem k tomu, že počet fotobiontů je daleko nižší než počet mykobiontů, dochází k tvorbě symbiózy s větším množstvím druhů hub a vytváří se tak odlišné druhy lišejníků (KOSECKA et al., 2021).

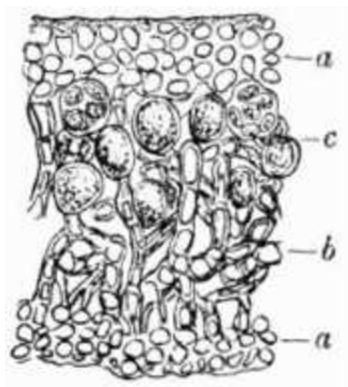
### 2.1.3 Chemismus lišejníků

Většina lišejníků produkuje specifické chemické sloučeniny. Tyto sloučeniny můžeme dělit do dvou skupin: primární metabolity (intracelulární sloučeniny) a sekundární metabolity (extracelulární sloučeniny). Mezi běžně vyskytující se intercelulární produkty patří proteiny, aminokyseliny, karotenoidy, polysacharidy a vitamíny, které jsou vázané v buněčné stěně a protoplastu (ORANGE et al., 2001). Některé produkty jsou syntetizované houbou a některé řasovou složkou. Většina intracelulárních produktů izolovaných z lišejníků je nesespecifická a vyskytují se také ve volně žijících houbách, řasách a vyšších rostlinách. Ovšem většina organických sloučenin nalezených v lišejnících jsou sekundární metabolity, které jsou spíše uloženy na povrchu hyf než v buněčné stěně. Veškeré sekundární metabolity jsou produkovány houbou. Patří mezi ně například orcinol, chromony, depsidy, dibenzofurany, xanthony nebo antrachinony (NASH, 2008). Tyto metabolity mohou zbarvovat lišejníky a napomáhat při determinaci obtížně odlišitelných druhů při kontaktu s čínidlem. Dále mohou sloužit jako ochrana před okusem, proti přímému slunečnímu záření nebo za jejich pomoci může lišejníková stélka ovlivnit růst okolních organismů (HALDA & KUČERA, 2016).



#### 2.1.4 Anatomie stélky

Anatomicky rozlišujeme dva stavební typy stélky lišejníků. U prvního z nich je ve stélce houbová i řasová složka stejnoměrně rozložena. V takovém případě se jedná o stélku homeomerickou (KREMER & MUHLE, 1998). Homeomerické lišejníky tvoří tenké krustozní, vláknité či houbovitě stélky (NASH, 2008). V druhém případě jde o stélku vrstevnatou neboli heteromerickou. Zde se fotobiont vyskytuje v tzv. řasové vrstvě a je tak oddělen od mykobionta (KALINA & VÁŇA, 2005). U těchto stélek dochází k morfologickému rozdělení na korovitou, keříčkovitou a lupenitou stélku. Heteromerická stélka je rozdělena do několika vrstev. Na svrchní straně (někdy i na spodní) bývá ohraničena korovitou vrstvou, která je tvořena z houbových hyf. Dále přechází v řasovou vrstvu, kde je fotobiont opleten buňkami mykobionta. Houbová složka tak vytváří intercelulární haustoria, které mohou narušovat buněčnou stěnu fotobionta. Patro s řasou navazuje na dřevnou vrstvu označovanou jako medulla a tvoří ji dlouhé hyfy hub, které jsou navzájem propletené (WIRTH et al., 2013).



*Obr.č.1: Stavba heteromerické stélky (Xanthoria parietina): a – korová vrstva, b – dřevná vrstva (medulla), c – řasová vrstva (SMITH, 1975).*

#### 2.1.5 Morfologie stélky

Lišejníky se běžně rozlišují do třech hlavních morfologických skupin: korovité (krustozní), lupenité (foliózní) a keříčkovité (frutikózní) lišejníky. Existuje řada dalších speciálních typů jako jsou rosolovité či vláknité lišejníky. Ovšem většina z nich může být řazena do jedné z hlavních tří skupin (NASH, 2008; KALINA & VÁŇA, 2005).

Korovité stélky jsou velmi pevně srostlé s podkladem a bývá velmi těžké je od sebe oddělit (KREMER & MUHLE, 1998). Můžeme je rozdělit na epilitické, které se vyskytují na skalních plochách a porůstají jejich povrch a endolitické, kde hyfy pronikají do substrátu

či půdy. Někdy jsou endolitické stélky celé či z části ponořeny do substrátu, nejčastěji jde o vápenec (SMITH, 1975). Lupenité stélky bývají zaokrouhlené a skládají se z lupenitých laloků (lobus). Strany laloků jsou rozlišeny na rubovou a lícovou stranu. K substrátu jsou na rubové straně přichyceny rhizinami. Do této skupiny můžeme řadit například již zmíněné vláknité lišejníky, jejichž stélku tvoří vlákno fotobionta opletené buňkami houbové složky (KREMER & MUHLE, 1998; SMITH, 1975). Keříčkovitá stélka přirůstá k podkladu jen malou částí. Je hojně rozvětvena a vzhledem připomíná keřík. U některých lišejníků tohoto typu jsou rozlišeny nálevkovité útvary, které na svém vrcholu mají plodničky. Spodní část bývá šupinatá (HALDA & KUČERA, 2016; KREMER & MUHLE, 1998).

### **2.1.6 Rozmnožování**

U lišejníků dochází k nepohlavnímu i pohlavnímu rozmnožování. K nepohlavnímu rozmnožování dochází při rozpadu stélky, kdy regenerací odlomené části poté vznikají noví jedinci. Nepohlavní rozmnožování probíhá také pomocí soredií. Jedná se o mikroskopické diaspory, které jsou tvořené buňkami řas a houbovými hyfami. Uvolňují se z míst zvaných sorály. Dalším typem nepohlavních struktur jsou izidie. Mají oválný tvar a na rozdíl od soredií je přítomna korová vrstva. U korovitých lišejníků se vytvářejí schizidie, které se ve formě šupinek odlupují ze stélky (PERLMUTTER, 2009; Nash 2008). K pohlavnímu rozmnožování dochází u lišejníků pouze u houbové složky. U *Ascomycet* se vytváří dva typy plodnic (ascomat). Apothecia mají tvar misky, otevřenou plodnici a je odhalena výtrusorodá vrstva (hymenium), která obsahuje vřecka (ascus). Uvnitř každého vřecka potom pohlavním rozmnožováním vznikají výtrusy (askospory). Perithecia mají lahvovitý tvar a na vrchu jsou otevřena otvorem, který se nazývá ostiolum. Uvnitř perithecia jsou v hymeniu také uložena vřecka (AHMADJIAN & HALE 1973; NASH, 2008). U *Basidiomycet* jsou plodnice rozlišeny na třeň a klobouk nebo mají kyjovitý tvar. Plodnice a jejich výtrusy jsou velmi důležitým determinačním znakem při určování lišejníků (AHMADJIAN & HALE, 1973).

### **2.1.7 Výskyt a význam lišejníků**

Výskyt lišejníků je velmi rozmanitý. Mnoho z nich je kosmopolitně rozšířeno, ale můžeme najít i mnoho endemických druhů. Vyskytují se především na extrémních stanovištích, kde je konkurence ostatních organismů velmi malá (pouště, polární oblasti) (ANDERSON et RUSHFORTH, 1977; BLISS et al, 1984). Distribuce lišejníků závisí na dvou faktorech, tím je klima a substrát. Můžeme je naleznout na skalách a kamenech či stromové borce.

V tropických oblastech to jsou i listy. Mohou se vyskytovat na velmi atypických místech jako jsou industriální materiály; sklo, plast, guma nebo na živočiších (krunýře želv, krovky hmyzu). Jako pomalu se vyvíjející organismy vyžadují neměnný substrát a jako organismy, které získávají živiny díky slunci, se vyhýbají hluboko zastíněným lesům: jejich výskyt tak do značné míry závisí na konfiguraci a celkové vegetaci země (KALINA & VÁŇA, 2005; SMITH, 1975; NASH, 2008). Úspěšné klíčení tedy nezávisí pouze na vhodném substrátu – na jeho struktuře, pH, stavu živin, ale také na faktorech prostředí jako je například teplota nebo vlhkost. Kromě toho může být výskyt lišejníku ovlivněn konkurencí o světlo, živiny, či může být lišejník alelopatickými či toxickými látkami jiných organismů (WIRTH et al., 2013). Některé lišejníky jsou s podkladem spojeny pouze slabě, zatímco jiné prorůstají celé do substrátu. Existují i druhy, které jsou schopné rozpouštět některé horniny v důsledku uvolňování kyselin ze stélky a dochází tak k jejímu narušení a zvětrávání (AHMADIJAN & HALE 1973). Lišejníky jsou důležité především v severských oblastech, kde slouží jako potrava býložravým živočichům vyskytujících se v tundrách. Jsou součástí potravy drobného hmyzu či jako úkryt pro roztoče. Díky obsahu pigmentů byly dříve používány jako barviva. Z pupkovky puchýřkaté (*Lasallia pustulata*) byla například získávána purpurová barva, z puklérky islandské (*Cetraria islandica*) poté barva žlutohnědá. Jiné lišejníky jsou využívány pro své léčivé účinky. Puklérka islandská (*Cetraria islandica*) slouží při léčbě respiračních obtíží. Některé lupenité lišejníky jsou v asijských zemích využívány jako potrava. Další duhy se využívaly například v koželužství, při výrobě piva či destilaci alkoholu. Důlkatec plicní (*Lobaria pulmonaria*) byl využíván v koželužství při činění kůží nebo jako náhrada chmele při vaření piva. Pro přípravu alkoholu se využívala dutohlávka sobí (*Cladonia rangiferina*) nebo puklérka islandská (*Cetraria islandica*) (HALDA & KUČERA, 2016; SMITH, 1975).

## 2.2 Rod Šálečka (*Lecidea*)

Říše: *Fungi*

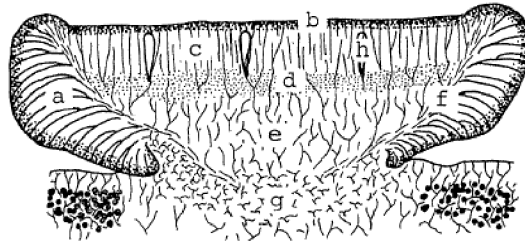
Kmen: *Ascomycota*

Třída: *Lecanoromycetes*

Řád: *Lecanorales (Lecideales)*

Čeleď: *Lecanoraceae (Lecideaceae)* WIJAYAWARDENE et al., 2018)

Druhově rozsáhlý rod *Lecidea* (1200 druhů, po revizi – 427 *Lecidea s.l.*, 100 *Lecidea s.s.* SCHMULL et al., 2011) patří mezi mikrolišejníky. Stélka je heteromerická korovitá, zřídka lupenitá, povrchová nebo může být zanořená. Tloušťka stélky se pohybuje od 0,2 mm do 0,6 mm. Je diferencovaná na vrstvu korovou a dřevnou, obsahující buňky fotobionta. Hyfy v korové vrstvě jsou uspořádány kolmo a těsně na sebe navazují. Vrstva řas je jednotná a dřev (medula) svou strukturou připomíná korovou vrstvu, hyfy jsou však uspořádány volněji a dál od sebe. Dále je stélka perforovaná areolami (políčky), které jsou ploché, více či méně konvexní s kolmými nebo šikmými okraji (INOUE, 1982). Fotobiontem je zpravidla zelená řasa nejčastěji z rodu *Trebouxia*. *Lecidea* vytváří plodnice (askomata) typu apothecium, která jsou většinou přisedlá ke stélce a zbarvena červenohnědě, tmavě hnědě až černě. Velikost apothecií se pohybuje od 0,15 mm do 2,5 mm. Okrajová část apothecia se nazývá excipulum. U rodu *Lecidea* je excipulum složeno z dvou vrstev, které označujeme jako parathecium a amphitecium; parathecium pochází ze spodní části hypothecia a bývá s ním rovnoběžné, amphitecium je odvozeno od parathecia, které směřuje k povrchu apothecia. Excipulum bývá bezbarvé, bledé někdy tmavě zbarvené. Zmíněné hypothecium představuje vrstvu hyf pod subhymenium. Jeho výška se liší podle druhu a stáří apothecia a proto tento znak při determinaci není příliš významný. Subhymenium je tkáň, ze které vyrůstají parafýzy a vřečka. Na mikroskopickém řezu není tato vrstva příliš nápadná, vrstva se však nápadně zbarví při použití činidla laktofenol (cotton blue). Hymenium se skládá z parafýz, podpůrných vláknitých hyf obklopujících vřečka. Bývá bezbarvé či v barvě epithecia. Pro řád *Lecanorales* je epithecium typické, jde o vrstvu na povrchu apothecia, která je tvořena koncovými buňkami parafýz. U rodu šálečka je epithecium zbarveno olivově, hnědě až černě. Vřečka obsahují osm spor a mají kyjovitý tvar. Askospory jsou jednoduché, hyalinní, konidie poté filiformní. Pouze jeden druh z rodu *Lecidea* vytváří soredie, a to *Lecidea leucosoralis* (SMITH et al., 2009; INOUE, 1982). Vytváří také řadu chemických substancí jako je například atranorin (*Lecidea elabens*), kyselina fumarprotocetrarová (*Lecidea elabens*), kyselina glomelliferová (*Lecidea auriculata*), kyselina planatová (*Lecidea lithophila*). Jsou velmi odolné vůči extrémním přírodním podmínkám a vyskytují se nejčastěji na kamenech, borce či na jiných lišejnících (INOUE, 1982).



**Obr. č.2:** Řez apotheciem rodu *Lecidea*: a – excipulum, b – epithecium c – hymenium, d – subhymenium, e – hypothecium, f – parathecium, g – medulla, h – vřecko (INOUE, 1982 upraveno).

## 2.2.1 Studované druhy r. *Lecidea*

### 2.2.1.1 *Lecidea lithophila*

Stélka popelavě bílá, občas s okrovým odstínem. Jsou přítomné areoly, které jsou ploché či mírně konvexní s drsným povrchem. Apothecia jsou přisedlá a dosahují okolo 2,5 mm, nejčastěji mají tmavě hnědou až černohnědou barvu. Excipulum je uvnitř bezbarvé, zatímco vnější část směřující k epitheciu se zbarvuje. Epithecium je světlehnědé až zelenohnědé. Hymenium je vysoké 40–60  $\mu\text{m}$ , subhymenium poté 50–70  $\mu\text{m}$ . Subhymenium a hypothecium je bezbarvé. Vřečka mají kyovitý tvar. Nachází se na nevápenatých horninách především v alpinském stupni. Tento druh je dobře rozpoznatelný podle bezbarvého subhymenia a hypothecia a bledě hnědé až zelenohnědé barvy epithecia. Druh je blízce příbuzný s *Lecidea plana*. (INOUE, 1982)

### 2.2.1.2 *Lecidea lapicida*

Stélka je perforovaná areolami, zbarvena popelavě šedě. Hymenium je bezbarvé a je vysoké 90–120  $\mu\text{m}$ . Subhymenium je také bezbarvé. Apothecia jsou přilehlá na bázi mírně zúžená. Excipulum dosahuje tloušťky 100–120  $\mu\text{m}$ , bývá bezbarvé, modrozelené či světle hnědé. Epithecium je modrozelené až černozelelé. Hypothecium je světle až tmavě hnědé, dosahuje výšky okolo 200  $\mu\text{m}$ . Může být bezbarvé, světle šedé, žlutavé až hnědě pigmentované. Vřečka jsou kyovitá, výtrusy poté elipsového tvaru. Můžeme ji najít nejčastěji na nevápenatých horninách (výjimečně vápenatých). *Lecidea lapicida* má občas bezbarvou, šedavou až nažloutlou barvu hypothecia a může tak být zaměněna s druhem *Lecidea plana*, která má bezbarvé hypothecium (INOUE, 1982; UPRETI et al., 2006).

### 2.2.1.3 *Lecidea fuscoatra*

Stélka je bělavě šedá, žlutohnědá až šedohnědá, opět perforována areolami. Apothecia měří 0,5 – 3 mm a jsou přisedlá. Epithecium je olivově zelené až olivově hnědé. Hymenium

je vysoké 40-60  $\mu\text{m}$ . Hypothecium má tmavě hnědou až černou barvu. Askospory jsou opět elipsovitého tvaru. Vyskytuje se na hladkých, často živinami bohatých křemičitých horninách (HERTEL, 1995; SMITH et al., 2009).

#### 2.2.1.4 *Lecidea confluens*

Stélka obsahující areoly. Apothecia jsou přisedlá, jejich velikost je 0,5 – 1,2 mm a vytváří se mezi areolami. Epithecium je olivově zelené až zelené. Hymenium je bezbarvé a měří 70–100  $\mu\text{m}$ . Hypothecium je tmavě červenohnědé až tmavě hnědé. Excipulum je na vnějším okraji načernalé, uvnitř bezbarvé. Vřecka mají kyjovitý tvar, askospory jsou elipsovité. Nejčastěji tento druh můžeme nalézt na křemičitých horninách a preferuje vlhčí stanoviště (HERTEL, 1995; UPRETI et al., 2006).

#### 2.2.1.5 *Lecidea plana*

Stélka je nepravidelně perforována areolami. Areoly jsou ploché, čočkovité a mají drsný povrch. Apothecia jsou přisedlá, na bázi mírně zúžena a jejich velikost se pohybuje od 0,4 do 1,2 mm. Excipulum dosahuje výšky 50–80  $\mu\text{m}$ , na okraji má sytě zelenou až modrozelenou barvu, směrem k vnitřní straně postupně bledne. Epithecium je tmavě zelené až modrozelené. Hymenium dosahuje výšky okolo 40–50  $\mu\text{m}$ , subhymenium okolo 60–80  $\mu\text{m}$ . Hypothecium a subhymenium nezřetelně odlišeno, bezbarvé. Vřecka mají kyjovitý tvar. Je blíže příbuzná s druhem *Lecidea lithophila*. *L. plana* se odlišuje menšími asposporami, nazelenalým epitheciem, nižším hymeniem a tmavě černými plodnicemi (INOUE, 1982; UPRETI et al., 2006).

### 2.3 Identifikace rodu *Lecidea* pomocí DNA

Taxonomie rodu *Lecidea* je velice složitá, především kvůli velké morfologické variaci v rámci druhů a mezi nimi (HERTEL, 2009). V 19. století se do tohoto rodu řadily obecně lišejníky s korovitou stélkou a fotobiontem ze skupiny zelených řas, které v okraji plodnic (excipulu) neobsahovaly buňky fotobionta a ve vřeckách vyrůstaly hyalinní jednobuněčné askospory. Tento rod čítal až 1600 druhů. Až ve druhé polovině minulého století započala snaha o revizi této skupiny na základě morfologických, chemických, ekologických a biogeografických dat. V současné době tento rod obsahuje okolo 100 druhů (*Lecidea sensu stricto*) na základě podobností a charakteristik, kterým jsem se věnovala v kapitole 2.2. V minulosti bylo obtížné většinu taxonů této skupiny přesně systematicky zařadit a vyřešit fylogenetické vztahy mezi příbuznými rody. Tento problém vyřešil příchod

moderních metod molekulární genetiky. V současnosti se daří tyto fylogenetické vztahy odhalit (BAŞARAN et al., 2015). Ve své práci jsem se pokusila překonat obtíže determinace lecidoidních lišejníků za použití molekulárních markerů používaných k testování příbuznosti mezidruhových vztahů rodu *Lecidea*. Molekulární identifikace pomocí specifických sekvencí DNA se během posledních 15–20 let stalo nedílnou součástí výzkumu taxonomie lichenizovaných hub a jejich genetických vztahů. Tato metoda zjednodušila řešení studia problematiky diverzity a identifikace jednotlivých taxonů (BELLEMAIN, 2010). Většina fylogenetických studií používá regiony Internal transcribed spacer (ITS) a External transcribed spacer (ETS) (BAŞARAN et al., 2015). Ve své diplomové práci tuto techniku využívám také.

### **2.3.1 DNA-barcoding**

Identifikace, klasifikace a názvosloví živých organismů na úrovni druhů je základem veškeré biologie a stalo se jedním z nepostradatelných kritérií v analýze a klasifikaci biodiverzity. Identifikace na základě výhradně morfologických znaků není vždy proveditelná. Ve většině případů je spojena s dalšími metodami, které mohou pomoci přesné taxonomické charakterizaci organismů. Tyto metody zahrnují chemické a genetické analýzy, kterým je v současné době věnována zvláštní pozornost díky své přesnosti. Genetická analýza je výhradně založena na DNA daného organismu a označuje se jako DNA-barcoding. Tato diagnostická technika používá krátké sekvence DNA pro identifikaci druhů ve skupině organismů. Při procesu je sekvenován krátký segment DNA získaný ze zkoumaného biologického materiálu, který je následně porovnán s dříve dostupnými sekvencemi v databázích k identifikaci druhů (MONDAL & SINGH, 2021). Tyto sekvence jsou druhově specifické, a proto fungují jako „nukleotidový“ nebo „molekulární podpis“ pro konkrétní druh, od kterého je vhodné jej identifikovat. Tento druhově specifický nukleotidový podpis je často označován jako biologický barcode, který otevřel cestu nejen k identifikaci různých druhů, ale také k podpoře odhadu genetické variability mezi druhy a vnitrodruhové variability. DNA barcoding je považován za silný nástroj v oblasti molekulární taxonomie pro taxonomy a biology po celém světě, který pomáhá objevovat nové druhy za pomoci analýzy sekvencí DNA. Sekvence jsou porovnávány se záznamy DNA-barcode databází, která je spojuje s již známými klíčovými morfologickými znaky (ANKOLA et al., 2021).

### 2.3.2 Metody používané pro získání DNA-barcodes

Úspěch DNA-barcodingu závisí na kvalitě a čistotě izolované DNA. Proces izolace bohužel často představuje zpracování a homogenizaci velkého množství materiálu před započítím samotné extrakce DNA. Problém představují vzorky, které obsahují menší množství DNA. Pro extrakci DNA existuje mnoho metod (KRESS & ERICKSON, 2012). Ve své práci jsem použila především metodu CTAB, ale vyzkoušela jsem také izolaci pomocí QIAamp DNA KITu.

K identifikaci konkrétních druhů se využívají markery. Markery nebo DNA-barcodes s konzervovanými přilehlými úseky (flanking sites) jsou zásadní pro vývoj specifických primerů používaných u široké škály taxonů. V případě, že mají DNA-barcodes nízkou intraspecifickou a vysokou mezidruhovou variabilitu, jsou vhodné pro klasifikaci druhů určité skupiny. Proto se různé barcodes používají pro různé skupiny organismů (HEBERT et al., 2003). Pro houby se využívají markery ITS, TEF1 $\alpha$ , RPB1 (LSU), RPB2 (LSU), 18S (SSU). Lokus obsahující DNA-barcodes purifikovaného vzorku DNA je amplifikován pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) společně se specifickou sadou primerů, které mohou při určité teplotě nasedat na cílovou DNA. Citlivost PCR a účinnost amplifikace barcode oblasti závisí výhradně na páru primerů použitých pro amplifikaci. Je tedy nezbytné použít nejvhodnější sadu primerů. Ve svém případě jsem používala primery ITS1F a ITS4 (KRESS & ERICKSON, 2012).

Molekulární nebo nukleotidový podpis je unikátní sekvence nukleotidů, kterou lze využít k determinaci a odlišení organismu od všech ostatních druhů stejně, jako funguje otisk prstu člověka. Název „DNA barcoding“ je odvozen od identifikačních čárových kódů EAN (European Article Number). Čárový kód se skládá z 10 číslic na 11 pozicích s 1011 možnými kombinacemi. Genetický kód tvoří jen 4 znaky na jedné pozici, celkový řetězec znaků je však mnohonásobně delší (sekvence 15 nukleotidů odpovídá matematicky 415 různým kombinacím, jaderná DNA lidského genomu se skládá v haploidním stavu z přibližně 3,2 miliardy párů bází – takový počet unikátních kombinací daleko přesahuje představy počtu biologických druhů na Zemi).

Krátký segment amplifikované DNA získaný pomocí PCR v délce od 400 do 800 bp je sekvenován pomocí Sangerova sekvenování (tj. sekvenování pomocí fluorescenčně značených ddNTP). Spočívá v začlenění specifického terminátoru syntézy DNA, který umožňuje vznik fragmentů DNA různé délky. Modifikované báze, dideoxynukleotidy (ddNTP) po začlenění do nově vznikajícího řetězce DNA polymerázou ukončí syntézu.



Metoda je výhodná pro získání delších souvislých sekvencí DNA (až 1000 bp) a je vysoce účinná při sekvenování DNA-barcodů menších množství vzorků (SINGH et. al., 2021).

K sekvenování čárových kódů DNA v laboratořích jsou vyvinuty pokročilé stolní sekvenační stroje jako je Roche 454 GS Junior System, IonProton System, Illumina MiSeq a MiniSeq (ANKOLA et al., 2021).

Referenční knihovny a databáze jsou online veřejná úložiště hostující sekvence odvozené z různých barcode regionů a obsahující vhodný počítačový software pro získání požadovaných dat pro analýzu. Data a bioinformační software dostupné v těchto knihovnách hrají zásadní roli pro přesnou identifikaci organismů na základě srovnávací analýzy vložené sekvence se sekvencemi uloženými v databázi. Nejvyužívanější a nejznámější jsou v současné době např.: GenBank, Barcode of Life Data System (BOLD), Medicinal Materials. Databáze DNA-barcodů – DNA (MMDBD), International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC) a Barcode Systém indexových čísel (BIN) umožňují výzkumníkům uložit novou sekvenci. Počet sekvencí přítomných v těchto databázích se může lišit a je aktualizován (RATNASINGHAM & HEBERT, 2007). Sekvence DNA-barcodů odvozených z ITS jsou uloženy v INSDC databázi a databáze UNITE spuštěná v roce 2003 je určena výhradně pro data hub generovaná na základě ITS.

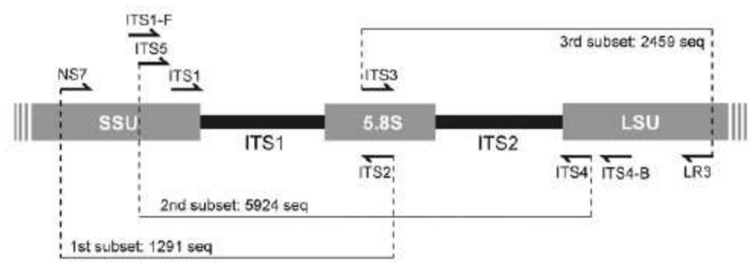
Sekvenční analýza barcodů je jedním z klíčových kroků v přesné identifikaci organismu, která je prováděna s pomocí různých online a offline bioinformatických nástrojů. Hlavním cílem sekvenční analýzy je porovnat nové sekvence generované ze studií DNA s řadou sekvencí uložených v databázi pro přesnou identifikaci taxonu. Pro hledání podobnosti slouží Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) a jedná se o jeden z nejlepších algoritmů, který páruje dotazované sekvence, které chceme porovnat s již existujícími v databázi. Podobnost je hodnocena pomocí skóre podobnosti generovaným na základě části dotazované sekvence zarovnané s referenčními sekvencemi. Na podobné bázi funguje model Kimura 2 parametr (K2P), jedna z nejlepších metod pro analýzu na základě vzdálenosti. K2P dokáže vypočítat vnitrodruhové a mezidruhové genetické vzdálenosti mezi sekvencemi, které jsou zásadní při hodnocení mezer v DNA-barcodech pro vymezení druhů. Kromě toho, fylogenetický vztah dotazované sekvence s referenčními sekvencemi, může být analyzován pomocí stromových metod. Zde lze sestavit fylogenetický strom založený na barcodech na základě dotazované sekvence s referenční sekvencí na základě sekvenční podobnosti. Existuje také několik bioinformatických nástrojů, včetně MEGA, PHYLIP a PAUP, které usnadňují konstrukci a vizualizaci fylogenetického stromu.

Technologie DNA-barcodingu se nepochybně ukázala jako jedinečný a slibný nástroj, který je pro molekulární taxonomii důležitý nejen pro překonání problémů spojených s taxonomickou identifikací organismů, ale je také prospěšný v několika dalších biologických a komerčních aspektech s tím spojených. Jedná se o výhodnou techniku, která dokáže doplnit stávající taxonomické nástroje, kde se nejedná pouze o rozšíření už existujících skupin o nově objevené taxony, ale poskytuje nám i pohled na drobné nejasnosti u již známých druhů a jejich mezidruhové vztahy. V neposlední řadě podporují vývoj novějších hypotéz týkajících se taxonomických pozic druhů a pomáhají nám vyřešit taxonomické nesnáze (ANKOLA et al., 2021).

### 2.3.3 Region ITS

Internal transcribed spacer (ITS) ribozomální DNA (rDNA) je nejvíce preferovaným DNA markerem při kódování DNA sekvencí za účelem určení genetické příbuznosti lišejníků na nižších taxonomických úrovních. Jedná se o oficiální primární marker, který je využíván při sekvenaci DNA v celé houbové říši. ITS region eukaryot je rozdělen na regiony ITS1 a ITS2, které jsou odděleny genem 5.8 S a nachází se mezi geny 18 S označovaný jako malá jaderná podjednotka (SSU) a 28 S neboli velká jaderná podjednotka (LSU) v rDNA. Velký počet kopií ITS regionu v genomu buňky (až 250) činí z tohoto regionu atraktivní cíl pro sekvenování biologického materiálu i v případě, že je koncentrace DNA nízká. Další důležitou vlastností je velikost regionu, která se pohybuje od 450 do 700 bp. Přítomnost vysoce konzervovaných sekvencí obklopujících každý ze dvou spacerů přispívá k snadnější PCR amplifikaci i při použití herbářových položek (BELLEMAIN, 2010; BALDWIN et al., 1995). Oblast ITS hraje také roli při vzniku ribozomů a stavbě malé a velké podjednotky rDNA. Evoluční původ ITS je považován za strukturu podobnou intronu ohraničenou vysoce konzervovanou oblastí, z které lze získat univerzální primery. Pro amplifikaci části či celého ITS regionu slouží specifické primery, krátké, specifické sekvence o velikosti 20–25 bp (BELLEMAIN, 2010). Pro svou práci jsem používala primery ITS1 (ITS1F) (forward) a ITS4 (reverse) vyskytující se v druhé podmnožině ITS. Primer ITS1F byl navržen speciálně pro sekvence hub (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') pro 3' konec 18S rDNA a ITS4 byl popsán jako univerzální primer (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), pro 5' konec 28S rDNA (BAŞARAN et al., 2015). Primer ITS1 a ITS4 patří mezi nejdéle používané PCR primery určené k práci s houbovými vzorky. Primer ITS1F byl později navržen především pro *Basidiomycety*. Vzhledem k tomu, že převažující složkou v lišejnících je houba, jsou tyto primery jasnou

volbou pro všechny lichenology (MARTIN & RYGIEWICZ, 2005). Pro určité skupiny lišejníků se však používají i další specifické primery (DÖRING et al., 2000).



**Obr.č.3:** Relativní poloha primerů, návrh podmnožiny a počet sekvencí v každé podmnožině (BELLEMAIN et al., 2010).

### 3 Metodika

#### 3.1 Odběr lišejníkových položek

Pro svou práci jsem použila herbářové položky dostupné od RNDr. Josefa Haldy, PhD a také několik vzorků čerstvého materiálu, který jsem odebírala osobně v terénu. Vzorky pocházejí převážně z horských oblastí České republiky. Odběr byl prováděn pomocí geologického kladívka a kamenického dláta ze substrátu, který byl tvořen převážně horninou (žula). U každého sběru byla zaznamenána data, která jsou vypsána níže. Následující tabulka tak zobrazuje jednotlivé údaje o nalezených lišejnících rodu *Lecidea*, u kterých se sekvenace podařila a s kterými jsem mohla pracovat.

ID	ID Sample	Druh	Lokalita	GPS	Datum
1	21716	<i>Lecidea lithophila</i>	Žďárské vrchy, Tisůvka, 789 m, rulová skála	N49.651887 E015.949326	3. 8. 2021
2	21717	<i>Lecidea lapicida</i>	Žďárské vrchy, Tisůvka, 789 m, rulová skála	N49.651887 E015.949326	3. 8. 2021
3	21728	<i>Lecidea fuscoatra</i>	Žďárské vrchy, Brožova skála, 787 m, rulová skála	N49.624471 E016.011047	4. 8. 2021
4	21743	<i>Lecidea lapicida</i>	Žďárské vrchy, Brožova skála, 778 m, rulová skála	N49.625126 E016.009504	4. 8. 2021
5	21744	<i>Lecidea lapicida</i>	Žďárské vrchy, Brožova skála, 778 m, rulová skála	N49.625126 E016.009504	4. 8. 2021
6	21752	<i>Lecidea confluens</i>	Králický Sněžník, U šestihanu, 1240 m, rulový balvan	N50.169253 E016.848748	7. 8. 2021
7	21763	<i>Lecidea lithophila</i>	Králický Sněžník, Milř, 1285 m, rulový balvan	N50.169052 E016.855650	7. 8. 2021
8	21871	<i>Lecidea plana</i>	Krkonoše, Malá Kotelní jáma, 1340 m, žulový balvan	N50.750168 E015.529919	4. 9. 2021
9	21882	<i>Lecidea lapicida</i>	Krkonoše, Malá Kotelní jáma, 1378 m, žulový balvan	N50.750546 E015.529305	4. 9. 2021
10	21885	<i>Lecidea lapicida</i>	Krkonoše, Malá Kotelní jáma, 1352 m, žulový balvan	N50.750401 E015.529700	4. 9. 2021
11	21911	<i>Lecidea confluens</i>	Krkonoše, Malá Kotelní jáma, 1390 m, žulový balvan	N50.750775 E015.529233	4. 9. 2021
12	21922	<i>Lecidea lapicida</i>	Krkonoše, Malá Kotelní jáma, 1378 m, žulový balvan	N50.750546 E015.529305	4. 9. 2021
13	22142	<i>Lecidea fuscoatra</i>	Kokořínsko, Husa, 444 m, pískovec	N50.588198 E014.452120	22. 9. 2021

14	22156	<i>Lecidea fuscoatra</i>	Jeseníky, Franz-Franz, 761 m, rulový balvan	N49.978879 E017.283852	27. 9. 2021
15	22741	<i>Lecidea lithophila</i>	Krkonoše, Labská bouda, 1394 m, žulový balvan	N50.775411 E015.550275	29. 10. 2021
16	22742	<i>Lecidea plana</i>	Krkonoše, Labská bouda, 1358 m, žulový balvan	N50.774692 E015.545909	29. 10. 2021

*Tab. č.1.: Charakteristika nalezených lišejníkových položek rodu Lecidea.*

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Izolace DNA metodou CTAB

Tato metoda slouží k extrakci většího množství čisté DNA a nejčastěji se používá pro ALFP analýzy a PCR metody následované sekvenací DNA (ČURN et al., 2019). Využívá detergentu, který se nazývá cetyltrimetylamonium bromid – CTAB. Ten je schopný vytvořit nerozpustný komplex s nukleovými kyselinami. V případě, že do mechanicky rozmělněných plodnic lišejníku přidáme CTAB dojde k vysrážení komplexu nukleových kyselin a CTAB. Proteiny, polysacharidy a další látky, které roztok kontaminují, zůstanou v supernatantu. DNA ve formě sraženiny je poté oddělena centrifugací a následně rozpuštěna roztokem chloridu sodného (BROWN, 2007).

DNA byla získávána z plodnic lišejníku rodu *Lecidea*, kdy byly plodnice nejdříve odděleny od podkladu pomocí žiletky a pinzety pod binolupou. Plodnice (0,1 g) byly následně vloženy do 1,5 ml zkumavky a označeny příslušným číslem vzorku. Do zkumavek bylo dále napipetováno 50 $\mu$ l zásobního roztoku 2 % CTAB a k materiálu s roztokem byly vloženy tři nerezové homogenizační kuličky o průměru 2 mm. Následně byly zkumavky vloženy do mixovacího mlýnu Mixer Mill MM 400 (Retsch), kde byl čas nastaven na dvě minuty s výkonem 30 000 kmitů za minutu. V tomto kroku musí dojít k rozdrčení plodnic a homogenizaci roztoku. Po uplynulém čase byly zkumavky vyjmuty a k rozdrčenému materiálu bylo přidáno 650 $\mu$ l zásobního roztoku CTAB a 10 $\mu$ l 1 % 2-merkapt ethanolu. Při manipulaci s toxickým 2-merkapt ethanolom je nutné pracovat v laboratorní digestoři. Dobře uzavřené zkumavky je vhodné promíchat proklepáním. Následovala inkubace vzorků, kdy byl pro práci použit Thermo-Shaker TS-100C (Biosan). Příklad byl nastaven na 60 °C po dobu patnácti minut a výkonu 1200 rpm. Následně bylo přidáno 500 $\mu$ l směsi chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1, tedy 480 $\mu$ l chloroformu a 20 $\mu$ l isoamylalkoholu. Tento krok opět vyžaduje práci v laboratorní digestoři. Dobře uzavřené zkumavky byly poté promíchány převrácením a umístěny do centrifugy. Centrifuga

MiniSpin od značky Eppendorf byla nastavena na dvě minuty s výkonem 10 000 rpm. Po vyjmutí vzorků z centrifugy se roztok rozdělil na dvě fáze, horní vodnou fází je nutné přepipetovat do nových 1,5ml zkumavek označených příslušným číslem vzorku. Použité špičky je třeba vyhazovat do nádob na nebezpečný odpad. Z dolní odpadní fáze byly vyjmuty kuličky určené k homogenizaci roztoku a fáze obsahující chloroform byla slita do příslušné lahve na nebezpečný odpad. Do nové zkumavky obsahující pouze horní fází bylo dále přidáno 500 $\mu$ l isopropanolu vychlazeného z mrazáku. Dobře uzavřené zkumavky byly několikrát promíchány převrácením a minimálně na patnáct minut ponechány v mrazáku. Následovala další centrifugace roztoku, tentokrát dvě minuty při 13 000 rpm. Po vyjmutí vzorků z centrifugy by se měl na dně zkumavky objevit drobný matně bílý pelet DNA. Supernatant byl odpipetován do kádinky na odpad a následně do příslušné lahve na nebezpečný odpad. V následujícím kroku bylo k peletu přidáno 400 $\mu$ l 70 % ethanolu vychlazeného z mrazáku. Obsah zkumavky byl promíchán proklepnutím a získaný pelet se tak oddělil od stěny zkumavky. Následovala centrifugace jednu minutu při 13 000 rpm. Supernatant byl opět odpipetován a znovu bylo přidáno 400 $\mu$ l 70 % ethanolu a byla zopakována centrifugace jednu minutu při 13 000 rpm. Supernatant byl naposledy odpipetován a zkumavky obsahující pouze pelet byly nechány otevřené a sušily se minimálně patnáct minut. V případě, že byly stěny zkumavek suché a bez viditelných kapek ethanolu bylo přidáno 20 $\mu$ l TE pufru. Takto připravené vzorky byly uloženy do lednice a později skladovány v mrazáku (PARK et al., 2014).

### **3.2.2 Izolace DNA pomocí QIAamp DNA KITu**

DNA z plodnic lišejníků jsem izolovala také za použití QIAamp DNA mini KIT. Tento kit kombinuje selektivní vazebné vlastnosti membrány na bázi oxidu křemičitého s flexibilními elučními objemy mezi 20 a 100  $\mu$ l. QIAamp DNA mini KIT poskytuje genomickou a mitochondriální DNA z malých vzorků připravených k použití v PCR. Dále tato metoda zjednodušuje izolaci DNA ze vzorků tkáně pomocí rychlých rotačních nebo vakuových postupů. Během postupu čištění se DNA specificky váže na silikagelovou membránu, zatímco kontaminanty procházejí skrz. Není nutná žádná extrakce chloroformem. Inhibitory PCR, jako jsou dvojmocné kationty a proteiny, jsou zcela odstraněny ve dvou účinných promývacích krocích, přičemž čistá DNA je eluována buď ve vodě nebo v pufru dodávaném se soupravou.

Nejprve byl opět proveden odběr plodnic lišejníku z podkladu (25 mg) a dále následovala samotná izolace. K biologickému materiálu bylo přidáno 50 $\mu$ l pufru ATL a následně byla

provedena homogenizace pomocí homogenizačních kuliček a mixovacího mlýnu Mixer Mill MM 400 (Retsch) po dobu dvou minut a výkonu 30 000 kmitů za minutu. Dále bylo do zkumavky přidáno 130 $\mu$ l pufru ATL a 20 $\mu$ l proteinázy K. Celý obsah byl krátce vortexován za použití Vortex Mixeru ZX4 (Velp Scientifica). Následně byly zkumavky vloženy na šedesát minut do Thermo-Shakeru TS-100C vytemperovaného na 56°C, dokud vzorky dokonale nezlyžují. V desetiminutových intervalech je potřeba vzorky krátce protřepat vortexem. Po uplynulém čase byly vzorky dány do centrifugy MiniSpin pro odstranění kapek z vnitřní strany víčka zkumavky po dobu jedné minuty za výkonu 10 000 rpm. Poté bylo přidáno 200 $\mu$ l pufru AL a vzorky byly krátce vortexovány po dobu patnácti vteřin a vloženy do Termo-Shakeru (Biosan) vytemperovaného na 70 °C po dobu deseti minut. Posléze je opět vhodné zkumavky vložit do centrifugy na jednu minutu při výkonu 10 000 rpm. V dalším kroku bylo do zkumavky přidáno 200 $\mu$ l 70 % ethanolu a celý vzorek byl vortexován po dobu patnácti vteřin s následnou centrifugací (1 min/10 000 rpm). Celý obsah zkumavky byl následně přepipetován do filtrační kolonky QIAamp Mini Spin vložené do sběrné mikrozukavky 2 ml. Je nutné dbát na to, aby okraj kolonky nebyl kontaminován. Dobře uzavřené zkumavky byly vloženy do centrifugy na jednu minutu při výkonu 8 000 rpm. Následně proběhla kontrola, zda veškerý vzorek prošel membránou filtrační kolonky. Pokud ne, centrifugace byla zopakována. Filtrační kolonka byla dále vložena do nové sběrné mikrozukavky o objemu 2 ml a použitá mikrozukavka s filtrátem byla vyhozena do odpadu. Filtrační kolonka byla opatrně otevřena, aby nedošlo ke kontaminaci okraje kolonky a bylo do ní přidáno 500 $\mu$ l pufru AW1. Vzorek byl stočen na centrifuze jednu minutu při 8 000 rpm. Filtrační kolonka byla opět vložena do nové sběrné zkumavky 2 ml a použitá zkumavka s filtrátem byla vyhozena do odpadu. Zkumavka byla následně otevřena a bylo přidáno 500 $\mu$ l pufru AW2 (nesmí být kontaminován okraj kolonky). Dobře uzavřené zkumavky byly vloženy do centrifugy na tři minuty a výkon činil 14 000 rpm. Filtrační kolonka byla vložena do nové zkumavky 2 ml a použitá zkumavka s filtrátem byla vyhozena do odpadu. Do vzorku s filtrační kolonkou bylo přidáno 50 $\mu$ l pufru AE a otevřená zkumavka byla ponechána jednu minutu v klidu s následnou centrifugací po jednu minutu na 8 000 rpm, aby došlo k vymytí DNA. Poslední krok byl následně ještě jednou zopakován. V posledním kroku byla filtrační kolonka vyhozena do odpadu a na dně zkumavky zbyla DNA lišejníku, která byla označena příslušným číslem vzorku a skladována v mrazáku (QIAGEN, 2014).

### 3.2.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR) s následnou elektroforézou

Po izolaci DNA z biologického materiálu byla získaná DNA amplifikována pomocí PCR reakce a přítomnost DNA ověřena elektroforézou. V případě potvrzení DNA byl získaný templát odeslán do Střediska sekvenace Mikrobiologického ústavu AV ČR v. v. i. na sekvenování.

Před vlastní prací byl nejdříve vysvícen UV lampou dekontaminační box Aura PCR (Bioair) po dobu 30 minut s následnou dezinfekcí boxu, aby veškerá práce probíhala ve sterilním prostředí. Všechny zkumavky obsahující reagentie pro PCR byly otvírány pouze uvnitř dekontaminačního flowboxu. Potřebné reagentie byly po vyjmutí z mrazáku ponechány při pokojové teplotě do jejich úplného rozmrznutí a následně krátce stočeny na stolní centrifuze. Zkumavky, které byly v následujících krocích použity jsem označily čísla dle příslušných vzorků s čistou odizolovanou DNA pro jejich správnou identifikaci a zamezení záměny vzorku. Do sterilní mikrozkušavky 1,5 ml byla připravena PCR směs pro příslušný počet vzorků společně s negativní kontrolou a rezervou pro pipetovací chybu (tedy o dva vzorky navíc). Každý vzorek byl připraven do mikrozkušavky s objemem 250  $\mu$ l: 5,1 $\mu$ l PCR Ultra H<sub>2</sub>O, 0,9 $\mu$ l primery (ITS1F + ITS4 či mrSSU1 + mrSSU3R v koncentraci 5 pmol/ $\mu$ l), 7,5 $\mu$ l Plain PP Master Mix a 0,6 $\mu$ l vyizolované DNA z plodnic lišejníku. Jednotlivé složky byly pipetovány v pořadí PCR Ultra H<sub>2</sub>O, primery, Plain PP Master Mix, DNA. Negativní kontroly DNA neobsahovaly. Celá směs byla promíchána a krátce stočena na MyFuge™ Mini centrifuze (Benchmark Scientific). Takto připravené vzorky bylo možné vložit do Thermal Cycleru (Analytik Jena). Před započítím PCR je nutné se ujistit, zda jsou víčka mikrozkušavek řádně uzavřena, aby se zkumavky při působení vysokých teplot neotevřely a nedošlo tak k odparu vzorku. Teplotní profil byl v Thermal Cycleru nastaven následující:

1 x 94 °C/ 3 minuty (počáteční denaturace)

45 x 94 °C/ 0,5 minut (cyklová denaturace)

55 °C/ 1 minuta (nasedání primerů; specifické pro daný primerový pár)

72 °C/ 1 minuta (cyklová elongace)

1 x 72 °C/ 10 minut (finální elongace)

1 x 15 °C/ hold (ochlazení směsi pro proběhnutí PCR)

Přibližně hodinu před dokončením programu byl připraven gel pro elektroforézu. Při celém procesu je třeba pracovat v rukavicích a snažit se zabránit jakékoli kontaminaci vzorků. Gel tvořil 40 ml 1,5 % agarózového gelu. Bylo tedy použito 0,6g agarózy a 40 ml



TAE pufru. Do zahřátého gelu bylo napipetováno 5 $\mu$ l Invitrogen SYBR Safe DNA gel stain. Gel byl nalit do vany na elektroforézu a byly do něj vloženy hřebínky pro vytvoření jamek. Po zatuhnutí gelu byl do vany nalit TAE pufr dosahující 3 mm nad povrch gelu. Do první jamky bylo aplikováno 6 $\mu$ l Invitrogen TrackIT 100bp DNA Ladder, který slouží ke stanovení velikosti a přibližnou kvantifikaci dvouřetězcové DNA v rozsahu 100 bp až 2 000 bp. Do ostatních jamek byl napipetován celý obsah jednotlivých zkumavek hotových PCR produktů za použití špiček s filtrem. Do produktů PCR byly zároveň přidány 2 $\mu$ l nanášecího pufru Invitrogen TrackIt Cyan/Orange loading buffer. Nejprve byl do všech zkumavek nanášecí pufr napipetován a jednotlivé použité špičky byly ponechány ve zkumavkách pro zabránění kontaminace. Při práci s DNA a PCR produkty je nutné pracovat v dekontaminačním boxu. Poté se směs promíchala propipetováním a následně byl obsah umístěn do kolonek vytvořených v agarózovém gelu. Došlo k zapnutí zdroje napětí ENDURO™ Mini 300 V (Labnet) a proud byl nastaven na 200 mA po dobu dvaceti minut. Po uplynulém čase byl gel opatrně vyjmut a přesunut na UV stolek UVISave (Uvitec Cambridge) s komorou obsahující kameru. Byla zapnuta UV lampa a získané fotky byly uloženy na flash disk pro případnou kontrolu a uchování výsledku elektroforézy. Gel byl vyhozen do kontejneru na nebezpečný odpad společně s rukavicemi a veškerým odpadovým materiálem zbylým po PCR a elektroforéze. Přístroj UVISave byl ošetřen lihem (ARUP, 2002).

### **3.2.4 Sekvenování**

Vzorky, u kterých byla pomocí PCR metody zjištěna přítomnost DNA bylo možné následně použít v dalších krocích a zaslat na sekvenaci, kde byla potvrzena přítomnost DNA a vytvořeny jednotlivé sekvence mnou zasláných vzorků odizolované DNA vybraných druhů lišejníků rodu *Lecidea*. Vzorky byly zaslány do Střediska sekvenace Mikrobiologického ústavu AV ČR v. v. i. (Václavská 1083, 142 20, Praha 4 – Krč). Zasláné vzorky obsahovaly čistý PCR produkt s požadavkem na konkrétní primery pomocí kterých se budou sekvenovat.

### **3.2.5 Tvorba alignmentů s následným vytvořením kladogramu**

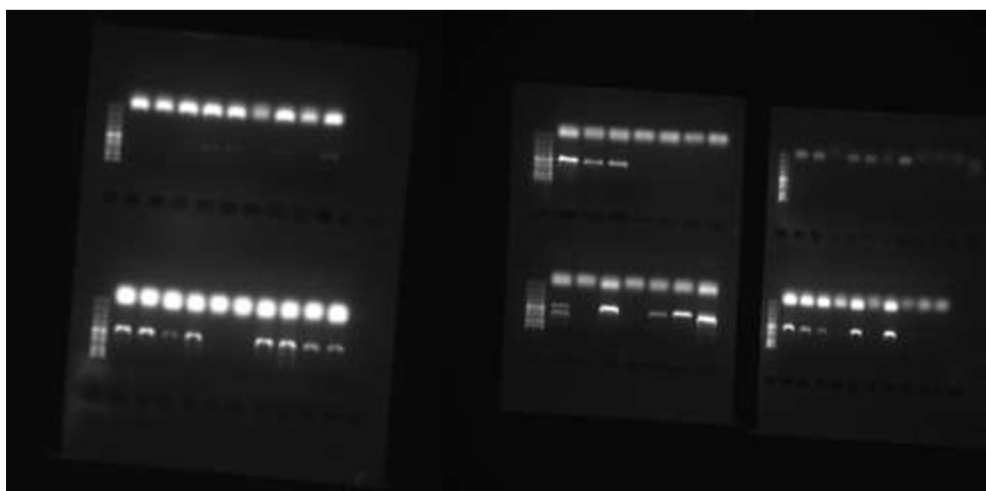
Sekvenční alignment je základním kontrolním krokem před provedením analýzy genomových sekvencí a strukturní analýzy proteinů. Párové zarovnání sekvencí a vícenásobné zarovnání sekvencí se provádí pomocí různých algoritmů a programů. Jedná se o uspořádání sekvence proteinu či DNA do obdélníkového pole s cílem, že zbytky

v daném sloupci jsou homologní (odvozené od jedné pozice v posloupnosti předků), identické (v pevném lokálním strukturálním alignmentu) nebo mají podobnou funkční roli. Ačkoli jsou tato tři kritéria v podstatě ekvivalentní pro blízce příbuzné proteiny a sekvence, struktura a funkce se v průběhu evoluce liší a různá kritéria mohou vést k různým alignmentům. Sekvence jsou zarovnány tak, aby pod sebou byly odpovídající si báze nukleotidů či aminokyselinové zbytky. Pro kratší sekvence jsou alignmenty vytvářeny ručně, složitější sekvence jsou poté vytvářeny za pomoci počítačových programů. Vytvořené alignmenty nám poté pomohou zjistit, zda se v sekvencích nachází podobné úseky a tím zjistit jejich příbuznost (PHILLIPS et al., 2000). Z hotových sekvencí, které mi byly zaslány z Mikrobiologického ústavu AV ČR v. v. i jsem vytvořila sekvenční alignmenty za pomoci programu MEGA 11. Takto připravené sekvence ve formě sekvenčních alignmentů bylo dále možné použít pro tvorbu kladogramu. Kladogramy byly vytvářeny opět v programu MEGA 11.

## 4 Výsledky

### 4.1 PCR a elektroforéza

Součástí mé práce bylo také vyzkoušet efektivitu a výtěžnost dvou vybraných izolačních metod (metoda CTAB a pomocí QIAamp DNA KITu) a zjistit pomocí které z nich bude vhodnější vyhotovit kvalitní izoláty, které budou nadále zpracovány ve vybrané laboratoři. Výsledky PCR bylo možné zjistit pomocí gelové elektroforézy. Pokud vzorek DNA obsahoval bylo možné ji spatřit pod UV světlem. Prázdné kolonky naznačují, že množství vyizolované DNA bylo velmi malé až žádné. Pokud by izoláty DNA obsahovaly, PCR metoda by to odhalila. Díky PCR a následné gelové elektroforéze se zjistilo, u jakých vzorků byla izolace zdařilá a bude je možné poslat na analýzu. Již po první srovnávací gelové elektroforéze bylo jasné, že DNA získaná za pomoci kitu nejspíše nebude obsahovat dostatečné množství čisté DNA pro následné použití. Srovnání výsledků elektroforézy je vidět na obrázku č. 4. Zároveň je na obrázku č. 4 ukázka výsledků gelové elektroforézy. Jelikož výtěžnost DNA u metody využívající kit nebyla dostatečná, rozhodla jsem se pokračovat v izolaci pouze pomocí metody CTAB a vytvořit tak dostatečně kvalitní izoláty z kterých by bylo možné získat jednotlivé sekvence. Z přibližně 100 vyhotovených izolátů (některé položky jsem izolovala opakovaně) obsahovalo pouze 24 z nich dostatečně čistou DNA, jejíž přítomnost byla potvrzena při gelové elektroforéze. Těchto 24 vzorků bylo následně odesláno do Střediska sekvenace Mikrobiologického ústavu AV ČR v. v. i., kde bylo možné získat sekvence celkem u 16 vzorků. Tyto vzorky jsou vypsány v kapitole 3.1.



*Obr.č.4: Vlevo nahoře: gel obsahující vzorky DNA vyhotovené pomocí QIAamp DNA KITu  
Vlevo dole: gel obsahující vzorky DNA vyhotovené metodou CTAB  
Vpravo: ukázka výsledků elektroforézy*

## 4.2 Molekulární analýzy a navazující rekonstrukce kladogramů

Kromě již zmiňovaného úseku ITS jsem se rozhodla pro analýzu dalšího úseku houbové DNA, a to úseku mtSSU pomocí primerů mrSSU1 (forward) (5'-AGCAGTGAGGAATATTGGTC-3') a mrSSU3R (reverse) (5'-ATGTGGCACGTCTATAGCCC-3') (ZOLLER et al. 1999). Jedná se o úsek malé mitochondriální podjednotky (SSU). Zatímco ITS oblast se využívá pro vymezení na úrovni druhů, mtSSU rDNA sekvence je více konzervativní genový lokus a umožňuje zkoumání vztahů mezi rody. Kombinovaná genetická analýza využívající ITS i mtSSU je poté hodnotnější při rozlišování rodů nebo skupin druhů (NADYEINA et al., 2010). Tento krok mi tedy umožnil s větší jistotou odkrýt a posoudit mezidruhové vztahy rodu *Lecidea* a případně odkrýt mezirodové vztahy, pokud by došlo k záměně při determinaci vzorku a velkou mírou přispěl ke zkvalitnění výsledků mé práce. Pracuji tedy se sekvencemi z 16 vzorků mnou zaslanych a následně vyhotovených v Mikrobiologickém ústavu AV ČR v. v. i. na dvou úsecích DNA. Pro doplnění fylogenetických stromů jsem kromě vlastních použila také podobné sekvence dostupné v databázi BLAST, která umožňuje vyhledávat a porovnávat sekvence v GenBank. Tento krok umožnil přesné určení studovaných taxonů. K tvorbě kladogramů jsem využila aplikaci MEGA 11. Přehled použitých primerů můžete vidět v tabulce č.2.

Region	Primer	Pozice	Sekvence
ITS	ITS1F	forward	(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')
	ITS4	reverse	(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')
mtSSU	mrSSU1	forward	(5'-AGCAGTGAGGAATATTGGTC-3')
	mrSSU3R	reverse	(5'-ATGTGGCACGTCTATAGCCC-3')

*Tab. č. 2: Primery použité pro amplifikaci DNA (BAŞARAN et al., 2015; ZOLLER et al., 1999).*

### 4.2.1 Sekvence ITS úseku

Pracovala jsem celkem s 35 sekvencemi regionu ITS (16 sekvencí pocházejících z herbářových a čerstvých položek dostupných od RNDr. Josefa Haldy, Ph.D.) zbylých 19 pocházelo z databáze BLAST. Těchto šestnáct vzorků bylo amplifikováno za použití primerů ITS1F (forward) a ITS4 (reverse) pomocí PCR a sekvenováno genetickým analyzátozem k odhalení genetické podobnosti a variace mezi vzorky. Vlastní vzorky jsou na kladogramu vyznačeny pod konkrétním číslem vzorku (seznam vzorků viz výše), vzorky použité z databáze GenBank jsou poté označeny číslem, pod kterým jsou

v databázi vedeny. Všechny použité sekvence z databáze BLAST (GenBank) jsou vypsány v tabulce č. 3. Analýza byla provedena v programu MEGA 11 pomocí statistické metody Neighbor-Joining Tree, který je běžně využíván při tvorbě fylogenetických stromů. Fylogenetický test bootstrapping byl proveden na základě 1000 replikátů. Jako substituční model byl použit Maximum Composit Likelihood. Počet nukleotidů u sekvencí se pohyboval od 576 po 624. Dle rozboru je druh *Lecidea lapicida* nejvíce vzdálen druhu *Lecidea fuscoatra*. Naopak nejvíce příbuznými druhy jsou *Lecidea plana* a *Lecidea lithophila*. Na kladogramu dále můžeme vidět, že druhy *Lecidea lapicida*, *Lecidea confluens*, *Lecidea auriculata*, *Lecidea lithophila* a *Lecidea plana* jsou nejpříbuznější (stejná větev), zatímco *Lecidea fuscoatra* se nachází na samostatné větvi a prokázala se tak odlišnost od ostatních druhů. Větve jednotlivých druhů jsou dobře podpořené, heterogenní je pouze skupina *L.lapicida*, *L.plana*, *L.confluens*. Největší variabilitu můžeme vidět u druhu *Lecidea lapicida* a *Lecidea fuscoatra*.

Druh	GenBank ID
<i>Lecidea auriculata</i>	KY266956.1
<i>Lecidea auriculata</i>	GU074428.1
<i>Lecidea auriculata</i>	MK620196.1
<i>Lecidea confluens</i>	EU263921.1
<i>Lecidea fuscoatra</i>	HQ650662.1
<i>Lecidea fuscoatra</i>	OL396651.1
<i>Lecidea fuscoatra</i>	EU263922.1
<i>Lecidea fuscoatra</i>	MZ159592.1
<i>Lecidea lapicida</i>	HQ650665.1
<i>Lecidea lapicida</i> var. <i>lapicida</i>	KJ162333.1
<i>Lecidea lapicida</i> var. <i>pantherina</i>	MK595456.1
<i>Lecidea lapicida</i> var. <i>pantherina</i>	AF332118.1
<i>Lecidea lapicida</i> var. <i>pantherina</i>	AF332120.1
<i>Lecidea lithophila</i>	MK620247.1
<i>Lecidea lithophila</i>	MK620090.1
<i>Lecidea plana</i>	EU259904.1
<i>Lecidea plana</i>	EU259903.1

<i>Porpidia macrocarpa</i>	KJ162270.1
<i>Porpidia macrocarpa</i>	KJ162267.1

*Tab. č. 3: Seznam druhů pro doplnění kladogramu nalezených v databázi GenBank pro region ITS.*

#### **4.2.2 Chybně určené druhy dle anatomických a morfologických znaků odhalené analýzou ITS**

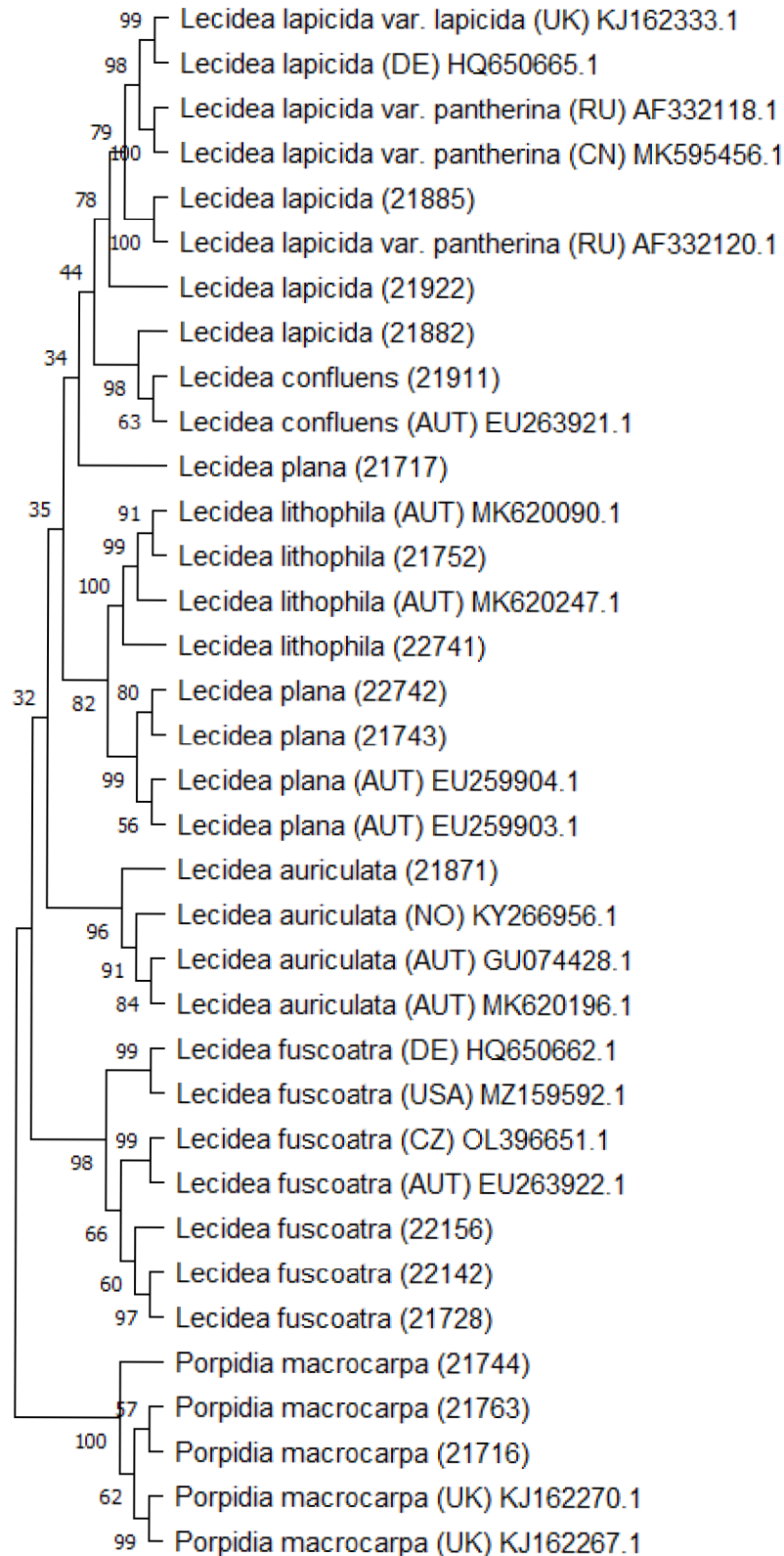
Získání sekvencí také odhalilo nepřesné určení položky 21871, která byla podle morfologických a anatomických znaků nejdříve determinována jako *Lecidea plana*. Po provedeném srovnání získané sekvence vzorku 21871 s databází GenBank byla nalezena sekvence se 100 % shodou v ITS regionu u vzorku KY266956.1 a 99% shoda u vzorků GU074428.1 a MK620196.1 a jde tedy s velkou pravděpodobností o druh *Lecidea auriculata*. Tento druh se v letech 1950–2009 nacházel pouze v NRP Kralický Sněžník a po roce 2010 byly učiněny dva nálezy na území NPR Bílá strž a PR Čertova stráž. Jedná se tedy o vzácný druh zařazený do Červeného seznamu ČR ([www.portal.nature.cz](http://www.portal.nature.cz)). Stejně tak v případě vzorku 21743, kdy byla položka determinována jako *Lecidea lapicida*. Po porovnání s databází se vzorek shodoval v 99 % se sekvencí vzorku EU259904.1 a 97 % shoda byla také u vzorku EU259903.1. a jedná se tak o druh *Lecidea plana*. Mezi dalšími chybně určenými položkami byl vzorek 21763, který byl označen jako *Lecidea lithophila*, z databáze GenBank však vyplývá, že se jedná o druh *Porpidia macrocarpa*. Shoda se vzorky KJ162270.1 a KJ162267.1 činila 95 %. Stejně tak u vzorku 21716, který byl určen jako *L. lithophila*. Opět se dle databáze GenBank jednalo o druh *Porpidia macrocarpa*. O další chybně určený druh šlo v případě vzorku 21716, který byl dle anatomických a morfologických znaků také určen jako *Lecidea lithophila*. Dle GenBank jde ovšem o taxon *Porpidia macrocarpa*. Dalším vzorkem, který byl dle GenBank určen jako *Porpidia macrocarpa* je vzorek 21744, který byl nesprávně určen jako *Lecidea lapicida*. Shoda v databázi GenBank byla se vzorkem KJ162270.1 96 % a s KJ162267.1 také 96 %. Rod *Porpidia* patří do řádu *Lecideales*, čeledi *Porpidiaceae*. Jedná se o taxon, který je rodu *Lecidea* podobný nejen morfologicky, ale z analýzy také vyplývá, že jsou oba rody geneticky velmi blízké. Velmi těsnou fylogenetickou příbuznost můžeme pozorovat u druhu *Lecidea fuscoatra*. Další nesprávně určený vzorek se nachází pod číslem 21717, kdy byl na základě anatomické a morfologické stavby určen jako *Lecidea lapicida*. Po kontrole s databází byl vzorek označen jako *Lecidea plana*, jelikož se jeho sekvence shodovala v 96

% s EU259903.1 a v 93 % s EU259904.1. Poslední nepřesně určený byl vzorek 21752, který byl zprvu determinován jako *Lecidea confluens*. Díky porovnání sekvencí v regionu ITS bylo pomocí GenBank zjištěno, že se jedná o druh *Lecidea lithophila*. Shoda s databází byla v případě vzorků MK620090.1 a MK620247.1 shodně 98 %. V případě poslední položky (21752) byla sekvence porovnávána pouze v ITS regionu. Tato položka byla mezi prvními, které se posílaly na sekvenaci do Mikrobiologického ústavu, kdy ještě nebylo plně rozhodnuto, zda pro svou práci využijí také marker mtSSU. Pro lepší přehlednost jsem v následující tabulce (č.4) vypsal veškeré nesprávně determinované položky na základě anatomických a morfologických znaků společně s výsledky sekvenací a porovnáním v databázi GenBank. Ve finálním kladogramu jsou položky opraveny na příslušný druh dle GenBank. Kladogram je uveden na obrázku č. 5.

<b>ID Sample</b>	<b>Druh dle anatomické a morfologické podobnosti</b>	<b>Druh dle shody sekvencí z GenBank (v kladogramu)</b>
<b>21871</b>	<i>Lecidea plana</i>	<i>Lecidea auriculata</i>
<b>21743</b>	<i>Lecidea laticida</i>	<i>Lecidea plana</i>
<b>21752</b>	<i>Lecidea confluens</i>	<i>Lecidea lithophila</i>
<b>21763</b>	<i>Lecidea lithophila</i>	<i>Porpidia macrocarpa</i>
<b>21716</b>	<i>Lecidea lithophila</i>	<i>Porpidia macrocarpa</i>
<b>21744</b>	<i>Lecidea laticida</i>	<i>Porpidia macrocarpa.</i>
<b>21717</b>	<i>Lecidea laticida</i>	<i>Lecidea plana</i>

**Tab. č. 4:** Výčet nesprávně determinovaných položek a srovnání jejich sekvencí s GenBank na úseku ITS.





**Obr.č. 5:** Kladogram vzájemných vztahů rodu *Lecidea* získaný pomocí sekvencí DNA s využitím markeru ITS. (Vytvořeno v programu MEGA 11)



### 4.2.3 Sekvence mtSSU úseku

Jak jsem již zmínila v kapitole 4.2., v průběhu práce jsem se rozhodla získat sekvence také z úseku mtSSU. Postup při rekonstrukci kladogramu byl tedy téměř totožný jako u úseku ITS. V případě mtSSU jsem pracovala s 32 sekvencemi (15 sekvencí pocházejících z herbářových a čerstvých položek dostupných od RNDr. Josefa Haldy, PhD.) zbylých 17 pocházelo opět z databáze GenBank. Chybí zde vzorek 21752 u kterého byla provedena analýza pouze na úseku ITS. Vzorky byly amplifikovány s použitím primerů mrSSU1 (forward) a mrSSU3R (reverse) pomocí PCR a následně byla provedena sekvenace, díky které mohlo dojít k porovnání genetických podobností na tomto úseku. Vlastní vzorky jsou na kladogramu také vyznačeny pod konkrétním číslem vzorku (viz výše) a vzorky použité z databáze GenBank jsou označeny vlastním příslušným ID číslem. Seznam vzorků pocházejících z GenBank je vypsán v tabulce č. 5. Analýza proběhla za stejných podmínek jako u úseku ITS, tedy v programu MEGA 11 pomocí statistické metody Neighbor-Joining Tree, fylogenetický test bootstrapping byl proveden na základě 1000 replikátů a jako substituční model byl shodně použit Maximum Composit Likelihood. Počet nukleotidů u sekvencí se pohyboval od 406 do 435. Na kladogramu lze vidět, že nejméně shodné byli sekvence lišejníků *Lecidea fuscoatra* a *Lecidea lapicida*, což se prokázalo i u úseku ITS. U rodu *Porpidia* je na úseku mtSSU vidět daleko větší shoda, než tomu bylo v případě ITS a druh *Porpidia macrocarpa* je nejvíce shodný s druhem *Lecidea auriculata*. Největší variabilitu vidíme u druhu *Lecidea fuscoatra* a *Lecidea lapicida*. Jednotlivé větve jsou dobře podpořené, heterogenní jsou pouze *L.lapicida*, *L.lithophila* a *L.confluens*. Nejvyšší variabilitu vykazují stejně jako u úseku ITS *Lecidea lapicida* a *Lecidea fuscoatra*. Seznam vzorků použitých pro sestavení kladogramu a porovnání sekvencí úseků mtSSU je uveden v tabulce č. 4

Druh	GenBank ID
<i>Lecidea auriculata</i>	MK684686.1
<i>Lecidea auriculata</i>	MK684586.1
<i>Lecidea auriculata</i>	MK684726.1
<i>Lecidea fuscoatra</i>	OK465490.1
<i>Lecidea fuscoatra</i>	OL396706.1
<i>Lecidea fuscoatra</i>	AY756401.1
<i>Lecidea fuscoatra</i>	DQ912275.1

<i>Lecidea lapicida</i>	MK684618.1
<i>Lecidea lapicida</i>	MK684584.1
<i>Lecidea lapicida</i>	MK684733.1
<i>Lecidea lapicida</i>	MK684641.1
<i>Lecidea lapicida</i>	MK684644.1
<i>Lecidea plana</i>	OK465596.1
<i>Lecidea plana</i>	GU074497.1
<i>Porpidia macrocarpa</i>	MK684604.1
<i>Porpidia macrocarpa</i>	MK684702.1
<i>Porpidia macrocarpa</i>	MK684730.1

*Tab. č. 5: Seznam druhů pro doplnění kladogramu nalezených v databázi GenBank pro region mtSSU*

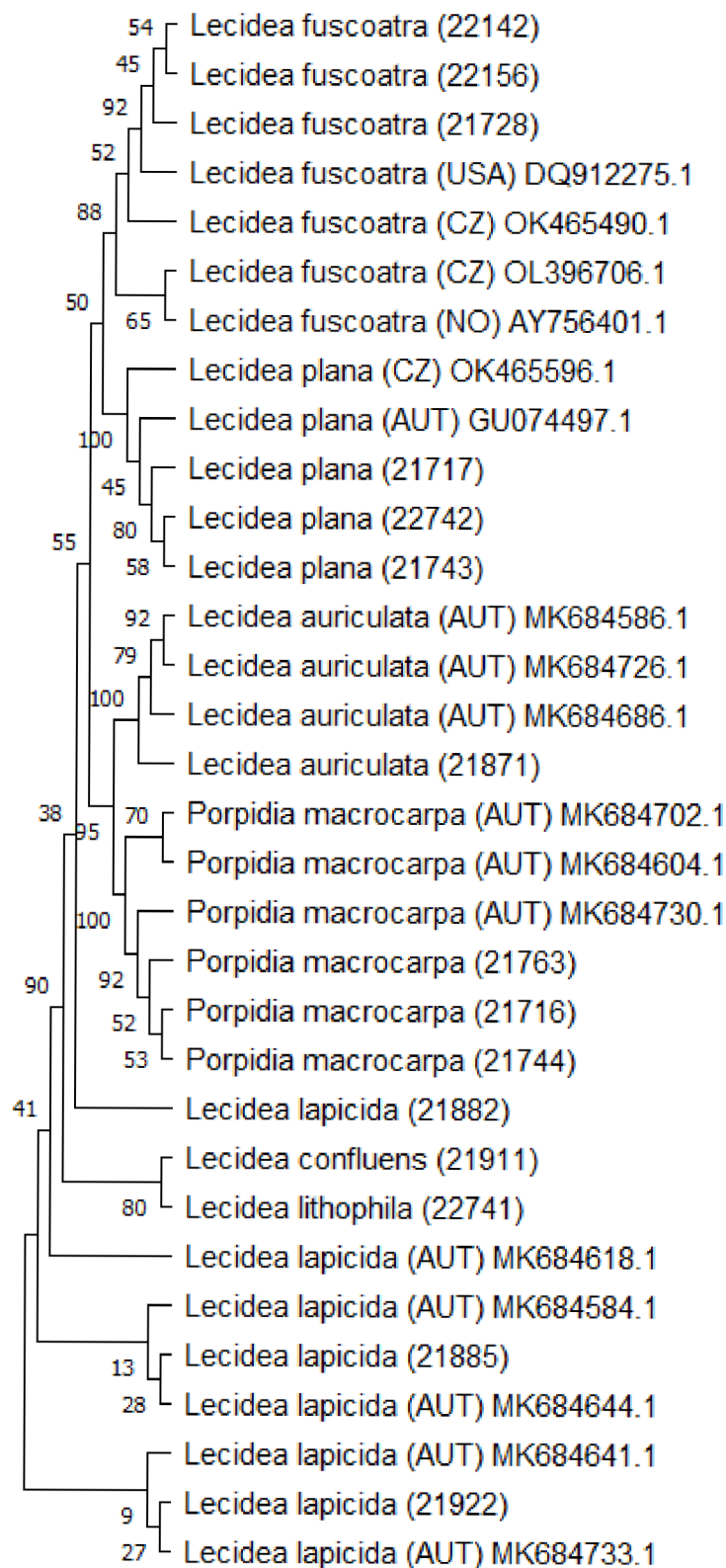
#### **4.2.4 Chybně určené druhy dle anatomických a morfologických znaků odhalené analýzou mtSSU**

Co se týče vzorku 21871, sekvence získané na tomto úseku potvrdily výsledek analýzy již získány na úseku ITS. Nejedná se tedy o druh *Lecidea plana*, ale o vzácnější druh *Lecidea auriculata*. Při porovnání s databází GenBank byla nalezena 100 % shoda u vzorků MK684686.1, MK684586.1 a MK684726.1. Stejně tak u položky 21743, kdy byl lišejník mylně determinován jako *Lecidea lapicida*. V databázi byla nalezena 100 % shoda sekvencí se vzorky OK465596.1 a GU074497.1 a je tak potvrzeno, že se jedná o druh *Lecidea plana*. Dále i vzorek 21716 byl nejdříve determinován jako *L.lithophila*, stejně jako u úseku ITS i zde bylo pomocí databáze GenBank prokázáno, že se jedná o druh *Porpidia macrocarpa*. Shoda z databáze nastala u vzorků MK684730.1 (99 %), MK684702.1 (98 %) a MK684604.1 (98 %). To stejné nastalo u vzorku 21763. Porovnání sekvencí na tomto úseku s databází GenBank potvrdilo, že se jedná o druh *Porpidia macrocarpa*. Shoda byla 99 % u vzorku MK684730.1 a 98 % u MK684702.1. Dalším mylně určeným vzorkem byla položka číslo 21744, která byla podle anatomických a morfologických znaků determinována jako *Lecidea lapicida*. Jednalo se však opět o druh *Porpidia macrocarpa*. Poslední nesprávně určenou položkou byl vzorek 21717, kdy byl označen jako *Lecidea lapicida*. V GenBank ovšem došlo ke shodě na základě sekvencí u OK465596.1 a GU074497.1 shodně 100 %. Bohužel žádná shoda v databázi GenBank se neobjevila v případě vzorku 21911 (*Lecidea confluens*), je tedy pravděpodobné, že shodný úsek zatím

nebyl do databáze vložen. Stejně tomu bylo i u vzorku 22741. V tomto případě se jednalo o druh *Lecidea lithophila* a ani v tomto případě nebyla v databázi nalezena žádná shoda. Seznam chybně určených vzorků je souhrnně sepsán v tabulce č. 6, vyhotovený kladogram je poté na obrázku č. 6.

<b>ID Sample</b>	<b>Druh dle anatomické a morfologické podobnosti</b>	<b>Druh dle shody sekvencí z GenBank (v kladogramu)</b>
<b>21871</b>	<i>Lecidea plana</i>	<i>Lecidea auriculata</i>
<b>21743</b>	<i>Lecidea lapicida</i>	<i>Lecidea plana</i>
<b>21763</b>	<i>Lecidea lithophila</i>	<i>Porpidia macrocarpa</i>
<b>21716</b>	<i>Lecidea lithophila</i>	<i>Porpidia macrocarpa</i>
<b>21744</b>	<i>Lecidea lapicida</i>	<i>Porpidia macrocarpa.</i>
<b>21717</b>	<i>Lecidea lapicida</i>	<i>Lecidea plana</i>

*Tab. č. 6: Výčet nesprávně determinovaných položek a srovnání jejich sekvencí s GenBank na úseku mtSSU*



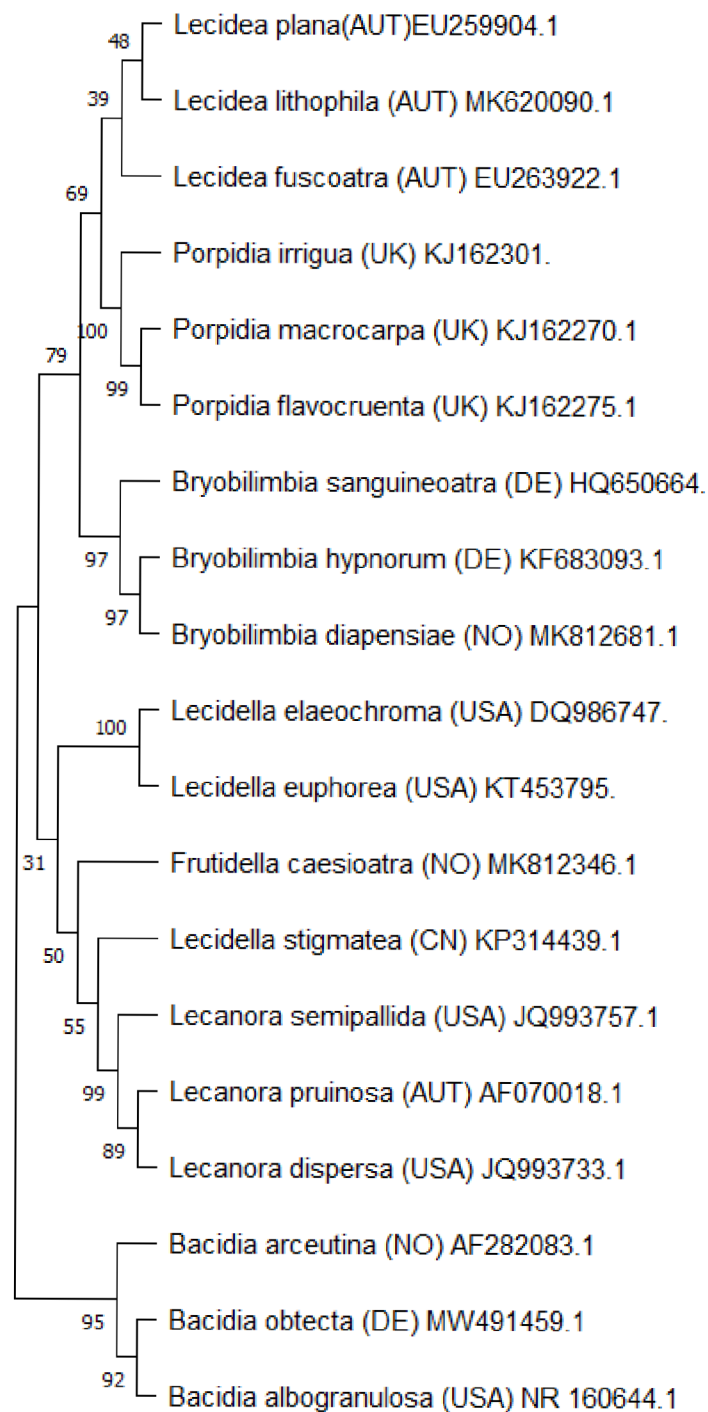
**Obr.č. 6:** Kladogram vzájemných vztahů rodu *Lecidea* získaný pomocí sekvencí DNA s využitím markeru *mtSSU*. (Vytvořeno v programu MEGA 11)

## 5 Diskuse

Fylogenetické zařazení druhů spadajících pod *Lecideaceae* v rámci *Lecanoromycetidae* stále není vyjasněné. *Lecideaceae* je monofyletická skupina a tvoří nezávislou linii. Všichni příslušníci rodu *Lecidea* s.s. (*sensu stricto*) jsou seskupeni v řádu *Lecideales*, zatímco většina ostatních členů *Lecidea* s.l. (*sensu lato*) spadá do různých existujících taxonů v rámci *Lecanorales* nebo reprezentuje neurčené rody v rámci *Lecanoromycetidae*. K *Lecidea* s.l. je nyní řazeno 427 druhů lišejníků a pouze 100 z nich spadá pod rod *Lecidea sensu stricto*. Do skupiny *Lecidea* s.l. patří lišejníky, které jsou řazeny do čeledi *Lecanoraceae* (*Lecanorales*). Ascus u této skupiny tvoří amyloidní tholus (ztloustlý vrchol vřeka) a patří sem například *Lecidea roseotincta*, *Lecidea nylanderii* nebo *Lecidea polytrichina*. Skupina *Lecidea* s.s. obsahuje taxony, které vykazují podobné anatomické a morfologické rysy a zároveň se jedná o výlučně saxikolní organismy čeledi *Lecideaceae* (*Lecideales*). Přestože je klasické členění čeledí *Lecideaceae* a *Lecanoraceae* založeno především na morfologických rozdílech stavby vřeka, molekulární studie odhalily, že struktura vřeka není konzistentním systematickým znakem v rámci skupin. Téměř všechny taxonomické studie o rodu *Lecidea* jsou založené výhradně na srovnání morfologických znaků a sekundárních metabolitů. Ovšem s nástupem molekulárních metod v současné době dochází k postupné revizi těchto obtížně rozlišitelných druhů lišejníků a na základě podobnosti jejich DNA se začínají blíže odkrývat jejich fylogenetické vztahy. Nejbližším taxonem rodu *Lecidea* je rod *Porpidia*. Jejich příbuznost je diskutována již od roku 1855, kdy byl rod *Porpidia* zařazen do podčeledi *Lecidinae*. Jedná se o rod, který také obsazuje skalní habitaty, vytváří sekundární metabolity a fotobiontem je převážně rod *Trebouxia*. Příbuznost se potvrdila jak morfologickými znaky, kdy bylo dokázáno, že vřeka typu *Lecidea* a *Porpidia* jsou variabilní a mohou se objevovat i mezistádia mezi těmito typy vřecek, tak blízkou genetickou příbuzností (SCHMULL et al., 2011). V rámci mé práce tento fakt mohu potvrdit. Není snadné vždy mikroskopicky přesně rozlišit typ vřeka, a proto bylo několik vzorků na základě morfologických znaků nepřesně zařazeno do rodu *Lecidea*. Molekulární analýza potvrdila, že se jedná o rod *Porpidia*. Kladogram znázorňuje blízké vztahy těchto dvou geneticky příbuzných rodů. Velmi příbuzným taxonem je v rámci *Lecideaceae* i rod *Xenolecia*. Byl vymezen (*X. spadicomma*) Hertelem (Hertel, 1984). Morfologicky je velmi obtížně odlišitelný od rodu *Lecidea*. Monotypický rod se po čase rozrostl o další druh z Falklandských ostrovů známý nejprve jako *Lecanora falkladica*. Po dalším pátrání byl potvrzen také v severní Patagonii (X Región de Los Lagos,

Chile) a zařazen jako *Xenolecia cataractarum*. Další areál výskytu tohoto druhu byl objeven na Mt. Honey, Campbell Island na Novém Zélandu (FRYDAY & THÜS, 2017). Dalším geneticky příbuzným taxonem je rod *Bryobilimbia*, který byl nedávno oddělen od rodu *Lecidea* (*Lecidea ahlesii* var. *ahlesii*, *L. ahlesii* var. *nemoralis*, *L. diapensiae*, *L. sanguineoatra*) na základě fylogenetické odlišnosti od ostatních druhů rodu, nyní tvoří samostatnou vývojovou větev (FRYDAY et al., 2014). Jako další příbuzné taxony tentokrát spadající do *Lecanoraceae*, kam se řadí druhy *Lecidea s.l.*, lze zmínit například rody *Lecanora*, *Lecidella*, *Frutidella* či *Bacidia* (SCHMULL et al., 2011). Pro srovnání vztahů mezi zmíněnými taxony jsem za pomoci GenBank vytvořila kladogram, kde je naznačena vzájemná příbuznost. V databázi GenBank se však nevyskytuje žádná sekvence patřící rodu *Xenolecia*. Z tohoto důvodu nemohu její zařazení a vztah k ostatním rodům potvrdit. Kladogram byl vytvořen dle úseku ITS stejnou metodou jako ostatní kladogramy v této práci za využití programu MEGA 11 (Obr. č. 7). Rod *Lecidea* tedy představuje krustózní lišejníky, u kterých se jejich fylogenetické vztahy stále vyvíjí, mění a jejich podobnost a příbuznost s ostatními rody je velmi těsná. V současné době dochází k objevování stále nových druhů v rámci rodu *Lecidea*. V nejbližší době to byl například objev druhu *Lecidea aprotii* v Pákistánu (Khyber Pakhtunkhwa Province, Swat district, Gabin Jabba valley) z roku 2018 odpovídající charakteristikám *Lecidea s.s.* Jedná se o druh nejvíce podobný stélkou druhu *Lecidea fuscoatra*. Stélka je políčkovitá a vytváří černá lecideoidní apothecia. Liší se však delšími asposporami, které dosahují délky 8–10 µm (u druhu *L. fuscoatra* 11–16 µm). Fylogenetické analýzy dále odhalily, že se jedná o sesterský druh pro *L. grisella*. Pro studii byl použit v molekulární analýze úsek ITS a nuLSU rDNA. Pro zjištění příbuznosti ostatních druhů byla využita databáze GenBank (KHAL et al., 2018). Další nový druh byl popsán na území pohoří Sierra Nevada v Kalifornii v roce 2014. Druh byl označen jako *Lecidea oreophila* a nejvíce připomíná druh *L. tessellata*. Nový druh byl popsán na základě rozdílů chemismu stélky (odlišné sekundární metabolity) obou druhů lišejníků za pomoci srovnání s herbářovými položkami Kalifornské Univerzity, Great Zimbabwe Univerzity a s položkami horských druhů z České republiky (KNUDSEN & KOCOURKOVÁ, 2014). Jako poslední bych chtěla zmínit objev druhu *Lecidea hoganii*, který byl roku 2015 nalezen v oblasti White Rocks Open Space, City of Boulder v Coloradu. Druh je morfologicky velmi podobný druhu *L. auriculata*. I v tomto případě byly provedeny molekulární analýzy pro vyjasnění vzájemných genetických vztahů. Byl použit úsek ITS a mtSSU a pro porovnání podobných sekvencí byla využita také databáze GenBank (TRIPP

& LENDEMER, 2015). Již známé druhy se také objevují na nových areálech. V tomto případě bych chtěla zmínit například nález druhu *Lecidea fuscoatrina* na území České republiky. Nejen, že tento druh nebyl dosud nalezen na území ČR, jedná se také o druh, který je nově objeven v Evropě. Průzkum v rámci něhož byl nalezen druh *L. fuscoatrina*, byl proveden na území NPR Týřov, kde na pouhých 10 km<sup>2</sup> bylo nalezeno celkem 675 druhů lišejníků. U většiny nalezených druhů byla také provedena molekulární analýza (VONDRÁK et al., 2022). Zde bych chtěla zmínit, že při vyhledávání podobných sekvencí u mého vzorku 21922 (*Lecidea lapicida*) v databázi GenBank jsem narazila na několik vzorků druhu *Lecidea medusula*, které se s mou sekvencí shodovaly na 100 až 99 % jak na úseku ITS, tak na úseku mtSSU. Tento druh ovšem na našem území nebyl dosud objeven a na základě jednoho vyhotoveného izolátu by bylo předčasné výskyt potvrdit. Nicméně je to pro mě impuls do budoucna, kdy bych ráda z místa nálezu odebrala další vzorky a pomocí analýzy DNA výskyt tohoto druhu na území ČR potvrdila či vyvrátila. Rod *Lecidea* je tedy velmi variabilním rodem, který je morfologicky téměř totožný s mnoha dalšími taxony a spolehlivě se odlišuje pouze znaky na molekulární úrovni. Prokázány byly jak anatomické a morfologické podobnosti, tak velmi podobná genetická výbava u různých druhů. U mnoha druhů stále není jasné jejich taxonomické zařazení pramenící právě z vysoké podobnosti jednotlivých taxonů. Studium tohoto rodu je stále v pohybu a postupné objevy a nálezy stále přispívají k bližšímu poznání mezidruhových i mezirodových genetických vztahů a odkrývají nám jejich fylogenetický vývoj.



**Obr.č. 7:** Kladogram mezirodových vzájemných vztahů příbuzných rodu *Lecidea*. (Vytvořeno pomocí programu MEGA 11)



## 6 Závěr

V závěru bych chtěla zmínit, že cíle práce, které jsem si vytyčila byly splněny. Celkem jsem měla k dispozici 59 čerstvých a herbářových položek, které byly nasbírány v průběhu roku 2021 na území České republiky. Jejich veškerý přehled je uveden v příloze č.1. Z těchto položek jsem vyhotovila přibližně 100 izolátů, kdy jsem některé položky izolovala vícekrát. Z přibližně 100 izolátů DNA, které jsem pomocí metody CTAB a pomocí QIAmp DNA mini KIT použila, se podařilo získat 24 vzorků s dostatečně čistou DNA vhodných pro molekulární analýzu. Ve Středisku sekvenace Mikrobiologického ústavu AV ČR v. v. i. byly vzorky analyzovány a 16 sekvencí jsem následně porovnála s databází GenBank. Vytvořila jsem kladogramy vzájemných genetických vztahů na základě podobnosti úseků ITS a mtSSU. Molekulární analýzy odhalily několik nepřesně určených položek, které byly determinovány na základě anatomických a morfologických znaků pro daný druh. V průběhu práce jsem si potvrdila, že se jedná o velmi složitou skupinu lišejníků, u níž stále není vyjasněná celá taxonomie z důvodu jejich podobnosti na všech úrovních. Zároveň jsem si vyzkoušela laboratorní práci s mikrolišejníky, která není vždy jednoduchá vzhledem k jejich velikosti, a proto i menšímu obsahu genetické informace. Současně s vyhotovením mé práce vyvstalo několik otázek spojených s determinací několika taxonů, na kterých je dále možné pracovat a vyjasnit neúplné informace k jejich rozšíření v ČR.

## Literatura

AHMADJIAN, V. & HALE, E. M. (1973): The Lichens. United States of America: Academic Press, Inc. (London). ISBN 0-12-044950-1.

AHMADJIAN, V. (1993): The Lichen Symbiosis. John Wiley & Sons. ISBN 978-0471578857.

ANDERSON, D. C. & RUSHFORTH, S. R. (1977): The cryptogam flora of desert crusts in southern Utah, U.S.A. – *Nova Hedwigia* 28: 691–729.

ANKOLA K., MELICHAR, T., BOREGOWDA, M.H. & MAHADEVGOWDA, L. (2021): Chapter 18 – DNA barcoding: nucleotide signature for identification and authentication of livestock. In: MONDAL, S. & SINGH, R.L. ed. (2021): *Advances in Animal Genomics*. United States: Academic Press, s. 299-308. ISBN 978-0-12-820595-2.

ARMALEO, D. & CLERC, P. (1991): Lichen chimeras: DNA analysis suggests that one fungus forms two morphotypes. – *Experimental Mycology* 15: 1-10.

ARUP U. (2002): PCR techniques and automated sequencing in lichens. - In: KRANNER I., BECKETT R.P. & VARMA A.K. (eds), *Protocols in Lichenology. Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and Use in Biomonitoring*, p. 392-411, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg

BALDWIN, B. G., SANDERSON J.M., PORTER J. M., WOJCIECHOWSKI F. M., CAMPBELL S. CH. & DONOGHUE J. M. (1995): The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. – *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82(2).

BAŞARAN, E., CANSARAN – DUMAN, D., İBÜYÜK, İ. & ARAS S. (2015): Identification of some Lecidea, Porpidia and Lecidella species (lichen-forming ascomycetes) distributed in Turkey by sequence analysis of rDNA ITS region. – *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 72(1), 45-58. ISSN 0377-9777.

BEIMFORDE, C., FELDBERG, K., NYLINDER, S., RIKKINEN, J., TUOVILA, H., DÖRFELT, H., GUBE, M., JACKSON, D. J., REITNER, J., SEYFULLAH, L. J. & SCHMIDT, A. R. (2014): Estimating the Phanerozoic history of the Ascomycota lineages: Combining fossil and molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 78: 386-398.

BELLEMAIN, E., CARLSEN T., BROCHMANN Ch., COISSAC E., TABERLET P. & KAUSERUD H. (2010): ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals

potential PCR biases. *BMC Microbiology*. 10(1) ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2180-10-189

BLISS, L. C., SVOBODA, J. & BLISS, D. I. (1984): Polar deserts, their plant cover and plant production in the Canadian High Arctic. *Holarctic Ecology* 7(3): 305-324.

BROWN, T. A. (2007): *Klonování genů a analýza DNA: úvod*. Olomouc: Univerzita Palackého. ISBN 9788024417196.

ČURN, V., TONKA T., KŘÍŽOVÁ L. & JOZOVÁ E. (2019): *Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů u hub*. České Budějovice: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita. ISBN 978-80-7394-781-1.

de VERE N., RICH T.C., TRINDER S.A. & LONG C. (2015): DNA barcoding for plants. *Methods Mol Biol*. 1245:101-18. doi: 10.1007/978-1-4939-1966-6\_8. PMID: 25373752.

DÖRING, H., CLERC, P., GRUBE, M. & WEDIN, M. (2000): Mycobiont-specific PCR primers for the amplification of nuclear ITS and LSU rDNA from lichenized ascomycetes. *Lichenologist* 32(2): 200-204.

FRYDAY, M. A. & THÜS H. (2017): The genus *Xenolecia* (Lecideaceae s. lat., Lecanoromycetidae inc. sed.), including a second species in the genus from Campbell Island, New Zealand. *The Lichenologist*, 49(4), 365–372.

FRYDAY, M. A., CH. PRINTZEN & EKMAN S. (2014): *Bryobilimbia*, a new generic name for *Lecidea hypnorum* and closely related species. *The Lichenologist*, 46(1), 25–37.

HALDA, J. & KUČERA J. (2016): *Atlas krkonošských mechorostů, lišejníků a hub*. Vrchlabí: Správa Krkonošského národního parku. ISBN 978-80-7535-027-5.

HALICI, M. G. & KAHRAMAN, M. (2021): DNA barcoding and morphological observations of three lichenized fungal species from James Ross Island (Antarctic Peninsula). *Ukrainian Antarctic Journal* 1: 123–148.

HEBERT, P.D.N., CYWINSKA, A., BALL, S.L. & DEWAARD, J.R., (2003): Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270, 313–321

HERTEL, H. (1995): Schlüssel für die Arten der Flechtenfamilie Lecideaceae in Europa. *Bibliotheca Lichenologica* 58: 137-180.

- HERTEL, H. (2009): A new key to cryptothalline species of the genus *Lecidea* (Lecanorales). *Bibliotheca Lichenologica* 99: 185-204.
- INOUE, M. (1982): The genera *Lecidea*, *Lecidella* and *Huilia* (Lichens) in Japan I. *Lecidea*. *J. Sci. Hiroshima Univ., ser. B, Div. 2 (Bot.)* 18: 1- 55.
- KALINA, T. & VÁŇA J. (2005): *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-1036-1.
- KHAN, M., KHALID, A.N. & LUMBSCHE, H.T. (2018): A new species of *Lecidea* (Lecanorales, Ascomycota) from Pakistan. *MycologyKeys*, 38, 25–34. ISSN 1314-4049
- KNUDSEN, K. & KOCOURKOVÁ, J. (2014): A new species of *Lecidea* (Lecideaceae, Lichenized Ascomycetes) from the mountains of California. *Opuscula Philolichenum*, 13, 80-83.
- KOSECKA, M., GUZOW-KRZEMIŃSKA, B., ČERNAJOVÁ, I., ŠKALOUD, P., JABŁOŃSKA, A. & KUKWA, M. (2021): New lineages of photobionts in Bolivian lichens expand our knowledge on habitat preferences and distribution of *Asterochloris* algae. *Scientific Reports* 11: 8701 [12 p.].
- KREMER, B.P. & MUHLE H. (1998): *Lišejníky, mechorosty, kaprad'orosty: evropské druhy: [spolehlivý a obsáhlý kapesní atlas pro milovníky přírody]*. Ilustroval Herbert GRAMBIHLER. Praha: Ikar. Průvodce přírodou (Ikar). ISBN 80-7202-356-x.
- KRESS, W. J. & ERICKSON D.L., ed. (2012): *DNA Barcodes: Methods and Protocols*. New York, USA: Humana Press. ISBN 978-1-61779-590-9.
- MARTIN, K.J. & RYGIEWICZ T. P. (2005): Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiolog.* 1Dynamac Corporation, National Health and Environmental Effects Research Laboratory, Corvallis, OR USA, 5(1.). Dostupné z: doi:10.1186/1471-2180-5-28
- MATTHEWS, J. A. & TRENBIRTH, H. E. (2011): Growth rate of a very large crustose lichen (*Rhizocarpon* subgenus) and its implications for lichenometry. *Geografiska Annaler* 93A(1): 27-39.
- MONDAL, S. & SINGH R. L., ed. (2021): *Advances in Animal Genomics*. United States: Academic Press. ISBN 978-0-12-820595-2.

- NADYEINA, O., GRUBE M. & MAYRHOFER H. (2010): A contribution to the taxonomy of the genus *Rinodina* (Physciaceae, lichenized Ascomycotina) using combined ITS and mtSSU rDNA data. *The Lichenologist*, 42(5), 521–531.
- NASH, H. (2008): *Lichen biology*. 2nd ed. New York: Cambridge University Press. ISBN 978-0-521-87162-4.
- ORANGE, A., JAMES, P. W. & WHITE, F. J. (2001): *Microchemical Methods for the Identification of Lichens*. British Lichen Society, 101 pp.
- PARK S.-Y., JANG S.-H., OH S.-O., KIM J.A. & HUR J.-S. (2014): An easy, rapid, and cost-effective method for DNA extraction from various lichen taxa and specimens suitable for analysis of fungal and algal strains. - *Mycobiology*, 42(4): 311–316
- PERLMUTTER, G. B. (2009): Basic Lichenology 2: Reproduction. *Bulletin of the California Lichen Society* 16(1): 7-11.
- PHILLIPS, A., D. JANIES & WHEELER W. (2000): Multiple Sequence Alignment in Phylogenetic Analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 16(3), 317–330.
- PURTY R.S. & CHATTERJEE S. (2016): DNA Barcoding: An Effective Technique in Molecular Taxonomy. *Austin J Biotechnol Bioeng*. 3(1): 1059. ISSN: 2378-3036.
- RATNASINGHAM, S. & HEBERT, P.D.N., (2007): bold: the Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol. Ecol. Notes* 7 (3), 355–364
- SCHMULL, M., MIADLIKOWSKA, J., PELZER, M., STOCKER-WÖRGÖTTER, E., HOFSTETTER, V., FRAKER, E., HODKINSON, B. P., REEB, V., KUKWA, M., LUMBSCH, H. T., KAUFF, F. & LUTZONI, F. (2011): Phylogenetic affiliations of members of the heterogeneous lichen-forming fungi of the genus *Lecidea* sensu Zahlbruckner (Lecanoromycetes, Ascomycota). *Mycologia* 103(5): 983-1003.
- SINGH, P. K., SINGH, P., SINGH, R. P. & SINGH, R. L.: (2021): Chapter 2 - From gene to genomics: tools for improvement of animals. In: MONDAL, S. & R. L. SINGH, ed. (2021): *Advances in Animal Genomics*. Academic Press. p. 13–32. ISBN 9780128205952.
- SMITH, A. L. (1975): *Lichens*. 1st reprinted ed, Richmond Publishing Co. ISBN 9780855461928.

SMITH, C.W., A. APTROOT, B.J. COPPINS, A. FLETCHER, O.L. GILBERT, P.W. JAMES & WOLSELEY P.A., ed. (2009): The Lichen Flora of Great Britain and Ireland. 2nd ed. Great Britain: MPG Books Group, Bodmin and King's Lynn. ISBN 978 0 9540418 8 5

TRIPP, E.A. & LENDEMER, J.C. (2015): *Candelariella clarkii* and *Lecidea hoganii*: two lichen species new to science from White Rocks Open Space, City of Boulder, Colorado. *The Bryologist*. 118(2), 154-163.

UPRETI, D.K., NAYAKA S. & ANDREEV M.P. (2006): Notes on some species of the lichen genus *Lecidea* from India. *MYCOTAXON*. 95, 323–330.

VONDRÁK, J., S. SVOBODA, J. MALÍČEK, PALICE Z., KOCOURKOVÁ J., KNUDSEN K., MAYRHOFER H., THÜS H., SCHULTZ M., JIŘÍ KOŠNAR J. & HOFMEISTER J. (2022): From Cinderella to Princess: an exceptional hotspot of lichen diversity in a long-inhabited central-European landscape. *Preslia*, 94, 143–181

WIJAYAWARDENE, N. N., HYDE, K. D., LUMBSCH, H. T., LIU, J. K., MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N., EKANAYAKA, A. H., TIAN, Q. & PHOOKAMSAK, R. (2018): Outline of Ascomycota: 2017. *Fungal Diversity* 88: 167–263.

WIRTH, V., HAUCK M. & SCHULTZ M. (2013): *Die Flechten Deutschlands*. Germany: Eugen Ulmer.

ZOLLER, S., SCHEIDEGGER CH. & SPERISEN CH. (1999): PCR primers for the amplification of mitochondrial small subunit ribosomal dna of lichen-forming ascomycetes. *Lichenologist*, 31(5), 511–516.

## **Internetové zdroje**

Agentura ochrany přírody a krajiny: Nálezová databáze ochrany přírody [online]. 2006–2022 [cit. 2022-05-15]. Dostupné z: <https://portal.nature.cz/nd/>

QIAGEN (2014): QIAamp® DNA Micro Handbook [online]. [cit. 31. 3. 2022]. Dostupné z WWW: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-dna-kits/#orderinginformation/>

## Přílohy

### Příloha č. I – Seznam veškerých položek, které jsem měla k dispozici pro izolaci DNA

<b>ID</b>	<b>ID Sample</b>	<b>Druh</b>	<b>Lokalita</b>	<b>Gps</b>	<b>Datum</b>
1	15026	<i>Lecidea lithophila</i>	Krkonoše, Sněžka – údolí Rudného potoka, 1095 m, žulový balvan	N50.730175 E015.731611	28. 10. 2015
2	15065	<i>Lecidea lithophila</i>	Krkonoše, Sněžka – údolí Rudného potoka, 1049 m, žulový balvan	N50.729483 E015.730650	28. 10. 2015
3	19266	<i>Lecidea plana</i>	Krkonoše, Modrý důl, Modrý potok, 1313 m, žulový balvan	N50.720761 E015.691997	4. 9. 2019
4	19269	<i>Lecidea confluens</i>	Krkonoše, Modrý důl, Modrý potok, 1206 m, žulový balvan	N50.718342 E015.694708	4. 9. 2019
5	20235	<i>Lecidea lithophila</i>	Adršpašsko-teplické skály, Bučina, 568 m, pískovec	N50.611150 E016.126475	19. 8. 2020
6	20309	<i>Lecidea plana</i>	Broumovské stěny, Koruna, 747 m, pískovec	N50.526218 E016.317744	11. 9. 2020
7	20358	<i>Lecidea confluens</i>	Krkonoše, Luční hora, 1519 m, žulový balvan	N50.728537 E015.683648	15. 9. 2020
8	20359	<i>Lecidea plana</i>	Krkonoše, Luční hora, 1545 m, žulový balvan	N50.727587 E015.682360	15. 9. 2020
9	20368	<i>Lecidea lithophila</i>	Krkonoše, Velká Kotelní jáma, 1360 m, žulový balvan	N50.754250 E015.534393	16. 9. 2020
10	20388	<i>Lecidea plana</i>	Krkonoše, Velká Kotelní jáma, 1174 m, žulový balvan	N50.750481 E015.536041	16. 9. 2020
11	20418	<i>Lecidea confluens</i>	Krkonoše, Malá Kotelní jáma, 1391 m, žulový balvan	N50.751755 E015.531688	17. 9. 2020
12	20680	<i>Lecidea fuscoatra</i>	Žďárské vrchy, Pasecká skála, 801 m, rulová skála	N49.615300 E016.081172	10. 10. 2020
13	20878	<i>Adelolecia pilati</i>	Krkonoše, Labský důl, Pančavská jáma, 1246 m, žulový balvan	N50.757392 E015.550325	30. 7. 2016



14	20893	<i>Lecidea fuscoatra</i>	Krkonoše, Labský důl, Pančavská jáma , 1246 m, žulový balvan	N50.757392 E015.550325	30. 7. 2016
15	20919	<i>Lecidea</i>	Krkonoše, Labský důl, Pančavská jáma , 1335 m, žulový balvan	N50.756902 E015.549703	30. 7. 2016
16	20937	<i>Lecidea</i> <i>sp.</i>	Krkonoše, Labský důl, Pančavská jáma , 1335 m, žulový balvan	N50.756902 E015.549703	30. 7. 2016
17	20946	<i>Lecidea plana</i>	Krkonoše, Labský důl, Pančavská jáma , 1335 m, žulový balvan	N50.756902 E015.549703	30. 7. 2016
18	20962	<i>Lecidea lithophila</i>	Krkonoše, Labský důl, Pančavská jáma , 1215 m, žulový balvan	N50.757481 E015.551225	30. 7. 2016
19	21008	<i>Lecidea lithophila</i>	Krkonoše, Labský důl, Pudlavský vodopád, 1004 m, žulový balvan	N50.758486 E015.567647	1. 7. 2015
20	21023	<i>Lecidea confluens</i>	Krkonoše, Labský důl, Pudlavský vodopád, 1004 m, žulový balvan	N50.758372 E015.567700	1. 7. 2015
21	21101	<i>Lecidea lapicida</i>	Krkonoše, Labský důl, Harrachova jáma, 1001 m, žulový balvan	N50.754439 E015.549728	30. 7. 2012
22	21603	<i>Lecidea confluens</i>	Orlické hory, Sfinga, 940 m, rulový balvan	N50.273751 E016.408606	12. 7. 2021
23	21705	<i>Lecidea fuscoatra</i>	Žďárské vrchy, Tisůvka, 789 m, rulová skála	N49.651887 E015.949326	3. 8. 2021
24	21706	<i>Lecidea fuscoatra</i>	Žďárské vrchy, Tisůvka, 789 m, rulová skála	N49.651887 E015.949326	3. 8. 2021
25	21713	<i>Lecidea lithophila</i>	Žďárské vrchy, Tisůvka, 789 m, rulová skála	N49.651887 E015.949326	3. 8. 2021
26	21715	<i>Lecidea lithophila</i>	Žďárské vrchy, Tisůvka, 789 m, rulová skála	N49.651887 E015.949326	3. 8. 2021

27	21716	<i>Lecidea lithophila</i>	Žďárské vrchy, Tisůvka, 789 m, rulová skála	N49.651887 E015.949326	3. 8. 2021
28	21717	<i>Lecidea lapicida</i>	Žďárské vrchy, Tisůvka, 789 m, rulová skála	N49.651887 E015.949326	3. 8. 2021
29	21728	<i>Lecidea fuscoatra</i>	Žďárské vrchy, Brožova skála, 787 m, rulová skála	N49.624471 E016.011047	4. 8. 2021
30	21731	<i>Lecidea lapicida</i>	Žďárské vrchy, Brožova skála, 787 m, rulová skála	N49.624471 E016.011047	4. 8. 2021
31	21743	<i>Lecidea lapicida</i>	Žďárské vrchy, Brožova skála, 778 m, rulová skála	N49.625126 E016.009504	4. 8. 2021
32	21744	<i>Lecidea lapicida</i>	Žďárské vrchy, Brožova skála, 778 m, rulová skála	N49.625126 E016.009504	4. 8. 2021
33	21750	<i>Lecidea plana</i>	Králický Sněžník, U šestihranu, 1240 m, rulový balvan	N50.169253 E016.848748	7. 8. 2021
34	21752	<i>Lecidea confluens</i>	Králický Sněžník, U šestihranu, 1240 m, rulový balvan	N50.169253 E016.848748	7. 8. 2021
35	21753	<i>Lecidea confluens</i>	Králický Sněžník, U šestihranu, 1240 m, rulový balvan	N50.169253 E016.848748	7. 8. 2021
36	21754	<i>Lecidea confluens</i>	Králický Sněžník, U šestihranu, 1240 m, rulový balvan	N50.169253 E016.848748	7. 8. 2021
37	21756	<i>Lecidea plana</i>	Králický Sněžník, U šestihranu, 1240 m, rulový balvan	N50.169253 E016.848748	7. 8. 2021
38	21757	<i>Lecidea plana</i>	Králický Sněžník, U šestihranu, 1240 m, rulový balvan	N50.169253 E016.848748	7. 8. 2021
39	21758	<i>Lecidea plana</i>	Králický Sněžník, U šestihranu, 1240 m, rulový balvan	N50.169253 E016.848748	7. 8. 2021
40	21762	<i>Lecidea lithophila</i>	Králický Sněžník, Milíř, 1285 m, rulový balvan	N50.169052 E016.855650	7. 8. 2021
41	21763	<i>Lecidea lithophila</i>	Králický Sněžník, Milíř, 1285 m, rulový balvan	N50.169052 E016.855650	7. 8. 2021
42	21799	<i>Lecidea lithophila</i>	Králický Sněžník, kar Moravy, 1100 m, rulový balvan	N50.199769 E016.843144	20. 8. 2021
43	21819	<i>Lecidea lithophila</i>	Králický Sněžník, kar Moravy, 1085 m, rulový balvan	N50.199404 E016.842878	20. 8. 2021

44	21865	<i>Lecidea plana</i>	Krkonoše, Malá Kotelní jáma, 1340 m, žulový balvan	N50.750168 E015.529919	4. 9. 2021
45	21871	<i>Lecidea plana</i>	Krkonoše, Malá Kotelní jáma, 1340 m, žulový balvan	N50.750168 E015.529919	4. 9. 2021
46	21877	<i>Lecidea plana</i>	Krkonoše, Malá Kotelní jáma, 1320 m, žulový balvan	N50.749625 E015.530001	4. 9. 2021
47	21882	<i>Lecidea lapicida</i>	Krkonoše, Malá Kotelní jáma, 1378 m, žulový balvan	N50.750546 E015.529305	4. 9. 2021
48	21883	<i>Lecidea lithophila</i>	Krkonoše, Malá Kotelní jáma, 1352 m, žulový balvan	N50.750401 E015.529700	4. 9. 2021
49	21885	<i>Lecidea lapicida</i>	Krkonoše, Malá Kotelní jáma, 1352 m, žulový balvan	N50.750401 E015.529700	4. 9. 2021
50	21892	<i>Lecidea confluens</i>	Krkonoše, Malá Kotelní jáma, 1352 m, žulový balvan	N50.750401 E015.529700	4. 9. 2021
51	21911	<i>Lecidea confluens</i>	Krkonoše, Malá Kotelní jáma, 1390 m, žulový balvan	N50.750775 E015.529233	4. 9. 2021
52	21922	<i>Lecidea lapicida</i>	Krkonoše, Malá Kotelní jáma, 1378 m, žulový balvan	N50.750546 E015.529305	4. 9. 2021
53	22093	<i>Lecidea fuscoatra</i>	Kokořínsko, Stříbrný vrch, 437 m, pískovec	N50.595734 E014.446763	22. 9. 2021
54	22142	<i>Lecidea fuscoatra</i>	Kokořínsko, Husa, 444 m, pískovec	N50.588198 E014.452120	22. 9. 2021
55	22152	<i>Lecidea fuscoatra</i>	Jeseníky, Pasák, 735 m, amfibolitová skála	N50.139081 E017.026319	26. 9. 2021
56	22155	<i>Lecidea fuscoatra</i>	Jeseníky, Franz-Franz, 761 m, rulový balvan	N49.978879 E017.283852	27. 9. 2021
57	22156	<i>Lecidea fuscoatra</i>	Jeseníky, Franz-Franz, 761 m, rulový balvan	N49.978879 E017.283852	27. 9. 2021
58	22741	<i>Lecidea lithophila</i>	Krkonoše, Labská bouda, 1394 m, žulový balvan	N50.775411 E015.550275	29. 10. 2021
59	22742	<i>Lecidea plana</i>	Krkonoše, Labská bouda, 1358 m, žulový balvan	N50.774692 E015.545909	29. 10. 2021