

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ
KATEDRA EKOLOGIE



**Chemická analýza obtížně určitelných lišejníků
vysokohorských smrčín a bučin České republiky**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Jana Kocourková, CSc.

Vypracovala: Anna Botová

2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Anna Botová

Aplikovaná ekologie

Název práce

Chemická analýza obtížně určitelných lišejníků vysokohorských smrčín a bučin České republiky

Název anglicky

Chemical analyses of high mountain spruce and beech forests lichens in the Czech Republic with insufficient morphology

Cíle práce

- 1/ Pomocí metody TLC zjistit a určit sekundární metabolity vybraných rodů lišejníků a popsat problematiku identifikace látek metodou TLC
- 2/ Na základě výsledků chemických analýz (zjištěných sekundárních metabolitů) a případných morfologických znaků určit zkoumané druhy
- 3/ Porovnání zjištěných druhů smrčín a bučin
- 4/ Sepsat charakteristiku a ekologii určených druhů
- 5/ Vyhodnotit stupeň ohrožení zjištěných druhů v ČR

Metodika

- 1/ Soupis lokalit sběrů
- 2/ Popis metodiky výzkumu a záměrů projektu Fragmentace
- 3/ Metodika identifikace lišejníků pomocí bodových chemických testů
- 4/ Metodika Thin Layer Chromatography (TLC)
- 5/ Literární rešerše k tématu

Doporučený rozsah práce

40-60

Klíčová slova

chemická analýza TLC, epifytické lišejníky, Lepraria, Micarea

Doporučené zdroje informací

- Czarnota P. (2007): The lichen genus *Micarea* (Lecanorales, Ascomycota) in Poland. – W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków. 199 pp.
- Kocourková J. (2016): Metody sběru, preparace a herbářového zpracování lišejníků, mechorostů a hub a určovací metodika lišejníků 2016. – 48 pp., Ms. [Depon in: FŽP ČZU, katedra ekologie].
- Kubiak D., Kukwa M. (2011): Chromatografia cienkownikowa (TLC) w lichenologii. – In: Dynowska M. et Ejdys E. (eds): Mikologia laboratoryjna: przygotowanie materiału badawczego i diagnostyka. – Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn, 176–190.
- Liška J., Palice Z. (2010): Červený seznam lišejníků České republiky (verze 1.1). – Příroda, Praha 29: 3–66.
- Orange A., James P. W. & White F. J. (2010): Microchemical Methods for the Identification of Lichens. – British Lichen Society, London. 101 pp.
- Wirth V., Hauck M., Schultz M. (2013): Die Flechten Deutschlands, Band 1 & 2. – Eugen Ulmer KG, Stuttgart. 1244 pp.

Předběžný termín obhajoby

2016/17 LS – FŽP

Vedoucí práce

doc. RNDr. Jana Kocourková, CSc.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie

Elektronicky schváleno dne 9. 9. 2016

Ing. Jiří Vojar, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 6. 10. 2016

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 25. 04. 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Jany Kocourkové, CSc., a že jsem uvedla všechny literární prameny, ze kterých jsem čerpala.

V Praze, dne 24. 4. 2017

Podpis:

Poděkování

Mé poděkování patří především vedoucí této bakalářské práce doc. RNDr. Janě Kocourkové, za podporu, ochotu, trpělivost a předání nových vědomostí během zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat prof. dr hab. Martinu Kukwowi za pomoc při mém výzkumu v Polsku. Krátkodobá zahraniční mobilita, která proběhla v Gdańsku, byla financována Rektoriátem České zemědělské univerzity v Praze.

Abstrakt

Chemická analýza byla provedena na materiálu sbíraném vedoucím bakalářské práce během předchozího výzkumu financovaného z Norských fondů. Lišejníky – indikátory fragmentace pralesovitých lesních porostů ČR. Během výzkumu ve vysokohorských přirozených a kulturních smrčínách a přirozených a kulturních bučinách byly sebrány mnohé obtížně určitelné lišejníky s nepatrnou stélkou a nedostatkem morfologických znaků. Chemická analýza těchto lišejníků, identifikace jejich sekundárních metabolitů a následná identifikace druhů byla záměrem předkládané bakalářské práce. K analýze bylo dodáno 89 vzorků, z nichž se podařilo metodou TLC identifikovat 16 sekundárních metabolitů. Na základě analýz se podařilo identifikovat 67 vzorků, které reprezentují 17 druhů lišejníků. Problematika analýz a vzorky, které se nepodařily určit do druhu, jsou v práci diskutovány. Speciální pozornost byla věnována komplexu druhů *Micarea prasina* a *M. micrococca* a rodu *Lepraria*. 49 vzorků bylo určeno z bučin, 40 ze smrčín. Z určených druhů jsou nejvýznamnějšími nálezy *Trapelia corticola*, ohrožená v České republice a *Micarea soralifera* je druh nový pro Českou republiku.

Klíčová slova: chemická analýza TLC, epifytické lišejníky, *Lepraria*, *Micarea*

Abstract

Chemical analysis was performed on lichen material collected by the supervisor of this bachelor thesis during her previous research founded by Nordic Funds for the project on fragmentation of old growth beech forests and mountain spruce forests. During the research, minute corticolous lichens with demanding morphological features were collected. These lichens are impossible to identify to species with common microscopic methods. 89 samples were a goal for identification of secondary metabolites and identification to species in this bachelor thesis. From all analyzed samples 16 secondary metabolites were identified. Consequently 67 samples could be identified to species and they represented 17 species of lichens. Problematics of the identification of chemical secondary metabolites and the samples which were not possible to identify in species is discussed in the thesis. Special attention was given to complex of species *Micarea prasina* and *M. micrococca* and to *Lepraria* genus. 49 species were identified from beech forests, and 40 from spruce forests. The most important species are *Trapelia corticola* endangered in the Czech Republic and *Micarea soralifera* which is a new species for the Czech Republic.

Obsah

1.	Úvod	6
2.	Cíle práce	7
3.	Literární rešerše.....	8
3.1	Charakteristika vybraných rodů	8
3.2	Chemismus lišejníků	12
3.2.1	Primární metabolity	13
3.2.2	Sekundární metabolity.....	13
4.	Stručná charakteristika dílčího lichenologického projektu Fragmentace krajiny	15
5.	Charakteristika zájmových území.....	17
5.1	Jeseníky.....	18
5.2	Králický Sněžník	19
5.3	Beskydy.....	21
5.3.1	Mionší.....	21
5.3.2	Razula	22
5.3.3	Salajka	22
5.4	Diana.....	23
6.	Metodika	24
6.1	Bodové chemické testy (spot tests)	25
6.2	Metoda tenkovrstevné chromatografie (TLC).....	26
7.	Výsledky.....	34
7.1	Seznam určených sekundárních metabolitů	34
7.2	Soupis lokalit sběrů.....	34
7.3	Seznam určených druhů.....	36
7.4	Komentáře k vybraným druhům	39
8.	Diskuse.....	46
9.	Závěr	48
10.	Použitá literatura.....	50

1. Úvod

Biodiverzita epifytických lišejníků představuje v lesních ekosystémech významnou složku celkové biodiverzity. Znečištěné ovzduší, fragmentace habitatu, lesní management, konkrétně těžba, mají negativní vliv na biodiverzitu epifytů. V přirozených lesních porostech se vyskytují stromy všech věkových skupin od semenáčků až po stromy vysokého stáří a ležící dřevo různého stádia rozkladu, porosty jsou prosvětlené, nabízejí více typů substrátu a je v nich zachována kontinuita. Na základě těchto vlastností se v nich předpokládá vyšší biodiverzita než v lesích ovlivněných člověkem (Kocourková & Vondrák 2017).

V současnosti je v České republice lesních porostů nedotčených člověkem velmi málo. K nejzachovalejšíma nejznámějším pralesovitým porostům se řadí Boubínský prales na Šumavě a Žofínský prales v Novohradských horách. Málo známé zachovalé přirozené porosty, nesprávně nazývané pralesovité, jsou Mionší, Razula a Salajka v Beskydech a Diana v Českém lese. Do těchto porostů v minulosti zasahoval člověk, proto se nejedná o pralesovité porosty.

Podle substrátu se lišejníky dělí na terikolní (na zemi), saxikolní (na skalách, na kameni), epifytické – lignikolní (na tlejícím dřevu) a kortikolní (na kůře dřevin). Biodiverzita lesních porostů se nejlépe odráží na biodiverzitě epifytických druhů.

Existují lišejníky, k jejichž determinaci jsou morfologické znaky nedostačující. Proto je zjišťován jejich chemismus – sekundární metabolity – pomocí mikrochemických metod. Mezi běžně používanými metodami patří bodové chemické testy, mikrokrytalizace, tenkovrstevná chromatografie (TLC) nebo náročnější metody hmotnostní spektrometrie, NMR (nukleární magnetická resonance) spektroskopie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Lišejníky jsou svými sekundárními metabolity jedinečné a díky této vlastnosti je většinou lze určit do druhu. Občas existují i lišejníky se stejnými metabolity a podobnou morfologií stélky. Tyto se pak zkoumají molekulárními metodami.

2. Cíle práce

Cílem bakalářské práce byla identifikace sekundárních metabolitů vybraných obtížně určitelných lišejníků horských oblastí pomocí metody tenkovrstevné chromatografie neboli TLC (Thin-Layer Chromatography). Na základě zjištěných metabolitů v kombinaci s morfologickými a mikroskopickými znaky bylo snahou dané lišejníky určit do druhu. Hlavní náplní experimentální části práce byla metoda TLC, která je detailněji popsána v kapitole metodika. Zároveň je v práci rozebrána problematika sekundárních metabolitů, která je doplněna o několik nových poznatků.

Chemická analýza lišejníků navazuje na dílčí lichenologický projekt Aktivita 11 "Lišejníky – indikátory fragmentace pralesovitých lesních porostů České republiky", v rámci projektu Zmírnění důsledků fragmentace biotopů v různých typech krajiny České republiky financovaného z Norských Fondů. Během výzkumu Aktivity 11 byly druhy nasbírány vedoucí práce doc. RNDr. Janou Kocourkovou, CSc. Vybrané druhy byly nasbírány ve vysokohorských smrčínách a bučinách. V každé zájmové lokalitě byly sbírány z přirozené a kulturní smrčiny a z přirozené a kulturní bučiny. Mnou zkoumané druhy lišejníků ze smrčín pocházejí ze zvláště chráněných území Jeseníků a Králického Sněžníku a druhy z bučin z Beskyd a Českého lesa. Na základě zjištěných druhů bylo snahou popsat rozdíly mezi vyskytujícími se druhy ve smrčínách a bučinách a rovněž tak v přirozených a antropogenně ovlivněných lesních porostech.

Chemická analýza bude provedena u epifytických druhů s homeomerickou stélkou, tedy takovou kde není na průřezu zřetelně rozlišena vrstva buněk mykobionta a fotobionta. Většina vybraných druhů spadá do rodu *Lepraria* a *Micarea*. U lišejníků, které se podařilo identifikovat do druhu, bylo cílem sepsat jejich charakteristiku a ekologii. Dalším cílem práce bylo vyhodnotit stupeň ohrožení zjištěných druhů lišejníků na základě Červeného seznamu druhů České republiky (Liška & Palice 2010).

3. Literární rešerše

3.1 Charakteristika vybraných rodů

***Lepraria* Ach. (Lecanorales, Stereocaulaceae)**

Tento rod patří mezi široce rozšířené, vegetativně se rozmnožující lišejníky (Slavíková & Fehrer 2007), u kterých nikdy nebyly nalezeny vřecka ani konidie (Kukwa 2002). Je charakterizován práškovitou stélkou produkující velké spektrum sekundárních metabolitů, díky kterým jsou vymezeny druhy tohoto rodu (Slavíková & Fehrer 2007). Stélka obsahuje soredie bez kůry – granule, pod nimiž je nedokonale diferenciovaná dřeňová vrstva (Smith et al. 2009). Podle Lendemera jsou základními jednotkami stélky jen granule nikoliv soredie. Granule rodu *Lepraria* a soredie jiných rodů si strukturou mohou být podobné, ale navzájem se ontogeneticky liší. Soredie lišejníků vznikají z primárních jednotek (např. z areol), zatímco u rodu *Lepraria* jsou primárními jednotkami granule (Lendemer 2010).

Rodem *Lepraria* a celkově sterilními lišejníky s leprosní stélkou se první zabýval Auguste-Marie Hue, který publikoval monografii této skupiny, ve které popsal více než 100 druhů (Lendemer 2011 ex. Hue 1924). Na tuto práci navázal Laundon (Lendemer 2011 ex. Laundon 1992), který první hodnotil druhy na základě chemotaxonomie i morfologických znaků. Laundonových poznatků využil americký lichenolog James Lendemer, který se v posledních letech zabýval taxonomií rodu *Lepraria* amerických druhů. Podle něho se taxonomie tohoto rodu může stále měnit, a to z několika důvodů. Jedním z nich je nedostatek spolehlivých morfologických znaků, podle kterých by se daly odlišit taxony. Z tohoto důvodu se taxonomové pracující na tomto rodu spoléhali především na sekundární metabolity (např. Ekman & Tønsberg 2002, Tretiach et al. 2009). To vedlo Lendemera k vyvinutí morfologického systému rodu *Lepraria* včetně terminologie. Lendemer rozlišuje primární, sekundární a terciární strukturu stélky, které jsou níže popsány (Obr.1) (Lendemer 2011).

Primární struktura

Nejmenší identifikovatelnou jednotkou stélky leprarií jsou hyfy. Měří v průměru 3–5 μm a větví se jednostranně. Hyfy se dělí na prothalové a stélkové. Ačkoliv jsou morfologicky identické, tak tvoří dvě rozdílné skupiny sekundárních

struktur. Prothalové hyfy vytváří nelichenizované sekundární struktury (prothallus, hypothallus a rhizohyfy). Stélkové hyfy formují lichenizované sekundární struktury (granule), které v sobě nesou fotobiontové buňky.

Sekundární struktura

Součástí sekundární jsou základními jednotkami stélky, přestože nejsou nejmenšími jednotkami.

Jedinými lichenizovanými částmi jsou granule, které mají sférický neboli kulovitý tvar velikosti 20–50 μm . Granule představují jediné místo, kde probíhá lichenizace a kde díky diasporám vznikají stélky nové.

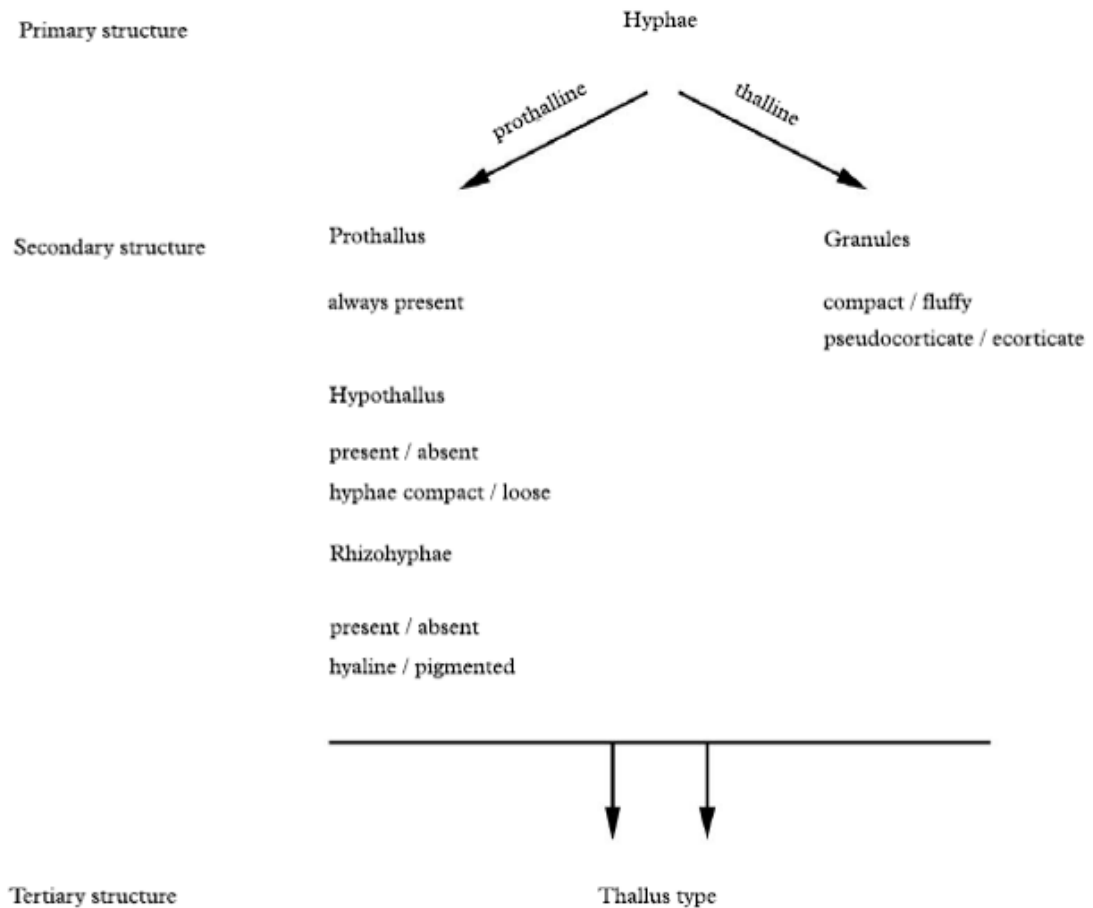
Nelichenizované struktury tvoří síť hyf, která slouží jako opora granulí ve stélce. První produkovanou nelichenizovanou sekundární částí je prothallus, který se nachází u všech leprarií alespoň zpočátku. Je složen z jedné nebo více hyf, které vyčnívají z granulí a připojují se k substrátu a k prothallům jiných granulí.

Hypothallus je další nelichenizovanou částí a je definován jako síť houbových hyf, do kterých jsou u druhů s tlustou stélkou vnořeny granule. Ne všechny typy stélek tvoří hypothallus. Někteří lichenologové u tohoto rodu nesprávně používají termín dřevná vrstva. Od tohoto termínu by mělo být upuštěno. Používání tohoto termínu je v rozporu s definicí dřevné vrstvy jako vrstvy houbových hyf pod kůrou a vrstvy řas (Kirk et al. 2001). Stélka leprarií není korovitá a neobsahuje řasovou vrstvu (není heteromerická), proto nemůže mít dřevnou vrstvu. Užívání termínu hypothallus je z tohoto důvodu vhodnější (Lendemer 2011).

Rhizohyfy jsou poslední nelichenizovanou sekundární strukturou. Z hypothallu směřují směrem k substrátu, do kterého zakotvují stélku. Rhizohyfy jsou přítomny pouze u druhů se ztlustělou stélkou a dobře vyvinutým hypothallem (Lendemer 2011).

Terciární struktura

Lendemer zde pohlíží na stélku jako na celek, kterou dělí na dva typy podle toho, zda je v ní hypothallus přítomen nebo nikoli. Druhy, které postrádají hypothallus mají nesouvislou stélku obsahující granule, které se shlukují do kupek. Tato stélka se nazývá agregovaná a má dva podtypy, *caesioalba*-typ a *caesiella*-typ. Pro druhý typ stélky je typická souvislá stélka s vnořenými granulemi do sítě hyf. Jedná se o plakodiodní stélku, která má 4 podtypy, *cryophila*-typ, *finkii*-typ, *normandinoides*-typ a *xerophila*-typ (Lendemer 2011).



Obr. 1: Hierarchie morfologické terminologie (Lendemer 2011).

V minulosti byl rod *Lepraria* považován za polyfyletickou skupinu (Poelt 1987, v Bayerové 2005), ale Ekman a Tønberg (2002) dospěli k závěru, že většina druhů tvoří monofyletickou skupinu. V současnosti se na tento rod opět pohlíží jako na polyfyletickou skupinu (Lendemer 2013).

***Micarea* Fr. (Ascomycota, Pilocarpaceae)**

V roce 1825 rod *Micarea* poprvé popsal Elias Magnus Fries (Czarnota ex. Fries 1825). Na konci 19. století stanovil Hedlund morfologické znaky, které byly určující pro tento rod. Hedlundův koncept nebyl několik let přijat a druhy byly přesunuty do jiných rodů. Až od 60. let 20. století byl koncept Hedlunda opět přijat. Tehdy bylo od některých Hedlundových znaků upuštěno a rod *Micarea* byl doplněn o více druhů. Roku 1983 popsal Coppins nové druhy a rod obsahoval 45 evropských druhů (Coppins 1983). Na začátku 21. století bylo známo přibližně 100 druhů, z čehož 60 druhů bylo evropských (Czarnota 2007). Od té doby počet nových druhů stoupá v Evropě, ale i jinde ve světě (např. Réunion, Indický oceán) (Brand et

al. 2014), především díky molekulárním metodám (Czarnota & Guzów-Krzemińska 2010, van den Boom & Ertz 2014, Guzow-Krzemińska et al. 2016, van den Boom et al. 2017). Mezi v poslední době nově popsané druhy z Evropy patří *Micarea usneae* van den Boom & Ertz (van den Boom & Ertz 2014), *Micarea soralifera* Guzow-Krzemińska, Czarnota, Łubek & Kukwa (Guzow-Krzemińska et al. 2016), *Micarea herbarum* Brand, Coppins, Sérus. & van den Boom a *Micarea meridionalis* van den Boom, Brand, Coppins & Sérus. (van den Boom et al. 2017).

Morfologií a chemismem tohoto rodu se zabýval Coppins (1983), který vymezil rod následujícími znaky, zahrnující druhy s korovitou stélkou, „mikareoidním“ fotobiontem, konvexními apothecii bez okraje s chudě vyvinutým excipulem, vřecky s apikální válcovitou strukturou umožňující uvolnění spór z vřecka, bezbarvými, jednoduchými až příčně septovanými askosporami bez perisporu, zanořenými, přisedlými nebo stopkatými pyknidami a velkým množstvím typů konidií. Rod také zahrnuje taxony s malými askosporami kapkovitého tvaru, jednoduše nebo řídce větvenými parafýzami a několika typy „nemikareodiních“ fotobiontů (Andersen & Ekman 2005 ex. Eriksson et al. 2003). Na základě jejich a pozdějších molekulárních výzkumů byla řada těchto taxonů přeřazena do čeledi Pilocarpaceae, pro skupinu *Micarea sylvicola*, která byla zjištěna, že patří do čeledi Psoraceae, byl popsán nový rod *Brianaria* S. Ekman & M. Svensson (Ekman & Svensson 2014).

Rod *Micarea* se vyznačuje několika morfologickými typy stélek. U terikolních druhů, druhů rostoucích na hrubé borce a větvičkách stromů je stélka tvořena více či méně konvexními areoly. Ztluštělá, lupenitá a zrníčkovitá stélka je obvykle pozorována u saxikolních druhů, obzvláště u druhů skupiny *Micarea sylvicola* (Flot.) Vězda & Wirth. Výjimku tvoří saxikolní druh *Micarea myriocarpa* V. Wirth & Vězda ex Coppins, která má tenkou a moučnou stélku. Velmi tenká endofloedická až povrchová (epifloedická) stélka je typická pro druhy vyskytující se na tlejícím měkkém dřevě. U několika druhů je stélka variabilní, záleží na druhu stanoviště, expozici světla, vlhkosti a kompetičních schopnostech příslušného taxonu. Tyto faktory způsobují komplikace při určování druhů, které se například vyskytují na osluněných místech, ale i ve stinných lesích. Většina druhů tvoří malá 0,1–0,5 mm široká, konvexní až kulovitá, tmavě pigmentovaná apothecia bez okrajů. Barva apothecií je velmi různorodá i v rámci jednoho druhu (Czarnota 2007).

V rodu *Micarea* se rozlišuje osm typů pigmentů nacházejících se uvnitř apothecií, které pomáhají určit druh. Jejich barva se mění po použití různých reakčních činidel (Coppins 1983). Jmenovitě se jedná o *Aucertina*-yellow,

Cinereorufa-green, *Elachista*-brown, *Intrusa*-yellow, *Melaena*-red, *Melaenida*-red, *Sedifolia*-grey a *Superba*-brown pigment (Czarnota 2007).

Fotobionti lišejníků byly zatím zkoumány a zjištěny pouze u 3% lišejníků, u zbývajících 97% jsou druhy fotobiontů stále neznámé. Podle Coppinse (Coppins 1983) byly u 45 druhů rodu *Micarea* zaznamenány tři typy fotobiontů-řas: „mikareoidní“, „protokokoidní“ a „chlorokokoidní“. Mikareoidní řasy jsou na rozdíl od ostatních typů řas malé buňky. Podle molekulárních metod a morfologických znaků patří do čeledi *Trebouxiaceae*. Převážná část druhů skupiny *Micarea prasina* obsahuje řasy rodu *Coccomyxa* (včetně *Pseudococcomyxa*) a *Elliptochloris* (Yahr 2015). Wirth uvádí i *Pseudochlorella*, *Interfilum* a *Neocystis* (Wirth et al. 2013).

Od všech rodů se rod *Micarea* především liší vyšším počtem různých typů konidií. Vznikají v pyknidách, jen vzácně na sporodochiích (*Micarea adnata*). Podle typu konidiogeneze a velikosti jsou nazývány makrokonidie, mezokonidie a mikrokonidie (Coppins 1983, Czarnota 2007).

3.2 Chemismus lišejníků

Koncept chemismu lišejníků spočívá v chemické i biologické stránce sloučenin, syntetizovaných lišejníky (Culberson 2001). Výsledkem syntézy jsou produkty látkové výměny – metabolity. U lišejníků se rozlišují metabolity primární a sekundární (Ranković 2015 ex Lawrey 1986).

Chemismus lišejníků má v životě lišejníků obrovský význam a plní řadu funkcí. Produkci specifických látek se lišejníky chrání před napadením mikroorganismy nebo působí alelopaticky proti cévnatým rostlinám (Culberson 2001). Nedávno bylo zjištěno, že sekundární látky hrají významnou roli mezi lišejníkem a vysoce specifickými houbovými parazity (Merinero 2015). Mezi další funkce, které sekundární metabolity plní, patří ochrana proti intenzivnímu UV záření nebo regulace množství vody ve dřevní stélce. V neposlední řadě jsou sekundární metabolity odpovědné za přežití lišejníků v extrémních podmínkách, ať už při velmi nízkých či velmi vysokých teplotách nebo v suchém či vlhkém prostředí (Huneck et Yoshimura 1996). Sekundární metabolity jsou z velké části zodpovědné za schopnost lišejníků adaptovat se na rozmanitou škálu nepříznivých podmínek. (Culberson 2001).

3.2.1 Primární metabolity

Primární, vnitrobuněčné metabolity zahrnují bílkoviny, aminokyseliny, sacharidy, karotenoidy, polysacharidy a vitamíny. Tyto látky jsou rozpustné ve vodě a dají se snadno izolovat vroucí vodou (Ranković 2015).

Některé z těchto metabolitů jsou produkovány houbou a jiné zase řasou (Hale 1983). Primární metabolity se nevyskytují pouze v lišejnících, ale objevují se i v houbách, řasách či cévnatých rostlinách a jsou to tedy látky druhově nespecifické (Jarkovský 1978, Ranković 2015).

Mezi produkty obou symbiontů, houby a řasy, patří výše zmíněné karotenoidy a polysacharidy. Karotenoidy mohou tvořit 1,5–24 mg/g váhy stélky a polysacharidy 3–5% váhy stélky (Culberson 1970). Vitamíny jsou produkovány především řasou, u hub je vyprodukované množství vitamínů téměř nezatelné. Mezi vitamíny nacházející se v lišejnících se řadí kyselina askorbová, biotin, α -tokopherol, kyselina nikotinová, kyselina pantotenová, riboflavin, thiamin a kyselina listová (Hale 1974).

3.2.2 Sekundární metabolity

V lišejnících se většina organických sloučenin nepolymerního charakteru nachází v podobě sekundárních metabolitů produkováných mykobiontem (Elix & Stocker-Worgotter 2008). Jsou uloženy v různé podobě v různých částech stélky. Většina z nich obaluje povrch houbových vláken, ale vyskytují se také jako krystaly, malé granule, kapénky a pigmenty v korové nebo především v dřevné vrstvě stélky (Malíček 2012). Tyto produkty jsou ve vodě nerozpustné, proto se extrahují organickými rozpouštědly (Elix & Stocker-Worgotter 2008). Zdá se, že sekundární metabolity jsou, co se týče koncentrace, velmi stabilní. U starých herbářových položek nebyl zaznamenán významný pokles koncentrace těchto látek (Rundel 1978).

V dnešní době je popsáno přibližně 850 druhů sekundárních metabolitů, které jsou sepsány v katalogu chromatografických dat Johna A. Elix (Elix 2014), ale jejich skutečný počet může být vyšší. Většina jich je pro lišejníky jedinečná, ale v malém množství se nacházejí i v nelichenizovaných houbách nebo cévnatých rostlinách. Jako příklad lze uvést parietin, který se vyskytuje v houbách (např.

Achaetomium, Alternaria, Aspergillus, Dermocybe, atd.), ale stejně tak i v cévnatých rostlinách (např. *Rheum, Rumex* a *Ventilago*) (Elix & Stocker-Worgotter 2008).

Sekundární metabolity nejsou zcela nezbytné pro růst a přežití lišejníků (Ranković 2015 ex Bentley 1999), ale jsou důležité z hlediska ochrany stélky před herbivory, patogeny, kompetitory a vnějšími abiotickými faktory. Syntéza těchto látek je ovlivňována viditelným světlem, UV zářením, nadmořskou výškou, kolísáním teploty a sezónností (Ranković 2015). Sekundární metabolity specificky inhibují absorpci těžkých kovů, které jsou přítomny v toxických koncentracích, zatímco kovy s nižší než toxickou koncentrací mohou být volně absorbovány (Hauck 2008).

U lišejníků s homeomerickou stélkou, hrají sekundární metabolity klíčovou roli v jejich taxonomickém zařazení (Slavíková-Bayerová & Orange 2006).

3.2.2.1 Klasifikace sekundárních metabolitů

Sekundární metabolity lišejníků jsou odvozeny od tří biosyntetických cest: metabolická cesta acetát-polymalonátu, kyseliny mevalonové a kyseliny šikimové (Obr. 2) (Ranković 2015).

Metabolická cesta acetát-polymalonátu

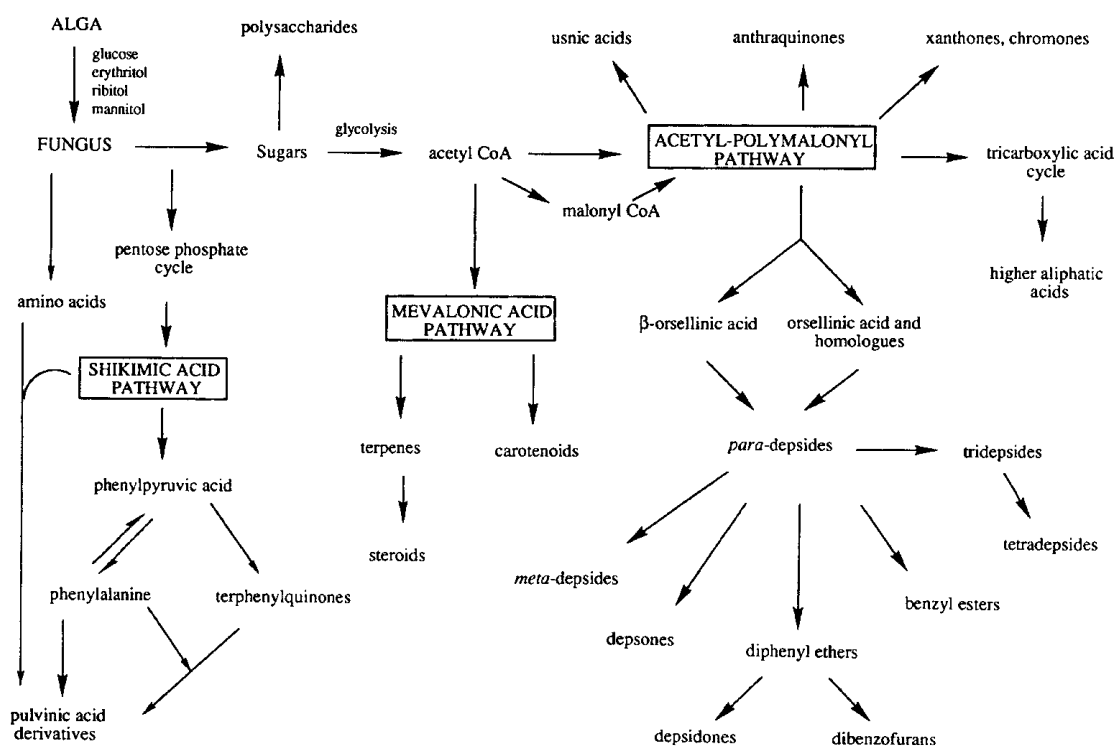
Tato cesta zahrnuje nejrozšířenější sekundární metabolity, jako jsou alifatické kyseliny, depsidy, depsidony, depsony, dibenzofurany, kyselina usnová, antrachinony, chromony, naftochinony a xanthyony (Ranković 2015).

Metabolická cesta kyseliny šikimové

Mezi deriváty kyseliny šikimové se řadí kyselina pulvinová, její deriváty a terfenylchinony, které patří mezi pigmenty (Culberson 1970). Ze skupiny terfenylchinonů jsou známy pouze dva, polyporová a teleforová kyselina. Deriváty kyseliny purinové jsou početnější skupinou zahrnující kalycin, epanorin, kyselinu leprarovou, pinastrovou, vulpinovou, rhizokarpovou, pulvinovou, pulvinový dilakton, methyl ether kyseliny lepariové a stiktaurin (Ranković 2015).

Metabolická cesta kyseliny mevalonové

Tato cesta syntetizuje triterpeny, diterpeny, karoteny a steroidy. Deriváty triirepenů jsou např. zeorin a leukotilin (Culberson 1970).



Obr. 2: Biochemické cesty sekundárních metabolitů (Nash 2008)

4. Stručná charakteristika dílčího lichenologického projektu Fragmentace krajiny

Celý název projektu je Zmírnění důsledků fragmentace biotopů v různých typech krajiny České republiky, který byl financován Norskými Fondy. Projekt probíhal od začátku ledna roku 2015 a byl ukončen nejprve na konci dubna 2016 a prodloužen do konce roku. Žadatelem byla Česká zemědělská univerzita v Praze. Aktivita 11 byla zaměřena na lichenologický výzkum, s názvem Lišejníky – indikátory fragmentace pralesovitých lesních porostů ČR. Popis dílčího projektu byl zpracován na základě závěrečné zprávy Aktivity 11 doc. RNDr. Jany Kocourkové, CSc. a kolektivu (Kocourková & Vondrák 2017).

Tento dílčí projekt měl za cíl posouzení stávajícího stavu pralesovitých fragmentů České republiky. K posouzení stavu bylo zapotřebí provést inventarizační průzkum biodiverzity epifytických lišejníků ve fragmentech přirozených horských

smrčín a bučín, které byly porovnány se smrkovými kulturami a lesy vyvíjejícími se k bukovým pralesům. Na základě zjištěné druhové diverzity bylo snahou vytipování lišejníkových indikátorů pralesovitých ekosystémů a zjištění vymizelých druhů a stavu populací ohrožených druhů. Mezi další cíle patřilo vyhodnocení rizik pokračující fragmentace, návrh postupů a managementových opatření vedoucích k zabránění jejího procesu. Opatření by také měla sloužit k udržení přirozených společenstev lišejníků a jejich přirozených biotopů.

Všechna opatření, výzkum, vývoj a stav fragmentace cenných biotopů by se měly dostat do povědomí státní nebo veřejné správy a oslovit širší veřejnost. Proto byl o tomto projektu natočen krátký dokument a bude publikován článek v časopise Živa.

Sběr dat

Sběr dat v terénu byl prováděn metodou průzkumu biodiverzity soutěžících lichenologů (Vondrák & Malíček 2016). Průzkum lokalit byl prováděn 3–4 členným týmem výzkumníků. Tato metoda je založena na principu kompetice, kdy se každý z výzkumníků snaží zaznamenat maximální počet druhů na zkoumané ploše. Pro inventarizaci biodiverzity druhů je nejvhodnější provést metodu kompetice, i když je časově, finančně i logisticky poměrně náročná.

Následně bylo zapotřebí vybrat reprezentativní čtverce. Jedná se o čtverce o ploše 1 ha, které se umísťují do lokálních „hot-spotů“. Lokální hot-spoty jsou místa, ve kterých se předpokládá nejvyšší diverzita lišejníků. Plochy by se tedy měly vybírat na místech s širokým rozpětím světelných i vlhkostních podmínek, s různými druhy dřevin, pokud možno různě věkově starých. Je žádoucí zároveň vybrat místa s přítomností ležících, mrtvých či čerstvě spadlých stromů. Výhodou této metody je nízký počet ploch, který je pro porovnání lokalit dostačující. Plochy tedy nebyly vybírány náhodně, musel by být zkoumán větší počet ploch na lokalitě, což by snížilo kvalitu výzkumu.

Lokality

V rámci projektu bylo v horských oblastech prozkoumáno celkem 40 ploch, 10 přirozených smrčín, 10 kulturních smrčín, 10 přirozených bučín a 10 kulturních bučín. Tato bakalářská práce se zabývala výzkumem lišejníků pouze ze 4 přirozených smrčín, 4 kulturních smrčín, 4 přirozených bučín a 4 kulturních bučín. Vždy byl prozkoumáván pár ploch, přirozená-kulturní. Páry se vybíraly podle nejnižší možné vzájemné vzdálenosti, podobné geomorfologie, nadmořské výšky, sklonu a orientace svahu.

Epifytické lišejníky, které byly později chemicky analyzovány, pocházejí ze čtyř lokalit. Ze smrčin se jedná o lokalitu Hrubého Jeseníku – Bílá Opava 1, Bílá Opava 2, Eustaška a o lokalitu Králického Sněžníku. Z bučin to jsou Moravskoslezské Beskydy – Razula, Salajka, Mionší a Český les – Diana. Dalšími studovanými lokalitami v rámci projektu Fragmentace byly Krkonoše, Šumava a Novohradské hory. Všechny lokality, na kterých byl prováděn výzkum, spadají do zvláště chráněných území České republiky.

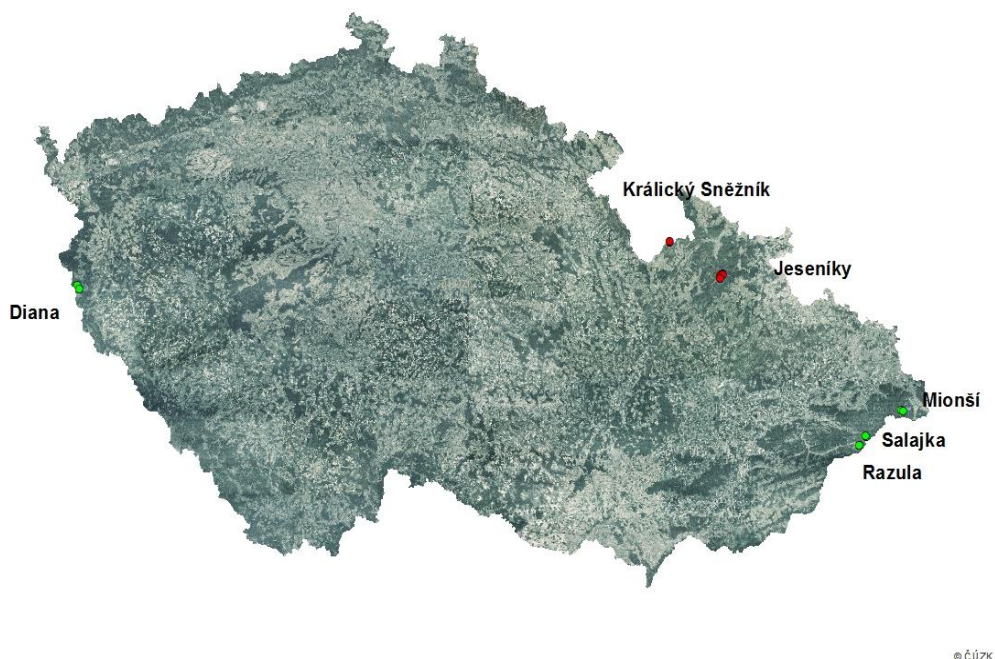
Lokality byly vytipovány členy týmu na základě dosavadních lichenologických údajů a znalostí lokalit horských lesních biotopů. K vytipování lokalit zároveň pomohly výsledky z mapování biotopů soustavy Natura 2000 poskytnuté Agenturou ochrany přírody a krajiny ČR. Podle poskytnutých údajů nebyly do výzkumu některé oblasti zahrnuty. Jedná se o oblasti s malými pralesovitými fragmenty nebo o oblasti druhově chudé. Dalším důvodem byly omezené finanční prostředky.

Sběr materiálu

Materiál určený k chemické analýze byl sbírán pomocí nože nebo dláta a kladiva. Posléze byl v potřebném množství vložen do papírových sáčků, které byly popsány terénními údaji. Než mohly být chemické analýzy druhů provedeny, musel být nasbíraný materiál vysušen a vymražen po dobu alespoň 10 dní při teplotě $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Identifikované druhy byly zpoložkovány, zapsány do databáze a uloženy do institucionálního herbáře nebo herbáře badatele. Sběry pro chemickou analýzu materiálu byly provedeny doc. RNDr. Janou Kocourkovou, CSc.

5. Charakteristika zájmových území

Výzkum probíhal ve více zájmových územích. Všechna zájmová území se řadí k zvláště chráněným územím. Mezi zájmová území patří Jeseníky a Králický Sněžník se smrkovými porosty a Beskydy a Diana s bučinami (Obr. 1). K některým lokalitám v zájmových územích nejsou doloženy žádné historické údaje. Pokud údaje byly zjištěny, jsou uvedeny v závěru textu k charakteristice území.



Obr. 3: Lokalizace zájmových území, ● smrčiny , ● bučiny (vytvořeno v ArcGis 10.4, zdroj mapy: ČÚZK)

5.1 Jeseníky

Zájmové plochy Bílá Opava a Eustaška se nacházejí v centrální části Hrubého Jeseníku v Národní přírodní rezervaci Praděd, která se překrývá s Chráněnou krajinnou oblastí Jeseníky. V roce 1963 byla tato území vyhlášena Státní přírodní rezervací Bílá Opava, která dnes spadá pod NPR Praděd. Důvodem vyhlášení SPR Bílá Opava byla ochrana jedné z nejzachovalejších přirozených horských smrkových lesů České republiky (Správa CHKO Jeseníky 2016). Nadmořská výška výzkumných ploch se pohybuje v rozmezí 1080–1290 m n. m. Studijní plocha Bílá Opava leží na jihovýchodní straně hory Praděd (1491 m n. m.) a plocha Eustaška leží východní straně pod vrcholem Vysoká hole (1464 m n. m.).

Z hlediska geomorfologického členění se zájmová oblast nachází v geomorfologickém celku Hrubého Jeseníku. Ten je součástí Jesenické oblasti spadající do Krkonoško-jesenické subprovincie, která náleží do provincie Česká vysočina (Boháč & Kolář 1996).

V horninovém podloží Hrubého Jeseníku převládají krystalinické horniny, devonské vápence nebo výjimečně se objevující bazaltické vložky. Keprnickou část

pohoří tvoří především ortoruly, ruly a svorové ruly. Zájmové území je součástí desenské klenby (Pradědská pahorkatina), kterou budují zejména jádrové migmatity, ruly, břidlice, svory, kvarcity a fylity (Čihař 2002).

Téměř 70% území pokrývá podzol modální, který je zde nejrozšířenějším půdním typem (Správa CHKO Jeseníky 2016).

Dle klimatického členění Quitta náleží zájmová lokalita k chladným oblastem CH4. Tato oblast se vyznačuje velmi krátkým, chladným a vlhkým létem, velmi dlouhým přechodným obdobím s chladným jarem a mírně chladným podzimem. Zima je velmi dlouhá, velmi chladná, vlhká s velmi dlouhým trváním sněhové pokrývky (Správa CHKO Jeseníky 2016 ex. Quitt 1992). Na hřebenech leží sněhová pokrývky obvykle od října do dubna nebo května (Čihař 2002). Roční úhrny srážek se pohybují přibližně kolem 1200 mm a průměrná roční teplota činí 4 °C (Tolasz et al. 2007).

Výzkumnými plochami Bílá Opava protéká stejnojmenná horská bystřina, která se pod Pradědem stéká se Střední a poté ještě s Černou Opavou (Čihař 2002). Dolní úsek toku Bílé Opavy byl v minulosti využíván k plavení dřeva, které v současnosti nezanechalo viditelné stopy (Správa CHKO Jeseníky 2016).

V NPR Praděd byly zájmové plochy Bílá Opava a Eustaška vybrány záměrně. Pouze zde se nacházejí klimaxové smrčiny pralesovitého charakteru s unikátními zbytky porostů smrku horského ekotypu. Pro tento smrk je charakteristická úzká až k zemi zavětvená kuželovitá koruna se skloněnými větvemi. Kromě smrku ztepilého (*Picea abies*) jsou zde příměsi jeřábu ptačího pravého (*Sorbus aucuparia* subsp. *aucuparia*), buk lesní (*Fagus sylvatica*) a javor klen (*Acer pseudoplatanus*) (Správa CHKO Jeseníky 2016).

Zkoumané plochy náleží do biotopu Horské třtinové smrčiny L9.1 a Horské papratkové smrčiny L9.3. Uplatňují se zde především třtina chloupkatá (*Calamagrostis villosa*), papratka horská (*Athyrium distentifolium*) a havez česnáčková (*Adenostylum alliariae*) (Härtel et al. 2009, Chytrý et al. 2001, Míček 2002).

5.2 Králický Sněžník

V této lokalitě je pouze jedna zájmová plocha, která se nachází v Národní přírodní rezervaci Králický Sněžník a je součástí stejnojmenného pohoří. NPR

Králický Sněžník byla zřízena v roce 1992 a leží v severovýchodní části Pardubického kraje a v severozápadní části Olomouckého kraje. Plocha se rozprostírá na jihovýchodní straně hory Králický Sněžník (1423, 7 m n. m.).

Pohoří zájmové lokality Králický Sněžník geomorfologicky spadá do Jesenické oblasti, která je součástí Krkonošsko-jesenické (Sudetské) subprovincie (Demek & Mackovčín 2006). Jedná se o kerné pohoří, které je vyzdviženo podél nápadných zlomů (Správa CHKO Jeseníky 2014).

Geologicky oblast patří k orlicko-kladskému krystaliniku, které je součástí lužické oblasti Českého masivu (Mísař 1983).

Území Králického Sněžníku je svojí stavbou z geologického hlediska složité. Stýkají se zde dvě skupiny, sněžnická a horninově pestrá stroňská skupina. Ve stroňské skupině převažují ruly a svory, místy se zde objevují vložky krystalických vápenců, dolomitů (mramorů), amfibolitů, amfibolických břidlic, kvarcitů a kvarcitických břidlic, grafitických kvarcitů a svorů, porfyroidů a leptynitů. Ke sněžnické skupině se řadí ortoruly a migmatity, které tvoří západní a východní hřbet pohoří a samotný vrchol Králického Sněžníku (Gawlikowska & Opletal 1997).

Studijní plocha leží dle klimatického členění Quitta v oblasti CH6. Tato oblast je typická velmi krátkým až krátkým létem, mírně chladným, vlhkým až velmi chladným létem a velmi dlouhou, mírně chladnou, vlhkou zimou s dlouhým trváním sněhové pokrývky (Správa CHKO Jeseníky 2014 ex. Quitt 1992). Pohoří patří v České republice k srážkově nejbohatším územím, vyskytují se však značné lokální rozdíly. Průměrná roční teplota se pohybuje kolem 4°C (1,7–5,1°C) a průměrný úhrn srážek okolo 1150 mm (Správa CHKO Jeseníky 2014).

Zájmové území spadá do smrkového vegetačního stupně, který je zastoupen podzoly jakožto půdním typem (Správa CHKO Jeseníky 2014).

Z hlediska vegetace jsou ve studijní oblasti vyvinuty klimaxové a podmáčené smrčiny *Piceion excelsae*, jejichž převažujícím typem je třtinová smrčina *Callamagrostio villosae-Piceetum* (Neuhäuslová et al. 1998).

Lokalitě Králický Sněžník se věnoval Halda, který ve své práci (Halda 2008 a, b) shrnul historii výzkumu lišejníků této lokality. Zároveň v lokalitě zaznamenal množství vzácných druhů (2006, 2008 a). Halda rovněž sepsal stručný přehled výzkumu lišejníků pro lokalitu Hrubý Jeseník (Halda 2009). Vzácné druhy lokalit Králický Sněžník a Hrubého Jeseníku byly sepsány v práci Jiřího Malíčka (Malíček 2014), které sepsal na základě výzkumu z let 2011 a 2012.

5.3 Beskydy

Chráněná krajinná oblast Beskydy, která byla vyhlášena v roce 1973, zahrnuje tři zájmové plochy - Mionší, Razula a Salajka. CHKO Beskydy se rozkládá v Moravskoslezském a Zlínském kraji a zaujímá téměř celé území Moravskoslezských Beskyd, část Vsetínských vrchů a Javorníků.

5.3.1 Mionší

Národní přírodní rezervace Mionší se nachází ve východní části Moravskoslezských Beskyd, přibližně 1 km východně od obce Horní Lomná a 4 km jihozápadně od obce Dolní Lomná. NPR Mionší byla vyhlášena v roce 1954 s celkovou výměrou 169,70 ha. Rezervace se může pyšnit největším fragmentem přirozených jedlobukových porostů s klenem a smrkem v České republice, který patří mezi hlavní předmět ochrany. Do budoucna je cílem péče o NPR ponechání lesního společenstva samovolnému vývoji s maximální dosažitelnou eliminací vlivů člověka (Adam et al. 2007). Zájmová plocha se vyskytuje v centrální části rezervace.

Oblast je tvořena flyšovým souvrstvím jílovců, pískovců a slepenců převážně godulského a istebňanského souvrství (Demek & Mackovčín 2006). Jílovité břidlice se vkládají mezi godulskou a istebňanskou vrstvu (Adam et al. 2007).

Území pokrývají kyselé až silně kyselé hnědé půdy (Tomášek 2000). Jsou zde rozšířeny kambizemě, většinou silně skeletnaté, na jejichž povrchu je většinou velký podíl štěrkovité frakce (Horsák et al. 2006).

Rezervace spadá do chladné klimatické oblasti CH7 (Adam et al. 2007 ex. Quitt 1974).

Z dřevin zde dominují *Fagus sylvatica*, *Abies alba* a *Acer pseudoplatanus*. Jako lesní typ zde převládá *Abieto-fagetum* asociace *Dentario glandulosae-Fagetum*, jejíž bylinné patro tvoří kyčelnice žláznatá (*Dentaria glandulosa*), šalvěj lepkavá (*Salvia glutinosa*) a pryšec mandloňovitý (*Euphorbia amygdaloides*) (Horsák et al. 2006). Místní přirozené porosty jsou svým druhovým složením a porostní výstavbou blízké původním jedlobukovým karpatským pralesům. Na území se

rovněž vyskytují stejnověké bučiny s příměsí jasanu, klenu a smrku (Adam et al. 2007).

Někdy je širokou veřejností mylně užíván název „prales“ Mionší, který je nesprávný. Mionší pralesem není, jelikož vliv člověka se odrazil v druhové skladbě i ve struktuře lesních porostů (Horsák et al. 2006, Adam et al. 2007).

5.3.2 Razula

Národní přírodní rezervace Razula leží přibližně 1,5 km jihovýchodně od části obce Velké Karlovice – Lískové v Moravskoslezském kraji. NPR Razula byla zřízena v roce 1933 s rozlohou 22, 57 ha.

V geologickém podloží jsou nejvíce zastoupeny snadno zvětrávající jílovce zlínských vrstev tvořící flyšové pásmo západních Karpat. V menším zastoupení jsou zde hůře zvětrávající glaukonitické pískovce, které budují hřbety (Průša & Holuša 1976).

Půdy jsou zde kyselé a převážně hlinito-písčité (Vrška 2001). Klimaticky NPR Razula patří do chladné oblasti CH6 (Quitt 1974).

Z hlediska vegetace v této rezervaci převládají květnaté karpatské bučiny asociace *Dentario glandulosae-Fagetum*, resp. květnaté bučiny s kyčelnicí devítilistou *Dentario enneaphylli-Fagetum* (Správa CHKO Beskydy). Podle mapy potenciální vegetace (Neuhäuslová et al. 1998) se na tomto území tyto dva typy bučin potkávají. Bylinné patro je tedy tvořeno druhy obou typů bučin. Převažující dřevinou je *Fagus sylvatica*, v menším zastoupení *Abies alba* a *Picea abies*. Zastoupení jedle se do budoucna bude zřejmě snižovat. Determinujícím faktorem jsou vysoké stavy zvěře, popřípadě intezita ochranných opatření. Nejvíce jsou ohroženy jedinci výškové třídy 15–50 cm, které trpí okusem terminálního výhonu (Správa CHKO Beskydy).

5.3.3 Salajka

Národní přírodní rezervace se nachází přibližně 500 m východně od hraničního přechodu Bumbálka se Slovenskem, na mírně zvlněných svazích hlavního hřebene Beskyd. NPR Salajka byla zřízena v roce 1956 a zaujímá rozlohu 21,95 ha.

Geologické podloží je tvořeno magurským flyšem. V pralese převažují jíly a jílovce, v menším zastoupení se zde vyskytují arkóзовé pískovce a drobové slepence s vložkami jílovců (Správa CHKO Beskydy 2014).

Rezervace náleží do chladné oblasti CH6 (Quitt 1974). Ve vegetačním období je průměrná teplota 11,2°C a úhrn srážek činí 645 mm (Správa CHKO Beskydy 2014).

Pro zájmové území jsou typické květnaté bučiny asociace *Asperulo-Fagetum* podsvazu *Eu-Fagenion* v mozaice s acidofilními bučinami asociace *Luzulo-Fagetum*. V současnosti je většina bylinného patra zastíněna vlivem zmlazujících porostů a dochází tak k přechodu k vegetaci kyselých bučin *Dryopterido dilatatae-Fagetum*. Převládající dřevinou je *Fagus sylvatica*, dosud hojně zastoupená je *Abies alba*, vtroušeně se objevuje *Picea abies* a *Acer pseudoplatanus*. NPR Salajka je obklopena smrkovými monokulturami (Správa CHKO Beskydy).

Mezi historické prameny lichenologicky zkoumaného území lze zařadit práce Hruby (1915), Suza (1921, 1923, 1924), Vězda (1955, 1957) (Malíček 2010 ex. Hruby 1915, Suza 1921, 1923, 1924, Vězda 1955, 1957). Další výzkum lichenologické flóry proběhl v rámci bryologicko-lichenologického setkání v Beskydech v roce 2005 a 2010 (Malíček 2010).

5.4 Diana

Přírodní rezervace Diana (Obr. 3) se překrývá s CHKO Český les v Plzeňském kraji a leží jižně od obce Rozvadova přibližně 1 km západně od vesnice Diana. Rezervace s výměrou 20,4 ha byla vyhlášena v roce 1998, ale území bylo chráněno již od roku 1933.

Geologické podloží zájmového území se skládá z muskovit-biotické žuly rozvadovského masivu a z cordierit-biotické a sillimanit-biotické migmatitizované pararuly. V PR Diana převládají oglejené půdy (Demek & Mackovčín 2006).

Podle klasifikace Quitta se území nachází v mírně teplé oblasti MT3 (Quitt 1977).

Převážná část rezervace je tvořena starým bukovým porostem, kde se věk nejstarších jedinců odhaduje na 260 let a více. Dominující dřevinou je *Fagus sylvatica* a méně zastoupenou je *Picea abies*. Fytocenologicky se na území

uplatňuje kyčelnicová květnatá bučina asociace *Dentario eneaphylli-Fagetum* (Správa CHKO Český les).



Obr. 3: Přírodní rezervace Diana (CHKO Český les), přirozené bukové porosty. Foto: Jana Kocourková

6. Metodika

Terénní metodika a metodika sběru odkazuje na metodiku v rámci lichenologického výzkumu projektu Fragmentace krajiny – Aktivita 11, která je zmíněna v kapitole č. 4. Sběry pro chemickou analýzu materiálu byly provedeny pouze doc. RNDr. Janou Kocourkovou, CSc.

Při zkoumání morfologických znaků druhů byl použit stereomikroskop. Pro identifikaci sekundárních metabolitů byly provedeny bodové chemické testy, metoda UV fluorescence a metoda tenkovrstevné chromatografie. Při metodě UV fluorescence se používá UV lampa nebo UV box s dlouhovlnným UV zářením (350 nm), pod nímž některé sekundární metabolity barevně svítí. Sekundární metabolity a druhy byly identifikovány pomocí literatury (Kocourková 2016, Orange et al. 2010, Smith et al. 2009, Wirth et al. 2013).

Chemická analýza pomocí tenkovrstevné chromatografie byla prováděna v herbáři a v laboratoři na Fakultě životního prostředí České zemědělské univerzity v Praze a v herbáři a laboratoři na Fakultě biologie Gdaňské univerzity v Polsku. Moje práce v laboratoři v Polsku proběhla pod vedením prof. dr hab. Martina Kukwy,

který je vedoucím laboratoře taxonomie hub na tamní fakultě. Prof. Kukwa dohlížel na správný průběh analýz a radil mi s identifikací vzorků a jejich sekundárních metabolitů, u nichž byla provedena metoda TLC. Výjezd do Polska byl financován z projektu Krátkodobá zahraniční mobilita (ČZU v Praze). Mobilita trvala 14 dní a proběhla v prosinci 2016.

Nomenklatura byla sjednocena podle nejnovější práce Wirtha (Wirth et al. 2013) a doplňkově podle aktuálního Červeného seznamu druhů České republiky (Liška & Palice, 2010) nebo z odborných článků. U nově popsanych druhů se nomenklatura řídí výše zmíněnou literaturou popisu nových druhů.

V seznamu zjištěných druhů je zkratkou uveden stupeň ohrožení podle Červeného seznamu druhů České republiky (Liška & Palice, 2010). V seznamu byly použity tyto zkratky: **DD** - druhy s nedostatečným počtem dat pro klasifikaci, **EN** - ohrožené druhy, **LC** - neohrožené druhy, **NT** - druhy blízké ohrožení, **VU** - zranitelné druhy.

Dalšími zkratkami použitými v seznamu zjištěných druhů jsou zkratky dřevin u substrátu: **AA** – *Abies alba*, **APs** – *Acer pseudoplatanus*, **FS** – *Fagus sylvatica*, **FR** – *Fraxinus excelsior*, **PA** – *Picea abies*, **TC** – *Tilia cordata*.

6.1 Bodové chemické testy (spot tests)

Bodovými testy se zjišťuje přítomnost blíže nespecifikovaných lišejníkových látek v tkáních lišejníků. Metoda je běžná, rychlá a snadno se provádí. V případě identifikace určité lišejníkové látky bodové testy nepostačí a je nutné použít citlivější testy, jako je metoda tenkovrstevné chromatografie. Metoda bodových chemických testů následuje metodiku dle Orange et al. (2010) a jako klíč s přehledy reakcí jednotlivých činidel byl použit Smith et al. (2009).

Metoda je prováděna pomocí reakčních činidel. Nejběžněji používaná jsou znázorněna v Tab. 1.

K test	[K]	10% roztok hydroxidu draselného v destilované vodě
C test	[C]	roztok chlornanu sodného (používá se desinfekční prostředek SAVO pro domácnost)
PD test	[PD]	roztok <i>para</i> -fenylendiaminu v 60–90% etanolu

Tab. 1: Reakční činidla s uvedenou zkratkou a jejich přípravou

Bodové testy se zpravidla provádějí na korové vrstvě lišejníku, pro zjištění dřevných látek na dřevné vrstvě. Reakční činidla se nanášejí buď přímo na lišejník nebo na separovaný fragment lišejníku. Část lišejníku, kde byl proveden bodový test, musí být vždy odstraněn z položky, aby nezbarvil herbářovou obálku. Reakční činidla jsou nanášena např. kapilárou, kalamářským perem, páratkem, atd.

Reakce K testu je žlutá až oranžová s řadou látek, včetně určitých depsidů, depsidonů a chromonů. Modré až červené nebo purpurové reakce vznikají s pigmenty chinonů. S norstiktovou kyselinou dochází k pomalé reakci s tvorbou červených mikroskopických krystalů. Reakce C testů jsou převážně oranžové nebo červené s některými depsidy, xanthy a jinými látkami. Mohou být i zelené s některými dibenzofurany. Používají se také KC testy, kdy je po K testu rychle aplikován C test na stejnou část lišejníku jako K test. Barva reakce je červená, zřídka fialová nebo žlutá. PD test se vyznačuje žlutou až červenou reakcí s aromatickými metabolity obsahující aldehydovou skupinu. Doba trvání do úplného zbarvení může být minuta až dvě.

6.2 Metoda tenkovrstvné chromatografie (TLC)

Metodika tenkovrstvné chromatografie (Thin-Layer Chromatography) byla prováděna a je zpracována podle Orange et al. (2010), podle lichenologů Dariusze Kubiaka a Martina Kukwy (Kubiak & Kukwa 2011) a je doplněna o poznatky z praxe.

Celkem byla proveden TLC analýza na 5 sadách. V každé sadě se analyzovalo 15 až 20 vzorků. TLC desky byly označeny příslušným použitým solventem A, C a G U každé sady nebyly použity všechny tři solventní systémy. U TLC 1 a TLC 2 byly použity A, C a G a u zbylých pouze solvent C.

Metoda TLC slouží k identifikaci sekundárních metabolitů lišejníků. Jedná se o separační metodu, která je založena na principu rozdílné schopnosti adsorpce a

migrace složek směsi v systému dvou fází – mobilní (pohyblivé) a stacionární (nepohyblivé). Stacionární fází je jemnozrnný sorbent fixovaný v tenké vrstvě na pevnou desku. V lichenologii se používají skleněné nebo hliníkové pevné desky pokryté tenkou vrstvou silikagelu. Jako mobilní fáze se používá rozpouštědlo (solventní systém), které stoupá po desce v důsledku sací kapilární síly. Tato metoda je relativně jednoduchá, levná a může ji vykonávat každý, kdo má možnost a povolení pracovat v laboratoři. V rámci chemotaxonomie je jednou z nejužitečnějších metod, která umožňuje určení taxonu.

Příprava

Solventní systémy a chromatografické komory:

Příprava rozpouštědel by měla být prováděna v digestoři, aby nedocházelo k přímému vdechování nebezpečných výparů. Jako chromatografické komory se používají tlustostěnné skleněné nádoby ve tvaru kvádrů. Měly by být čisté, zcela suché a po celou dobu umístěné v digestoři. Rozpouštědla se nalévají do komor do výšky přibližně 1 cm. Poté se komory přiklopí skleněným víkem a nechají stát přibližně dvě hodiny. Komory je vždy lepší si popsat typem solventu, který byl použit.

Některé solventní systémy (Tab. 2) jsou používané pro běžnou analýzu vzorků lišejníků. Ovšem existují již takové, které používají odborníci a vědí, kdy jaký solvent použít. Začátečnickům jsou doporučeny solventní systémy C nebo G, které jsou stabilní a spolehlivé. Některé roztoky se rychle rozkládají a s časem se jejich spolehlivost snižuje, nejrychleji u solventu B, a je třeba je obnovit. V případě, že je potřeba určit druh, u kterého jsou sekundární metabolity známy, stačí použít jeden solventní systém. Někdy ovšem nemusí být všechny složky od sebe odděleny, proto je lepší použít více solventních systémů.

SOLVENTNÍ SYSTÉMY		
(Orange et al. 2010)		
A	toluen / dioxan / kyselina octová	180 : 45 : 5
B	hexan / methyl <i>tert</i> -butyl ether (MTBE) / kyselina mravenčí	140 : 72 : 18
C	toluen / kyselina octová	170 : 30*
G	toluen / ethylacetát / kyselina mravenčí	139 : 83 : 8

* někteří autoři preferují poměr 200 : 30

Tab. 2: Solventní systémy rozpouštědel s uvedeným chemickým složením a jejich poměrem

Reakční činidla pro zviditelnění skvrn:

K vizualizaci skvrn se nejčastěji používá 10% kyselina sírová. Připraví se smícháním koncentrované 98% kyseliny sírové a destilované vody v poměru 1 : 9. Kyselina se opatrně přidává do vody, nikoliv naopak.

Mezi další činidla patří hydrochlorid 2-hydrazono-3-methylbenzothiazolu (MBTH) a hexakvanoželezitan draselný, které se často používají spolu. Dalšími jsou octan hořečnatý a triethylamin, které se používají pouze pro chinony.

Desky:

TLC desky jsou vyrobeny ze skla nebo hliníku a jsou pokryté tenkou vrstvou silikagelu. Jejich velikost je obvykle 20 x 20 cm. Na desku se měkkou tužkou narýsuje čára rovnoběžná se spodním okrajem desky, od níž je vzdálena 2 cm. Na tzv. startovní čáru se vynesou body v intervalech 0,9 cm pro 18 vzorků (včetně kontrolních) nebo v intervalech 0,8 pro 20 vzorků (včetně kontrolních). První a poslední bod by měl být od vnějšího okraje vzdálen 1,5 cm. Body se musí očíslovat. Deska by měla být popsána číslem TLC analýzy, typem solventu a jménem vykonavatele.

Postup

Před samotnou chemickou analýzou je vždy lepší alespoň tušit, o jaký lišejník se jedná. Podle toho se dá očekávat, jaké sekundární metabolity vzorků by se mohly na desce objevit. Dle očekávaných lišejníkových látek se vyberou kontrolní vzorky, které obsahují očekávané látky. Většinou se používají obecné kontroly jako

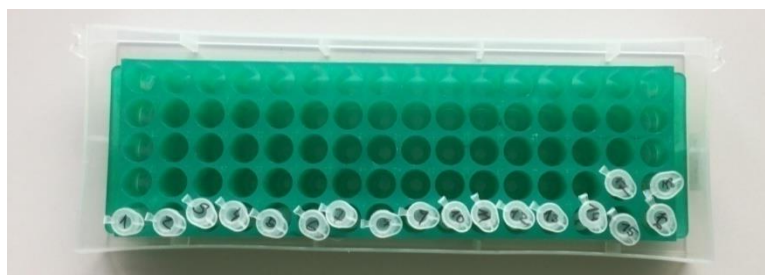
je norstiktová kyselina nebo atranorin (Tab. 3). Tyto kontroly pomáhají určit pozici skvrn, jejich retardační faktor. Kontrolní vzorky se doporučuje nanášet na pozice 3 a 7 startovní čáry.

<i>Pleurosticta acetabulum</i>	norstiktová kyselina
<i>Cladonia subcervicornis</i>	fumarprotocetrarová kyselina, atranorin
<i>Parmelia sulcata</i>	salazinová kyselina, atranorin
<i>Parmotrema perlatum</i>	stiktová kyselina, atranorin

Tab. 3: Užitečné kontroly získané z uvedených druhů, lze je získat i směsí jejich směsí

S přibývajícím počtem prováděných analýz a vzorků se kontroly nemusejí použít. Badatel předpokládá, jak a kde se skvrny sekundárních metabolitů na desce zobrazí. Stejně tak se nemusí TLC analýza provádět ve třech solventech. Standardně se používá solvent A a C, solvent B se většinou vynechává, pokud není vyžadován pro určité rody. Zkušený badatel používá nejčastěji pouze solvent C, který např. pro rod *Lepraria* nebo *Micarea* snadno postačí.

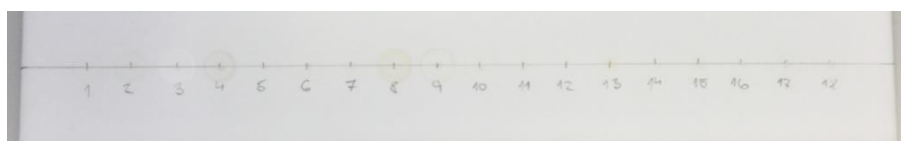
Z lišejníků se odebere malé množství vzorku do jednorázových plastových mikrozku mávek s víčkem, tzv. eppendorfek. Vzorek se odebírá pod stereomikroskopem pinzetou, skalpelem nebo žiletkou, záleží na typu stélky. Odebrané vzorky by měly být čisté bez příměsí jiných lišejníků. Mikrozku mávky se musejí popsat a čísla musí odpovídat číslům na TLC desce (Obr. 4).



Obr. 4: Ukázka očíslovaných eppendorfek

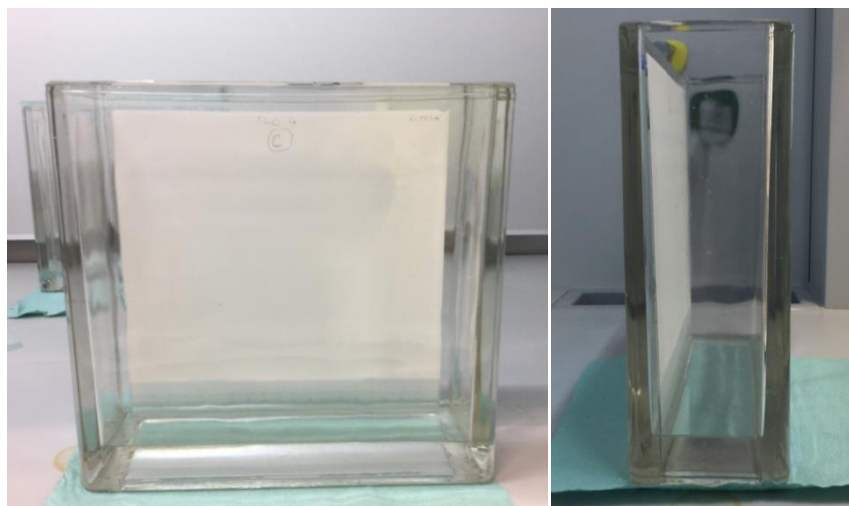
Ke každému vzorku se přikape pár kapek acetonu, do kterého se extrahují sekundární metabolity. Pokud je vzorek savý, jako je např. *Lepraria*, přidá se pár kapek navíc.

Pomocí tenké skleněné kapiláry o objemu 10 μl se acetonový extrakt nanese na příslušnou pozici vzorku vyznačenou na desce (Obr. 5). Číslo vzorku na eppendorfci musí odpovídat číselné pozici na desce. Pro každý další vzorek se použije nová nepoužitá kapilára. Roztok acetonu jednoho vzorku se kapilárou na desku nanáší bodově přibližně třikrát. Nanesené kapky se nesmějí vzájemně dotýkat. Ne všechny nanesené vzorky extrahované v acetonu jsou po nanesení na desce vidět.



Obr. 5: Startovní linie s nanesenými vzorky

Chromatografické desky s nanešenými vzorky se umístí téměř kolmo ke stěně do skleněných komor (Obr. 6 a 7). Komora musí být rozpouštědlem naplněna tak, aby se linie se startovními body nacházela nad hladinou rozpouštědla, nesmí být do něj ponořena. Poté se nádoby přiklopí skleněnými víky. Eluent postupně vzlíná po desce k hornímu okraji. Po přibližně 45 minutách, kdy se eluent nachází cca 5 cm od horního okraje desky, se desky vyjmou.



Obr. 6 a 7: Komora s vloženou deskou (pohled zepředu a pohled ze strany)

Následně se z desek musí zcela odpařit eluent. Tento proces urychlíme pomocí vysoušeče vlasů. Obvykle jsou desky suché po pěti až deseti minutách.

Z desek nesmí být cítit žádný zápach (např. kyseliny octové či mravenčí), v tu chvíli je rozpouštědlo zcela odpařené a desky jsou suché.

Identifikace na deskách a značení skvrn

Sekundární metabolity nejsou na denním světle většinou viditelné. Ale pokud jsou, tak se jeví jako zelené, žluté, oranžové nebo červené skvrny. Označují se obloučkem a velkým písmenem „P“ jako pigment. Všechny skvrny na deskách se označují měkkou tužkou.

Desky jsou následně pozorovány pod UV lampou v temnu nebo v UV boxu pod krátkými vlnami o délce 254 nm. Aromatické látky se proti jasně zelenému fluorescenčnímu pozadí zobrazí jako tmavé skvrny. Ty se označí měkkou tužkou a obloučkem. Poté se desky zkoumají pod dlouhými vlnami o délce 366 nm. V tuto chvíli se sekundární metabolity zobrazí barevně. Barva se nadepíše nad oblouček již označených skvrn. Skvrny, které nebyly viděny pod krátkými vlnami, se tečkovaně označí obloučkem.

Pokud jsou ve vzorcích očekávány mastné kyseliny, desky se sprejují destilovanou vodou. Mastné kyseliny se vyznačují hydrofobními vlastnostmi. Na desce se zobrazí jako bílé skvrny, okolo nichž je pozadí mokré a průhledné. Mastné kyseliny se označí tečkovanou čarou po celém obvodu. Desky musí vyschnout. Pro zrychlení se může použít vysoušeč vlasů, který tento krok podstatně urychlí.

Dalším krokem je zviditelnění skvrn 10% kyselinou sírovou. Tento krok se provádí v digestoři se zapnutým větrákem. Kyselina sírová by neměla být inhalována a mělo by se vyhnout případnému potřísnění oděvu. 10% kyselina sírová se nasprejuje (neměla by kapat) na desku nebo se na desku nanese širokým štětcem. Štětce se musí po aplikaci kyseliny sírové důkladně opláchnout vodou. Deska se vloží do předehřáté trouby nebo na TLC vařič a suší se při teplotě 110°C. Autoři uvádějí různou dobu sušení, která se pohybuje mezi třemi až deseti minutami. Praxe je taková, že se deska musí hlídat. Deska je hotová tehdy, když jsou skvrny plně vybarveny a než deska začne hnědnout. V tuto chvíli se deska sejme z vařiče (vyjme z trouby). Skvrny, které se objevily, se označí obloučkem nebo se obkreslí celá skvrna a nadepíše se nad ně příslušná barva skvrny. Značení skvrn není striktně dané, badatel si je označí takovým způsobem, který mu vyhovuje a ve kterém se sám vyzná.

Nakonec jsou desky opět zkoumány pod dlouhovlnným UV zářením. Kyselina sírová umožnila zviditelnění skvrn na denním světle, ale některé metabolity jsou nadále viditelné pouze pod dlouhovlnným UV zářením, např. xanthyony. Některé

sekundární metabolity se zobrazily až při druhém zkoumání pod dlouhými vlnami díky kyselině sírové. Desky by se měly vyfotografovat na denním světle i pod dlouhovlnným UV zářením. S časem se barva skvrn mění.

Interpretace desek

Identifikace skvrn na vyvinutých deskách se porovnává s publikovanými TLC údaji. Mezi tyto údaje patří R_f (retardační faktor), barva a fluorescenční znaky skvrny. Jako publikovaný údaj se nejčastěji používá příloha č. 1 v publikaci Orange et al. (2010). V této příloze jsou údaje o 155 nejčastěji se vyskytujících sekundárních metabolitech. R_f je zde uveden pro solventy A, B, C a G. Barva pod UV před zahřátím desky, barva po aplikaci kyseliny sírové a barva pod UV po zahřátí desky. V publikaci jsou k daným sekundárním metabolitům doporučené druhy kontrolních vzorků a poznámky (Obr. 8).

Appendix 1 (continued). TLC data for commonly encountered lichen substances									
COMPOUND	RELATIVE R_f				UV BEFORE HEATING	SPOT COLOUR AFTER ACID AND HEATING	UV AFTER HEATING	SUGGESTED CONTROL SPECIES	NOTES
	C	A	B	G					
zeorin	43	52	43	52	-	dull purple	pink	Haematomma ochroleucum, Cladonia diversa, Lepraria incana	triterpenoid

Obr. 8: Ukázka tabulky z přílohy č. 1 (Orange et al. 2010)

Retenční (retardační) faktor R_f

Hodnota R_f vyjadřuje uraženou vzdálenost skvrny analyzované látky od startu k čelu rozpouštědla. Retardační faktor se spočítá podle níže uvedeného vzorce, kde člen a udává vzdálenost skvrny od startu a člen b vyjadřuje vzdálenost čela rozpouštědla od startu. Jedná se o bezrozměrnou veličinu. R_f hodnota je pro danou látku v daném systému rozpouštědel charakteristická. Obvykle se hodnota násobí stem.

Výpočet R_f :
$$R_f = \frac{a}{b}$$

Tedy pokud se skvrna lišejníkové látky nachází v polovině mezi startovní čarou a čelem rozpouštědla, její R_f je 50. Každá lišejníková látka má svoji R_f hodnotu, která se liší podle použitého typu solventního systému. Absolutní R_f hodnota může být ovlivněna různými faktory, např. atmosférickými podmínkami, typem desky, atd. Proto je R_f hodnota relativní. R_f látek jsou vůči sobě více či méně konstantní, proto jsou obvykle vyjádřeny s odkazem na vybrané látky jako tzv. standardy (kontroly). Běžně používanými standardy jsou norstiktová kyselina a

atranorin. Tudiž pokud skvrna urazila v solventním systému C vzdálenost 40 mm od startovní čáry, zatímco norstiktová kyselina 50 mm bude relativní hodnota látky $40/50 \times 30 = 24$. Dále existují tzv. R_f třídy, které také odkazují na standardy. Lišejníkové látky mající stejnou hodnotu R_f jako norstiktová kyselina patří do R_f třídy 4. Pokud mají stejné R_f jako atranorin, náleží do R_f třídy 7. Pokud se R_f rovná nule pak je R_f třída 1. R_f tříd je 1-8.

Retardační faktor nebo R_f třídy se nepočítají v případě, kdy už badatel skrvy zná a ví, kde se přibližně objevují. Osobně jsem při výzkumu R_f třídy nepočítala, relativní R_f hodnoty jsem počítala a vždy jsem je srovnávala s R_f hodnotami v příloze 1 Orange et al. (2010).

<u>kontrolní látky</u>	<u>Relativní R_f hodnoty (x 100) v jednotlivých typech solventů</u> (Mietzsch et al. 1994)			
	A	B	C	G
atranorin	75	73	79	-
usnová kyselina	70	65	71	88
norstiktová kyselina	40	32	30	57
stiktová kyselina	32	9	18	34
salazinová kyselina	10	7	4	26

Tab. 4: Standardizované hodnoty kontrolních sloučenin převzatých z Mietsche et al. (1994 in Orange et al. 2010)

Materiál určený k chemické analýze byl sbírán pomocí nože nebo dláta a kladiva. Posléze byl v potřebném množství vložen do papírových sáčků, které byly popsány terénními údaji. Než mohly být chemické analýzy druhů provedeny, musel být nasbíraný materiál vysušen a vymražen po dobu alespoň 10 dní při teplotě $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Identifikované druhy byly zpoložkovány, zapsány do databáze a uloženy do instituciálního herbáře nebo herbáře badatele. Sběry pro chemickou analýzu materiálu byly provedeny doc. RNDr. Janou Kocourkovou, CSc.

7. Výsledky

Celkem bylo chemicky analyzováno 89 vzorků lišejníků, z nichž se podařilo určit 16 sekundárních metabolitů a 67 vzorků, které reprezentují 17 druhů. *Micarea soralifera* byla zjištěna jako nová pro Českou republiku.

7.1 Seznam určených sekundárních metabolitů

Celkem bylo identifikováno 16 sekundárních metabolitů.

6-methylester kyseliny panarové

argopsin

atranorin

divarikatová kyselina

jackinová kyselina

fumarprotocetrarová kyselina

gyroforová kyselina

konnorstiktová kyselina

methoxymikareová kyselina

mikareová kyselina

nefrosteranová kyselina

panarová kyselina

rokcelová kyselina

stiktová kyselina

tamnolová kyselina

zeorin

7.2 Soupis lokalit sběrů

1. Bílá Opava (1), CHKO Jeseníky, přirozený smrkový les s *Picea abies* a *Sorbus aucuparia* subsp. *aucuparia*, N 50°4'13,8" E 17°14'52,3", 1290 m n. m.

2. Bílá Opava (1), CHKO Jeseníky, kulturní smrkový les s *Picea abies*, N 50°4'36,5" E 17°15'55,6", 1160 m n. m.
3. Bílá Opava (2), CHKO Jeseníky, přirozený smrkový les s *Picea abies*, N 50°4'38,0" E 17°15'6,8", 1190 m n. m.
4. Bílá Opava (2), CHKO Jeseníky, kulturní smrkový les s *Picea abies* a zřídka s *Fagus sylvatica* a *Sambucus nigra*, N 50°4'49,8" E 17°15'57,1", 1080 m n. m.
5. Eustaška, CHKO Jeseníky, přirozený smrkový les s *Picea abies*, N 50°3'37,4" E 17°15'10,4", 1230 m n. m.
6. Eustaška, CHKO Jeseníky, kulturní smrkový les s *Picea abies* a zřídka se *Sorbus aucuparia* subsp. *aucuparia*, N 50°3'34,9" E 17°15'13,9", 1210 m n. m.
7. NPR Králický Sněžník, přirozený smrkový les s *Picea abies* a zřídka se *Sorbus aucuparia* subsp. *aucuparia*, N 50°12'1" E 16°51'22,6", 1190 m n. m.
8. NPR Králický Sněžník, kulturní smrkový les s *Picea abies* a zřídka se *Sorbus aucuparia* subsp. *aucuparia*, N 50°12'5,3" E 16°51'28,5", 1210 m n. m.
9. NPR Salajka, CHKO Beskydy, starý jedlobukový les s *Fagus sylvatica*, *Abies alba*, *Picea abies* a zřídka s *Acer pseudoplatanus*, N 49°24'7,7" E 18°25'11,8", 740 m n. m.
10. NPR Salajka, CHKO Beskydy, kulturní bučina s *Fagus sylvatica*, *Picea abies* a zřídka s *Abies alba*, N 49°24'17,3" E 18°24'57,6", 820 m n. m.
11. NPR Razula, CHKO Beskydy, starý bukový les s *Fagus sylvatica*, *Abies alba* a *Picea abies*, N 49°21'39,1" E 18°22'52", 710 m n. m.
12. NPR Razula, CHKO Beskydy, kulturní bučina s *Fagus sylvatica*, *Picea abies* a zřídka s *Fraxinus excelsior*, *Acer pseudoplatanus* a *Betula pendula*, N 49°21'34,7" E 18°22'12", 730 m n. m.
13. NPR Mionší, CHKO Beskydy, starý bukový les s *Fagus sylvatica*, *Acer pseudoplatanus*, *Picea abies* a zřídka s *Abies alba*, N 49°32'21" E 18°39'30,6", 860 m n. m.
14. NPR Mionší, CHKO Beskydy, kulturní bučina s *Fagus sylvatica*, *Picea abies* a zřídka s *Abies alba*, N 49°32'5" E 18°40'2,7", 640 m n. m.
15. PR Diana, CHKO Český les, starý bukový les s *Acer platanoides*, *Fagus sylvatica*, *Picea abies* a *Tilia cordata*, N 49°37'55,3" E 12°34'46,7", 510 m n. m.

16. PR Diana, CHKO Český les, kulturní bučina s *Acer pseudoplatanus*, *Fagus sylvatica*, *Picea abies* a zřídka s *Betula pendula*, *Fraxinus excelsior* a *Ulmus glabra*, N 49°36'46,8" E 12°35'37,3", 530 m n. m.

7.3 Seznam určených druhů

V seznamu určených druhů je u každého druhu zmíněn stupeň ohrožení podle Červeného seznamu ČR, čísla lokalit výskytu a substrát se zkratkou dřeviny.

Bacidina sulphurella (Samp.) M. Hauck & V. Wirth **LC** – 7

Biatora efflorescens (Hedl.) Räsänen **VU** – 11 na kůře PA

Chaenotheca stemonea (Ach.) Müll. Arg. **VU** – 5 na kůře PA

Lepraria elobata Tønsberg **LC** – 4, 5, 6, 7 na kůře PA, 11 na kůře FS, 13 na kůře APs

Lepraria finkii (Hue) R.C. Harris **LC** – 3 pod pařezem, 9, 15 na kůře FS, 12 na kůře PA, 16 kořen FS

Lepraria incana (L.) Ach. **LC** – 1, 3 hluboko pod pařezem, 11 na kůře FS, na suchém dřevě FS, na kůře PA, 13 na kůře APs, 15 na kůře FS, PA,TC, zesponu na tlustém pařezu, 16 na ležícím torzu FS, ležící větve FS, na dřevě PA

Lepraria jackii Tønsberg **NT** – 5 na kůře PA, 16 na kůře FS

Lepraria rigidula (B. de Lesd.) Tønsberg **LC** – 1, 8 na kůře PA, 13 ležící FS, 15 zesponu tlustého pařezu, 16 ležící větve FS

Lepraria umbricola Tønsberg **NT** – 6 na kůře PA

Lepraria vouauxii (Hue) R.C. Harris **LC** – 9 báze FS, 11

Micarea byssacea (Th. Fr.) Czarnota, Guzow-Krzemińska & Coppins **DD** – 9, 11 na kůře FS

Micarea micrococca (Körb.) Gams ex Coppins **LC** – 6 na stojícím pařezu PA, 7 na bázi PA

Micarea prasina Fr. s. str. **LC** – 5 na kůře PA, na trouchnivém a stojícím pařezu PA, 6 na stojícím pařezu PA, 8 na kůře PA, 11 na velmi trouchnivém pařezu PA

Micarea soralifera Guzew-Krzemińska, Czarnota, Łubek & Kukwa (stupeň ohrožení neznámý) – 1 na kůře PA

Mycoblastus fucatus (Stirt.) Zahlbr. **LC** – 13 na kůře APs

Placynthiella dasaea (Stirt.) Tønsberg **LC** – 5 na trouchnivém dřevu PA

Trapelia corticola Coppins & P. James **EN** – 5 na kmeni PA

Seznam vzorků zařazených pouze do rodu

Micarea Fr. – 11, 16 na kůře FS

Počet analyzovaných vzorků z každé lokality je znázorněn v tabulce (Tab. 5). Chemická analýza byla provedena u 40 vzorků lišejníků ze smrčín a 49 z bučin. Pokud se porosty smrčín i bučin (dohromady) rozdělí na přirozené a kulturní, činí počet analyzovaných vzorků lišejníků 69 z přirozených porostů a 20 z kulturních porostů. Z kulturních bučin byly druhy podle TLC identifikovány pouze z lokality Diana. Z lokalit Mionší, Razuly a Salajky nebyly druhy určeny k chemické analýze. Z lokality Bílá Opava 2 – kulturní smrčiny, nebyly druhy takéž předmětem chemické analýzy.

V další tabulce (Tab. 6) jsou sepsány určené druhy, kterých bylo identifikováno 17. Zároveň jsou v tabulce znázorněny druhy podle výskytu v smrčíně přirozené a kulturní a v bučině přirozené a kulturní. Nejvíce zaznamenaných druhů pochází z přirozených smrkových porostů a nejméně z kulturních bučin.

	P	K
Bílá Opava 1	7	1
Bílá Opava 2	4	0
Eustaška	14	4
Králický Sněžník	5	5
Diana	11	10
Mionší	7	0
Salajka	4	0
Razula	17	0
Součet vzorků	69	20

Tab. 5: Počet analyzovaných vzorků, P – přirozené porosty, K – kulturní porosty, zeleně zvýrazněny smrčiny, modře bučiny

Určené druhy	Smrčiny		Bučiny		Počet vzorků
	P	K	P	K	
<i>Bacidina surphurella</i>	+				1
<i>Biatora efflorescens</i>			+		1
<i>Chaenotheca stemonea</i>	+				1
<i>Lepraria elobata</i>	+	+	+		8
<i>Lepraria finkii</i>	+		+	+	6
<i>Lepraria incana</i>	+		+	+	21
<i>Lepraria jackii</i>	+			+	2
<i>Lepraria rigidula</i>	+	+	+	+	6
<i>Lepraria umbricola</i>		+			1
<i>Lepraria vouauxii</i>			+		2
<i>Micarea byssacea</i>				+	2
<i>Micarea micrococca</i>	+	+			2
<i>Micarea prasina s. str.</i>	+	+	+		10
<i>Micarea soralifera</i>	+				1
<i>Mycoblastus fucatus</i>			+		1
<i>Placynthiella dasaea</i>	+				1
<i>Trapelia corticola</i>	+				1

Tab. 6: Přehled určených druhů a počty vzorků. Znakem „+“ je označen výskyt druhu v smrčíně nebo v bučině přirozené (P) nebo kulturní (K)

Nejhojněji zastoupeným druhem je *Lepraria incana*, s deseti identifikovanými vzorky následuje *Micarea prasina s. str.* V rodě *Lepraria* je dále hojně zastoupen druh *L. elobata*. Druh *L. rigidula* s šesti nálezy byl zastoupen v přirozené a kulturní

smrčině a stejně tak v přirozené a kulturní bučině. Druhy, které byly zastoupeny pouze jednou, pocházejí až na jeden druh z přirozených porostů. Druh *Lepraria umbricola* byl zaznamenán z kulturní smrčiny Králického Sněžníku.

Většina určených druhů není podle Červeného seznamu ČR ohrožena. Druhy *Lepraria jackii* (NT) a *Lepraria umbricola* (NT) jsou blízké ohrožení. K zranitelným druhům pocházejících z přirozených porostů se řadí *Biatora efflorescens* (VU) z Razuly a *Chaenotheca stemonea* (VU) z Eustašky. Vzácným, ohroženým druhem je *Trapelia corticola* (EN), která pochází z přirozeného smrčového porostu z Eustašky. U druhu *Micarea byssacea* (DD) není určen stupeň ohrožení kvůli nedostatečnému množství dat pro klasifikaci ohrožení v ČR. Druh *Micarea soralifera* se nevyskytuje v aktuálním Červeném seznamu druhů ČR. Proto u něho není uveden stupeň ohrožení.

Na základě historických výzkumů byl potvrzen vzácný, ohrožený druh *Trapelia corticola* z Hrubého Jeseníku, který byl zaznamenán na téže lokalitě (Malíček 2014). Dalšími potvrzenými druhy byly, *L. finkii* z Razuly (Malíček 2010) *Lepraria vouauxii* ze Salajky (Malíček 2010), *M. byssacea* z Razuly (Malíček 2010), *M. prasina* z Králického Sněžníku (Halda 2008) a z Razuly (Malíček 2010).

7.4 Komentáře k vybraným druhům

Tato kapitola je věnována druhům z rodů *Lepraria* a *Micarea*, jejichž problematika byla rozebrána v části literární rešerše. Převážná většina druhů, která byla chemicky analyzována, spadá právě do těchto rodů, a proto jsou zde detailněji popsány. Komentáře jsou strukturovány, jako první je zmíněna morfologie, následuje chemismus, poté ekologie a nakonec jsou doplněny o literární rešerši. U každého druhu je zmíněn počet identifikovaných druhů.

***Lepraria elobata* Tønsberg**

Morfologie: Pro tento druh je typická práškovitá, pudrovitá, agregovaná, modrošedá, zelenošedá, tenká stélka (Lendemmer 2013, Tsurykau 2016). Prothallus je trvalý a hypothallus chybí (Lendemmer 2013).

Chemismus: Atranorin, komplex kyseliny stiktové, zeorin (Tønsberg 1992).

Ekologie: Většinou se nachází na kůře jehličnanů , ale i na kyselých horninách (Smith et al. 2009). Kukwa úvadí (Kukwa 2006), že se vyskytuje i na kůře listnatých stromů a zřídka na půdě a na dřevě.

Počet určených vzorků: 8.

***Lepraria finkii* (Hue) R.C. Harris**

Syn.: *Lepraria lobificans* (Lendemer 2010).

Morfologie: Stélka je práškovitá, vlnitá, ztluštělá, plakodiodní, světle zelená až našedivělá (Lendemer 2013, Tsurukau 2016). Prothallus s věkem mizí. Hypothallus tvoří vrstvu hustě propletených hyf obklopující granule, které měří 24–104 µm (Lendemer 2013).

Chemismus: Atranorin, komplex kyseliny stiktové, zeorin (Tønsberg 1992).

Ekologie: Nenáročný druh preferující vlhké prostředí, který roste na mnoha různých substrátech (Kukwa 2006).

Lepraria finkii má stejné chemické složení jako *Lepraria elobata*, ale liší se stélkou, která je u *L. elobata* tenká (Tsurukau 2016). *L. finkii* má na rozdíl od *Lepraria elobata* dlouhé hyfy (Kukwa 2006).

Počet určených vzorků: 6.

***Lepraria incana* (L.) Ach.**

Morfologie: Tento druh je charakterizován práškovitou, pudrovitou, agregovanou stélkou zelenobílé, šedozelené barvy (Tsurukau 2016, Lendemer 2011), s granulemi 0,05–0,12 mm v průměru (Smith et al. 2009).

Chemismus: Divarikatová kyselina, zeorin a někdy nordivarikatová kyselina (Laundon 1992, Tønsberg 1992).

Ekologie: Vyskytuje se především na kyselém podkladu (Tsurukau 2016), v otevřených místech, ale i ve stinných lesích. Objevuje se i ve městech, snáší znečištění (Kukwa 2006).

Rozšíření: *Lepraria incana* je celosvětově velmi rozšířeným druhem, především v Evropě. Nevyskytuje se v Arktidě, Antarktidě a v Severní Americe (Tsurukau 2016). V Severní Americe se vyskytují druhy, které také obsahují divarikatovou kyselinu a zeorin, a proto byly považovány za *L. incana*. Lendemer je

prozkoumal podrobněji a zjistil, že se odlišují morfologicky a jsou fylogeneticky příbuzné s *L. incana*. Na základě výsledků popsal dva nové druhy *Lepraria hodkinsoniana* Lendemer a *Lepraria pacifica* Lendemer (Lendemer 2013).

Lepraria incana je druh chemismem podobný *Lepraria crassissima*, ale liší se koncentrací kyseliny nordivarikatové, morfologií a substrátem. *L. incana* se nikdy nevyskytuje na vápnitém substrátu, *L. crassissima* bazický podklad preferuje (Kukwa 2004).

Počet určených vzorků: 21.

***Lepraria jackii* Tønsberg**

Morfologie: Vyznačuje se práškovitou, pudrovitou, agregovanou, tenkou, nazelenalou, zelenošedou stélkou (Lendemer 2013, Tsurykau 2016) s granulemi velkými do 0,6 mm (Smith et al. 2009).

Chemismus: Atranorin, kyselina jackinová, kyselina rokcelová, kyselina norjackinová (stopy) (Kukwa 2006). Mimo atranorin jsou zbylé látky mastné kyseliny.

Ekologie: Vyskytuje se na dřevinách s kyselou borkou, často na jehličnanech, ale také na *Betula* spp., *Alnus glutinosa* (Slavíková et Orange 2006).

Do roku 2002 byly známy pouze 3 druhy obsahující mastné kyseliny a atranorin: *L. borealis* Loht. & Tønsberg, *L. jackii* a *L. rigidula* (B. de Lesd.) Tønsberg. Od té doby bylo nově popsáno 6 druhů, jmenovitě *L. bergensis* Tønsberg, *L. celata* Slavíková, *L. granulata* Slav.-Bay., *L. humida* Slavíková & Orange, *L. sylvicola* Orange a *L. toensbergiana* Bayerová & Kukwa (Tsurykau 2016). U posledního uvedeného druhu nebylo dosud spolehlivě vyřešeno, zda se jedná o samostatný druh nebo pouze o varietu v rámci druhu *Lepraria jackii* jako *L. jackii* var. *toensbergiana* (Śliwa et Kukwa 2012).

Počet určených vzorků: 2.

***Lepraria rigidula* (B. de Lesd.) Tønsberg**

Morfologie: Tento druh má práškovitou, pudrovitou, agregovanou, tenkou bělavou nebo velmi světle zelenou stélku (Lendemer 2013, Tsurykau 2016). Charakteristické jsou dlouhé vyčnívající hyfy (Kukwa 2006). Morfologické znaky se v různých podmínkách mohou lišit (Tsurykau 2016).

Chemismus: Atranorin, kyselina nefrosteranová (Lendemer 2013).

Ekologie: *L. rigidula* roste na živinově bohatých, středně kyselých až bazických borcích, zřídka na horninovém podkladu nebo na zemi (Kukwa 2006).

Počet určených vzorků: 6.

***Lepraria umbricola* Tønsberg**

Morfologie: Druh je charakteristický práškovitou, šedo-zelenou až zelenou stélkou bez vyčnívajících hyf (Smith et al. 2009).

Chemismus: Kyselina tamnolová (Tønsberg 1992), občas atranorin a kyselina rokcelová (Leuckert et al. 1995).

Ekologie: Preferuje kyselý borcový a dřevný jehličnanů v zastíněných porostech, ale také *Quercus*, *Alnus* a *Betula*. Méně často roste na horninách a půdě. Patří mezi druh vyžadující vlhkost (Smith et al. 2009).

Zdá se, že je tento druh vzácný, ale široce rozšířený (Kukwa 2006).

Počet určených vzorků: 1.

***Lepraria vouauxii* (Hue) R.C. Harris**

Morfologie: Stélka je práškovitá, jemná, ztlustělá, plakodiodní, šedá až zelená barva, se zřetelným nádechem žlutým (Lendemer 2013, Tsurykau 2016).

Chemismus: 6-methylester kyseliny panarové, může se zde objevit kyselina panarová a vzácně atranorin (Smith et al. 2009).

Ekologie: Nachází se na středně kyselých až bazických, živinami bohatých substrátech. Často se vyskytuje na borcích stromů, na horninách a méně často na půdě (Kukwa 2006).

Počet určených vzorků: 2.

***Micarea byssacea* (Th. Fr.) Czarnota, Guzew-Krzemińska & Coppins**

Morfologie: Stélka je granulózni, zelená až olivově-zelená, složená z malých goniocyst. Apothecia bývají obvykle početná, olivově-šedá, bílo-šedá, šedá až černo-šedá, konvexní až polokulovitá. Pyknidy občas přítomné. Je tvořena fotobionty mikareoidního typu kulovitého tvaru (Czarnota & Guzew-Krzemińska 2010).

Chemismus: Methoxymikareová kyselina (Czarnota & Guzow-Krzemińska 2010).

Ekologie: Jedná se o lesní epifyt, který pravděpodobně neupřednostňuje určité druhy stromů/ forofyty. Také roste na trouchnivějících pařezech jehličnanů (Czarnota & Guzow-Krzemińska 2010).

Do roku 2007 byla *M. byssacea* považována za *M. micrococca* kvůli stejnému chemismu (Czarnota 2007). Po dalším zkoumání byly zaznamenány morfologické rozdíly, a proto byl vymezen druh *M. byssacea* (Czarnota & Guzow-Krzemińska 2010). *M. byssacea* se od *Micarea micrococca* liší tmavšími, většími apothecii obsahujícími *Sedifolia*-grey pigment. *M. byssacea* občas vytváří bledavá apothecia, která jsou větší a jejich zrníčkovitá stélka je vždy olivovější barvy a ne tak moučná jako *M. micrococca* s. str. (Czarnota & Guzow-Krzemińska 2010).

Z České republiky byla v minulosti *M. byssacea* publikována na úrovni formy jako *Biatora prasina*f. *byssacea* ze Ždárských vrchů (Kovář 1906).

V roce 2010 byl proveden fylogenetický výzkum evropských druhů *Micarea micrococca*, u kterého se na základě molekulárních metod zjistilo, že se nejedná o monofyletický druh. Díky těmto poznatkům byly z komplexu *M. micrococca* vymezeny tři taxony: *M. byssacea*, *M. micrococca* s. str. a nepojmenovaný taxon, který je přechodným morfotypem dvou zbylých taxonů (Czarnota & Guzow-Krzemińska 2010). Lichenologové Barton a Lendemer (2014) se od tohoto konceptu zdržují kvůli nedostatečnému množství molekulárních studií v Evropě a v Severní Americe. Taxon *M. micrococca* preferují v širším smyslu (Barton & Lendemer 2014), který navrhl Czarnota (2007).

Počet určených vzorků: 2.

***Micarea micrococca* s. str. (Körb.)Gams ex Coppins**

Morfologie: Stejná jako u *M. byssacea* s výše zmíněnými rozdíly. Stejně tak obsahuje mikareodní fotobionty s kulovitými buňkami (Czarnota et Guzow-Krzemińska 2010).

Chemismus: Methoxymikareová kyselina (Czarnota et Guzow-Krzemińska 2010).

Ekologie: Tento druh se hojně vyskytuje na bázi kmene jehličnanů i listnatých stromů. V evropských borech a smrčinách většinou pokrývá vlhké části kmene poblíž mechů nebo půdy. Nachází se v lesích různého stáří, ale jeho

nejčastějším výskytem jsou mladé kultury. Ve smrkových (jehličnatých) monokulturách je považován za hlavního kolonizátora kyselé borky. Občas se objevuje na spadlých kládách/kmenech nebo na kyselých horninách (Czarnota et Guzow-Krzemińska 2010).

Počet určených vzorků: 2.

***Micarea prasina* Fr. s. str.**

Morfologie: Stélka je rozšířená, zrníčkovitá až sorediální, bílozelená, jasně zelená až olivovozelená nebo olivová, složená z malých goniocyst obklopených hyalinními hyfami. Apothecia jsou různorodá ve velikosti i barvě (od pleťové do tmavě šedéhnědé). Obsahuje fotobionty mikareoidního typu. Stélka tohoto druhu je velmi variabilní. Pokud roste na měkkém dřevě, tak je stélka tlustá a bez apothecií. Naopak méně zřetelná až nenápadná (obzvláště když je pokryta nelichenizovanou řasou) stélka s apothecii pokrývá tvrdé dřevo nebo kůru stromů (Czarnota 2007).

Chemismus: Mikareová kyselina (Czarnota 2007)

Ekologie: Czarnota (2007) uvádí, že je tento druh častější v horských než v nížinných lesních oblastech. Druhy, rostoucí v horách, se především vyskytují na měkkém dřevě trouchnivých pařezů a ležících kmenech v doprovodu lignikolních mechů. V nížinách se také objevuje u báze stromů nebo na borce některých listnatých stromů. Nejčastěji byla zaznamenána v horských oblastech jedlo-smrkových a vyšších smrkových porostů. Nejvýše byla zaznamenána v nadmořské výšce 1500 m n. m. v Polsku ve Vysokých Tatrách (Czarnota 2007).

Druhu *M. prasina* se podobají druhy mající jasně zelenou, sterilní, sorediální stélku. Jedná se o druhy *Biatora chrysantha* (Zahlbr.) Printzen, *B. efflorescens* (Hedl.) Erichsen, *B. epixanthoides* (Nyl.) Diederich, *Micarea viridileprosa*, *Placynthiella dasaea* (Stirt.) Tønsberg, *Vezeadaea retigera* Poelt & Döbbeler a několik druhů *Bacidia* (*Bacidina*). *M. prasina* se od těchto zmíněných druhů liší obsahem mikareové kyseliny (Czarnota 2007).

Počet určených vzorků: 10.

***Micarea prasina* s. lat.**

Skupina *M. prasina* byla zkoumána mnoha vědci. Lichenolog Brian J. Coppins (1983) zjistil, že *M. prasina* s. lat. je složena ze tří různých chemotypů

obsahujících neidentifikované látky. Později byly identifikovány jako methoxymikareová, mikareová a prasinová kyselina (Elix et al. 1984, Coppins 1992). Tehdy methoxymikareová kyselina příslušela výhradně *M. micrococca*, mikareová kyselina pouze *M. prasina* s. str. a prasinová kyselina výhradně *M. subviridens* (Coppins 2002). Později bylo zjištěno, že mikareovou kyselinu neprodukuje pouze *M. prasina*, ale že je přítomna také v *M. nowakii* (Czarnota 2007).

***Micarea soralifera* Guzew-Krzemińska, Czarnota, Łubek & Kukwa**

Morfologie: Druh je charakterizován neurčitou stélkou v nesorediální části stélky, která vytváří na substrátu tenký šedozelený až jasně zelený povlak. V sorediálních částech je tvořena areoly, které jsou ploché až konvexní, brzy tvořící sorály. Sorály mají často modrošedý nebo nahnědlý nádech, který je způsobený pigmentací soredií. Apothecia se vyvíjejí zřídka. Apothecia, pokud jsou přítomna, a soredie obsahují *Sedifolia*-grey pigment. Fotobiont je chlorokokoidní, mikareoidní, s buňkami kulovitě až elipsovitého tvaru (Guzew-Krzemińska et al. 2016).

Chemismus: Mikareová kyselina, stopy neidentifikovaných sloučenin (Guzew-Krzemińska et al. 2016).

Ekologie: Vyskytuje se v listnatých lesích a zřídka v jehličnatých, ale vždy ve vlhkých a stinných podmínkách. Obvykle roste na rozpadajících se kmenech a málokdy na stojících živých kmenech (Guzew-Krzemińska et al. 2016).

Tento druh se velmi podobá druhu *M. prasina* s. str. – oba druhy jsou tvořeny zelenou stélkou a obsahují mikareovou kyselinu. *M. prasina* s. str. na rozdíl od *M. soralifera* nevytváří sorály. Mikareovou kyselinu také produkuje *M. nowakii* Czarnota & Coppins, která se liší černými apothecii a nepřítomností sorálů (Czarnota 2007, Guzew-Krzemińska et al. 2016).

Ostrůvkovité sorály jsou uvnitř rodu *Micarea* přítomny pouze u dalších čtyř druhů: *M. alectorialica* Brand et al., *M. coppinsii* Tønsberg, *M. pseudocoppinsii* Brand et al. a *M. viridileprosa* Coppins & van den Boom (Brand et al. 2014, (Guzew-Krzemińska et al. 2016)). *M. soralifera* může být dokonce zaměněna s druhy, které nepatří do rodu *Micarea*. Jedná se o druhy *Trapeliopsis flexuosa* (Fr.) Coppins & P. James, *Biatora chrysantha* (Zahlbr.) Printzen, *Trapelia corticola* Coppins & P. James a *Catillaria croatica* Zahlbr., která se od *M. soralifera* liší chemismem. Mimo *Catillaria croatica*, která neobsahuje žádný sekundární metabolit, ostatní produkují

gyroforovou kyselinu (Guzow-Krzemińska et al. 2016, Harris & Lendemer 2010, Kukwa et al. 2012, Tønsberg 1992).

M. soralifera je nově popsáný druh polskými lichenology (Guzow-Krzemińska et al. 2016), který patří do skupiny *Micarea prasina*. Zatímco *M. soralifera* produkuje mikareovou kyselinu, její fylogeneticky nejbližší příbuzný druh *M. subviridens* (Nyl.) Hedl. obsahuje prasinovou kyselinu. To znamená, že těsný fylogenetický vztah ne vždy souvisí se stejným či podobným chemismem (Guzow-Krzemińska et al. 2016). Na tuto skutečnost již poukázali např. Buschbom a Mueller (2006) nebo Nelsen a Gargas (2008, 2009) ve svých molekulárních pracích.

Počet určených vzorků: 1.

8. Diskuse

TLC analýzou bylo identifikováno 16 sekundárních metabolitů. Při identifikaci sekundárních metabolitů vždy záleží na zkušenostech badatele s jejich určováním. Z tohoto důvodu nebylo možné některé sekundární metabolity určit. Některé druhy byly analyzovány opakovaně (ve dvou TLC sadách) v případě, kdy bylo odebráno málo vzorku nebo, když vznikaly pochybnosti o R_f pozici dané látky. Neidentifikované sekundární metabolity by mohly být předmětem dalšího výzkumu lichenologů, na základě kterých by mohly být určeny druhy lišejníků ze zkoumaných území.

Na základě určených sekundárních metabolitů byly identifikovány druhy ze zájmových lokalit. Pro určení druhů nestačilo znát pouze jejich chemismus, vždy následovalo zkoumání morfologických znaků. Zkoumání morfologie bylo především nezbytné u druhů, které se vyznačovaly stejným chemismem, např. druhy *Lepraria finkii* a *Lepraria elobata*. Stejný chemismus v rámci rodu vykazovaly také některé druhy rodu *Micarea*. Methoxymikareovou kyselinu obsahuje *Micarea micrococca* i *Micarea byssacea*. Mikareová kyselina je charakteristická pro více druhů z rodu *Micarea*, proto byly morfologické znaky u druhů s touto kyselinou pečlivěji zkoumány. Ze zkoumaných druhů s touto kyselinou byly určeny druhy *Micarea prasina* s. str. a nově popsáný druh *Micarea soralifera*. U jednoho vzorku lišejníku byla identifikována mikareová kyselina, kterou obsahuje i *Micarea nowakii*. Tomuto druhu se zkoumaný vzorek lišejníku morfologicky i ekologicky nejvíce podobal. Jelikož nebyl druh s jistotou určen, nebyl zařazen do výsledného seznamu zjištěných druhů lišejníků.

Práce se věnovala především druhům z rodů *Lepraria* a *Micarea*. U obou rodů není dosud dořešena fylogeneze a taxonomie, proto jsou lichenology zkoumány pomocí molekulárních metod, na jejichž základě jsou neustále objevovány nové druhy. V rodě *Micarea* byl dokonce jeden z nově popsáných druhů identifikován během výzkumu v rámci této bakalářské práce. Tento druh *Micarea soraliifera*, byl určen přímo prof. Kukwou, jedním z autorů popisu. Sběr pochází z Jeseníků z lokality Bílá Opava 1 z přirozených smrkových porostů. Určité druhy rodu *Micarea* jsou velmi značně proměnlivé ve své morfologii a snadno zaměnitelné za blízkce příbuzné i vzdáleně příbuzné druhy, které se od nich mohou i jen nepatrně odlišovat. Navíc, podle posledních molekulárních výzkumů jsou oprávněné domněnky, že v rámci komplexů druhů (např. *Micarea prasina* a *M. micrococca*) existují i dosud nepopsané druhy, které komplikují identifikaci druhů. Z tohoto důvodu nebyly některé vzorky ani po zjištění chemických látek určeny do druhu.

Řada druhů z rodu *Micarea* nevykazuje žádné chemické metabolity. Jeden vzorek lišejníku, z kulturní bučiny Diana, právě žádný chemismus nevykazoval a jedná se o druh *M. tomentosa* nebo *M. hedlundii*, které byly zkoumány prof. Kukwou. Tento druh byl zařazen pouze do rodu, neboť neměl dobře vyvinuté pyknidy.

Některé vzorky vykazovaly takové sekundární metabolity, které mohly být jenom přibližně určeny. Problém vznikal v případech, že se ve srovnání s ostatními sekundárními metabolity nacházely na TLC desce v pozici, kde být neměly, nebo se skvrna lišil v barvě ve srovnání s obvyklou barvou, která byla uvedena v příloze 1 Orange et al. (2010). Jako příklad lze uvést vzorky, u nichž byla na základě TLC analýzy předběžně určena např. methoxymikareová kyselina. U těchto vzorků však nakonec konkrétní sekundární metabolit nebyl identifikován na základě nejistoty správného určení sekundárního metabolitu. V konkrétních případech vzorků s methoxymikareovou kyselinou se tedy mohlo jednat o druhy *Micarea micrococca* nebo *Micarea byssacea*. Problematické byly taktéž vzorky, které obsahovaly kyselinu divarikatovou. Kyselina divarikatová je u druhů rodu *Lepraria* doprovázena vždy buď zeorinem – *L. incana* nebo komplexem kyseliny stiktové (*L. finkii* nebo *L. elobata*). Mezi analyzovanými vzorky lišejníků se však nacházel jeden vzorek lišejníku, který obsahoval divarikatovou kyselinu bez doprovodu výše zmíněných látek. U tohoto vzorku se lze domnívat, že by se mohlo jednat o druh *Lecidea nylanderii*, který se v seznamu určených druhů nenachází. Měl by být určen specialistou.

Rozdíly mezi přirozenými a kulturními porosty v souvislosti s výskytem a počtem druhů nebylo možné statisticky hodnotit. Nebyl sbírán stejný počet vzorků z každé lokality a v některých lokalitách žádný. Všechny zkoumané lišejníky měly korovitou homeomerickou stélku, byly nepatrné a většina takových druhů tedy není možná určit v terénu. Dalším důvodem byl nerovnoměrný počet vzorků lišejníků sesbíraných z přirozených a kulturních porostů, určených k chemické analýze. Počet vzorků lišejníků z přirozených porostů (69) převyšoval počet sesbíraných vzorků z kulturních porostů (20). Ze setu náhodně sbíraných vzorků podle potřeby pro identifikaci (bez záměru pro následné statistické vyhodnocování) byl v materiálu nejhojněji zastoupen druh *Lepraria incana*. Vyskytoval se hojně ve smrčinách i v bučinách, což potvrzuje jeho velký areál rozšíření a širokou diverzitu ekologických nik, které je tento druh schopen osidlovat. Z rodu *Micarea* byl nejhojněji zastoupen druh *Micarea prasina* s. str. Druh byl zastoupen ve všech zkoumaných typech porostů kromě kulturní bučiny. Jeho nejčastějším substrátem bylo měkké dřevo trouchnivějících pařezů. Typ substrátu je v souladu s poznatky z odborné literatury (Czarnota 2007). Tento druh by se mohl vyskytovat i v kulturní bučině, z důvodu nízkého počtu sběrů v kulturní bučině nebyl však zaznamenán ani jeden vzorek tohoto druhu. Jedním z identifikovaných druhů byl vzácný druh *Lepraria umbricola*, který byl zaznamenán v kulturní smrčině v zájmové lokalitě Eustaška. Kukwa (2006) uvádí, že se jedná o druh vzácný, ale široce rozšířený. Substrátem tohoto identifikovaného druhu byla kůra smrku, na které by se měl tento druh vyskytovat. Druh zároveň vyžaduje humidní prostředí. Lokalita druhu se nacházela v údolí v částečně podmáčením lese.

9. Závěr

Hlavním cílem práce byla identifikace druhů na základě identifikovaných sekundárních metabolitů pomocí metody TLC. Z 89 vzorků lišejníků sesbíraných ze zájmových území bylo určeno 67, což je relativně vysoký počet. Zbylých 22 vzorků lišejníků by mohlo být v budoucnu předmětem výzkumu zkušených lichenologů.

Na základě TLC metody se nepodařilo všechny sekundární metabolity identifikovat. Došlo i k případům, kdy vzorky lišejníků nevykazovaly přítomnost žádných sekundárních metabolitů. Z těchto důvodů některé vzorky lišejníků nemohly být určeny do druhu.

Hlavním přínosem této práce je identifikace zcela nedávno popsaného druhu *Micarea soralifera*, která je novým druhem pro Českou republiku.

Snahou bylo porovnat zjištěné druhy smrčin a bučin. Bylo zjištěno, že druh *Lepraria incana* se vyskytuje ve smrčinách i bučinách, jak přirozených tak kulturních. Druhy *L. elobata*, *L. finkii*, *L. jackii*, *L. incana* a *M. prasina* s. str. byly zastoupeny ve smrčinách a bučinách. Většina z nich byla zastoupena v přirozených porostech. Přehled zjištěných druhů vyskytujících se ve smrčinách i bučinách nevypovídá nic o tom, že by se ostatní zjištěné druhy na základě chemické analýzy nemohly rovněž v těchto porostech vyskytovat. V terenu byly náhodně sbírány druhy, u který nebyl znám druh a nevědělo se, o jaký druh se jedná. Proto až po chemické analýze byly druhy identifikovány a některý druh byl identifikován vícekrát, např. *Lepraria incana*, která byla identifikována jednadvacetkrát.

Na základě Červeného seznamu druhů pro Českou republiku (Liška & Palice 2010) byl zaznamenán ohrožený druh (EN) *Trapelia corticola* z přirozeného smrkového porostu ze zájmové lokality Eustaška v Jeseníkách.

10. Použitá literatura

Adam D., Hort A. & Vrška T. (2007): Plán péče o Národní přírodní rezervaci Mionší na období 2009–2018. – AOPK ČR, Správa CHKO Beskydy, Horní Lomná

Andersen H. L. & Ekman S. (2005): Disintegration of the Micareaeae (lichenized Ascomycota): a molecular phylogeny based on mitochondrial rDNA sequences. *Mycological Research* 109: 21–30.

Barton J., & Lendemer J. (2014): *Micarea micrococca* and *M. prasina*, the first assessment of two very similar species in eastern North America. *Bryologist* 117: 223–231.

Bayerová Š. & Haas K. (2005): Toensbergianic acid, a new higher aliphatic diacid from the genus *Lepraria* (Ascomycota, Stereocaulaceae) – *The Bryologist* 108: 224–227.

Bayerová Š., Kukwa M. & Fehrer J. (2005): A new species of *Lepraria* (lichenized Ascomycetes) from Europe. – *Bryologist* 108: 131–138.

Boháč P. & Kolář J. (1996): Vyšší geomorfologické jednotky České republiky. – ČÚZK, Praha.

Brand A. M., Boom P. P. G van den & Sérusiaux E. (2014): Unveiling a surprising diversity in the lichen genus *Micarea* (Pilocarpaceae) in Réunion (Mascarenes archipelago, Indian Ocean). – *Lichenologist* 46: 413–439.

Coppins B. J. (1983): A taxonomic study of the lichen genus *Micarea* in Europe. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany Series* 11: 17–214.

Coppins B. J. (1992): *Micarea* Fr. (1825). In *The Lichen Flora of Great Britain and Ireland* (O. W. Purvis, B. J. Coppins, D. L. Hawksworth, P. W. James & D. M. More, eds): 371–384. London: Natural History Museum Publications.

Coppins B. J. (2002): Checklist of Lichens of Great Britain and Ireland. London: British Lichen Society.

Culberson C. F. (1970): Supplement to „Chemical and botanical guide to lichen products“. – *Bryologist* 73: 177–377.

Culberson C. F. & Culberson W. L. (2001): Future directions in lichen chemistry. – *The Bryologist* 104(2):230–234.

Czarnota P. (2007): The lichen genus *Micarea* (Lecanorales, Ascomycota) in Poland. – Polish Botanical Studies 23: 1–199.

Czarnota P. & Guzów-Krzemińska B. (2010): A phylogenetic study of the *Micareaprasina* group shows that *Micarea micrococca* includes three distinct lineages. – Lichenologist 42: 7–21.

Čihař M. (2002): Naše hory. – Ottovo nakladatelství, Praha.

Demek J. & Mackovčín P. (2006): Zeměpisný lexikon ČR: Hory a nížiny. – Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Brno.

Ekman S. & Svensson M. (2014): *Brianaria* (Psoraceae), a new genus to accommodate the *Micarea sylvicola* group. – The Lichenologist 46: 285–294.

Ekman, S. & Tønsberg, T. (2002): Most species of *Lepraria* and *Leproloma* form a monophyletic group closely related to *Stereocaulon*. – Mycological Research 106: 1262–1276.

Elix J. A. (2014): A Catalogue of Standardized Chromatographic Data and Biosynthetic Relationships for Lichen Substances. Third Edition. Elix, Canberra.

Elix J. A., Jones A. J., Lajide L., Coppins B. J. & James P. W. (1984): Two new diphenyl ethers and a new depside from the lichen *Micarea prasina* Fr. – Australian Journal of Chemistry 37: 2349–2364.

Elix J. A. & Stocker-Wöröggtter E. (2008): Biochemistry and secondary metabolites. In: Nash III T. H. (ed.): Lichen Biology (Second Edition). – Cambridge University, Cambridge, pp. 104–133.

Gawlikowska E. & Opletal M. (1997): Králický Sněžník. Geologická mapa pro turisty. [1:50 000]. – ed. Český geologický ústav, Praha.

Guzow-Krzemińska B., Czarnota P., Łubek A. & Kukwa M. (2016): *Micarea soralifera* sp. nov., a new sorediate species in the *M. prasina* group. – *The Lichenologist* 48: 161–169.

Hauck M. (2008): Metal homeostasis in *Hypogymnia physodes* is controlled by lichen substances. – Environmental Pollution 153:304–308.

Halda J. P. (2006): Interesting lichen records from Králický Sněžník Mts (Glatzer Schneeberg, Czech Republic). – In: Lackovičová A., Guttová A., Lisická E. & Lizoň P. (eds), Central European lichens – diversity and threat, p. 315–323, Mycotaxon Ltd., Ithaca.

Hale M. E. Jr. (1974): The Biology of the Lichens. Second Edition. – Edward Arnold, Baltimore.

Härtel H., Lončáková J. & Hošek M. (2009): Mapování biotopů v České republice: východiska, výsledky, perspektivy. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha.

Harris R.C. & Lendemer J.C., (2010): A review of *Lecania croatica* (syn. *Catillaria croatica*) in North America. – Opuscula Philolichenum 8: 41–49.

Hauck M. (2008): Metal homeostasis in *Hypogymnia physodes* is controlled by lichen substances. – Environmental Pollution 153:304–308.

Horsák M., Novák J. & Novák M. (2006): Prales NPR Mionší – malakozoologický ráj v Beskydech. – Malacologica Bohemoslovaca 5: 18–24.

Huneck S. & Yoshimura I. (1996): Identification of Lichen Substances. – Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Chytrý M., Kučera T. & Kočí M. (2001): Katalog biotopů České republiky. – AOPK Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha.

Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W. & Stalpers J.A. (2008): Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 10th Edition. CABI Europe – UK: [i]-xi, [1]-771.

Kocourková J. (2016): Metody sběru, preparace a herbářového zpracování lišejníků, mechorostů a hub a určovací metodika lišejníků 2016. – 48 pp., Ms. [Depon in: FŽP ČZU, katedra ekologie].

Kocourková J. & Vondrák J. (2017): Ukončení projektu – závěrečná zpráva. AKTIVITA 11. Lišejníky – indikátory fragmentace pralesovitých lesních porostů ČR. – 16 pp., Ms. [Depon in: FŽP ČZU, katedra ekologie].

Kubiak D. & Kukwa M. (2011): Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) w lichenologii. – In: Dynowska M. et Ejdyś E. (eds): Mikologia laboratoryjna: przygotowanie materiału badawczego i diagnostyka. – Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn, 176–190.

Kukwa M. (2002): Taxonomic notes on the lichen genera *Lepraria* and *Leproloma*. Annales Botanici Fennici 39: 225–226.

Kukwa M. (2004): *Lepraria incana* Ach. In Atlas of the Geographical Distribution of Lichens in Poland (U. Bielczyk, S. Cieslinski & W. Fałtynowicz, eds) 4: 45–57. Kraków: W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences.

Kukwa M. 2006: The lichen genus *Lepraria* in Poland. – Lichenologist 38: 293-305.

Kukwa M., Łubek A., Szymczyk R. & Zalewska A. (2012): Seven lichen species new to Poland. *Mycotaxon* 120: 105–118.

Laundon J. R. (1992): *Lepraria* in the British Isles. *Lichenologist* 24: 315–350.

Leuckert C., Kümmerling H. & Wirth W. (1995): Chemotaxonomy of *Lepraria* Ach. and *Lepruloma* Nyl ex. Crombie, with particular reference to Central Europe. – *Bibliotheca Lichenologica* 58:245–259.

Lendemer J. C. (2010): Notes on *Lepraria* s.l. (Lecanoromycetes, Ascomycota) in North America: New species, new reports, and preliminary keys. – *Brittonia* 62: 267–292.

Lendemer J. C. (2011.): A standardized morphological terminology and descriptive scheme for *Lepraria* (Stereocaulaceae). *Lichenologist* 43: 379–399.

Lendemer J.C. (2013): A monograph of the crustose members of the genus *Lepraria* Ach. s. str. (Stereocaulaceae, Lichenized Ascomycetes) in North America north of Mexico. – *Opuscula Philolichenum* 12: 27–141.

Liška J. & Palice Z. (2010): Červený seznam lišejníků České republiky (verze 1.1). *Příroda*, Praha, 29: 3–66.

Malíček J. 2012): Sekundární metabolity lišejníků a jejich význam pro taxonomii. – *Živa* 6: 276–278.

Merinero S., Bidussi M. & Gauslaa Y. (2015): Do lichen secondary compounds play a role in highly specific fungal parasitism? – *Fungal Ecology* 14: 125–129.

Míček M. (2002): Analýza vlivu lesního hospodaření na lesní ekosystémy v CHKO Jeseníky. – *Hnutí DUHA a Přátelé Jeseníků* – SOJKA, Brno.

Misař Z. (1983): Geologie ČSSR I, Český masív. – Státní pedagogické nakladatelství, Praha.

Nash III T. H. (2008): *Lichen Biology*. – Cambridge University Press, Cambridge.

Nelsen M. P. & Gargas A. (2008): Phylogenetic distribution and evolution of secondary metabolites in the lichenized fungal genus *Lepraria* (Lecanorales: Stereocaulaceae). – *Nova Hedwigia* 86: 115–131.

Nelsen M. P. & Gargas A. (2009): Assessing clonality and chemotype monophyly in *Thamnolia* (Lcmaadophilaceae). – *Bryologist* 112: 42–53.

Neuhäuslová Z. (1998): Mapa potenciální přirozené vegetace České republiky. – Academia, Praha.

Orange A., James P. W. & White F. J. (2010): Microchemical Methods for the Identification of Lichens. – British Lichen Society, London.

Průša E. & Holuša J. (1976): Prales Razula. Lesnictví, 22 (XLIX), 5: 343–368.

Quitt E. (1971): Klimatické oblasti Československa. Academia, Studia Geographica 16, GÚ ČSAV v Brně, Brno.

Tsurykau A., Golubkov V. & Bely P. (2016): The genus *Lepraria* (Stereocaulaceae, lichenized Ascomycota) in Belarus. – *Folia Cryptogamica Estonica* 53: 43-50.

Ranković B. (ed.) (2015): Lichen Secondary Metabolites. Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential. – Springer International Publishing Switzerland, Cham.

Slavíková-Bayerová Š. (2006): New and interesting records of *Lepraria* (Stereocaulaceae, Ascomycota) from the Czech Republic. – In: Lackovičová A., Guttová A., Lisická E. & Lizoň P. (eds), Central European lichens – diversity and threat, p. 97–107, Mycotaxon Ltd., Ithaca.

Śliwa L. & Kukwa M. (2012): New distribution data for sterile crustose lichens in the Polish Tatra Mts and its surroundings. – *Polish Botanical Journal* 57(1): 259–278.

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

Správa CHKO Jeseníky (2014): Plán péče o Národní přírodní rezervaci Králický Sněžník na období 2014–2023. – AOPK ČR. Správa CHKO Jeseníky, Jeseník.

Správa CHKO Český les (2015): Plán péče o Přírodní rezervaci Diana na období 2016–2024. – AOPK ČR, Regionální pracoviště Správa CHKO Český les, Přimda.

Správa CHKO Jeseníky (2016): Plán péče o Národní přírodní rezervaci Praděd na období 2016–2024. – AOPK ČR Správa CHKO Jeseníky, Jeseník.

Tolasz et al. (2007): Atlas podnebí Česka – Český hydrometeorologický ústav, Praha; Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.

Tomášek M. (2000): Půdy České republiky. – Český geologický ústav, Praha.

Tønsberg T. (1992): The sorediate and isidiate, corticose, crustose lichens in Norway. – *Sommerfeltia*: 1–331.

Van den Boom P. P. G. & Ertz D. (2014): A new species of *Micarea* (Pilcarpaceae) from Madeira growing on *Usnea*. – *Lichenologist* 46: 295–301.

Vondrák J. & Malíček J. (2016): Kdo najde víc, vyhrává – jedinečná metodavýzkumu lišejníkové diverzity. – Živa 2: XLI–XLII.

Wirth V., Hauck M., Schultz M. (2013): Die Flechten Deutschlands. Band 1, 2. – Eugen Ulmer KG, Stuttgart.

Yahr R., Florence A., Škaloud P.& Voytsekhovich A. (2015): Molecular and morphological diversity in photobionts associated with *Micarea* s. str. (Lecanorales, Ascomycota). – Lichenologist 47: 403-414.