

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2022

Nikola Žďárská

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

**Sekundární metabolity stélek lichenizovaných hub
rodu *Cladonia* ve Vysokých Sudetech**

Bakalářská práce

Autor: Nikola Žďárská

Studijní program: B1101/Matematika

Studijní obor: Biologie se zaměřením na vzdělávání,
Matematika se zaměřením na vzdělávání

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

Zadání bakalářské práce

Autor: Nikola Žďárská

Studium: S18MA027BP

Studijní program: B1101 Matematika

Studijní obor: Biologie se zaměřením na vzdělávání, Matematika se zaměřením na vzdělávání

Název bakalářské práce: **Sekundární metabolity stélek lichenizovaných hub rodu Cladonia ve Vysokých Sudetech**

Název bakalářské práce AJ: Secondary metabolites of thalli of lichenized fungi of the genus Cladonia in High Sudetten Mountains

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Práce vyžaduje ovládnutí techniky tenkovrstevné chromatografie a izolaci sekundárních metabolitů z herbářových vzorků lišejníkových stélek.

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

Wirth, V., Hauck, M. & Schultz, M. 2013. Die Flechten Deutschlands. ? Stuttgart: Ulmer. 2 volumes. 1244 pages. Hardcover. ISBN: 978-3-8001-5903-1

Garantující pracoviště: Katedra biologie,
Přírodovědecká fakulta

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

Datum zadání závěrečné práce: 23.1.2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, ze kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne 10. 5. 2022

Nikola Žďárská

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Josefu Haldovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky při psaní této práce, dále za poskytnuté studijní materiály a odbornou pomoc v laboratoři. Chtěla bych také poděkovat své rodině za obrovskou podporu během celého studia i při psaní této práce.

Anotace práce

ŽDÁRSKÁ, N. Sekundární metabolity stélek lichenizovaných hub rodu *Cladonia* ve Vysokých Sudetech. Hradec Králové, 2022. Bakalářská práce na přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Josef Halda, Ph.D.

Bakalářská práce se zabývá studiem druhotných metabolických produktů specifického metabolismu lišejníků, které nazýváme lišejníkové látky neboli sekundární metabolity. První část bakalářské práce je literární rešerší pojednávající o lišejnících jakožto ekologické skupině organismů a o sekundárních metabolitech a jejich významu, jak pro lišejníky, tak pro druhy z živočišné říše či člověka. Druhá část bakalářské práce je výzkumem obsahu sekundárních metabolitů, obsažených ve stélkách morfologicky velmi variabilních druhů dutohlávek, izolovaných pomocí metody tenkovrstvé chromatografie. Na základě získaných poznatků byl vytvořen určovací klíč a didaktické výukové pomůcky, které jsou obsaženy v příloze této práce.

Klíčová slova

Lišejník, dutohlávka, TLC chromatografie, sekundární metabolit

Annotation

ŽDÁRSKÁ, N. Secondary metabolites of thalli of lichenized fungi of the genus *Cladonia* in High Sudetten Mountains. Hradec Králové, 2022. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor RNDr. Josef Halda, Ph.D.

The bachelor thesis deals with the study of secondary metabolic products of specific lichen metabolism, which are called lichen substances or secondary metabolites. The first part of the bachelor thesis is a literature search dealing with lichens as an ecological group of organisms and with secondary metabolites and their importance, both for lichens and for species from the animal kingdom or humans. The second part of the bachelor's thesis is an analysis of the content of secondary metabolites contained in the thalli of morphologically highly variable species of hollowworms (genus *Cladonia*) isolated by thin-layer chromatography. On the basis of the findings obtained, a determination key and didactic teaching aids were developed and are included in the appendix of this thesis.

Keywords

Lichen, *Cladonia*, TLC chromatography, secondary metabolites

Obsah

Úvod a cíle práce	8
1 Literární rešerše	9
1.1 Charakteristika lokality Vysokých Sudet	9
1. 1. 1. Historie	9
1. 1. 2 Geologická charakteristika	10
1.2 Lišejníky (Lichenes).....	11
1.3 Lišejníkové látky (sekundární metabolity)	12
1. 3. 1. Význam lišejníkových látek.....	13
1. 3. 2. Neznámější lišejníkové látky.....	14
1.4 rod <i>Cladonia</i> (dutohlávky).....	19
1.5 Metoda tenkovrstvé chromatografie (TLC).....	30
1. 5. 1. Princip TLC	31
2 Metodika	33
2.1 Postup vyvolání desky se vzorky	33
2.2 Určení lišejníkových látek.....	36
2. 2. 1. Výpočet retenčního faktoru	36
2. 2. 2. Výsledné určení sekundárního metabolitu	36
2.3 Tvorba klíče	37
2.4 Příprava didaktických pomůcek	38
3 Výsledky	39
3.1 Identifikované druhy lišejníků.....	39
3.2 Nalezené lišejníkové látky	40
4 Diskuse	44
Závěr	47
Literatura	48
Přílohy	52

Úvod a cíle práce

Lišejníky tvoří ekologickou skupinu podvojných organismů. Symbiotické spojení mezi dvěma organismy umožňuje osídlení mnohých extrémních stanovišť na naší planetě. Díky netradiční stavbě a způsobu života jsou látkovým a energetickým metabolismem produkovány také specifické látky, které nazýváme lišejníkové látky neboli sekundární metabolity.

Sekundární metabolity jsou složité chemické sloučeniny poskytující lišejníkům mnohé výhody a funkce. V krátkodobém měřítku však nejsou zcela nezbytné pro život. Sekundární metabolity hrají také významnou roli v taxonomii lišejníků.

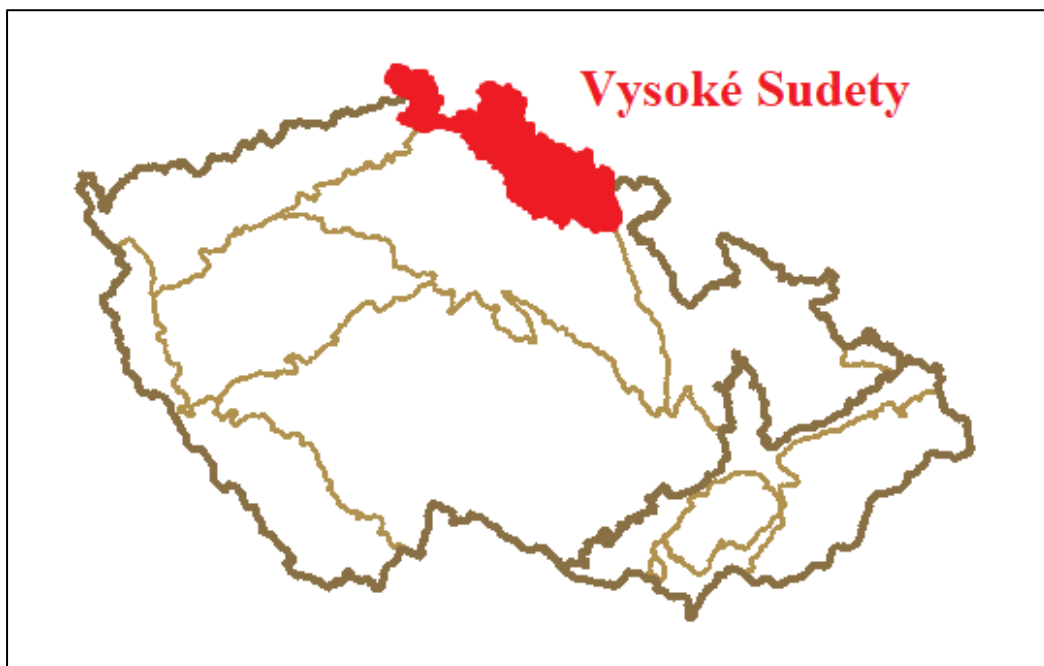
Cílem teoretické části této práce je sjednotit nejdůležitější poznatky o lišejnících, o sekundárních metabolitech obsažených v jejich stélkách a o metodě tenkovrstvé chromatografie, pomocí níž můžeme dané sekundární metabolity identifikovat.

Cílem praktické části této bakalářské práce je determinace morfologicky velmi variabilních druhů dutohlávek na základě obsahu sekundárních metabolitů izolovaných pomocí metody tenkovrstvé chromatografie. A následné vytvoření určovacího klíče dutohlávek podle zjištěných obsahových látek. Dalším cílem je vytvořit výukové plakátky a pracovní list pro žáky gymnázií, v nichž budou propojeny poznatky získané při psaní této práce s aktuálně platným rámcově vzdělávacím programem pro gymnázia.

1 Literární rešerše

1.1 Charakteristika lokality Vysokých Sudet

Sudety jsou tvořeny soustavou vyšších pohoří, izolovaných vrcholů a horských hřbetů. Tvoří protáhlé horské pásmo dlouhé zhruba 250 km a rozprostírají se v oblasti mezi 50 až 51° severní šířky a 14 až 18° východní délky. Sudety můžeme rozčlenit na mnoho menších celků. Nejčastěji se setkáváme s dělením na Sudety západní, Sudety střední a Sudety východní. Jako západní Sudety (někdy také Vysoké Sudety) jsou označovány Krkonoše. Krkonoše jsou nejvyšším pohořím celých Sudet s nejvyšším vrcholem Sněžkou dosahují výšky 1603 metrů nad mořem. Jako střední Sudety jsou označovány Orlické hory, východní Sudety jsou známější jako Jeseníky (Jeník, 1961).



Obr. 1: Oblast Vysokých Sudet (geoportal.gov.cz)

1. 1. 1. Historie

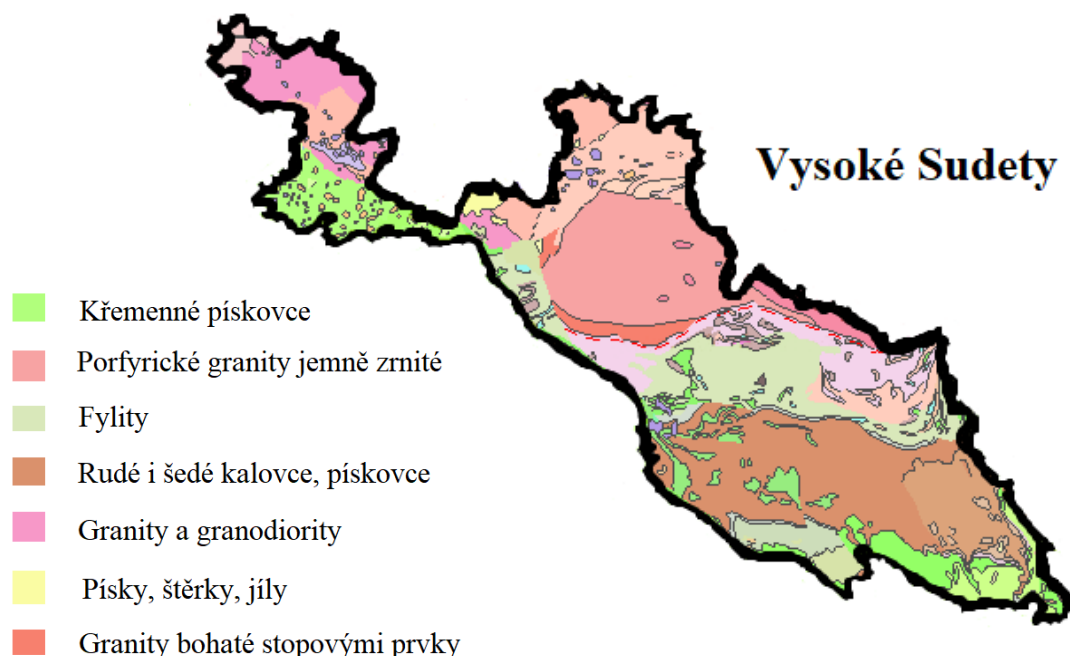
Krkonoše řadíme mezi nejstarší evropská vrásová pohoří, pocházející z doby předdevonské. Zvětrávání, eroze a odnos probíhaly již před počátkem třetihor. Dnešní reliéf je však výsledkem intenzivní erozní činnosti třetihorního a čtvrtohorního stáří (Obenberger, 1952).

Po dlouhá tisíciletí zde ledovce a horské toky vytvářely hluboké prolákliny nazývané ledovcové kary. V Krkonoších jich můžeme najít čtrnáct. Souhrou mnoha jevů, mezi něž můžeme řadit činnost větru, ledu, sněhu, vody, lavin, teplot a orientací svahů, došlo v ledovcových karech k vytvoření nejbohatšího naleziště fauny a flóry v celých Krkonoších (Štursa, 1983).

Osídlování Krkonoš ve středověku se uskutečňovalo velmi pomalu a povětšinou bylo omezeno na obchodní cesty spojující Čechy a Slezsko. K většímu a systematickému osídlení horských oblastí Krkonoš docházelo až v 16. století v souvislosti s rozvojem těžby kovů, sklářského průmyslu a rozsáhlého kácení lesů. Od 18. století příroda utrpěla vlivem pastvy, sběračů léčivých bylin a počínajícího turismu nemalé škody, ke kterým v dnešní době také přispívá negativní vliv imisí (David, 2019).

1. 1. 2 Geologická charakteristika

Oblast Vysokých Sudet se nachází v severní části Českého masívu. Převažujícími horninami v této oblasti jsou šedé žula, fylity, svory a krystalické břidlice. (Chaloupský, 1989).



Obr. 2: Výřez mapy oblasti Vysokých Sudet z hlediska geologického rozdělení (geoportal.gov.cz)

1.2 Lišejníky (*Lichenes*)

Lišejníky nejsou skupinou taxonomickou, nýbrž skupinou ekologickou (Kalina, 2005) a na rozdíl od ostatních vyšších či nižších rostlin, nejsou jednotným organismem, ale organismem podvojným. Proto zaujímají v rostlinné říši zvláštní postavení (Rabšteinek, 1987). Lišejník je tedy symbiotickým organismem složeným z houby (*Fungi*) a sinice (*Cyanobacteria*), případně řasy. Houbového symbionta označujeme jako mykobiont. Nejčastěji ho tvoří vřeckovýtrusná houba (*Ascomycetes*). U několika lišejníkových rodů je mykobiontem houba stopkovýtrusná (*Basidiomycota*). Fotobionty jsou u lišejníků sinice a zelené řasy (*Chlorophyta*) (Kremer, 1998).

Spojení těchto dvou organismů v jeden celek bylo popsáno již v roce 1869 (Schwendener, 1869). Propojením obou komponentů, mykobionta a fotobionta, vzniká symbiotický organismus s novými vlastnostmi, který má nové nároky na prostředí, v němž se vyskytuje i na způsoby rozmnožování (Balabán, 1960).

Partneři symbiomy jsou specifictí. Daný druh houby se nejčastěji spojuje s daným druhem řasy. Oba účastníci čerpají ze společného soužití výhody a vytvářejí unikátní životní formu označovanou jako stélka (*thallus*). Hyfy houby (mykobiont) tvoří větší část stélky a určují její vzhled. Poskytují buňkám fotobionta ochranu před nepříznivými vlivy z vnějšího prostředí, chrání před vysycháním a přehříváním. Především ale poskytují vodu, v níž jsou rozpuštěné důležité minerální látky. Fotobiont obsahuje chlorofyl, je schopen fotosyntézy a do symbiotického spojení dodává organické látky, například glycidy (Rabšteinek, 1987).

V symbiotickém spojení nemusí být nutně pouze jeden mykobiont a jeden fotobiont. Jsou známy případy, kdy tvoří stélku lišejníku kromě hyf houby ještě zelený a sinicový fotobiont (Nash, 2008).

Díky specifickému soužití jsou lišejníky schopny existovat v extrémních lokalitách, v nichž by ani jeden ze zúčastněných organismů izolovaně existovat nemohl. Mezi extrémní lokality výskytu lišejníků mohou patřit holé skály, chudé písčité půdy či horské oblasti s vyšší nadmořskou výškou (Balabán, 1960). Horské oblasti vyznačující se rozmanitostí podkladů i stanovišť jsou bohaté na výskyt lišejníků. Lišejníková flóra Krkonoš v minulosti patřila k nejbohatším ve střední Evropě. Hlavní příčinou je pestrá

geologická stavba a velká nadmořská výška Krkonoš. Lišejníky se významně podílejí na utváření rostlinných společenstev Krkonoš, protože jako první osidlují pro jiné rostliny neobyvatelná stanoviště. Na holém povrchu tvoří lišejníky běžně samostatná společenstva. Lišejníková flóra Krkonoš čítá přes 200 rodů lišejníků a více než 600 druhů. Nejpočetnějšími rody jsou dutohlávka (*Cladonia*), misnička (*Lecanora*) a mapovník (*Rhizocarpon*) (Flousek, 2007).

Lišejníky jsou dlouhověké a vytrvalé, díky tomu mohou být pozorovány a sbírány po celý rok (Flousek, 2007). Růst lišejníků je ve srovnání s jinými houbami velmi pomalý. U některých rodů byl zjištěn přírůstek pouze 1 mm za 20 let. Stáří některých stélek rodu mapovník (*Rhizocarpon*) se odhaduje na 1000–4500 let. Lupenité a keříčkovité lišejníky rostou rychleji, zhruba 10–40 let (Kalina, 2005).

Vegetativní tělo lišejníků neboli stélku (thallus) můžeme dělit na dva základní stavební typy. Stejnorodá (homeomerická) stélka se vyskytuje nejčastěji u rosolovitých lišejníků. Buňky fotobionta a hyfy mykobionta jsou uspořádány rovnoměrně. Vrstevnatá (heteromerická) stélka je diferencovaná do několika odlišných vrstev a hyfy fotobionta najdeme jen v prostřední vrstvě (dřeň). Dále rozlišujeme tři hlavní růstové formy: korovité lišejníky, lupenité lišejníky a keříčkové lišejníky. Tyto růstové formy mezi sebou přecházejí (Kremer, 1998). Lišejníky je dále možné dělit dle typu obsazeného substrátu na lišejníky skalní (epilitické), lišejníky zemní (epigeické) a lišejníky stromové (epifytické) (Flousek, 2007).

1.3 Lišejníkové látky (sekundární metabolity)

Důsledkem zvláštní anatomické stavby stélky lišejníku a způsobu života je odlišný látkový a energetický metabolismus, jehož výsledkem jsou nejen obvyklé produkty látkové výměny (např. sacharidy, lipidy, volné aminokyseliny), ale také látky značně odlišné od produktů metabolismu jiných rostlin (Jarkovský, 1978).

Pro lišejníky je charakteristické vytváření druhotných metabolických produktů nazývaných lišejníkové látky neboli sekundární metabolity. Jedná se o složité chemické sloučeniny, které v krátkodobém měřítku nejsou zcela nezbytné pro život. Plní mnohé

funkce a často také ovlivňují zbarvení lišejníkové stélky (Flousek, 2007). Dnes je známo více jak 1050 sekundárních metabolitů (Stocker-Wörgötter, 2008).

Jedná se o látky rozpustné v organických rozpouštědlech a ve vodě většinou nerozpustné. Často mají kyselou povahu, z tohoto důvodu byly dříve nazývány lišejníkovými kyselinami (Jarkovský, 1978).

Sekundární metabolity jsou produkovány mykobiontem a ukládají se extracelulárně tj. na vnějším povrchu houbových hyf (Orange, 2010). Lišejníkové látky jsou koncentrovány v sušině stélky a tvoří až 20 % její hmotnosti. Ukládají se v kůře nebo ve dřeni. V kůře bývají obsaženy barevné látky a ve dřeni látky bezbarvé (např. depsidy) (Jarkovský, 1978). Někdy nám samotný vzhled lišejníku může napovědět, jaké chemické látky obsahuje (Orange, 2010).

Syntéza lišejníkových látek probíhá třemi základními biosyntetickými dráhami. Jsou to dráha kyseliny šikimové, dráha kyseliny mevalonové a dráha acetyl-polymalonylová (Nash, 2008).

Pro zjištění přítomnosti obsahu lišejníkových látek v lišejníku slouží více sofistikovaných metod, mezi které patří například reakce stélky na dlouhovlnné UV záření, mikrokrytalizační testy nebo chromatografie. Při práci s lišejníky využíváme dva základní typy chromatografie. Tenkovrstvou chromatografií (TLC) a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) (Malíček, 2012).

1. 3. 1. Význam lišejníkových látek

Lišejníkové látky některých druhů lišejníků jsou velmi dlouho využívány člověkem jako barviva. Za tímto účelem byly používány lišejníky obsahující erythrin a kyselinu lekanorovou. Dále byly lišejníkové látky využívány k léčebným účelům jako složky léčivých čajů (kyselina fumarprotocetrarová z pukléřky islandské). Některé sekundární látky (např. kyselina usnová) mohou mít také antibiotické účinky (Jarkovský, 1978).

Sekundární metabolity plní také ochrannou funkci. Přítomnost kyselin způsobuje hořkou chuť stélky, která odrazuje většinu herbivorních živočichů od jejich konzumace

a tmavé barvivo chrání druhy před poškozením ze slunečního záření (Černajová & Svoboda, 2014; Kalina, 2005). Antibiotické účinky kyselin zabraňují napadení lišejníku bakteriemi. Existují také látky, které jsou toxické pro savce např. kyselina vulpinová (Kalina, 2005).

Významnou roli hrají lišejníkové látky také v taxonomii. Používání obsahu chemických látek k determinaci se datuje již od sedmdesátých let minulého století (Walker et James, 1980). V mnohých případech se členění na základě obsahu chemických látek shoduje s členěním na základě morfologicko-anatomických znaků. U některých druhů byly zjištěny pouze rozdíly chemické (Jarkovský, 1978). Schopnost detekce sekundárních metabolitů napomohla rozvoji taxonomie mnoha makroskopických lišejníků zejména rodů provazovka (*Usnea*), vousatec (*Bryoria*) a dutohlávka (*Cladonia*) (Malíček, 2012).

Kyseliny způsobující zbarvení působí jako filtr a chrání fotobionty před slunečním světlem (Kalina, 2005). Některé látky (například atranorin nebo kyselina usnová) mají schopnost absorbovat UV záření (Rundel, 1978). Lišejníkové látky mohou navíc potencionálně ovlivnit buněčné dělení řasového partnera, čímž hrají zásadní roli v udržování rovnováhy mezi symbionty (Lokajová et al. 2014). Sekundární metabolity mohou zastávat důležitou roli při detoxikaci těžkých kovů (Purvis, 2008).

Existují však také názory, že lišejníkové látky představují pouze odpadní produkty metabolismu mykobionta a že nemají konkrétní význam pro život lišejníku. (Kalina, 2005)

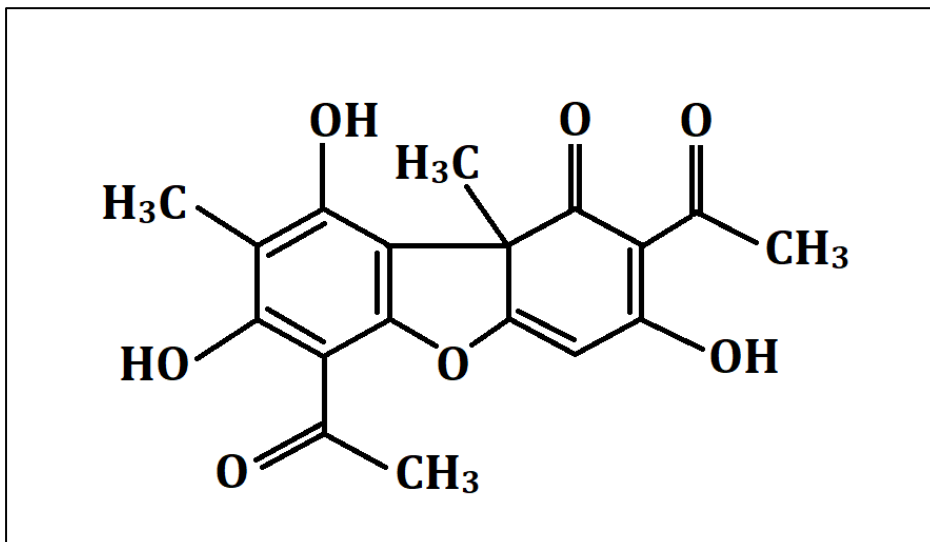
1. 3. 2. Nejznámější lišejníkové látky

DIBENZOFURANY

Kyselina usnová

Kyselina usnová byla poprvé izolována roku 1844 a od té doby se stala jedním z nejrozsáhleji studovaných metabolitů. Nejhojněji se vyskytuje u lišejníků rodu *Cladonia*, *Usnea* a *Lecanora*. Mnoho lišejníků a extraktů obsahujících kyselinu usnovou se využívá pro lékařské, kosmetické a ekologické účely (Ingolfsdottir, 2002). Kyselina usnová způsobuje žlutavé až žlutozelené zbarvení lišejníku a patří tak mezi pigmenty

chránící fotobionta před dopadajícím zářením (Rundel, 1978). Pro některé obratlovce může být toxická (Dailey et al., 2008). Kyselina usnová je odvozena z acetylpolymalonylové dráhy (Elix et Stocker-Wörgötter, 1996).



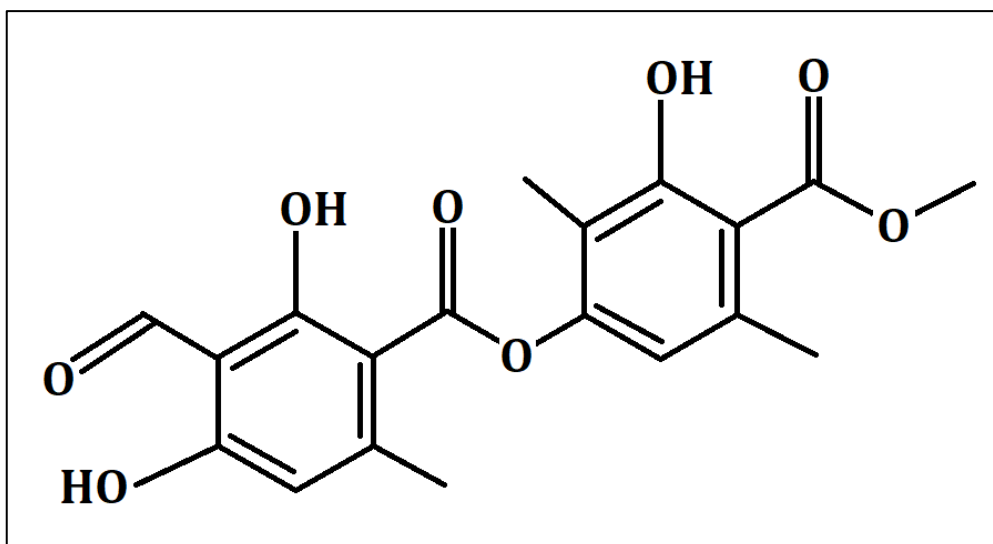
Obr. 3: Vzorec kyseliny usnové.

DEPSIDY

Stavebními jednotkami lišejníkových depsidů jsou fenolkarboxylové kyseliny odvozené od orcinu a β -orcinu. Lišejníkové depsidy vznikají obvykle spojením dvou nebo tří molekul základní složky (Jarkovský, 1978).

Atranorin

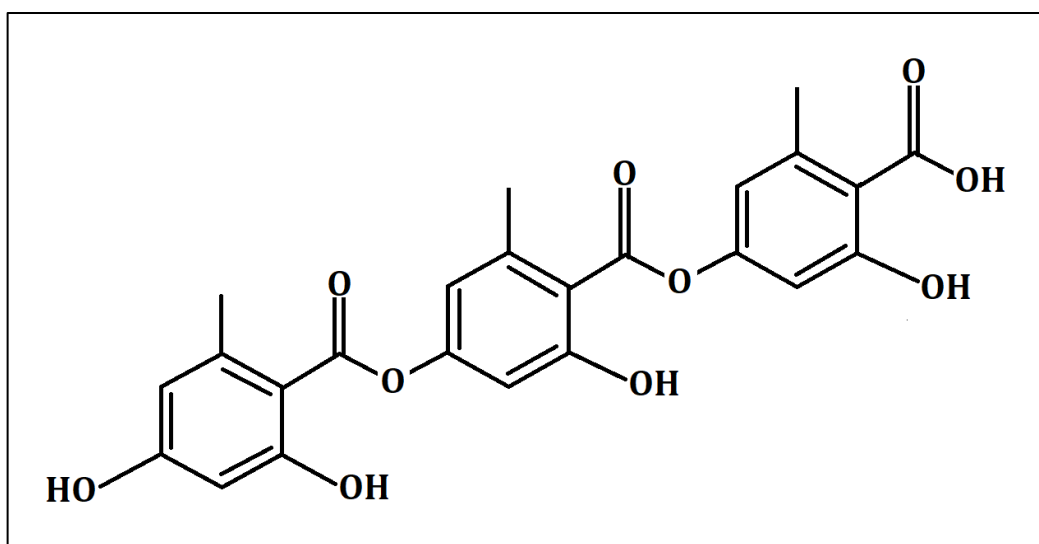
Atranorin je jedním z nejběžnějších sekundárních metabolitů lišejníků (Studzinska-sroka, 2017). Je jednou z lišejníkových látek, které mají silné schopnosti absorbovat UV (Rundel, 1978). Barva skvrny po aplikaci kyseliny sírové a vypálení je matně žlutá až oranžovožlutá (Orange, 2010).



Obr. 4: Vzorec atranorinu.

Kyselina gyroforová

Kyselina gyroforová náleží mezi tridepsidy (Thor, 1991), je cytotoxická a inhibuje růst buněk (Kumar et Müller, 1999). Po aplikaci kyseliny a následném vypálení má skvrna obsahující kyselinu gyroforovou oranžovou barvu a při pozorování pod dlouhovlnným UV je matně zelená až do hněda (Orange, 2010).



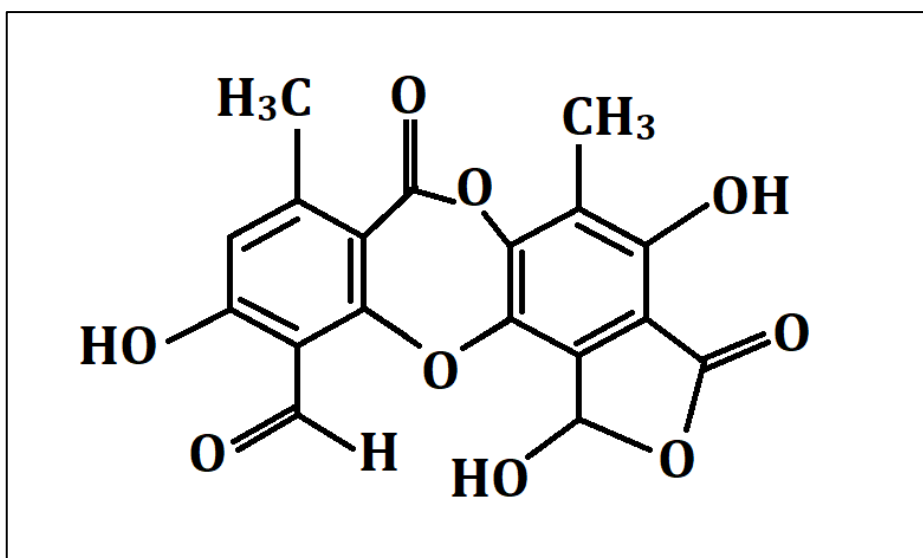
Obr. 5: Vzorec kyseliny gyroforové.

DEPSIDONY

Depsidony tvoří druhou největší skupinu lišejníkových látek. Odvozují se od orcinu nebo β -orcinu. V přírodě lišejníkové depsidony pravděpodobně vznikají oxidativní cyklizací depsidů, čímž vzniká velmi stabilní etherová vazba. Mezi nejznámější zástupce depsidonů patří kyselina norstiktová, kyselina fumarprotocetrarová a kyselina stiktová (Jarkovský, 1978).

Kyselina norstiktová

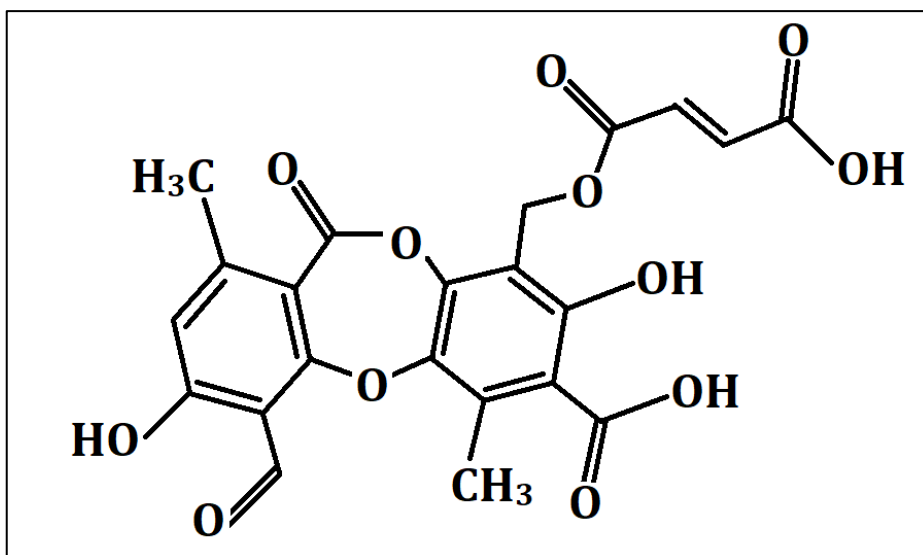
Kyselina norstiktová je používána jako jedna z kontrol při provádění tenkovrstvé chromatografie. Relativní hodnota R_f při použití systému C jako organického rozpouštědla je 30. Barva skvrny kyseliny norstiktové po aplikaci kyseliny sírové a následném zahřátí je jasně žlutá (Orange, 2010).



Obr. 6: Vzorec kyseliny norstiktové.

Kyselina fumarprotocetrarová

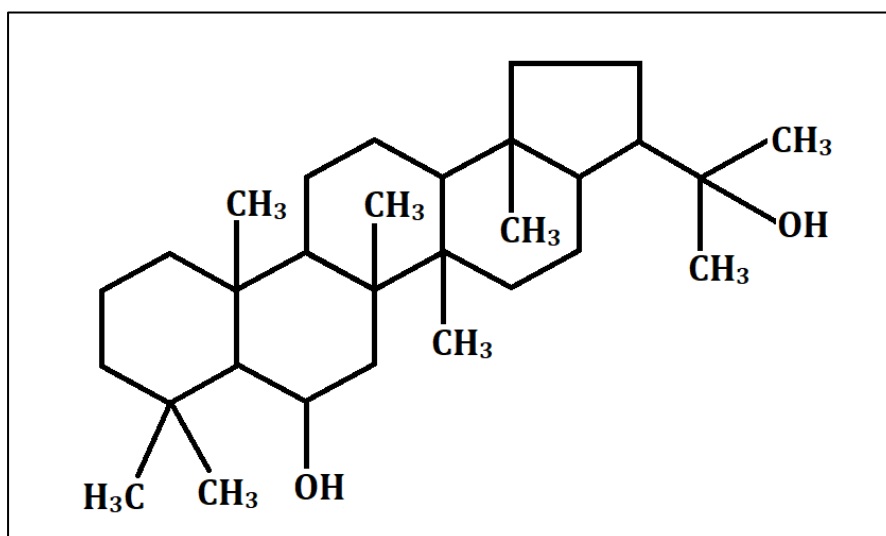
Kyselina fumarprotocetrarová je jednou z lišejníkových látek s antioxidačními účinky (De Barros Alves, 2014). Po aplikaci kyseliny sírové a následném zahřátí se jeví jako šedá skvrna (Orange, 2010).



Obr. 7: Vzorec kyseliny fumarprotocetrarové.

TERPENY

Ze skupiny terpenů jsou v lišejnících obsaženy jak diterpeny, tak daleko početnější triterpeny. Typickým zástupcem triterpenů je zeorin. Terpeny se v lišejnících vyskytují v poměrně malých koncentracích. Jsou bezbarvé a poskytují pozitivní reakci s kyselinou sírovou (Jarkovský, 1978). Po aplikaci kyseliny sírové a následném zahřátí je na denním světle pozorujeme jako fialové, načervenalé, šedé, zelené nebo hnědé skvrny nebo čáry, které typicky vykazují fluorescenci v dlouhovlnném UV záření. Jejich pozici, barvu a fluorescenční barvu je nutné okamžitě zaznamenat, protože skvrny brzy ztrácejí na intenzitě a blednou (Orange, 2010).



Obr. 8: Vzorec zeorinu.

1.4 rod *Cladonia* (dutohlávky)

Dutohlávky mají dvoutvarou nebo keříčkovitou stélku, která se často bohatě větví. Stélka není upevněna k podkladu pomocí rhizinů. Tuto funkci nahrazují příchytné terčíky, kterými stélka zpravidla v jednom místě přirůstá a kolem něj zřetelně odstává. Dutohlávky s dvoutvarou stélkou mají vyvinutou spodní korovitou, šupinkatou až lupenitou část nazývanou přízemní stélkové šupiny a vzpřímenou horní část nazývanou kmínky neboli podetia (Svrček, 1976). Do rodu *Cladonia*, který vyniká vysokou mnohotvárností a proměnlivostí druhů spadá největší počet půdních lišejníků (Balabán, 1960).

Dutohlávky dominují v boreálních lesích a arktické tundře. V severních oblastech tvoří významnou složku potravy sobů (*Cladonia rangiferina*) a využití našly také ve farmaceutickém průmyslu (*Cladonia stellaris*). U dutohlávek bylo identifikováno více než 60 sekundárních metabolitů (Ahti et al., 2013).

Pro určování dutohlávek jsou významné mikroskopické morfologické a anatomické znaky stélky, které jsou patrné za pomoci stereolupy a mikroskopu. K identifikaci určitých druhů se využívají lišejníkové látky obsažené v jejich stélkách. Některé sekundární metabolity jsou druhově specifické a patří mezi nejlepší rozlišovací znaky (Svrček, 1976). Dutohlávky můžeme dělit podle typu stélky nebo dle barvy plodnic na červenoplodé a hnědoplodé (Ahti et al., 2013).

Starší práce uvádějí na území České republiky nejčastější výskyt *Cladonia rangiferina* (dutohlávky sobí), *Cladonia arbuscula* (dutohlávky lesní), *Cladonia fimbriata* (dutohlávky třásnité), *Cladonia coccifera* (dutohlávky červcové) a *Cladonia pyxidata* (dutohlávky pohárkaté) (Balabán, 1960). Záleží však na typu biotopu, v němž dutohlávky hledáme. V současnosti jsou v běžném lesním biotopu (Lesní kultury s nepůvodními dřevinami) nejběžnější *Cladonia digitata* (dutohlávka prstovitá), *Cladonia coniocraea* (dutohlávka šídlovitá) a *Cladonia fimbriata* (dutohlávka třásnitá). Keříčkovité dutohlávky jsou mnohem vzácnější a jejich masivnější výskyt je omezen na chráněné biotopy (NDOP, 2022).

CLADONIA RANGIFERINA (dutohlávka sobí)

Popis:

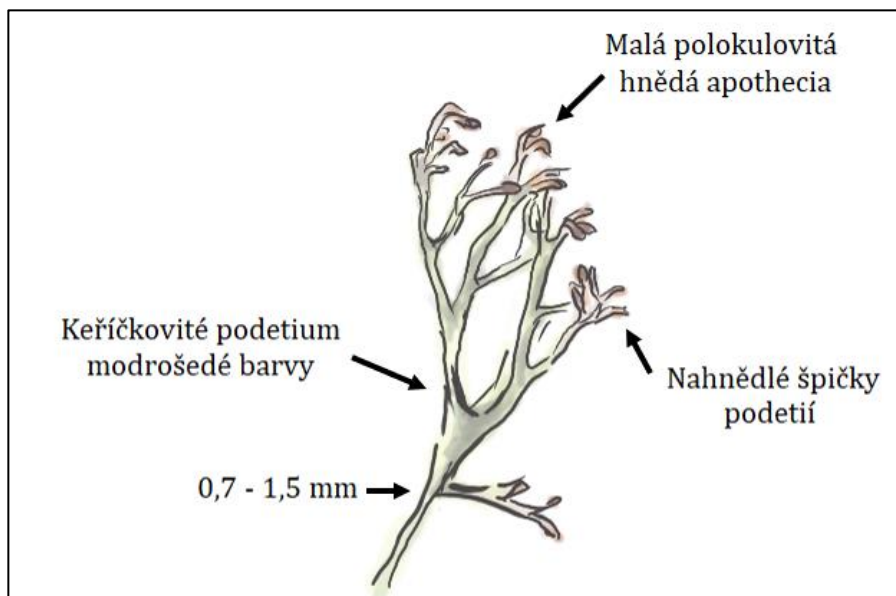
Cladonia rangiferina je jedním z nejnámějších a kdysi nejrozšířenějších druhů u nás. Keříčkovitá stélka dutohlávky sobí se bohatě větví a dosahuje výšky 5–15 cm. Hlavní větvičky jsou silné 0,7–1,5 mm a mají popelavě šedé, modrošedé až bělošedé zbarvení s nahnědlými špičkami. Na koncích postranních větviček se vzácně tvoří malá, polokulovitá, červenohnědá apothecia (Ahti et al., 2013). Působením roztoku KOH se větvičky zbarvují žlutě (Balabán, 1960).

Výskyt:

Cladonia rangiferina je dobře adaptovaná na dlouhotrvající sucha. Trvalé zamokření však nesnáší a nejlépe jí vyhovuje střídání vlhka se suchem (Balabán, 1960). Dutohlávka sobí se nejčastěji vyskytuje na suchých osluněných stanovištích s písčitymi, kyselými půdami. Nejčastěji je v suchých borových lesích, na vřesovištích a pasekách (Rabšteinek, 1987).

Obsah lišejníkových látek:

Mezi lišejníkové látky, které jsou obsaženy ve stélce *Cladonia rangiferina* patří atranorin a kyselina fumarprotocetrarová, v menším měřítku také kyselina ursolová a neznámé mastné kyseliny (Ahti et al., 2013).



Obr. 9: Charakteristické znaky *Cladonia rangiferina* (dutohlávky sobí).

CLADOINA ARBUSCULA agg. (dutohlávka lesní)

Popis:

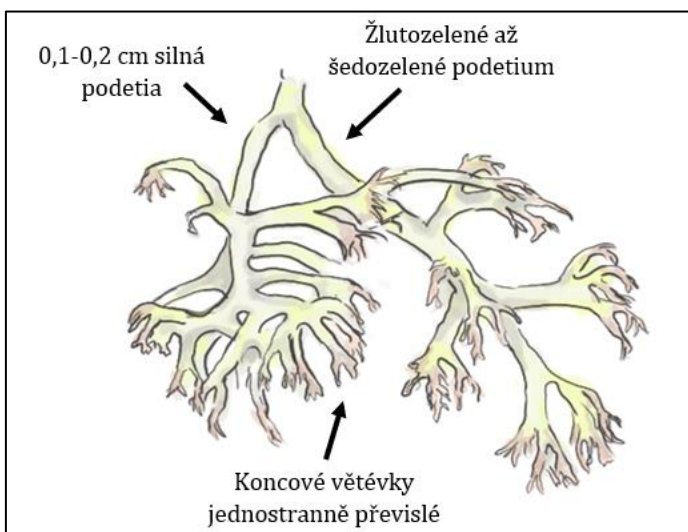
Taxon *Cladonia arbuscula* představuje druhový komplex tradičně rozdělený na několik poddruhů na základě morfologie stélky a obsahu sekundárních metabolitů (Piercey-Normore, 2010). Má přímá 5–15 cm vysoká a 0,1–0,2 cm silná podetia. Od *Cladonia rangiferina* (dutohlávky sobí) se liší především barvou větví, které jsou slámově žluté, žlutozelené až šedo zelené. Koncové větévký jsou jednostranně převislé a stejné barvy jako hlavní větve nebo slabě zahnědlé. Povrch větviček je hladký, matný a slabě pavučinově plstnatý. Apothecia jsou malá, červenohnědá až tmavohnědá na koncích vzpřímených vrcholových větví (Balabán, 1960).

Výskyt:

Cladonia arbuscula je velmi přizpůsobivý druh vyskytující se na kyselých půdách s různým geologickým podložím od nejnižších poloh až po horské oblasti. Roste na rašeliništích, v suchých lesích i na kamenitých sutích (Rabšteinek, 1987).

Obsah lišejníkových látek:

Dle obsahu lišejníkových látek můžeme u *Cladonia arbuscula* rozlišit tři hlavní chemotypy. První typ obsahuje kyselinu usnovou, kyselinu izousnovou, kyselinu psoromovou a kyselinu 2'-0-demethylpsoromovou. Druhý typ obsahuje kyselinu usnovou, kyselinu izousnovou a kyselinu fumarprotocetrarovou. U třetího typu nalezneme pouze kyselinu usnovou a kyselinu izousnovou (Ahti et al., 2013).



Obr. 10: Charakteristické znaky *Cladonia arbuscula* agg. (dutohlávky lesní).

CLADONIA PYXIDATA (dutohlávka pohárkatá)

Popis:

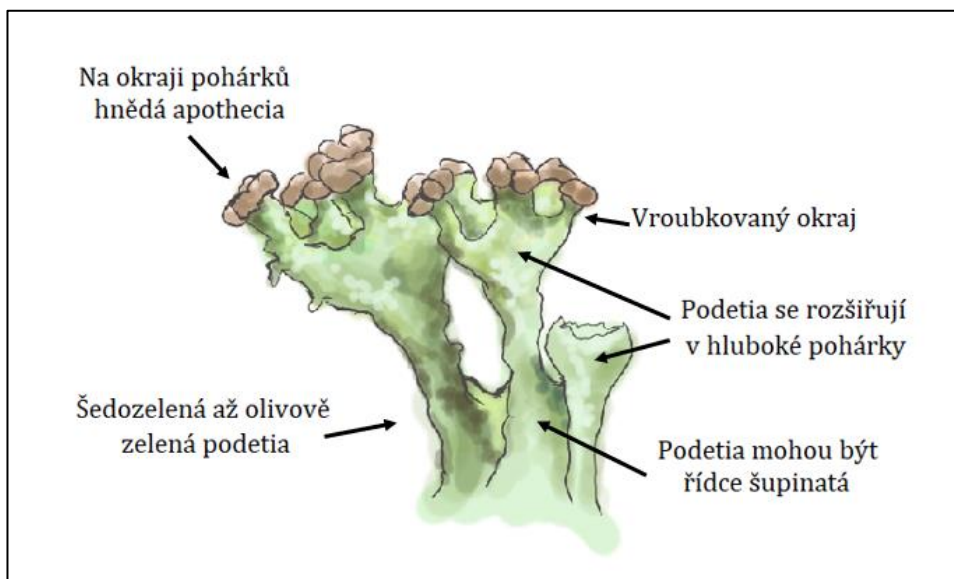
Hlavním odlišovacím znakem *Cladonia pyxidata* je tvar podetií, které jsou krátké a široce rozevřené (Kotelko, 2010). Přízemní stélka *Cladonia pyxidata* je drobně šupinatá, šedavá, šedozelená až hnědá, na spodní části může být bělavá. Je dosti tuhá, vystoupavá nebo přitisklá k podkladu. Podetia jsou 1–4 cm vysoká, šedozelená někdy olivově zelená či bělavá, řídce šupinatá, nebo úplně bez šupin. Podetia se směrem vzhůru rozšiřují v pravidelné, hluboké, blanou uzavřené pohárky s jednoduchým nebo vroubkovaným okrajem. Na okraji pohárků jsou světle hnědá až tmavohnědá apothecia, která jsou buď přisedlá, nebo mají krátkou stopku (Rabšteinek, 1987).

Výskyt:

Cladonia pyxidata obývá středně až silně kyselé minerální půdy, dále skalní oblasti pokryté mechem, travní porosty nebo dálniční násypy tvořené člověkem (Ahti et al., 2013). Typicky se vyskytuje na osluněných chudých půdách (Balabán, 1960).

Obsah lišejníkových látek:

Ve stélce je obsažena kyselina fumarprotocetrarová, kyselina hypoprotocetrarová a kyselina quaesitová. Zřídka může obsahovat stopy atranorinu a neznámých mastných kyselin (Ahti et al., 2013).



Obr. 11: Charakteristické znaky *Cladonia pyxidata* (dutohlávky pohárkaté).

CLADONIA COCCIFERA agg. (dutohlávka červcová)

Popis:

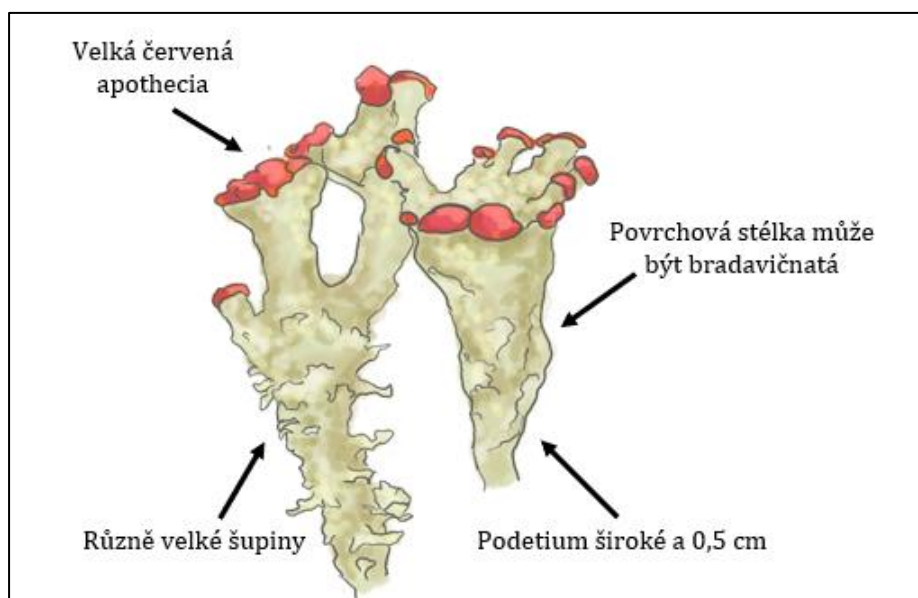
Cladonia coccifera agg. je skupina obsahující dvanáct morfologicky velice podobných druhů (Stenroos, 1989). Přízemní stélka *Cladonia coccifera* je laločnatá, pokrytá různě velkými vroubkovanými šupinami šedé nebo žlutozelené barvy. Spodní strana stélky je světlá, běložlutá. Podetium je vysoké až 5 cm a v dolní části široké až 0,5 cm, žluté, šedozelené až šedé barvy. Povrchová kůra stélky může být bradavičnatá, s hrubě zrnitými sorediemi nebo šupinkami (Rabšteinek, 1987). Apothecia jsou velká, nápadná a červená (Ahti et al., 2013).

Výskyt:

Vyskytuje se hojně v jehličnatých lesích od nížin po horské oblasti. Roste především na svěžích humózních nebo písčitých půdách. Dále osídluje vlhčí skály a pařezy. Netvoří trsy ani polštáře, ale roste samostatně nebo v menších skupinách (Balabán, 1960).

Obsah lišejníkových látek:

U skupiny *Cladonia coccifera* se můžeme setkat s poměrně velkým množstvím sekundárních metabolitů. Kyselina usnová a zeorin jsou ve stélce obsaženy vždy. Často se vyskytuje také kyselina izousnová a porphyrilová. Existují také chemotypy s neidentifikovatelnými terpenoidy a mastnými kyselinami (Ahti et al., 2013).



Obr. 12: Charakteristické znaky *Cladonia coccifera* agg. (dutohlávky červcové).

CLADONIA FLOERKEANA (dutohlávka Floerkeova)

Popis:

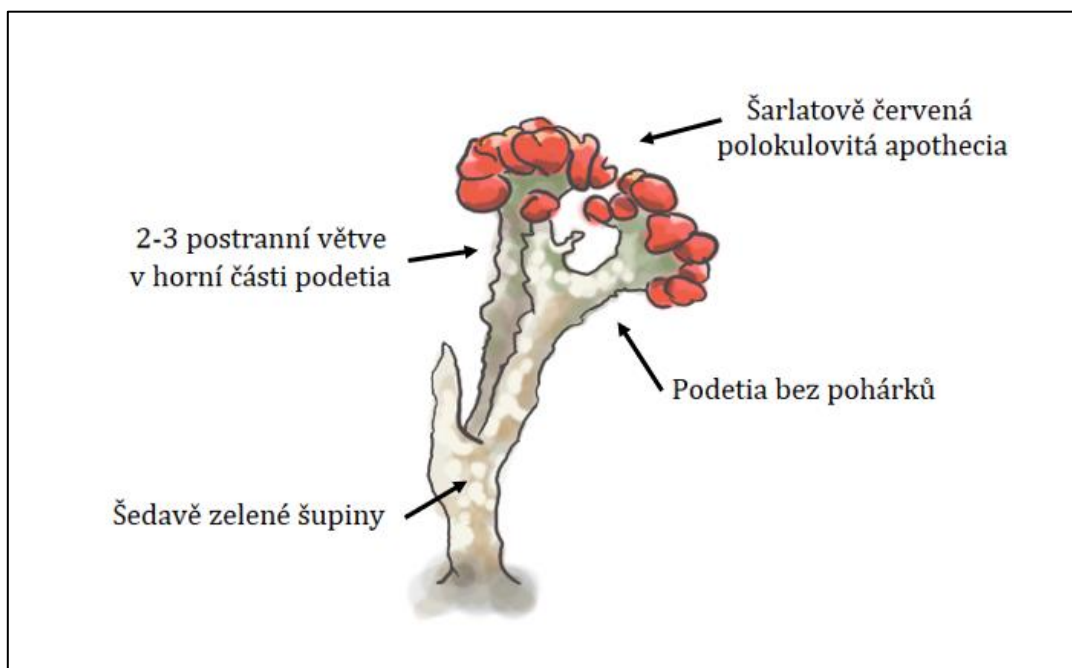
Cladonia floerkeana má malé šedavě zelené šupiny, podetia bez pohárků jsou většinou válcovitá, vysoká 1-3 cm. V horní části podetia vyrůstají z jednoho místa dvě až tři postranní větve. Kůra podetií je hladká zrnitě sorediózní. Na konci podetií se nacházejí šarlatově červená, polokulovitá apothecia (Kremer, 1998).

Výskyt:

Jedná se o krátkověkou dutohlávku kolonizující jako pionýrský druh nedávno obnažená stanoviště (Cooper, 2001). Nalezneme ji na kyselých, humózních stanovištích (Kremer, 1998), pařezech, starém dřevě, v rašeliništích, vřesovištích i na písčitéch půdách (Svrček, 1976).

Obsah lišejníkových látek:

Dle obsahu sekundárních metabolitů se u *Cladonia floerkeana* odlišují dva hlavní chemotypy. První typ obsahuje kyselinu barbatovou a kyselinu dydimovou. Druhý typ obsahuje kyselinu thamnolovou a kyselinu dydimovou (Ahti et al., 2013).



Obr. 13: Charakteristické znaky *Cladonia floerkeana* (dutohlávky Floerkeovy).

CLADONIA SULPHURINA (dutohlávka sírová)

Popis:

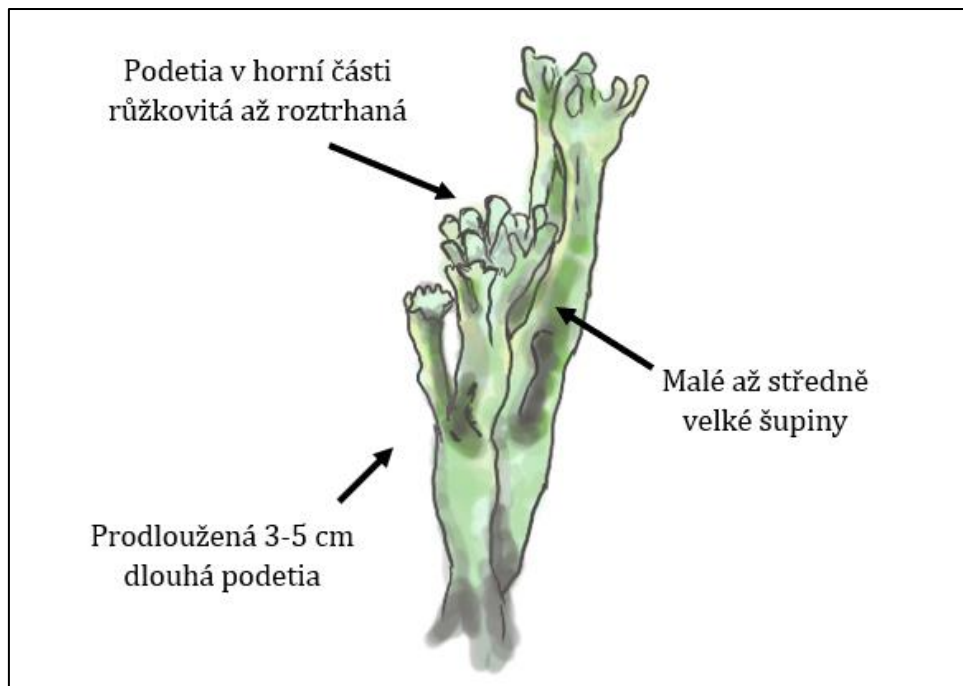
Cladonia sulphurina má prodloužená 3-5 cm dlouhá podetia. Na povrchu stélky jsou malé až středně velké šupiny, které jsou ve spodní části bílé a v horní části šedozelené. Podetia jsou v horní části růžkovitá nebo úzce pohárkovitá až roztrhaná. Apothecia jsou červená (Kremer, 1998) a vyvíjejí se na horním okraji nepravidelně tvarovaných podetií (Ott, 1993). Sterilní podetia jsou obtížně rozlišitelná od sterilních žlutavých druhů s hnědými apothecii (Kremer, 1998).

Výskyt:

Cladonia sulphurina má dobře vyvinutá rhizinová vlákna, která zpomalují proces vysychání (Ott, 1993). Běžně se vyskytuje na holé a odvodněné rašelině, neporušených bažinatých pahorcích, shnilém dřevě nebo v alpských a alpinských vřesovištích (Ahti et al., 2013).

Obsah lišejníkových látek:

Mezi lišejníkové látky obsažené ve stélce *Cladonia sulphurina* spadá kyselina squamatová a mastné kyseliny (Ahti et al., 2013).



Obr. 14: Charakteristické znaky *Cladonia sulphurina* (dutohlávky sírové).

CLADONIA FIMBRIATA (dutohlávka třásnitá)

Popis:

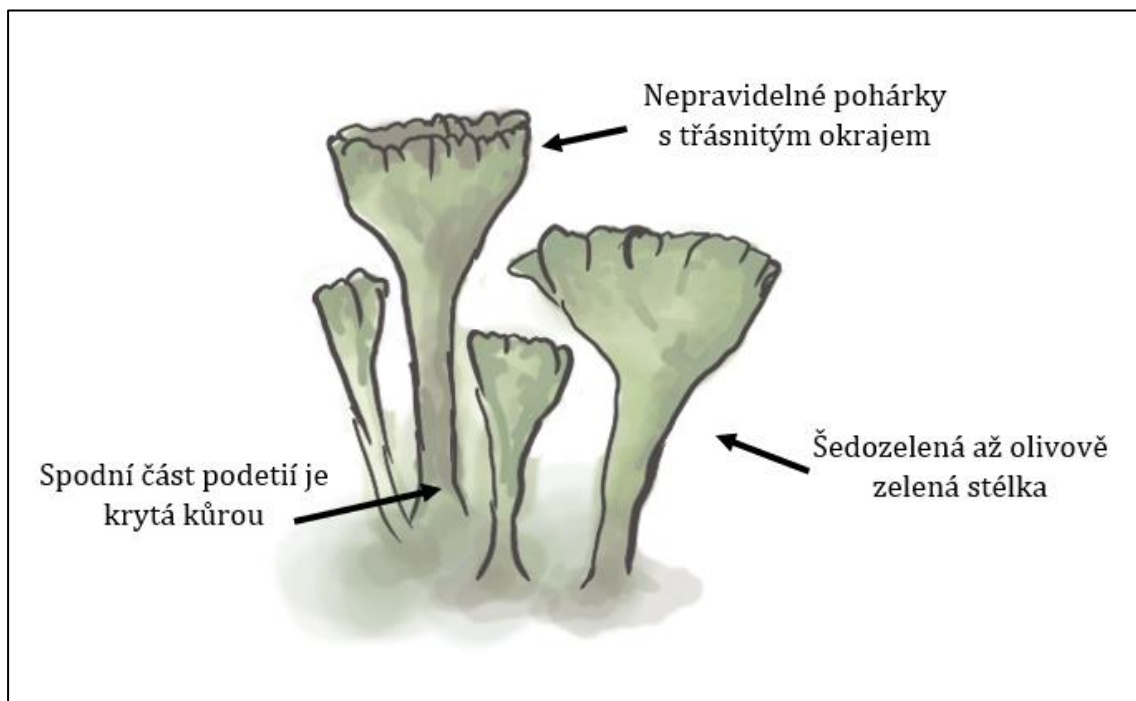
Cladonia fimbriata má šedozelenou až olivově zelenou stélku s velmi pevnými, drobnými, okrouhlými šupinami. Podetium dorůstá výšky 10–40 mm. Spodní část podetií je kryta kůrou, horní část je ukončena nepravidelnými pohárky s třásnitým okrajem. Na okrajích pohárků jsou hustě umístěna hnědě zbarvená apothecia. Celá plocha podetia je moučnatě sorediózní (Rabšteinek, 1987).

Výskyt:

Cladonia fimbriata je velice adaptabilní druh (Rabšteinek, 1987). Je jedním z nejčastěji se vyskytujících druhů dutohlávek, rostoucí od nížin až po horské oblasti. Roste ve světlých lesích na humózních půdách, na vřesovištích a rašeliništích. Výjimkou není ani výskyt na mechovitých skalách či ztrouchnivělých pařezech (Balabán, 1960).

Obsah lišejníkových látek:

Ve stélce *Cladonia fimbriata* je obsažena kyselina fumarprotocetrarová a atranorin (Ahti et al., 2013).



Obr. 15: Charakteristické znaky *Cladonia fimbriata* (dutohlávka třásnitá).

CLADONIA SQUAMOSA (dutohlávka šupinatá)

Popis:

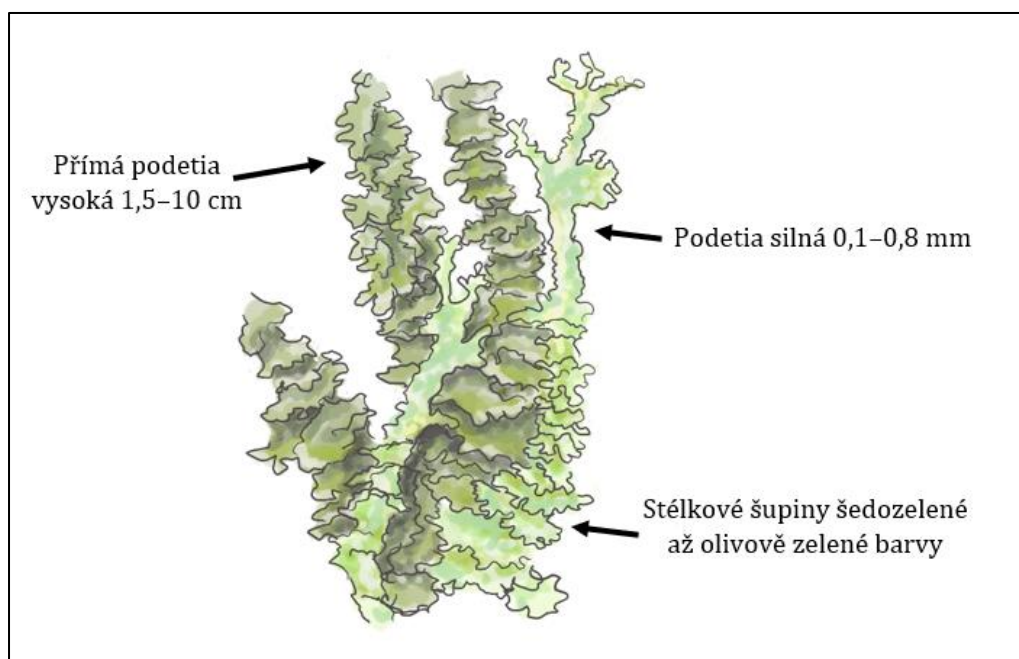
Charakteristickým znakem *Cladonia squamosa* jsou 2–7 mm dlouhé a 0,5–1 mm široké, nepravidelně dělené, přízemní stélkové šupiny. Šupiny mají zelené, šedozelené až olivově zelené zbarvení. Podetia přímá, dutě válcovitá, vysoká 1,5–10 cm a silná 0,1–0,8 mm. Zbarvení podetií je šedé až šedozelené. Na konci krátkých větévek se nacházejí otevřená světle až tmavě hnědá apothecia (Kremer, 1998).

Výskyt:

Cladonia squamosa roste na skalních stanovištích, starých pařezech nebo na bázi kmenů (Rabšteinek, 1987). Velmi často se vyskytuje od nížin do hor (Kremer, 1998).

Obsah lišejníkových látek:

Dle obsahu sekundárních metabolitů *Cladonia squamosa* vytváří dva hlavní chemotypy. První typ obsahuje kyselinu squamatovou, kyselinu barbatovou a neznámé terpenoidy. Druhý typ obsahuje kyselinu tamnolovou, kyselinu barbatovou, kyselinu dekarboxytamnolovou a neznámé terpenoidy (Ahti et al., 2013).



Obr. 16: Charakteristické znaky *Cladonia squamosa* (dutohlávky šupinaté).

CLADONIA GRACILIS (dutohlávka štíhlá)

Popis:

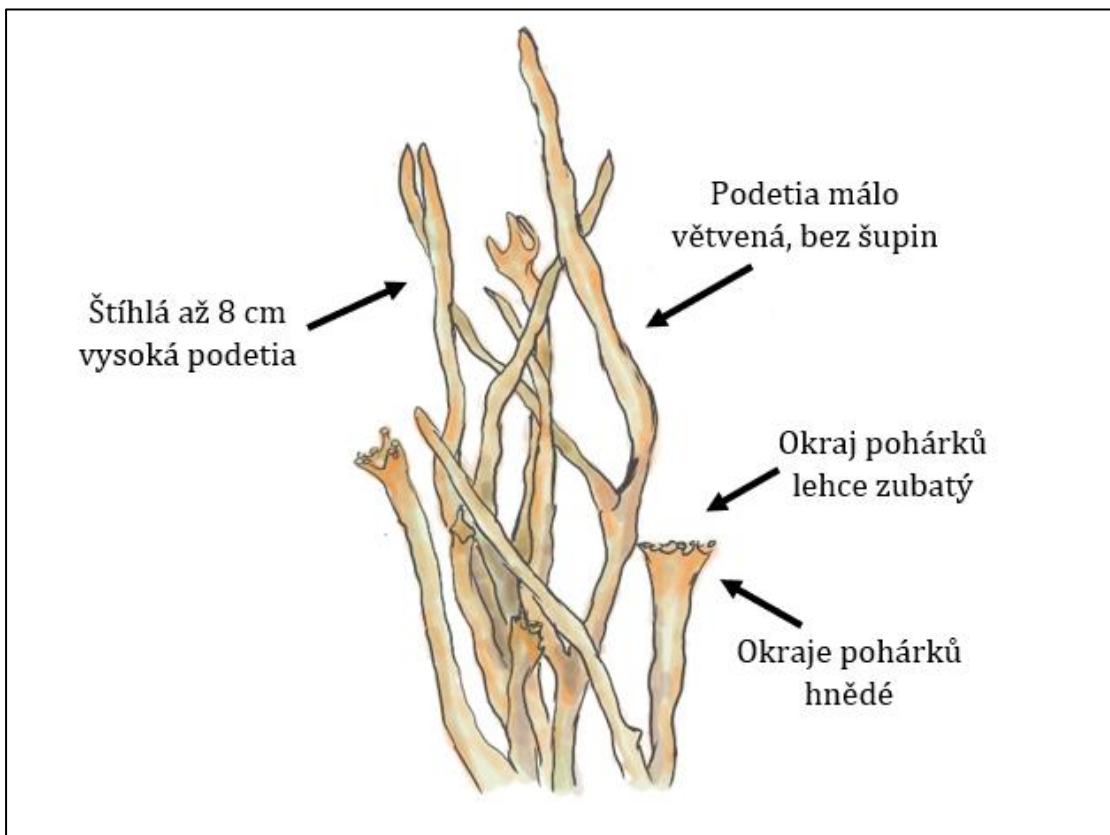
Cladonia gracilis vytváří štíhlá až 8 cm vysoká, málo větvená podetia bez šupin. Pohárky na konci podetií jsou úzké nebo úplně chybějí (Svrček, 1976). Okraj pohárků je lehce zubatý a většinou vybíhá v tenké úzce pohárkovité větévky. Apothecia na okraji pohárků jsou hnědé barvy, drobné až střední velikosti (Rabšteinek, 1987).

Výskyt:

Jedná se o velice různotvárný a proměnlivý druh, který se vyskytuje od nížinných oblastí až po vysoké hory. Roste na surovém humusu v rozvolněných světlých lesích (Rabšteinek, 1987). Nalézt jí můžeme také na písčítých půdách nebo vřesovištích (Svrček, 1976).

Obsah lišejníkových látek:

Jedinou lišejníkovou látkou obsaženou ve stélce *Cladonia gracilis* je kyselina fumarprotocetrarová (Ahti et al., 2013).



Obr. 17: Charakteristické znaky *Cladonia gracilis* (dutohlávky štíhlé).

CLADONIA BELLIDIFLORA (dutohlávka chudobkokvětá)

Popis:

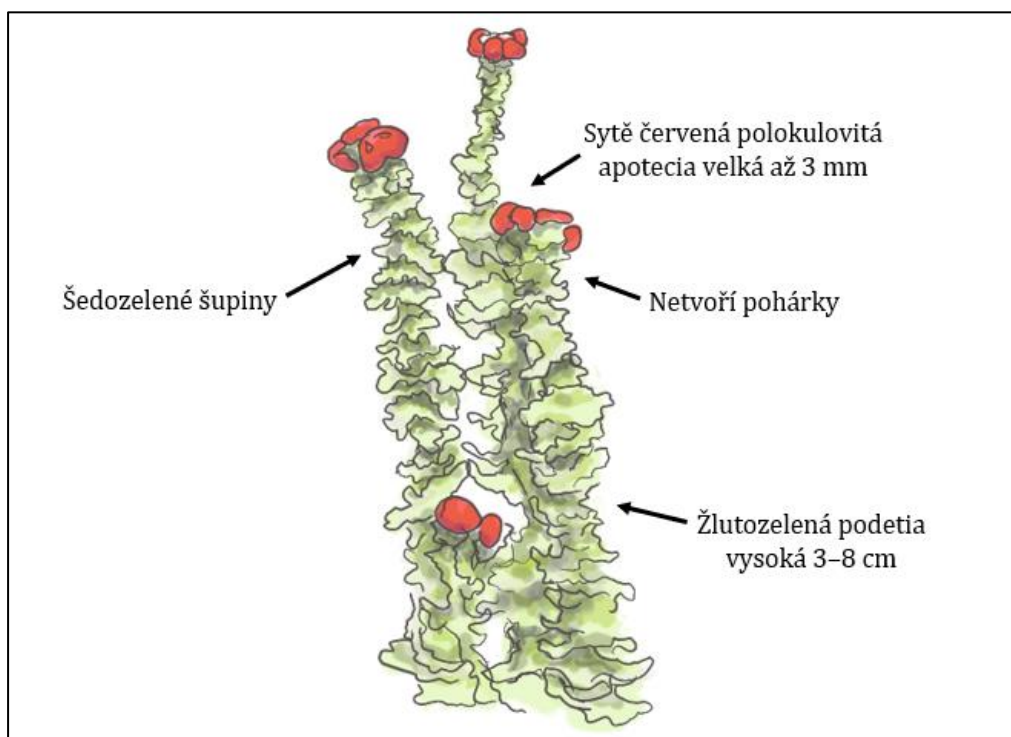
Primární stélka *Cladonia bellidiflora* je tvořena šedozeleými šupinami. Žlutozelená podetia dorůstají výšky 3–8 cm, jsou málo rozvětvená a netvoří pohárky. Na povrchu podetií bývá narušovaná korová vrstva, hustě prorostlá vodorovně postavenými krátkými šupinkami o velikosti 1–2 mm. Na vrcholcích podetií vyrůstají sytě červená polokulovitá apothecia velká až 3 mm (Ahti et al., 2013).

Výskyt:

Cladonia bellidiflora se nejčastěji vyskytuje mezi mechy na horských balvanitých svazích a ve světlých horských lesích, vzácněji ji můžeme nalézt také na surovém humusu v hlubokých vápencových údolích nebo na rašelině (Kremer, 1998).

Obsah lišejníkových látek:

Ve stélce velmi zřídka chybí kyselina usnová, dále může obsahovat kyselinu squamatovou, kyselinu rodokladoniovou a belidiflorin. Existují také chemotypy obsahující kyselinu tamnolovou nebo fumarprotocetrarovou (Ahti et al., 2013).



Obr. 18: Charakteristické znaky *Cladonia bellidiflora* (dutohlávky chudobkokvěté).

1.5 Metoda tenkovrstvé chromatografie (TLC)

Chromatografie na tenké vrstvě patří mezi nejrozšířenější separační analytické a preparační metody využívané v lékařství, biologii a chemii lipidů. Metoda TLC je vhodná především pro kvalitativní separace látek (Ranný, 1984).

Lichenologové používají k identifikaci lišejníků různé metody, jednou z nejvyužívanějších metod je právě chromatografie na tenké vrstvě. Tenkovrstvá chromatografie je citlivá a relativně levná metoda, využitelná v laboratoři se základním laboratorním vybavením jako je digestoř a bezpečné úložiště chemikálií. Vytvářející systémy TLC jsou lidskému zdraví nebezpečné, a proto je zapotřebí důsledně pracovat v rukavicích a používat laboratorní plášť. Metodu tenkovrstvé chromatografie není možné provádět mimo laboratoř (Orange, 2010).

Metoda tenkovrstvé chromatografie výrazně zlepšila rychlost a jistotu rozpoznání sekundárních metabolitů obsažených v lišejnících (Schumm, 2016). Pro identifikaci chemické látky je důležité, aby testovaný materiál byl jednotný. Přítomnost jiných druhů ve vzorku způsobí kontaminaci, která vede k nesprávným závěrům a mylné determinaci (Orange, 2010).

V rámci provádění metody TLC pracujeme s mobilní a stacionární fází. Stacionární (nepohyblivou) fází nazýváme skleněnou případně hliníkovou desku pokrytou vrstvou silikagelu. Mobilní fáze se v chromatografickém systému pohybuje. Pohyb umožňují různá organická rozpouštědla – systémy (Schneiderka, 2000).

Pro analýzu vzorků lišejníků se využívá několik typů organických rozpouštědel, z nichž každé ukazuje jiné výsledky. Mezi základní systémy patří systém A (Toluen, dioxan a kyselina octová v poměru 180:14:5), systém B (Hexan, metyl 3-butyl éter a kyselina mravenčí v poměru 140:72:18), systém C (Toluen a kyselina octová v poměru 170:30) a systém G (Toluen, etyl acetát a kyselina mravenčí v poměru 139:83:8). Kromě základních systémů existují ještě systémy specializované. Pro počáteční analýzu se využívá systém C nebo systém G. Za účelem hrubého rozlišení jednotlivých látek většinou stačí využít jeden systém rozpouštědel. Pro podrobnější analýzu je vhodné využít systémů více, protože jeden systém nemusí oddělit všechny sloučeniny, které jsou ve vzorku obsaženy (Orange, 2010).

Tabulka 1: Specializované systémy využívané pro TLC (Orange, 2010).

Systém	Složení	Poměr
E	Cyklohexan, ethyl acetát	75: 25
EA	Diethyl éter / kyselina octová	100: 1
EH	Diethyl éter / hexan	90: 30
EHF	Diethyl éter / hexan / kyselina mravenčí	300: 100: 3
F	Ethyl acetát / cyklohexan	1: 1
H	Cyklohexan / chloroform / methylethylketon	60: 30: 40
HEF	Hexan / ethyl acetát / kyselina mravenčí	139: 83: 8
J	Dichlormethan / aceton	4: 1
OH	Ethyl acetát / methanol / amoniak	75: 20: 5

1. 5. 1. Princip TLC

Za pomoci acetonu se ze stélky lišejníku vyextrahují sekundární metabolity. Získaný extrakt nanášíme tenkými kapilárami na skleněnou případně hliníkovou desku se silikagelem, kterou následně vložíme do vyvíjející komory s vhodným organickým rozpouštědlem. Ve vyvíjející komoře dochází ke vztlínání organického rozpouštědla společně s látkami obsaženými v lišejníku. Po vyjmutí desky z vyvíjející komory, můžeme pozorovat stopy metabolitů v podobě skvrn, které jsou na desce umístěny charakteristickým způsobem. Výsledné skvrny označíme (Orange, 2010).

Pro identifikaci pozorované skvrny je zapotřebí vypočítat retenční faktor (Rf). Hodnoty Rf se často liší až o 5 %. Některé lišejníkové látky mají stejnou hodnotu Rf. Abychom látky s totožnou hodnotou retenčního faktoru odlišili, je deska se vzorky také pozorována pod dlouhovlnným a krátkovlnným UV. Pro zjištění přítomnosti mastných kyselin, které jsou bezbarvé, je deska potřena vodou. V případě obsahu mastné

kyseliny ve vzorku by se po aplikaci vody objevila nová skvrna. Na závěr je deska potřena 10 % kyselinou sírovou a zahřáta. Porovnáním získaných poznatků s databází zjistíme, jaká lišejníková látka je ve vzorku obsažena (Schumm, 2016).

Pro ověření správnosti výpočtu se používá kontrolní vzorek neboli kontrola. Kontrolu nanášíme na třetí pozici od obou okrajů desky (stacionární fáze). Jako kontrolní látky se nejčastěji používají kyselina norstiktová a atranorin (Orange, 2010).

2 Metodika

2.1 Postup vyvolání desky se vzorky

Použila jsem následující postup podle práce Orange, 2010.

- 1) Příprava vzorků.** Pomocí pinzety si do malých plastových zkumavek připravím vzorky lišejníků.
- 2) Příprava vyvíjející komory.** Roztok – systém C (170 ml toluenu + 30 ml kyseliny octové) naliji do vyvíjející komory alespoň 30 minut před vložením desky. Výška hladiny roztoku je přibližně 10 mm. Vyvíjející komoru následně přiklopím víkem, aby se celý prostor nasýtil výpary roztoku. Po celou dobu pracuji v digestoři a používám ochranné pomůcky – plášť a latexové rukavice.
- 3) Příprava stacionární fáze.** Na skelněnou desku se silikagelem zakreslím okraje (20 mm), poté označím a očísloji startovní pozice vzorků (15 mm od okraje desky a 10 mm mezi vzorky). Na třetí pozici od obou krajů desky označím kontrolní vzorek. Ve středu desky si označím čelo.
- 4) Přidání acetonu.** Do připravených a očíslovaných vzorků napipetuji pomocí mikropipety 150 μ l acetonu (vzorek nesmí plavat, hladina acetonu nesmí přesáhnout úroveň zúžení zkumavky). Při pipetování je třeba předejít, kontaktu špičky pipety se vzorky. Došlo by ke kontaminaci a znehodnocení vzorků a následně mylným výsledkům.
- 5) Nanesení vzorku na startovní pozice.** Takto připravené vzorky nanáším tenkými kapilárami na startovní pozice. Pro každý vzorek musím použít vlastní kapiláru, aby nedošlo ke kontaminaci. Vzorky nanáším po jedné kapce. Více kapek najednou by vytvořilo příliš velký kroužek a mohlo by dojít ke kontaminaci se vzorky na sousedních pozicích. Ideální velikost kroužku je 5–6 mm v průměru. Na každou startovní pozici nanesu postupně 15 kapek vzorku.

- 6) Vložení desky do vyvíjecí komory.** Připravenou desku s nanesenými vzorky vložím do vyvíjecí komory, kde nechám vzorky stoupat 30–60 minut (dokud hladina vztlínání nepřiblíží označenému čelu).
- 7) Vyjmutí desky.** Desku vyndám, položím na filtrační papír a vysuším v digestoři. Deska nesmí být cítit po kyselině octové.
- 8) Příprava trouby.** Připravím si troubu na vypékání. Troubu předeheji na 110 °C.
- 9) Pozorování na světle.** Vysušenou desku si prohlédnu a vyfotím zblízka při normálním světle. Vzniklé skvrny označím tužkou.
- 10) Pozorování pod krátkovlnným UV.** Nasadím si ochranné brýle (krátkovlnné UV světlo poškozují zrak), desku prohlédnu a vyfotím pod krátkovlnným UV (254 nm), nové skvrny zakreslím vlnovkou.
- 11) Pozorování desky pod dlouhovlnným UV.** Desku prohlédnu a vyfotím pod dlouhovlnným UV (366 nm), nové skvrny zakreslím přerušovanou čarou.
- 12) Aplikace vody.** Pro zjištění přítomnosti mastných kyselin opatrně stříčkou poliji desku studenou vodou. Opět desku prohlédnu a vyfotím na normálním světle. Nově vzniklé skvrny označím křížkem uvnitř.
- 13) Aplikace kyseliny sírové.** Nasadím si silné rukavice a naliji si do kádinky 10 % kyselinu sírovou. Celou desku poté opatrně potru kyselinou pomocí širokého štětce.
- 14) Vypékání v troubě.** Ihned po aplikaci kyseliny vložím desku do předeheřaté trouby. Desku vypaluji zhruba 10 minut, dokud se zřetelně neobjeví vyvolané skvrny.

- 15) Pozorování na světle.** Desku znovu prohlédnu a vyfotím na denním světle a neoznačené skvrny (načervenalé terpenoidy) vyšrafuji.
- 16) Pozorování pod dlouhovlnným UV.** Na závěr desku opět pozoruji pod dlouhovlnným UV (366 nm) a přerušovanou čarou zakreslím pozice nových skvrn.

2.2 Určení lišejníkových látek

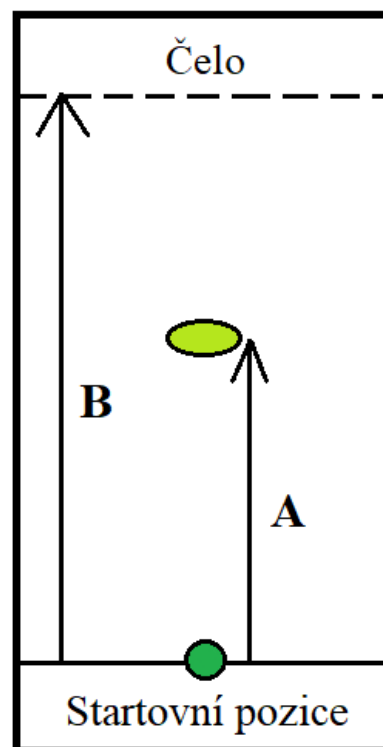
2. 2. 1. Výpočet retenčního faktoru

Máme-li vyvolanou desku se vzorky můžeme přistoupit k určování lišejníkových látek. K identifikaci vzniklých skvrn je zapotřebí vypočítat retenční faktor (Rf). Retenční faktor je hodnota, o kterou zaostává analyt za rozpouštědlem a vypočítáme ji následujícím způsobem:

- 1) Změříme vzdálenost skvrny od startovní pozice, čímž získáme vzdálenost A.
- 2) Změříme vzdálenost čela od startovní pozice, čímž získáme vzdálenost B.
- 3) Získané hodnoty dosadíme do následujícího

$$\text{vzorce: } Rf = \frac{A}{B} \cdot 100$$

(Orange, 2010)



Obr. 19: Určení Rf.

2. 2. 2. Výsledné určení sekundárního metabolitu

Pro výsledné určení dané lišejníkové látky je zapotřebí:

- Hodnota Rf.
- Barva skvrny pod dlouhovlnným UV před vypálením.
- Barva skvrny po aplikaci kyseliny sírové a následném vypálení.
- Barvu skvrny pod dlouhovlnným UV po vypálení.

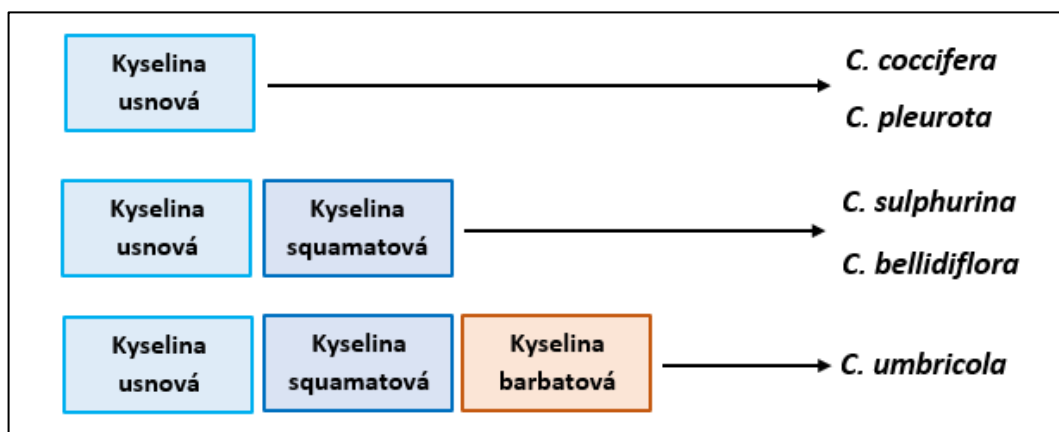
Máme-li všechny hodnoty zaznamenány výsledný sekundární metabolit dohledáme v databázi (Schumm, 2016).

2.3 Tvorba klíče

Na základě výsledků získaných při provádění metody tenkovrstvé chromatografie jsem vytvořila klíč ke snadší identifikaci morfologicky variabilních druhů dutohlávek, pomocí látek obsažených ve stélce lišejníku.

Postup tvorby klíče

- 1) Nalezení sekundárních metabolitů.** Pomocí metody TLC jsem v laboratorních podmínkách našla jednotlivé sekundární metabolity obsažené ve vzorcích.
- 2) Určení druhů dutohlávek.** Na základě mikroskopických morfologických a anatomických znaků stélky a látek ve stélce obsažených jsem určila jednotlivé druhy dutohlávek, z nichž byly vzorky zhotoveny.
- 3) Sjednocení výsledků.** Pomocí MS Excel a MS Word jsem vyhodnotila a zpracovala výsledky, které jsem sjednotila je do tabulek obsažených v kapitole 3 (Výsledky).
- 4) Finální klíč.** Dutohlávky jsem utřídila do dvou skupin, na červenoplodé a hnědoplodé. Nalezené sekundární metabolity jsem seřadila od nejvíce se vyskytujících po nejméně se vyskytující a na těchto podkladech vytvořila klíč. Finální podoba klíče je obsažena v příloze 2 této práce.



Obr. 20: Ukázka klíče.

2.4 Příprava didaktických pomůcek

V souladu s aktuálně platným rámcově vzdělávacím programem pro gymnázia a tématem mé bakalářské práce jsem vytvořila plakátky pro výuku žáků na středních školách. Plakátky jsou obsaženy v příloze č. 2.

Příprava:

- 1) Prostudování aktuálních RVP pro gymnázia.
- 2) Rešerše odborné dostupné literatury.
- 3) Tvorba obrázků za pomoci grafického tabletu a programu malování.
- 4) Finální zpracování v MS Word.

The image shows a screenshot of a lesson plan for 'BIOLOGIE HUB'. It is structured as follows:

- Učivo**
 - stavba a funkce protist
- BIOLOGIE HUB**
- Očekávané výstupy**
- žák**
 - ▶ pozná a pojmenuje (s možným využitím různých informačních zdrojů) významné zástupce hub a lišejníků
 - ▶ posoudí ekologický, zdravotnický a hospodářský význam hub a lišejníků
- Učivo**
 - stavba a funkce hub
 - stavba a funkce lišejníků

Obr. 21: Výřez RVP – biologie hub (edu.cz).

Možnost využití plakátků:

- Vylepení ve třídě nebo na chodbě školy.
- Využití při výuce, v hodinách s tématem biologie hub.
- Rozšíření učiva v biologickém kroužku.

3 Výsledky

3.1 Identifikované druhy lišejníků

Během práce v laboratoři jsem zhotovila 82 vzorků, na kterých byla následně provedena metoda TLC chromatografie pro zjištění přítomnosti sekundárních metabolitů. Dle vzhledu a obsahu lišejníkových látek ve stélce jsem posléze určovala výsledný druh lišejníku, z něž byl daný vzorek zhotoven.

V celkovém počtu 82 vzorků jsem identifikovala 24 druhů lišejníků. Nalezené druhy, které se vyskytovali ve více vzorcích shrnuji i s počty vzorků, v nichž byly obsaženy v tabulce č. 2.

Tabulka 2: Nejčastěji nalezené druhy *cladonií*.

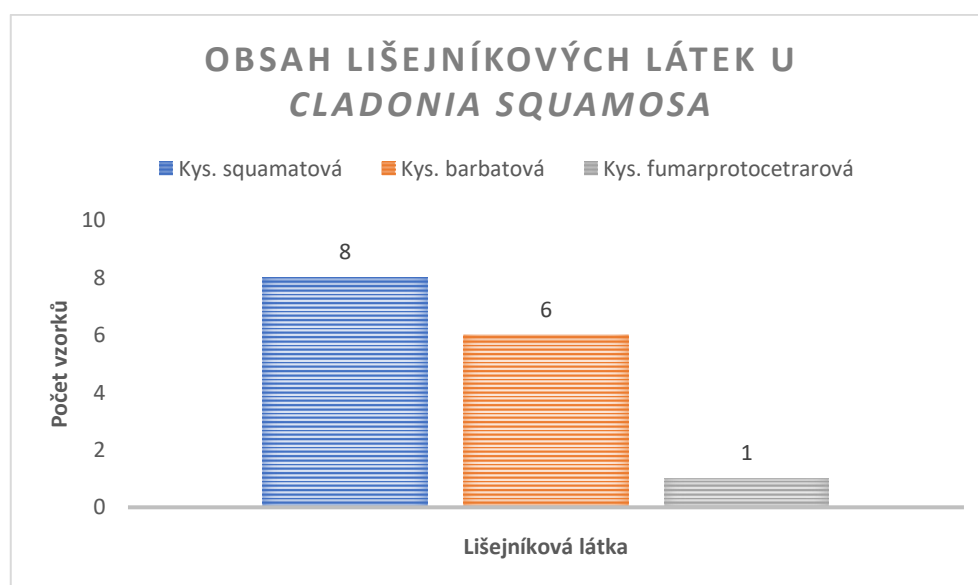
Latinský název	Český název	Počet vzorků
<i>Cladonia arbuscula</i>	dutohlávka lesní	4
<i>Cladonia bellidiflora</i>	dutohlávka chudobkokvěta	7
<i>Cladonia borealis</i>	dutohlávka severní	5
<i>Cladonia cervicornis</i>	dutohlávka rohovitá	4
<i>Cladonia floerkeana</i>	dutohlávka floerkeova	3
<i>Cladonia furcata</i>	dutohlávka rozsochatá	3
<i>Cladonia gracilis</i>	dutohlávka štíhlá	6
<i>Cladonia grayi</i>	dutohlávka Grayova	4
<i>Cladonia macroceras</i>	dutohlávka statná	2
<i>Cladonia macrophylla</i>	dutohlávka velkolupenná	4
<i>Cladonia merochlorophaea</i>	-	3
<i>Cladonia ochrochlora</i>	dutohlávka okrozelená	3
<i>Cladonia pleurota</i>	dutohlávka křídlovitá	2
<i>Cladonia rangiferina</i>	dutohlávka sobí	2
<i>Cladonia squamosa</i>	dutohlávka šupinatá	9
<i>Cladonia sulphurina</i>	dutohlávka sírová	5
<i>Cladonia uncialis</i>	dutohlávka hvězdovitá	3

Dále jsem identifikovala následující druhy: *Cladonia cenotea* (dutohlávka dutonohá), *Cladonia coccifera* (dutohlávka červcová), *Cladonia mitis* (nemá český název), *Cladonia polydactyla* (dutohlávka mnohoprstá), *Cladonia pyxidata* (dutohlávka pohárkatá), *Cladonia stygia* (dutohlávka temná) a *Cladonia umbricola* (nemá český název). Každý z těchto sedmi druhů byl identifikován pouze po jednom vzorku.

3.2 Nalezené lišejníkové látky

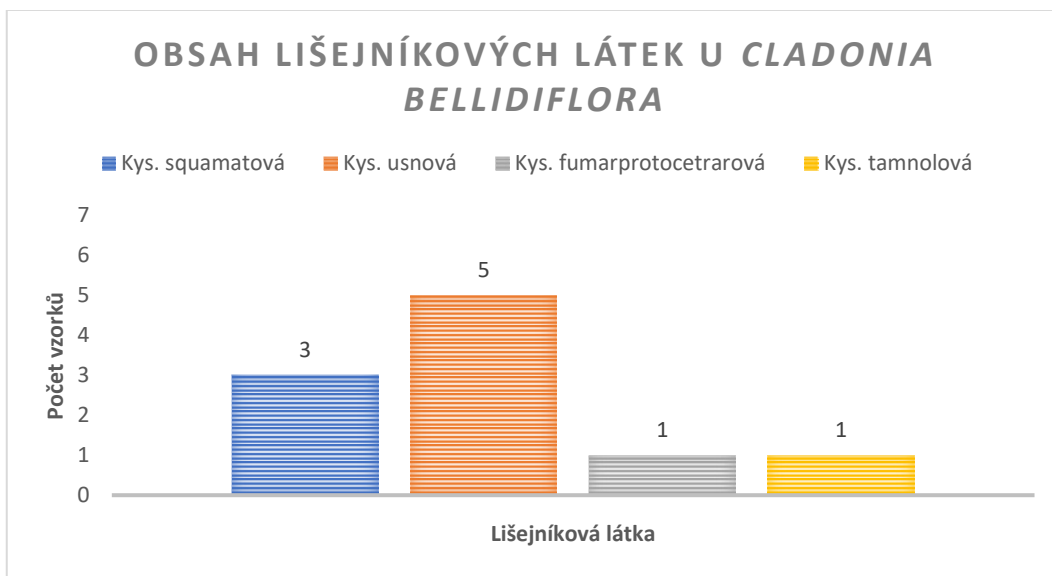
V 82 zhotovených vzorcích jsem identifikovala 13 sekundárních metabolitů. U červenoplodých dutohlávek byla nejčastěji se vyskytující lišejníkovou látkou kyselina usnová, kterou jsem identifikovala u šesti druhů. Mezi hnědoplodými dutohlávkami se nejčastěji vyskytovala kyselina fumarprotocetrarová, kterou jsem identifikovala u dvanácti druhů. Lišejníkovými látkami identifikovanými pouze u jediného druhu jsou kyselina grayanová (*Cladonia grayi*), kyselina merochlorophaevá (*Cladonia merochlorophaea*), kyselina psoromová (*Cladonia macrophylla*), kyselina rangiformová (*Cladonia macrophylla*) a kyselina stiktová (*Cladonia mitis*).

Nejpočetnějším druhem byla *Cladonia squamosa* (dutohlávka šupinatá), ze které bylo zhotoveno 9 vzorků. U 8 vzorků jsem ve stélce identifikovala kyselinu squamatovou. V 6 vzorcích kyselinu barbatovou a u jediného vzorku kyselinu fumarprotocetrarovou.



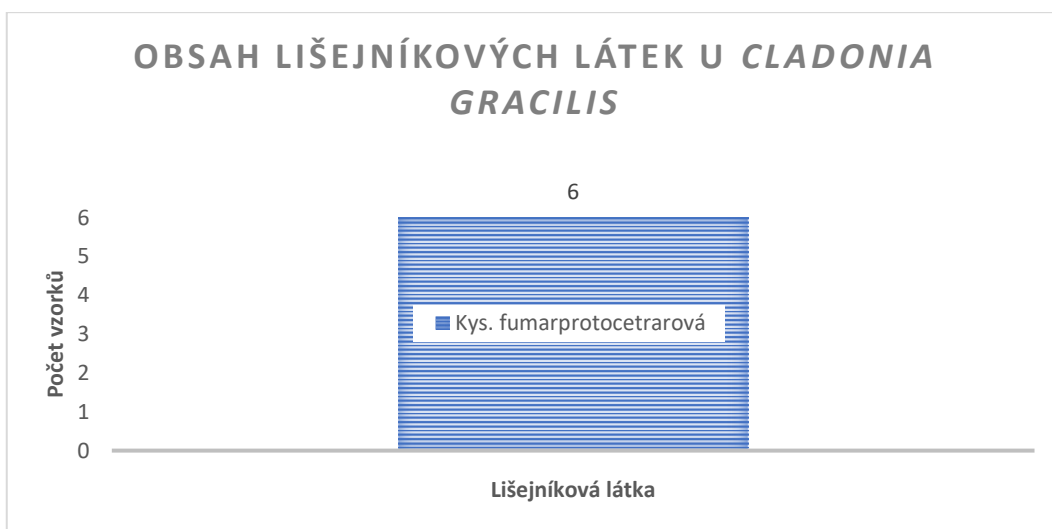
Obrázek 22: Obsah lišejníkových látek ve vzorcích *Cladonia squamosa*.

Cladonia bellidiflora (dutohlávka chudobkokvětá) byla identifikována v sedmi vzorcích. Lišejníkovými látkami nalezenými ve stélce jsou kyselina usnová a kyselina squamatová, kyselina fumarprotocetrarová a kyselina tamnolová. V pěti vzorcích byla obsažena kyselina usnová, ve třech vzorcích kyselina squamatová a v jediném vzorku kyselina fumarprotocetrarová a kyselina tamnolová.



Obrázek 23: Obsah lišejníkových látek ve vzorcích *Cladonia bellidiflora*.

Třetím nejpočetnějším druhem, pozorovaným v 6 vzorcích byla *Cladonia gracilis* (dutohlávka štíhlá), která měla ve stélce obsaženu pouze kyselinu fumarprotocetrarovou, kterou jsem našla ve všech vzorcích.



Obrázek 24: Obsah lišejníkových látek ve vzorcích *Cladonia gracilis*.

Kyselina fumarprotocetrarová, jako jediný sekundární metabolit byla nalezena také u dalších čtyř lišejníků: *Cladonia cervicornis* (dutohlávka rohovitá), *Cladonia furcata* (dutohlávka rozsochatá), *Cladonia macroceras* (dutohlávka statná) a *Cladonia ochrochlora* (dutohlávka okrozelená).

Zjištěné lišejníkové látky u jednotlivých druhů *Cladonia* shrnuji v tabulce č. 3.

Tabulka 3: Zjištěné sekundární metabolity.

Latinský název	Český název	Sekundární metabolity
<i>Cladonia arbuscula</i>	dutohlávka lesní	kys. fumarprotocetrarová
		kys. usnová
<i>Cladonia bellidiflora</i>	dutohlávka chudobkokvětá	kys. squamatová
		kys. usnová
		kys. fumarprotocetrarová
		kys. tamnolová
<i>Cladonia borealis</i>	dutohlávka severní	kys. barbatová
		kys. usnová
<i>Cladonia cenotea</i>	dutohlávka dutonohá	kys. squamatová
<i>Cladonia cervicornis</i>	dutohlávka rohovitá	kys. fumarprotocetrarová
<i>Cladonia coccifera</i>	dutohlávka červcová	kys. usnová
<i>Cladonia floerkeana</i>	dutohlávka Floerkeova	kys. tamnolová
		kys. barbatová
<i>Cladonia furcata</i>	dutohlávka rozsochatá	kys. fumarprotocetrarová
<i>Cladonia gracilis</i>	dutohlávka štíhlá	kys. fumarprotocetrarová
		kys. usnová
<i>Cladonia grayi</i>	dutohlávka Grayova	kys. fumarprotocetrarová
		kys. grayanová
		kys. usnová?
		neznámá mastná kyselina
<i>Cladonia macroceras</i>	dutohlávka statná	kys. fumarprotocetrarová

<i>Cladonia macrophylla</i>	dutohlávka velkolupenná	kys. rangiformová
		kys. psoromová
<i>Cladonia merochlorophaea</i>	-	kys. merochlorophaeová
		kys. fumarprotocetrarová
		kys. homosekikaiová
		kys. usnová
<i>Cladonia mitis</i>	-	kys. fumarprotocetrarová
		kys. stitková
<i>Cladonia ochrochlora</i>	dutohlávka okrozelená	kys. fumarprotocetrarová
<i>Cladonia pleurota</i>	dutohlávka křídlovitá	kys. usnová
<i>Cladonia polydactyla</i>	dutohlávka mnohoprstá	kys. tamnolová
<i>Cladonia pyxidata</i>	dutohlávka pohárkatá	kys. fumarprotocetrarová
		kys. homosekikaiová
		atranorin
<i>Cladonia rangiferina</i>	dutohlávka sobí	kys. fumarprotocetrarová
		atranorin
<i>Cladonia squamosa</i>	dutohlávka šupinatá	kys. fumarprotocetrarová?
		kys. barbatová
		kys. squamatová
<i>Cladonia stygia</i>	dutohlávka temná	kys. fumarprotocetrarová
		atranorin
<i>Cladonia sulphurina</i>	dutohlávka sírová	kys. usnová
		kys. squamatová
<i>Cladonia umbricola</i>	-	kys. barbatová
		kys. squamatová
		kys. usnová
<i>Cladonia uncialis</i>	dutohlávka hvězdovitá	kys. squamatová
		kys. usnová

4 Diskuse

Při porovnávání výsledků mé bakalářské práce s odbornou literaturou, kterou jsem citovala v rešeršní části této práce, jsem zjistila některé zajímavé poznatky. U devatenácti druhů lišejníků jsem byla s nálezy lišejníkových látek ve shodě s odbornými publikacemi zabývajícími se chemotypy dutohlávek a metodou tenkovrstvé chromatografie. U pěti druhů jsem pozorovala následující odlišnosti.

Poměrně velkou variabilitu sekundárních metabolitů jsem zaznamenala u *Cladonia bellidiflora* (dutohlávka chudobkokvětá). V celkem sedmi vzorcích jsem našla čtyři sekundární metabolity. Kyselina usnová byla obsažena v pěti vzorcích, z nichž ve třech vzorcích společně s kyselinou squamatovou a ve dvou vzorcích byla obsažena samostatně jako jediný sekundární metabolit. Jeden vzorek obsahoval pouze kyselinu squamatovou. Jeden vzorek obsahoval kyselinu fumarprotocetrarovou a kyselinu tamnolovou. Ahti et al. (2013) zaznamenal, že *Cladonia bellidiflora* obsahuje kyselinu usnovou, která chybí pouze vzácně a dále může obsahovat kyselinu squamatovou, kyselinu rodokladoniovou či belidiflorin. Mohou však také existovat chemotypy s kyselinou fumarprotocetrarovou a kyselinou tamnolovou. U jednoho vzorku jsem pravděpodobně narazila na tento chemotyp. Kyselinu rodokladoniovou ani belidiflorin jsem nezaznamenala u žádného vzorku.

Cladonia sulphurina (dutohlávka sírová) a *Cladonia deformis* (dutohlávka znetvořená) jsou morfologicky obtížně rozpoznatelné. K identifikaci velmi pomůže dlouhovlnné UV, pod kterým *Cladonia sulphurina* svítí bíle zatímco *Cladonia deformis* nesvítí. Dalším rozlišovacím znakem je přítomnost zeorinu ve stélce lišejníku. *Cladonia deformis* zeorin obsahuje a *Cladonia sulphurina* nikoliv. Pozorovala jsem však jeden vzorek *Cladonia sulphurina*, který pod dlouhovlnným UV nesvítí, protože pravděpodobně obsahoval nízké množství kyseliny usnové. Metoda TLC však předpokládá, že se jedná o vzorek *Cladonia deformis* vyvrátila, protože ve stélce nebyl obsažen zeorin.

Zajímavý jev jsem pozorovala u druhu *Cladonia uncialis* (dutohlávka hvězdovitá), který jsem určovala třikrát. Dle práce (Ahti et al., 2013) obsahuje *Cladonia uncialis* ve stélce kyselinu usnovou, která vzácně chybí a občas může obsahovat kyselinu squamatovou. Já jsem však kyselinu usnovou pozorovala pouze u jediného vzorku. U dvou vzorků jsem zaznamenala jen kyselinu squamatovou.

U dvou vzorků jsem narazila na látku, která pro daný druh není v odborné literatuře zaznamenána. Jednalo se o vzorek *Cladonia squamosa* (dutohlávka šupinatá) a *Cladonia grayi* (dutohlávka Grayova). *Cladonia squamosa* se vyskytuje ve dvou hlavních chemotypech. První chemotyp obsahuje kyselinu squamatovou, kyselinu barbatovou a neznámé terpenoidy. Druhý chemotyp obsahuje kyselinu tamnolovou, kyselinu barbatovou, kyselinu dekarboxytamnolovou a neznámé terpenoidy. Ani jeden z těchto chemotypů neobsahuje kyselinu fumarprotocetrarovou. Já jsem však u jednoho z devíti vzorků kyselinu fumarprotocetrarovou pozorovala. Pravděpodobně tedy došlo kontaktu dvou lišejníků a tím ke kontaminaci a vzorku a falešným výsledkům. Stejná situace nastala u *Cladonia grayi*, kdy jsem u jednoho ze čtyř vzorků objevila kyselinu usnovou, která taktéž není v odborné literatuře zaznamenána. Tyto látky jsou v tabulce č. 3 (Zjištěné sekundární metabolity) označeny otazníkem.

Jednou z nejčastěji se vyskytujících dutohlávek na území české republiky je *Cladonia fimbriata* (dutohlávka třásnitá), v jejíž stélce bývá obsažena kyselina fumarprotocetrarová a atranorin. Tuto dutohlávku jsem však při provádění tenkovrstvé chromatografie a porovnávání anatomických a morfologických znaků neidentifikovala. Stejně lišejníkové látky (kyselina fumarprotocetrarová a atranorin) jsou obsaženy také ve stélce *Cladonia rangiferina* (dutohlávka sobí) a *Cladonia stygia* (dutohlávka temná). *Cladonia rangiferina* je velmi známý druh, který v minulosti spadal mezi nejrozšířenější druhy ČR. Dnes patří mezi druhy blízké ohrožení. Mezi sekundární metabolity obsažené ve stélce *Cladonia rangiferina* spadá kyselina fumarprotocetrarová a atranorin, které chybí jen velice zřídka. Občas může být obsažena také kyselina ursolová či neznámé mastné kyseliny. Při provádění metody tenkovrstvé chromatografie jsem narazila na tři vzorky obsahující pouze kyselinu fumarprotocetrarovou a atranorin, na základě anatomických a morfologických znaků stélky lišejníku jsem dva druhy identifikovala jako *Cladonia rangiferina* a jeden druh jako *Cladonia stygia*.

Poměrně vzácněji se na území ČR vyskytuje *Cladonia macrophylla* (dutohlávka velkolupenná), jejíž výskyt je omezen na horské oblasti. Ve stélce *Cladonia macrophylla* je vždy přítomna kyselina psoromová a kyselina rangiformová, ale může také obsahovat kyselinu norrangiformovou. *Cladonia macrophylla* jsem identifikovala ve

čtyřech vzorcích, z nichž všechny obsahovali kyselinu psoromovou a kyselinu rangiformovou.

Při zpracovávání výsledků jsem narazila na jednu skvrnu (lišejníkovou látku), kterou jsem nedokázala identifikovat. Vyskytovala se u více vzorků. Hodnota retenčního faktoru této skvrny byla 62. Po vyjmutí z vyvíjecí komory se skvrna jevila jako lehce nažloutlá, při pozorování pod krátkovlnným UV před vypálením jako černá a při pozorování pod dlouhovlnným UV před vypálením nebyla vidět. Po aplikaci vody nevytvořila novou skvrnu, nejedná se tedy o masnou kyselinu. Po aplikaci kyseliny sírové a následném vypálení neměla načervenalé zbarvení, pravděpodobně se tedy nejedná ani o druh terpenoidu. Jelikož takovéto vlastnosti neměl žádný ze sekundárních metabolitů typicky se vyskytujících ve stélkách lišejníků, u nichž byla takto skvrna pozorována, nepodařilo se mi skvrnu identifikovat.

Závěr

První část bakalářské práce je věnována obecné charakteristice lišejníků s podrobným zaměřením na rod *Cladonia*, dále lišejníkovým látkám a chromatografii na tenké vrstvě. Okrajově je zde zmíněna charakteristika Vysokých Sudet, jakožto místa původu herbářových položek, které byly využity pro praktickou část této práce.

Druhá část práce je zaměřena na podrobný popis metody tenkovrstvé chromatografie, od vyvolání desky se vzorky přes výpočet retenčního faktoru, po výsledné určení sekundárního metabolitu. Dále je zde zmíněn postup tvorby plakátků s lišejníkovou tematikou a pracovních listů pro didaktické účely.

Sekundární metabolity zaujímají, mimo jiné, významnou roli v taxonomii lišejníků. Jejich obsah ve stélkách morfologicky variabilních lišejníků lze relativně snadno zjistit pomocí chromatografie na tenké vrstvě a základního laboratorního vybavení. Jedním z cílů této práce bylo vytvořit klíč, který pomůže ke snazší identifikaci některých druhů dutohlávek na základě obsahu lišejníkových látek v jejich stélkách.

Výstupem této práce je klíč k určování druhů dutohlávek nalezených při psaní této práce a didaktické pomůcky (výukové plakátky a pracovní list), které mohou sloužit žákům základních a středních škol k lepšímu pochopení problematiky lišejníků.

Na bakalářskou práci je možné navázat studiem dalších druhů dutohlávek a rozšířit tak určovací klíč o další druhy.

Literatura

Ahti, T.; Stenroos, S.; Moberg, R. *Nordic lichen flora. Volume 5. Cladoniaceae*. Museum of Evolution, Uppsala University. 2013. ISBN 978-91-85221-29-5.

BALABÁN, K. *Lesnický významné lišejníky, mechorosty a kaprad'orosty*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. Lesnická knihovna. 1960.

COOPER, A.; MCCANN, T. P.; HAMILL, B. Vegetation regeneration on blanket mire after mechanized peat-cutting. *Global Ecology and Biogeography*, 2001, 10.3: 275-289.

ČERNAJOVÁ, I.; SVOBODA, D. Lichen compounds of common epiphytic *Parmeliaceae* species deter gastropods both in laboratory and in Central European temperate forests. *fungus ecology*, 2014, 11: 8-16.

DAILEY, R. N., et al. Toxicity of the lichen secondary metabolite (+)-usnic acid in domestic sheep. *Veterinary pathology*, 2008, 45.1: 19-25.

DAVID, P. a V. SOUKUP. *Krkonoše známé i neznámé*. Praha: Euromedia Group, 2019. Universum (Euromedia Group). ISBN 978-80-7617-731-4.

DE BARROS ALVES, G. M., et al. Expectorant and antioxidant activities of purified fumarprotocetraric acid from *Cladonia verticillaris* lichen in mice. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 2014, 27.2: 139-143.

ELIX, J. A.; STOCKER-WÖRGÖTTER, E. Biochemistry and secondary metabolites. *Lichen biology*, 1996, 1: 154-180.

FLOUSEK, J., ed. *Krkonoše: příroda, historie, život*. Praha: Baset, 2007. ISBN 978-80-7340-104-7.

CHALOUPSKÝ, J. *Geologie Krkonoš a Jizerských hor*. Praha: Academia, 1989.

INGOLFSDOTTIR, K. Usnic acid. *Phytochemistry*, 2002, 61.7: 729-736.

JARKOVSKÝ, M. *Lišejníkové látky a jejich identifikace*. Hradec Králové: Pedagogická fakulta v Hradci Králové, 1978. ISBN 59-220-75.

JENÍK, J. *Alpínská vegetace Krkonoš, Králického Sněžníku a Hrubého Jeseníku: Teorie anemo-orografických systémů*. Praha: ČSAV, 1961.

KALINA, T. a J. VÁŇA. *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-1036-1.

KOTELKO, R.; PIERCEY-NORMORE, M. D. *Cladonia pyxidata* and *C. pocillum*; genetic evidence to regard them as conspecific. *Mycologia*, 2010, 102.3: 534-545.

KREMER, B. P. a H. MUHLE. *Lišejníky, mechorosty, kaprad'orosty: evropské druhy*. Ilustroval Herbert GRAMBIHLER. Praha: Ikar, 1998. ISBN 80-7202-356-X.

KUMAR KC, S.; MÜLLER, K. Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. *Journal of natural products*, 1999, 62.6: 821-823.

LOKAJOVÁ, V.; BAČKOROVÁ, M.; BAČKOR, M. Allelopathic effects of lichen secondary metabolites and their naturally occurring mixtures on cultures of aposymbiotically grown lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta). *South African Journal of Botany*, 2014, 93: 86-91.

MALÍČEK, J. Sekundární metabolity lišejníků a jejich význam pro taxonomii. *Živa*, 2012, (6), 276-278.

NASH III, T. H. *Lichen Biology*. Cambridge University Press, second edition, 2008.

NDOP (2022): Nálezová databáze ochrany přírody AOPK ČR [online]. [cit. 2022-04-21]. Dostupné z [www: portal.nature.cz/nd/](http://www.portal.nature.cz/nd/)

OBENBERGER, J. *Krkonoše a jejich zvířena: Práce z entomolog. Oddělení Národního muzea v Praze*. Praha: Přírodovědné vydavatelství, 1952.

ORANGE, A.; JAMES, P. W.; WHITE, F. J. *Microchemical Methods for the Identification of Lichens*. 2nd edition. London: British Lichen Society, 2010. ISBN 978 0 9540418 9 2.

OTT, S.; MECHMANN, A.; JAHNS, H. M. Rhizine-Strands in *Cladonia sulphurina* (Michaux) Fr. *Symbiosis*, 1993.

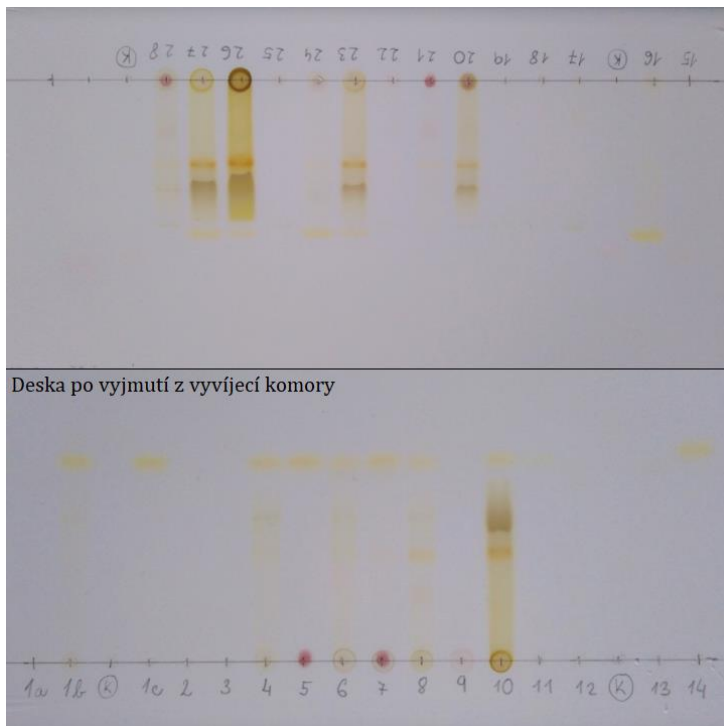
- PIERCEY-NORMORE, M. D.; AHTI, T.; GOWARD, T. Phylogenetic and haplotype analyses of four segregates within *Cladonia arbuscula* sl. *Botany*, 2010, 88.4: 397-408.
- PURVIS, O. W.; PAWLIK-SKOWROŃSKA, B. Lichens and metals. In: *British mycological society symposia series*. Academic Press, 2008. p. 175-200.
- RABŠTEINEK, O., PORUBA, M.; SKUHROVEC, J. *Lišejníky, mechorosty a kaprad'orosty ve fotografii*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1987. ISBN 07-056-88.
- RANNÝ, M. *TLC-FID, nová technika kvantitativní chromatografie na tenké vrstvě*. Praha: Academia, 1984. ISBN 21-064-84.
- RUNDEL, P. W. The ecological role of secondary lichen substances. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1978, 6.3: 157-170.
- SCHNEIDERKA, P. *Kapitoly z klinické biochemie*. Praha: Karolinum, 2000. ISBN 80-246-0140-0.
- SCHUMM, F. *Atlas of Images of Thin Layer Chromatograms of Lichen Substances. Supplement*. Norderstedt: Books on Demand, 2016. ISBN 978-3-7431-4586-3.
- STENROOS, S. Taxonomy of the *Cladonia coccifera* group. 1. In: *Annales Botanici Fennici*. The Finnish Botanical Publishing Board, 1989. p. 157-168.
- STOCKER-WÖRGÖTTER, E. Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Natural product reports*, 2008, 25.1: 188-200.
- STUDZINSKA-SROKA, E.; GALANTY, A.; BYLKA, W. Atranorin-an interesting lichen secondary metabolite. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 2017, 17.17: 1633-1645.
- SVRČEK, M. *Klíč k určování bezcévných rostlin: Sinice, řasy, hlenky, houby, lišejníky a mechorosty*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1976.
- ŠTURSA, J.; BRUNÍK, J. *Krkonoše národní park České socialistické republiky*. Hradec Králové: Kruh, 1983. ISBN 46-001-83.

THOR, G. The placement of *Chiodecton sanguineum* (syn. *Chiodecton rubrocinctum*), and *Cryptothecia striata* sp. nov. *Bryologist*, 1991, 94(3): 278-283.

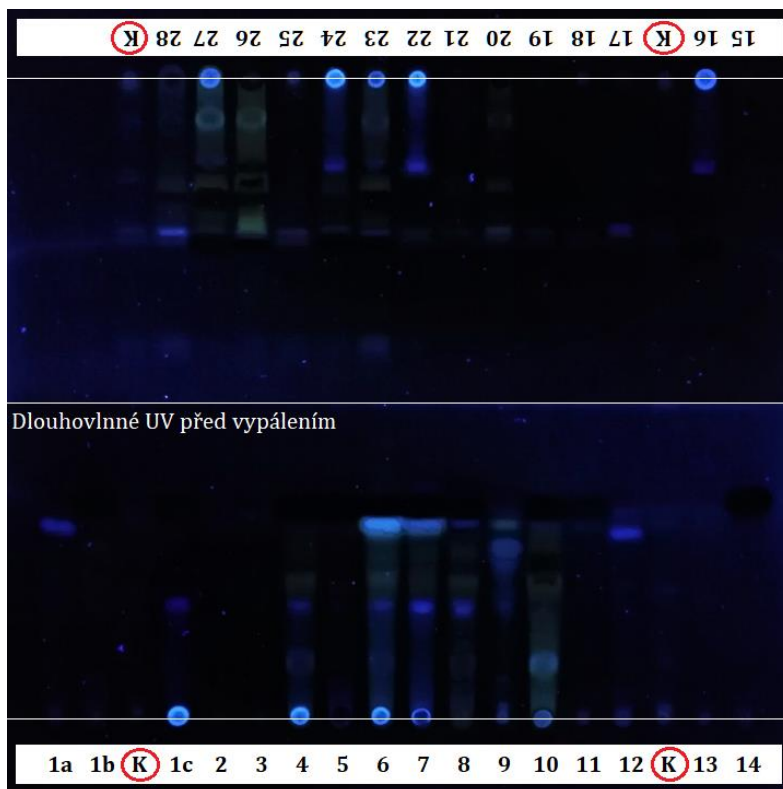
WALKER, F. J.; JAMES, P. W. A revised guide to microchemical techniques for the identification of lichen products. *British Lichen Society Bulletin*, 1980, 46 (supplement): 13-29.

Přílohy

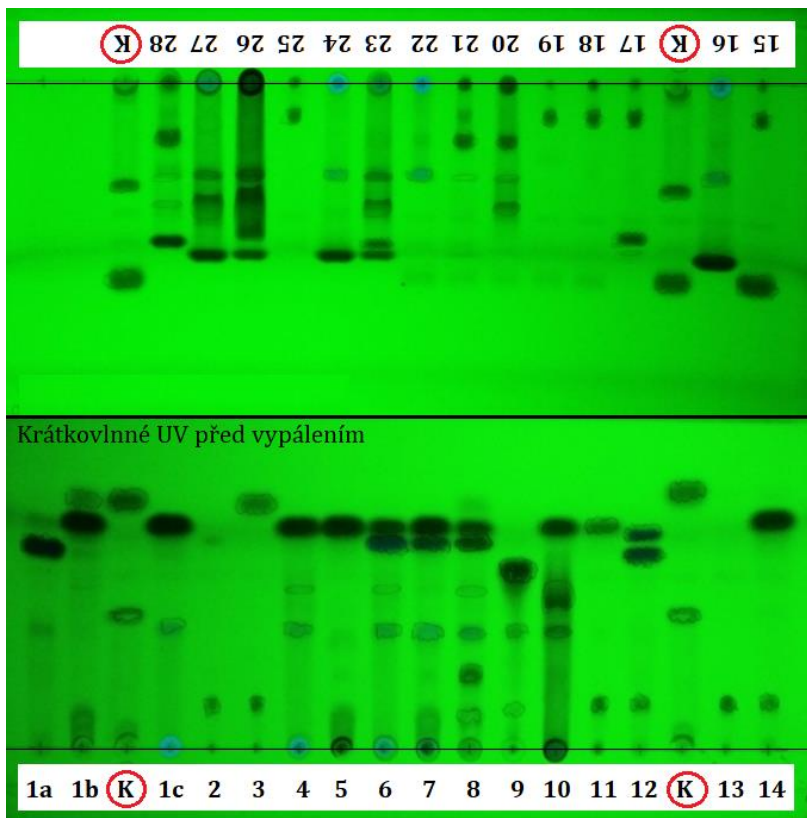
Příloha 1: Fotografie desek se vzorky



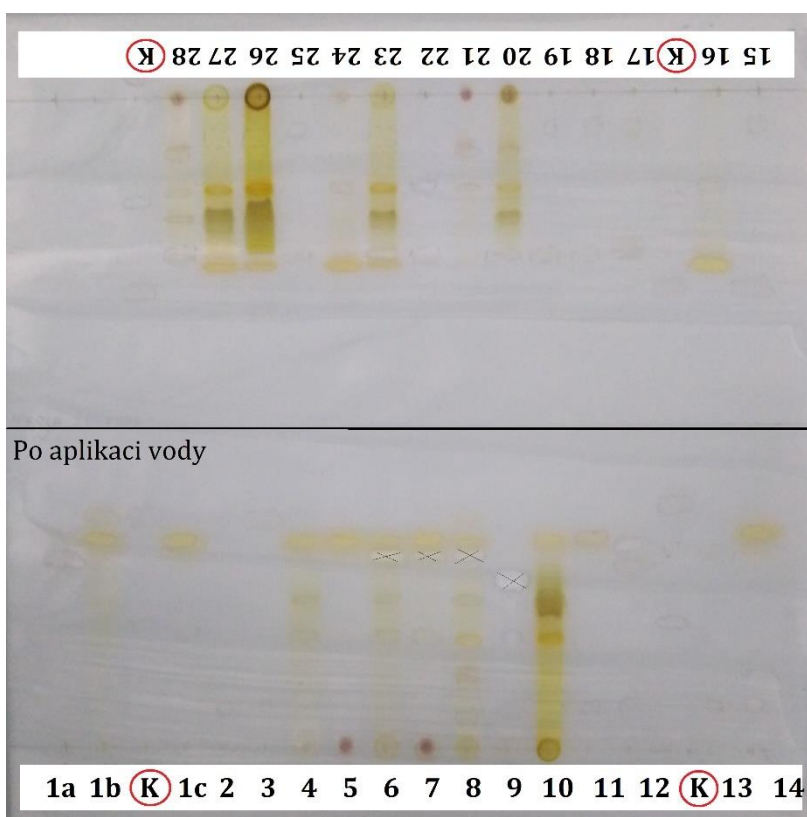
Obr. 25: Deska po vyjmutí z vyvíjecí komory.



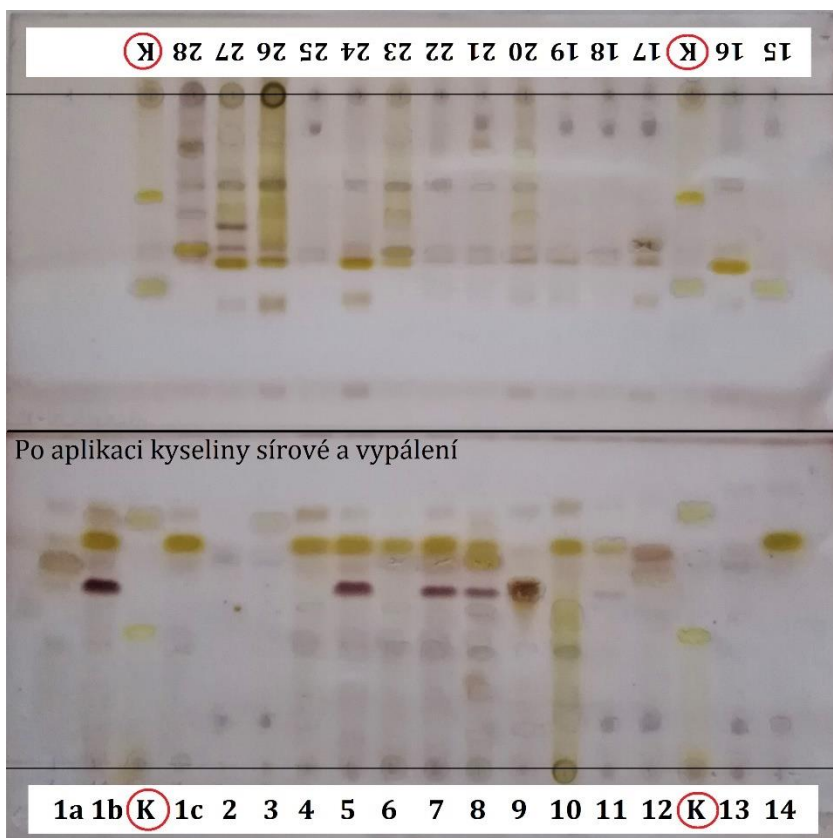
Obr. 26: Deska pod dlouhovlnným UV před aplikací kyseliny a vypálením.



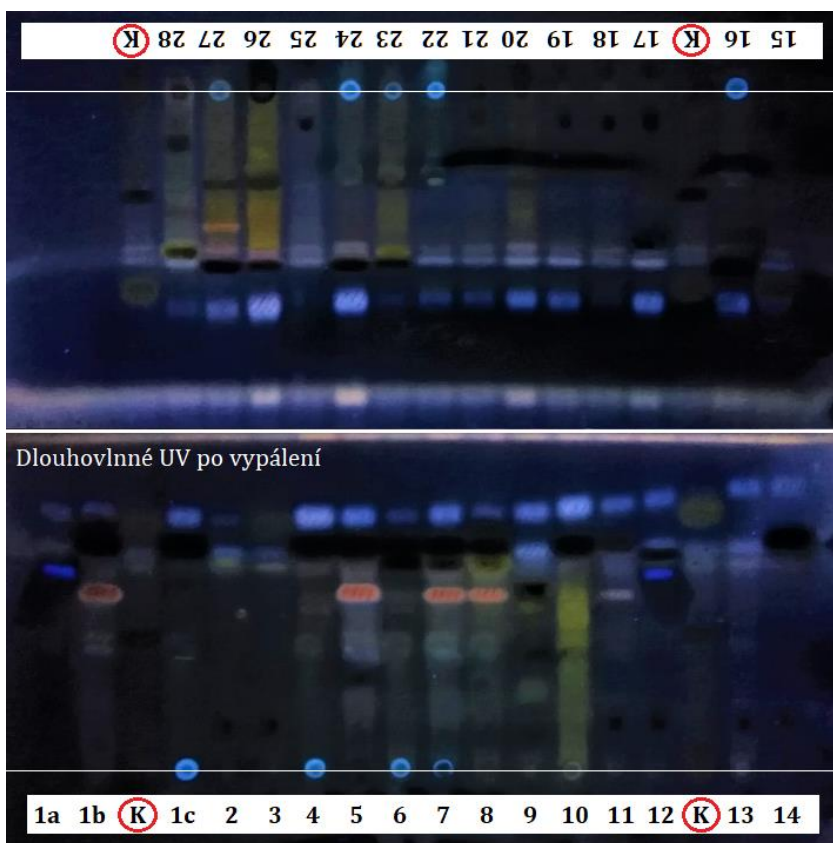
Obr. 27: Deska pod krátkovlnným UV před aplikací kyseliny a vypálením.



Obr. 28: Deska po aplikaci vody.

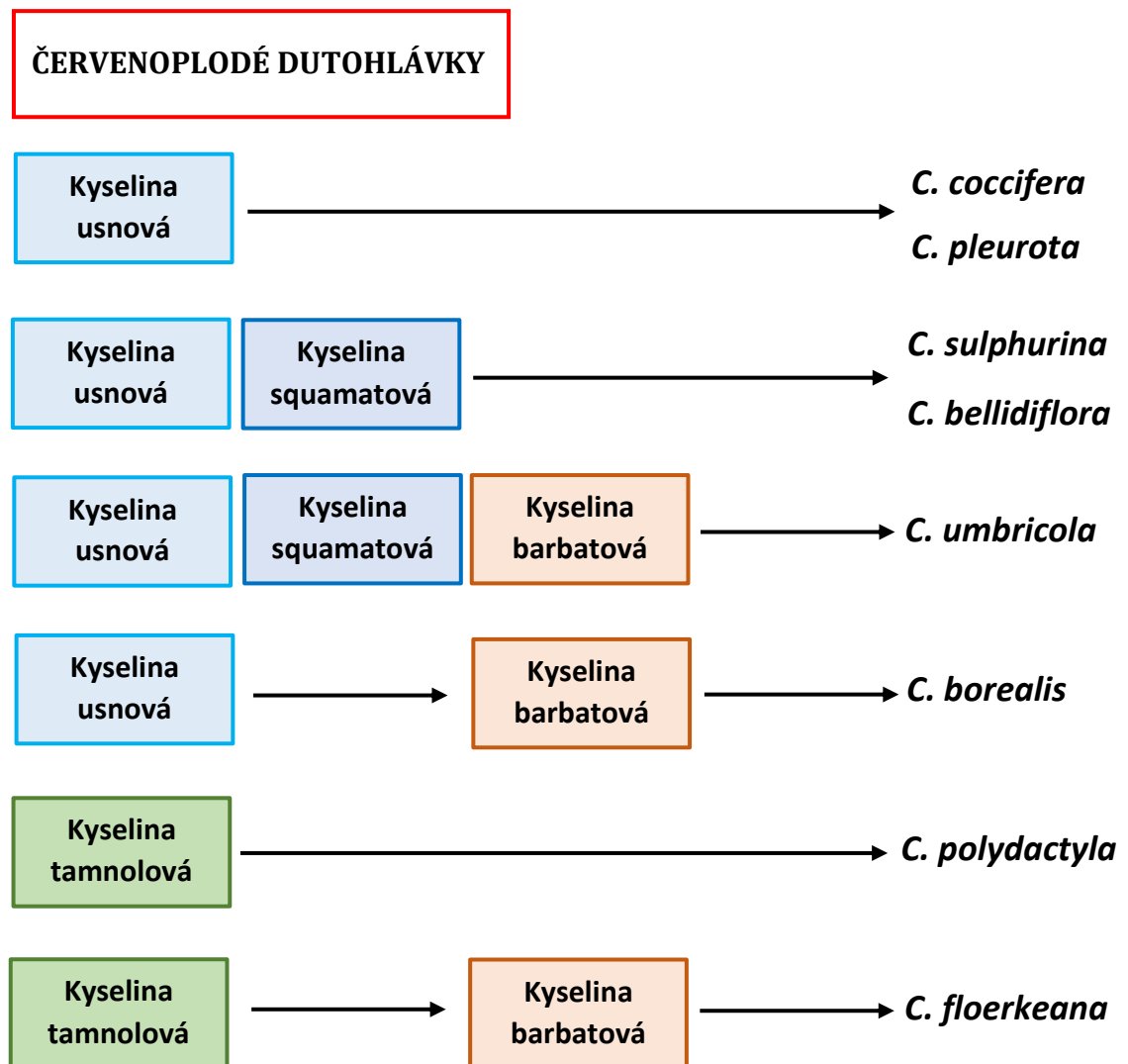


Obr. 29: Deska po aplikaci kyseliny sírové a následném vypálení.

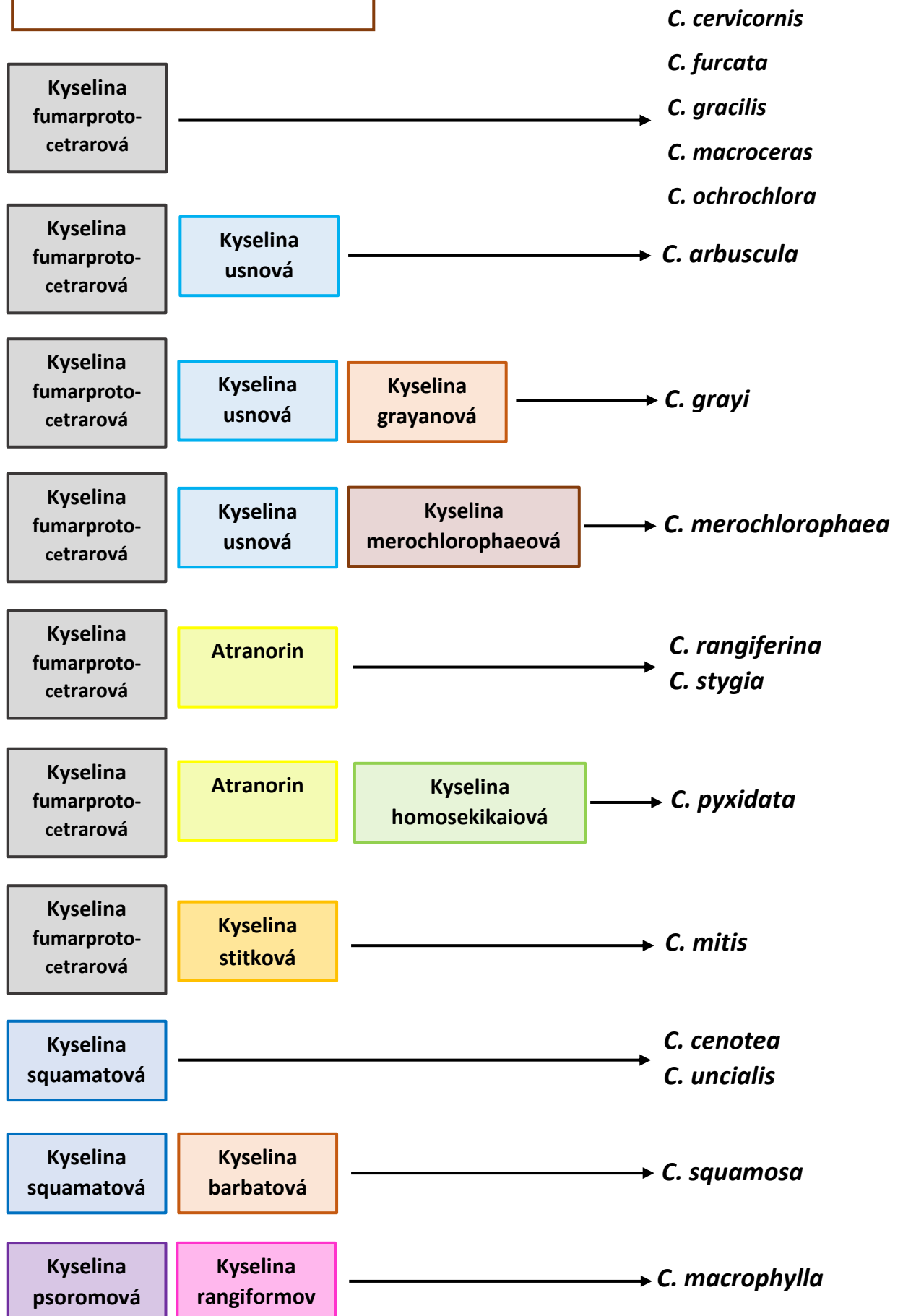


Obr. 30: Deska pod dlouhovlnným UV po aplikaci kyseliny a vypálení.

Příloha 2: Klíč k určování dutohlávek

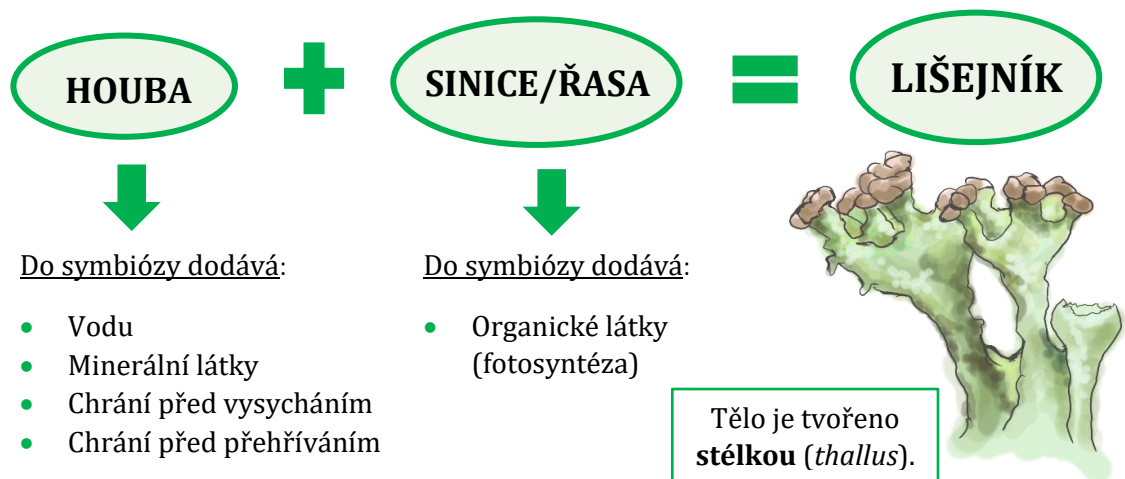


HNĚDOPLODÉ DUTOHLÁVKY



Lišejníky (*Lichenes*) → Podvojný organismy, zaujímající v rostlinné říši zvláštní postavení.

Lišejník je **symbiotickým organismem** složeným z houby (*Fungi*) a sinice (*Cyanobacteria*), případně řasy. Houbového symbionta označujeme jako **mykobiont**. Nejčastěji ho tvoří vrčkovitýtrusná houba (*Ascomycetes*). U několika lišejníkových rodů je mykobiontem houba stopkovitýtrusná (*Basidiomycota*). Sinicového symbionta nazýváme **fotobiont**. Fotobionty jsou u lišejníků sinice a zelené řasy (*Chlorophyta*) (Kremer, 1998)



Díky specifickému soužití jsou lišejníky schopny existovat v **extrémních lokalitách**, v nichž by ani jeden ze zúčastněných organismů izolovaně existovat nemohl.

Mezi extrémní lokality výskytu lišejníků mohou patřit: → **Holé skály**

→ **Chudé písčité půdy**

→ **Horské oblasti**

Specifickou vlastností lišejníků je produkce **sekundárních metabolitů**, které by houba ani řasa nebyla schopna samostatně vyrobit. Plní mnohé funkce a často také ovlivňují zbarvení lišejníkové stélky.

ROZMNOŽOVÁNÍ:

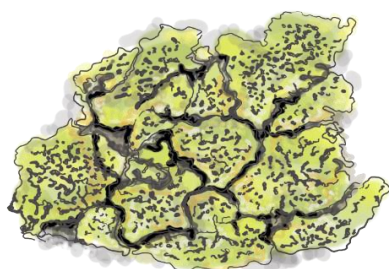
a) Pohlavní – pouze mykobiont
- apothecia

b) Nepohlavní – fragmentace stélky

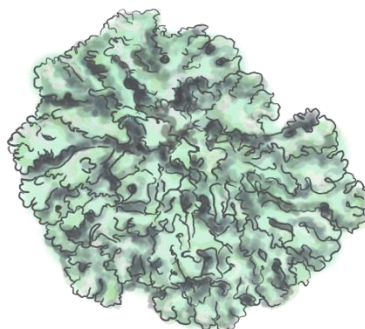
V České republice se lišejníková flóra hojně vyskytuje v **Krkonoších**, kde můžeme nalézt více než 200 rodů lišejníků. Nejpočetnějšími rody jsou: **dutohlávka** (*Cladonia*), **misnička** (*Lecanora*) a **mapovník** (*Rhizocarpon*).

Tělo je tvořeno **stélkou** (*thallus*), jejíž vzhled je určen hyfami houby (mykobiontem).

Rozlišujeme tři typy stélky:



1) Korovitá
(Mapovník zeměpisný)

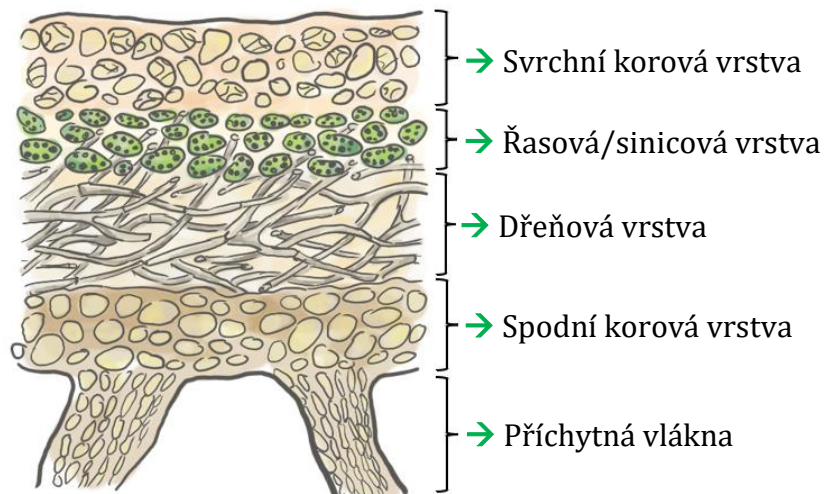


2) Lupenitá
(Terčovka bublinatá)



3) Keříčkovitá
(Dutohlávka sobí)

Stavba stélky lišejníku:



Význam lišejníků:

POTRAVA PRO ŽIVOČICHY

→ Sob, housenky

BIOINDIKACE ČISTOTY OVZDUŠÍ

→ Lišejníky jsou citlivé na oxidy síry, dusíku i těžké kovy

PRIMÁRNÍ KOLONIZÁTOŘI

→ Osidlování extrémních stanovišť

PRODUKCE SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ

→ Barviva

→ Léčiva

→ Taxonomie

PŮDNÍ EROZE

→ Narušování skalního podkladu

URČOVÁNÍ STÁŘÍ USAZENIN

Sekundární metabolity

Složité chemické
sloučeniny

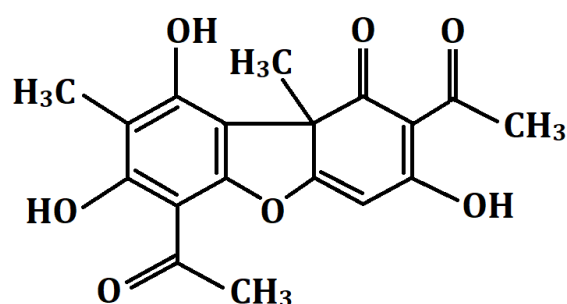
Důsledkem zvláštní anatomické stavby stélky lišejníku a způsobu života je **odlišný látkový a energetický metabolismus**, jehož výsledkem jsou nejen obvyklé produkty látkové výměny (např. sacharidy), ale také specifické látky, které nazýváme lišejníkové látky neboli **sekundární metabolity**.

Význam:

- Barviva
- Léčebné účely
- Antibiotické účinky
- Ochrana před UV
- Ochrana před herbivory
- Taxonomie

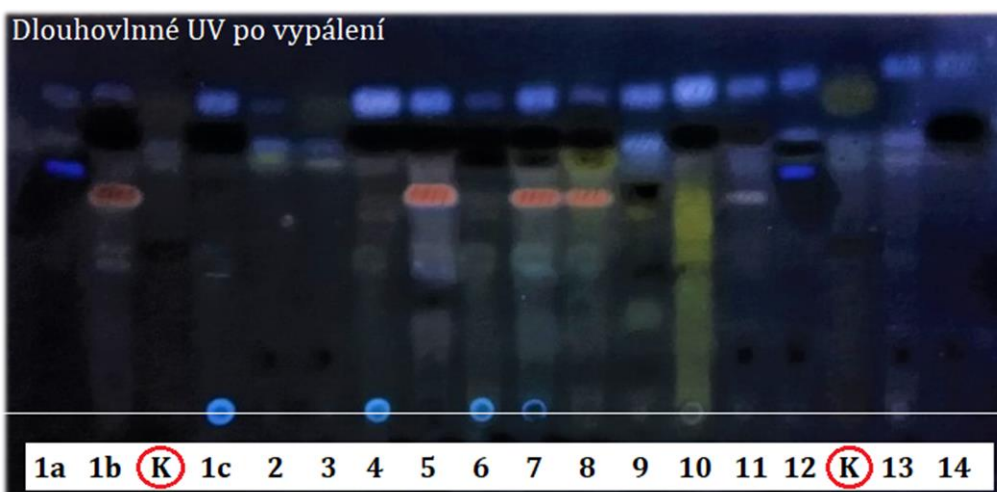
Mezi nejznámější lišejníkové látky patří:

Kyselina usnová, atranorin, zeorin a kyselina fumarprotocetrarová.



Vzorec kyseliny usnové

Pro **zjištění přítomnosti obsahu lišejníkových látek** v lišejníku slouží více sofistikovaných metod, mezi které patří například reakce stélky na dlouhovlnné UV záření, mikrokrytalizační testy nebo chromatografie. Při práci s lišejníky využíváme dva základní typy chromatografie. **Tenkovrstvou chromatografií (TLC)** a **vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC)**.



Metoda tenkovrstvé chromatografie (TLC)

PRACOVNÍ LIST – LIŠEJNÍKY

Jméno a příjmení: _____

Třída: _____

Datum: _____

① Vhodně doplňte do následujícího textu:

Lišejník je _____ organismem, složeným z _____ a _____ případně _____.

Díky specifickému spojení jsou lišejníky schopny osídlovat _____,

například _____ nebo _____. Specifickou

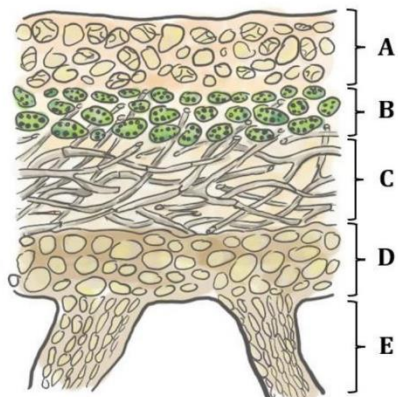
vlastností lišejníků je produkce _____.

② Vypište alespoň pět možností využití lišejníků:

- _____
- _____
- _____
- _____
- _____

③ Popište svými slovy, jak funguje spolupráce organismů v lišejníku:

④ Pojmenujte části lišejníkové stélky:



A - _____

B - _____

C - _____

D - _____

E - _____

PRACOVNÍ LIST - LIŠEJNÍKY

Jméno a příjmení: _____

Třída: _____

Datum: _____

① Vhodně doplňte do následujícího textu:

Lišejník je **symbiotickým** organismem, složeným z **houby** a **sinice** případně **řasy**.
 Díky specifickému spojení jsou lišejníky schopny osídlovat **extrémní lokality**,
 například **holé skály** nebo **chudé písčité půdy**. Specifickou
 vlastností lišejníků je produkce **Sekundárních metabolitů**.

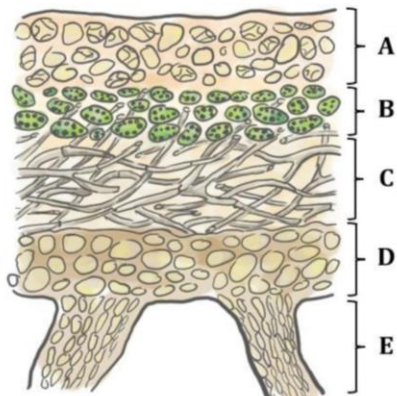
② Vypište alespoň pět možností využití lišejníků:

- **Potrava pro živočichy (soby, housenky)**
- **Bioindikace čistoty ovzduší**
- **Produkce sekundárních metabolitů (barviva, léčiva, taxonomie)**
- **Primární kolonizátoři**
- **Určování stáří usazenin**

③ Popište svými slovy, jak funguje spolupráce organismů v lišejníku:

Houbovitá část (mykobiont) chrání fotobionta před vysycháním a přehříváním a do symbiotického spojení dodává minerální látky a vodu. Fotobiont zajišťuje fotosyntézu a tím do symbiotického spojení dodává organické látky.

④ Pojmenujte části lišejníkové stélky:



- A - **Svrchní korová vrstva**
- B - **Řasová/sinicová vrstva**
- C - **Dřeňová vrstva**
- D - **Spodní korová vrstva**
- E - **Přichytná vlákna**