

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
Katedra biologie

**Izolace vybraných sekundárních metabolitů
ze stélek různých druhů lišejníků pomocí TLC**

Bakalářská práce

Autor: Adéla Nosková
Studijní program: B0511A030001 Biologie a ekologie
Studijní obor: Biologie a ekologie
Vedoucí práce: RNDr. Josef Halda, Ph.D.



Zadání bakalářské práce

Autor: Adéla Nosková

Studium: S19BI060BP

Studijní program: B0511A030001 Biologie a ekologie

Studijní obor: Biologie a ekologie

Název bakalářské práce: **Izolace vybraných sekundárních metabolitů ze stélek různých druhů lišejníků pomocí TLC**

Název bakalářské práce AJ: Isolation of secondary metabolites from thalli of lichenized fungi using the TLC method

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Cílem bakalářské práce je zvládnutí techniky tenkovrstevné chromatografie (TLC) za účelem izolace sekundárních metabolitů. Lišejníky jsou známé produkcí unikátních metabolitů, které plní důležitou roli při udržování citlivé rovnováhy v rámci symbiózy mezi partnery v lišejníkové stélce, obraně proti predátorům a ochraně proti UV záření. Některé produkované metabolity mají antibiotické vlastnosti.

Calcott M.J., Ackerley D.F., Knight A., Keyzers R.A. & Owen J.G. (2018): Secondary metabolism in the lichen symbiosis. - Chemical Society Reviews, 47(5): 1730–1760.

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

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

Zadávací pracoviště: Katedra biologie,
Přírodovědecká fakulta

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

Datum zadání závěrečné práce: 23.1.2020

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové dne 11.5.2023

Adéla Nosková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Josefu Haldovi, Ph.D. za odbornou konzultaci, cenné rady a pomoc při práci v laboratoři, dále za jeho vstřícnost a velkou trpělivost, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Také děkuji svým rodičům za podporu a trpělivost v celém období tvorby práce.

ANOTACE

NOSKOVÁ, A. *Izolace vybraných sekundárních metabolitů ze stélek různých druhů lišejníků pomocí TLC*. Hradec Králové, 2023. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Josef Halda, Ph.D. 42 s.

Bakalářská práce se zabývá studiem lišejníkových látek nazývaných sekundární metabolity. Lišejníky se vyznačují produkcí velkého množství sekundárních metabolitů, z nichž většina je specifická pouze pro tyto organismy. První část práce literární rešerše se zabývá popisem, stavbou a rozdělením lišejníků, dále pak pojednává o sekundárních metabolitech, jejich funkci a významu jak pro člověka, tak i pro živočichy. Je zde popsána také metoda chromatografie, její rozdělení a princip. V praktické části bakalářské práce jde o výzkum obsahu sekundárních metabolitů ve stélkách různých druhů lišejníků, které byly izolovány pomocí metody tenkovrstvé chromatografie. V závěru práce jsou pak uvedeny výsledky výzkumu.

KLÍČOVÁ SLOVA

lišejník, sekundární metabolity, chromatografie, TLC

ANNOTATION

NOSKOVÁ, A. *Isolation of selected secondary metabolites from thalli of lichenized fungi using the TLC method*. Hradec Králové, 2023. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor RNDr. Josef Halda, Ph.D. 42 p.

The bachelor thesis deals with the study of lichen substances called secondary metabolites. Lichens are characterized by the production of a large number of secondary metabolites, most of which are specific only to these organisms. The first part of the literary research work deals with the description, structure and division of lichens, then discusses about secondary metabolites, their function and meaning, both for humans and animals. The method of chromatography, its division and principle are also described here. In the practical part of the bachelor's thesis, it concerns the research of the content of secondary metabolites in the thallus of various species of lichens, which were isolated using the thin-layer chromatography method. At the end of the work, the results of the research are presented.

KEYWORDS

lichen, secondary metabolites, chromatography, TLC

Obsah

Úvod	8
1 Lišejníky	9
1.1 Symbióza nebo mutualismus	9
1.1.1 Mykobiont.....	11
1.1.2 Fotobiont.....	11
1.2 Vybrané druhy lišejníků obsahující metabolity vhodné k izolaci..	12
1.3 Sekundární metabolity lišejníků	17
1.3.1 Význam sekundárních metabolitů.....	18
1.3.2 Zkoumané sekundární metabolity	19
1.4 Chromatografie	22
1.4.1 Princip chromatografie.....	23
1.4.2 Tenkovrstvá chromatografie (TLC).....	24
2 Metodika	25
2.1 Postup vyvolání desky	25
2.2 Určení sekundárních metabolitů.....	28
3 Výsledky	29
3.1 Izolované sekundární metabolity.....	29
4 Diskuse	30
Závěr	31
Seznam použité literatury	32
Přílohy.....	40

Úvod

Zajímá mě práce v laboratoři, a proto mě zaujalo téma izolace lišejníkových látek. Je obecně známo, že lišejníky tvoří ekologickou skupinu a jejich stélku skládají dva nebo více organismů. Symbióza, častěji označovaná jako mutualismus, představuje spolupráci fylogeneticky velmi vzdálených organismů (houba, sinice, řasa). Vzájemná spolupráce všech těchto prvků v lišejníku z něj tvoří celkově velmi odolný organismus, který umožňuje osídlení extrémních stanovišť od polárních oblastí po tropy. Jsou skvěle adaptovány na prostředí s nedostatkem vody a bez obtíží snášejí sucho, horko i mráz. Proti nadměrné radiaci se například chrání vytvářením specifických látek označovaných jako lišejníkové látky, lišejníkové kyseliny nebo obecně sekundární metabolity. Jsou to biologicky aktivní látky zajišťující lišejníkům různé výhody a funkce. Slouží například jako ochrana proti býložravcům a UV záření, mnoho z nich se vyznačuje farmakologickými účinky a jsou využívány k výrobě léčiv nebo jiných podpůrných produktů. Další jsou využívány v potravinářství, kosmetickém průmyslu a v zemědělství. Nejoceňovanější sekundární metabolity jsou látky s antibiotickými účinky.

Cílem práce je shrnutí základních a nejdůležitějších poznatků o lišejníkových látkách a jejich izolaci pomocí metody tenkovrstvé chromatografie (TLC), která se nejvíce využívá k identifikaci sekundárních metabolitů lišejníků.

Izolované metabolity budou použity pro společný projekt s univerzitou v Istanbulu (účinek metabolitů jako antibiotický agens).

1 Lišejníky

1.1 Symbióza nebo mutualismus

Lišejníky – lichenizované houby nejsou skupinou taxonomickou, nýbrž tvoří ekologickou skupinu, fylogeneticky náležející do různých skupin říše hub, převážně vřeckovýtrusných (Honegger, 2022). Na rozdíl od rostlin nejsou jednotným organismem, tělo tvoří více partnerů s různým stupněm vzájemné vazby (Van Beneden, 1875). Symbiotický vztah ve stélce přítomných partnerů – houby a sinice, případně řasy je označován jako mutualismus (Ametrano, et al., 2022). Houbového symbionta označujeme jako mykobiont a je jím vždy houba. Fotobionta zastupují různé zelené řasy (fytobionti) nebo sinice (cyanobionti) (Štiková, 2015). Mykobiont poskytuje ochranu, zabezpečuje příjem vody, minerálů a anorganických látek a se svou větší biomasou udává tvar stélky a reguluje množení fotobionta. Fotobiont poskytuje organické sloučeniny a zprostředkovává fotosyntézu, jejími produkty pak zásobuje mykobionta (Nguyen, et al., 2013), (Kremer, et al., 1998). Tvar lišejníků je primárně určován mykobiontem. Pouze v několika případech jsou známé lišejníky, ve kterých určuje vzhled celé stélky fotobiont, například ve vláknitých rodech *Coenogonium*, *Ephebe*, *Cystocoleus* a *Racodium* (Bláha, 2017).

Vnější stavba těla lišejníku představuje jednotný útvar, který není nijak podobný ostatním rostlinám. Lišejníky nemají kořeny, stonek ani listy. Tělo lišejníku se nazývá thallus (stélka) (Dreyer, et al., 2019). Na základě celkového vzhledu, tvaru a růstu stélek dělí lišejníky na tři typy: korovité, lupenité a keříčkovité. Korovité jsou nejdrobnější a zpravidla nejméně nápadné stélky, proto jsou někdy nazývány mikrolišejníky. Jsou pevně přichyceny k podkladu a vzhledem k tomu, že vytváří velmi nízké potahy na skalnatých plochách, není možné odebrat jejich vzorek, aniž by došlo k poškození stélky. Tyto lišejníky často obrůstají skaliska, kameny, balvany, kořeny a borky stromů (Dostál, 2006). Lupenité stélky jsou také pevně připevněny k podkladu, ale lupínky na okrajích stélky přichyceny k podkladu nejsou. Druhy s tímto typem stélky nejčastěji najdeme na borce stromů. Posledním, nejnápadnějším typem stélky je stélka keříčkovitá. Bohatě se větví a v příznivých podmínkách může dorůstat délky až několika metrů (Esseen, et al., 2023).

Laloky keříčkovité stélky mají protáhlý vlásčitý, pásovitý nebo keříčkovitý tvar. Mohou být ploché nebo válcovité (Büdel, et al., 2008). Keříčkovitá stélka se dá lehce odstranit či vyjmout z podkladu, protože k němu přirůstá jen na jednom místě (Dostál, 2006).

Lišejníky představují jednu z neúspěšnějších forem vzájemného soužití v přírodě. Mohou se rozmnožovat jak pohlavně – pomocí výtrusů, tak i nepohlavně – takzvaným vegetativním způsobem, fragmentací stélky (Nash, 2008).

Lišejníky jsou využívány jako indikátory kvality ovzduší (Abas, 2021). I přes to, že lišejníky nejsou schopny aktivní regulace příjmu vody a patří mezi poikilohydrické organismy (organismy, u nichž se značně mění obsah vody – střídavě vysychají a opět přijímají velké množství vody, aniž by tím utrpěly) (Liška, 2000), jsou schopny přežívat na extrémních stanovištích, především s minimem vody a živin (Round, 1984). Mezi extrémní lokality výskytu lišejníků patří například holé skály, písčité půdy nebo horské oblasti s vyšší nadmořskou výškou (Balabán, 1960). Především horské oblasti jsou velice bohaté na výskyt lišejníků. Jejich život je vázán na přítomnost vody ve stélce. Vzhledem k tomu, že nemají speciální orgány pro příjem vody, přijímají vodu celým povrchem těla. Zároveň však nejsou schopny vodu udržet, a proto je pro jejich život typické neustálé střídání vlhké a suché stélky (Liška, 2000).

Růst lišejníků je velice pomalý. Důvodů pomalého růstu může být několik. Nejčastěji s tím souvisí právě extrémní podmínky a vlhkost stélky. Totiž v extrémních podmínkách jsou lišejníky schopny přečkávat mnohdy i dlouhá období v latentní fázi (spánku) (Kalina, et al., 2005). Ve fyziologickém spánku odolávají jak nízkým teplotám, tak i vysychání, a přežijí tudíž velice dlouho bez jakéhokoliv poškození (Liška, 2000). Pro spoustu biologických výzkumů mají nepostradatelný význam, jelikož jsou schopny přežívat teploty od - 196 °C do +100 °C (Čeněk, 2009).

Naše lišejníková flóra v Krkonoších v minulosti patřila a stále patří k nejbohatším ve střední Evropě (Kossowska, 2011). Hlavním důvodem je pestrá geologická stavba, velká diverzita biotopů a horské podmínky s vyšším podílem srážek zajišťující vzdušnou vlhkost. Lišejníková flóra Krkonoš čítá přes 200 rodů a více než 600 druhů lišejníků. Nejpočetnějšími rody jsou dutohlávka (*Cladonia*), misnička (*Lecanora*) a mapovník (*Rhizocarpon*) (Kossowska, 2011).

Lišejníky jsou vytrvalé a dlouhověké, mohou být pozorovány a sbírány po celý rok (Flousek, et al., 2007).

1.1.1 Mykobiont

Mykobiont – houbová složka lišejníku vytváří velmi podstatnou část celého těla lišejníku. Mykobiont určuje systematické zařazení (vědecké jméno lišejníku) (Printzen, 2010). Zajišťuje příjem vody a minerálních látek, tvoří stélku a je rozhodující složkou pohlavního a nepohlavního rozmnožování. Do několika vrstev stratifikované tělo lišejníku (tzv. heteromerická stélka) určuje množství dopadajícího záření a usnadňuje výměnu plynů fotobionta (Kalina, et al., 2005). Mykobionty jsou z 98 % zástupci vřeckovýtrusných hub (*Ascomycetes*). Každý druh lišejníku je tvořen specifickým druhem mykobionta, vázaným na jeden druh fotobionta. Existují však výjimky, kdy stejný mykobiont je schopný vytvářet morfologicky odlišné lišejníkové stélky (fototypy či fotomorfy) nebo různé lišejníky s různými fotobionty. Mykobionty se také mohou vyskytovat samostatně jako aposymbiotické organismy, ale v přírodě se téměř výhradně vyskytují jako symbionty (Printzen, 2010). Mykobiont určuje rozčlenění stélky lišejníku do několika vrstev: svrchní kůry, dřene a někdy spodní kůry. Právě dřeň (tzv. gonidiová vrstva) obsahuje buňky fotobionta (Sedlářová, et al., 2004).

1.1.2 Fotobiont

Fotobiont – řasová (fykobiont) nebo sinicová (cyanobiont) složka lišejníku tvoří 5 – 10 % celé biomasy lišejníku (Sedlářová, et al., 2004). Fotobiont tvoří v lišejnících téměř 40 rodů zelených a hnědých řas a 13 rodů sinic (Sanders, et al., 2021). Jako zelené řasy se nejvíce uplatňují rody *Trebouxia*, *Trentepohlia* a ze sinic rod *Nostoc*. Z cytologického hlediska můžeme fotobionty rozdělit na eukaryotické a prokaryotické. Rody *Trebouxia* a *Trentepohlia* jsou eukaryotické organismy patřící do zelených řas (*Chlorophyta*). Prokaryotičtí fotobionti jsou sinice, kam patří rod *Nostoc*, *Stigonema* nebo *Gloeocapsa* (Honegger, 2022). Někteří zástupci fotobiontů žijí volně v přírodě (Borgato, et al., 2022).

Fotobionty slouží v lišejnících k zajištění všech fotochemických dějů a poskytují jejich uhlíkaté metabolity houbě. Houbová vlákna oplétají buňky fotobionta a odčerpávají z nich asi 50 % produktů fotosyntézy (Sedlářová, et al., 2004).

1.2 Vybrané druhy lišejníků obsahující metabolity vhodné k izolaci

***Bryoria fuscescens* – vousatec hnědavý**

Vousatec vytváří nápadnou keříčkovitou stélku. Je zelenošedé až hnědavé barvy (DALIB.CZ, 2020). Dlouhé převislé nitkovité větve stélky se nepravidelně větví. Roste hlavně v zachovalých lesních ekosystémech v horských oblastech na větvích a kmenech jehličnanů. Místy se vyskytuje i v nižších polohách, například v opuštěných sadech. Nedávno byl nalezen v Průhonickém parku (Liška, 2012). Kromě jehličnanů roste také na skalách a v okolí porostů trnek a hlohů (DALIB.CZ, 2020). Vyskytuje se v podstatě po celé severní polokouli. Jeho stélka může obsahovat kyselinu alektoriovou, která vykazuje silnou antivirovou aktivitu proti respiračnímu syncytiálnímu viru (Omarsdottir, et al., 2006).

***Cladonia bellidiflora* – dutohlávka chudobkokvětá**

Dutohlávka chudobkokvětá je červenoplodá dutohlávka, jejíž primární stélka je tvořena šedozelenými šupinami. Žlutozelená podétia jsou hustě porostlá velkými šupinami. Podétia se téměř nevětví a netvoří pohárky (DALIB.CZ, 2020). Na vrcholech podeítií vyrůstají velké červené plodnice. Hojně roste v horských oblastech na kyselé půdě, rašeliništích, mezi mechy, na balvanitých svazích nebo v různých štěrbinách (Halda, et al., 2016). Preferuje především vlhká místa, nejčastěji tedy plochy s dlouho přetrvávající sněhovou pokrývkou (DALIB.CZ, 2020). Rozšířena je v Evropě, Asii, Severní a Jižní Americe, na Novém Zélandu, a dokonce i v Antarktidě. V Evropě je tento lišejník vázán hlavně na vyšší pohoří. U nás je běžný na hřebenech Krkonoš, Šumavy, Kralickém Sněžníku a v Jeseníkách (Halda, et al., 2016). Dutohlávka obsahuje kyselinu squamatovou a rodokladonivou. Bylo prokázáno, že kyselina squamatová má antioxidační, antimikrobiální, cytotoxické a protirakovinné účinky (Paluszczak, 2018).

***Cladonia borealis* – dutohlávka severní**

Dutohlávka severní se vzhledem podobá dutohlávce červcové (*Cladonia coccifera*). Spolehlivě od sebe oba druhy odlišují obsahové látky a destičkové šupiny na povrchu podeštíí. Dutohlávka severní tvoří pravidelné knoflíkovité/puchýřnaté destičky, zatímco dutohlávka červcová tvoří nepravidelné šupinové destičky (DALIB.CZ, 2020). Nejvíce se vyskytuje v horských oblastech na severu a subpolárních oblastech, kde roste na minerální půdě nebo silikátových skalách. V ČR je druh nejhojnější v podhorských oblastech a horách na kyselých skalách (DALIB.CZ, 2020). Dutohlávka obsahuje kyselinu usnovou a kyselinu barbatovou. Obě kyseliny mají farmakologické účinky a využívají se ve farmacii, lékařství nebo v kosmetickém průmyslu (Ingólfssdóttir, 2002), (Wang, 2017).

***Evernia prunastri* – větvičník slívový**

Větvičník slívový, lidově nazývaný dubový mech, je typický svou vidličnatě větvenou žlutozelenou sorediální stélkou s bílými stranami spodních větví (DALIB.CZ, 2020). Keříčky lišejníku jsou tvořeny plochými větvemi, visícími volně dolů. Spodní strana větví je bílá. Hojně se vyskytuje od nížin po hory většinou na starých kmenech, na větvích listnatých stromů a keřů a vzácně i na skalách. Může však růst i na jehličnanech (Pavlovičová, 2013). Jeho celkový výskyt je rozsáhlý, roste v oblastech Eurasie, Severní Ameriky a severní Afriky. U nás má tento lišejník velice širokou ekologickou valenci (DALIB.CZ, 2020). Větvičník slívový je považován za léčivou rostlinu, vyrábí se z něj tak různé tinktury a extrakty. Obsahuje kyselinu usnovou, která má silné antibiotické účinky, a to především v oblasti dýchacích cest a žaludku. Působí také proti některým virům, léčí dvanáctníkové a žaludeční vředy a zlepšuje vstřebávání živin (Kadaňka, 2020).

***Flavoparmelia caperata* – terčovka svažštělá**

Tento druh terčovky se u nás řadí mezi největší terčovky. Je typická svým šedozeleým, po zvlhčení žlutozeleým zbarvením a puchýřkovitými sorály (DALIB.CZ, 2020). Stélka je nepravidelná nebo růžicovitá, poskládaná z laloků. Roste především v nižších a středních polohách na otevřených stanovištích, na kůře listnatých stromů, nejvíce dubů. Vzácněji se vyskytuje i na křemičitých horninách (Halda, et al., 2016).

Terčovka svažšťělál je poměrně citlivá na znečišťěné ovzduší, ve střední Itálii byla dokonce po dobu 14 let využívána jako indikátor znečišťění kolem skládky. Lišejník odhalil zvýšené ukládání některých prvků (Fe, Cr, Cd, Ni) a snížení rozmanitosti druhů lišejníků na místech kolem rozšiřující se skládky (Paoli, et al., 2012). Její výskyt se vlivem znečišťění poměrně omezil i u nás jen na určitá stanovišťě. Můžeme ji pozorovat především v okolí říčních toků (kolem Labe, Vltavy, Dyje nebo Berounky). V současné době, s úbytkem znečišťění, ji můžeme opět najít v nižších polohách, kde se vyskytuje hojně (DALIB.CZ, 2020). Terčovka svažšťělál obsahuje kyselinu kaperátovou a protocetrarovou, které mají cytotoxické a protizánětlivé účinky (Dieu, et al., 2020).

***Lecanora saxicola* – misnička zední**

Misnička zední je zelenobílý lišejník s korovitou stělkou, na okrajích s lalůčky (tzv. plakodiovitá stělka). Stělka je uprostřed hustě porostlá miskovitými plodnicemi, které mají tmavě zelenou barvu (Pavlovičová, 2013). Řadí se mezi saxikolní lišejníky a osídluje hlavně vápnité substráty, jako jsou vápence. Často roste na omítkách, náhrobních kamenech, betonu, asfaltu nebo i na střešních taškách (DALIB.CZ, 2020). U nás je velice běžný, vyskytuje se od nížin až po nejvyšší polohy Krkonoš. Vyhledává otevřená stanovišťě s dostatkem živin. Rod *Lecanora* je velmi početný a rozmanitý a má kosmopolitní rozšíření (Weber, et al., 2007). Tento rod často obsahuje sekundární metabolit zeorin, který má silné antibakteriální a antimikrobiální účinky a využívá se při léčbě různých onemocnění způsobených mikroorganismy (Kosanic, et al., 2010).

***Lecidea confluens* – šálečka splývající**

Tento druh šálečky je poměrně nápadný a zajímavý svým vzhledem. Tvoří rozsáhlé souvislé šedé povlaky, na kterých jsou rozesety skupinky černých hustě nahloučených apotecií. Roste na skalách v horských oblastech na silikátech nebo kyselých vulkanitech. Preferuje vlhčí stanovišťě, nejčastěji plochy s dlouho přetrvávající sněhovou pokrývkou. V ČR je lišejník hojný v Krkonoších, Jeseníkách, na Šumavě, v Českém středohoří nebo v Brdech (DALIB.CZ, 2020).

***Lepraria membranacea* – prášenka blanitá**

Prášenka blanitá je dobře rozeznatelný druh lišejníku (DALIB.CZ, 2020). Od ostatních druhů se odlišuje nápadně laločnatým okrajem stélky (Gažovčiak, 2017). Osídluje převážně silikátové skály, kamenné stěny, stromy s kyselou borkou (borovice, duby) nebo se může i výjimečně vyskytovat na starých kmenech stromů. Druh je rozšířen kosmopolitně. V České republice je hojný po celém území od nížin do hor (DALIB.CZ, 2020). Prášenka obsahuje atranorin, který je považován za jeden z nejrozšířenějších sekundárních metabolitů u lišejníků a v TLC chromatografii se používá jako standard (Malíček, 2012).

***Letharia vulpina* – větvičník žlutý**

Větvičník žlutý je epifytický keříčkovitý lišejník, který roste na kůře jehličnanů, holém dřevě, na různých otevřených stanovištích, může osídlovat i různé dřevěné ploty, telegrafní sloupy, šindelové střechy a vzácně ho nalezneme i na skalách (Marková, 2011). Díky své výrazně žluté až žlutozelené barvě je nepřehlédnutelným lišejníkem. Vyskytuje se především v Severní Americe, Asii a Africe (Dětinský, et al., 2000). Nejvíce lokalit v Evropě se nachází v horách. V ČR byl vždy velmi vzácný s výskytem v pohraničních oblastech (Šumava, Jeseníky, Krkonoše, České Švýcarsko) (Marková, 2011). Zmínka o sběru tohoto lišejníku u Českého Švýcarska pochází z roku 1905. Od roku 2016 je monitorován na lokalitě ve Vlasenicích u Kamenice nad Lipou (DALIB.CZ, 2020). Jedná se však o druh zařazený v Červeném seznamu lišejníků České republiky jako druh kriticky ohrožený (Marková, 2011). Stélka větvičníku žlutého obsahuje velké množství jedovaté kyseliny vulpinové. Tato kyselina se v minulosti používala v Evropě, především ve Skandinávii, k otravě predátorů. Extrakty z této kyseliny však prokázaly také silné antimikrobiální účinky, a je tedy vhodná například k léčbě žaludečních potíží (Shrestha, et al., 2015).

***Phlyctis argena* – měchýřovka stříbřitá**

Měchýřovka stříbřitá je lišejník s okrouhlou stélkou stříbřité šedé až bělavé barvy. Na okraji je ohraničená prvostélkou (*prothallus*) (NatureSpot, 2009). Roste především na kůře listnatých stromů, méně často jehličnanů, také může růst na povrchu mechů a řadí se mezi první kolonizátory hladké kůry. Vyskytuje se po celé Evropě v lesích nebo i v otevřené krajině.

U nás se vyskytuje od nížin do hor (ČMS, 2004). Stélka lišejníku vytváří kyselinu norstiktovou, která se reakcí s KOH sráží do jehlicovitých, krvavě červeně zbarvených krystalů. Je významná v medicíně při vývoji léčiv proti rakovině prsu (Ebrahim, et al., 2016). Kyselina norstiktová je standardem pro izolaci lišejníkových látek pomocí TLC (Orange, et al., 2010).

***Rhizocarpon lecanorinum* – mapovník misničkovitý**

Mapovníky patří mezi nejnápadnější lišejníky se žlutou stélkou. Tvoří korovitou stélku sestavenou ze žlutých areol podkovovitého tvaru, které jsou uprostřed přerušené černými apotécií. Okraj stélky lemují po obvodu černá prvostélka (*protallus*, hyfy houby bez fotobionta) (DALIB.CZ, 2020). Druh roste v podhorských až vysokohorských oblastech na silikátových a ultrabazických skalách a balvanech (Halda, et al., 2016). Preferuje osluněná stanoviště s dostatkem dešťových srážek (DALIB.CZ, 2020). Po určitém čase porůstá také antropogenní substráty, například staré střešní tašky. Vyskytuje se v Evropě, Asii, Africe a Severní Americe (Halda, et al., 2016). V celé Evropě se tento druh mapovníku řadí mezi běžné zástupce rodu (Nimis, et al., 2022). Je hojný po celém našem území, nejvíce však na hřebenech hor (Halda, et al., 2016). Obsahuje kyselinu stiktovou a rhizokarpovou. Kyselina rhizokarpová funguje jako filtr proti nadměrné radiaci a chrání buňky fotobionta (Meessen, et al., 2013). Některé výzkumy potvrzují její odolnost proti radioaktivitě (Villar, et al., 2005).

***Xanthoparmelia pulla* – terčovka tmavá**

Terčovka tmavá vytváří lupenitou stélku, která je pevně přichycena k podkladu. Skládá se z tmavohnědých lesklých laloků, které jsou směrem ke středu zvrásnělé. Často tvoří široké splývající růžice (Gažovčiak, 2017). Podobných druhů existuje více a často se zaměňují. Nejspolehlivější je určování podle obsahu sekundárních metabolitů (DALIB.CZ, 2020). Hlavní obsahovou látkou je kyselina stenosporová s antimikrobiálními účinky (Candan, et al., 2006). Roste na silikátových skalách a kamenech, na eutrofizovaných a antropogenních stanovištích. U nás druh roste roztroušeně po celém území (DALIB.CZ, 2020).

1.3 Sekundární metabolity lišejníků

Živé organismy jsou schopny produkovat mnoho primárních metabolitů, jako jsou aminokyseliny, sacharidy a fotosyntetické pigmenty. Produkují ale také řadu sekundárních metabolitů, látek, které nejsou v krátkodobém měřítku pro život jedince zcela nezbytné. Jednou ze skupin organismů, které tvoří neobvykle velké množství různých sekundárních metabolitů, jsou lišejníky (Malíček, 2012).

V lišejnících se vyskytují dvě skupiny metabolitů. Jsou to metabolity intracelulární (primární) a extracelulární (sekundární). Sekundární metabolity jsou produkty podmíněné soužitím mykobionta a fotobionta ve stélce. V současné době je známo více než 1050 sekundárních metabolitů (Stocker - Wörgötter, 2008).

Sekundární metabolity lišejníků jsou produkovány mykobiontem. Tím jsou v absolutní většině případů houby ze skupiny *Ascomycota*, méně často pak ze skupiny *Basidiomycota*. Ukládají se ve formě malých krystalků extracelulárně na vnějším povrchu houbových vláken (Orange, et al., 2010). Tyto látky jsou ve vodě nerozpustné a mohou být extrahovány pouze organickými rozpouštědly, například acetonem. Často mají kyselou povahu, z tohoto důvodu byly dříve označovány jako lišejníkové kyseliny (Jarkovský, 1978). Lišejníkové látky mohou tvořit až 20 % sušiny stélky. Ukládají se v kůře nebo ve dřeni. V kůře bývají obsaženy barevné látky a ve dřeni látky bezbarvé (Jarkovský, 1978). Přítomnost některých látek někdy bývá patrná na první pohled, protože mohou určovat barvu lišejníku. K nejčastějším sekundárním metabolitům patří kyselina usnová, která způsobuje žlutozelené zbarvení provazovek (*Usnea*), atranorin určuje šedou barvu terčovníků (*Physcia*), parietin žlutooranžovou stélku terčovníku zedního (*Xanthoria parietina*) a kyselina rodoklanová způsobuje nápadné červené zbarvení plodnic některých dutohlávek (*Cladonia*) (Malíček, 2012).

U syntézy lišejníkových látek se rozlišují tři základní biosyntetické dráhy: dráha kyseliny šikimové, dráha kyseliny mevalonové a acetyl-polymalonylová dráha (Nash, 2008).

K detekci lišejníkových látek slouží velké množství různých metod, mezi které patří například reakce stélky na dlouhovlnné UV záření, mikrokrytalizační testy nebo chromatografie.

1.3.1 Význam sekundárních metabolitů

Sekundární metabolity lišejníků a jejich funkce v organismu jsou stále velmi málo prozkoumanou oblastí. Lišejníkové látky z některých druhů jsou dlouhou dobu využívány člověkem jako barviva. Jiné slouží kléčebným účelům, jako složky léčivých čajů. Některé jsou významnou složkou při výrobě parfémů a mohou mít také antibiotické a protirakovinné účinky (Jarkovský, 1978). Sekundární metabolity plní také ochrannou funkci. Přítomnost kyselin způsobuje hořkou chuť stélky (např. kyselina fumarprotocetrarová), která odrazuje většinu herbivorních živočichů od jejich konzumace, a tmavé barvivo chrání druhy před poškozením ze slunečního záření (Černajová, 2013), (Kalina, et al., 2005).

V samotném lišejníku mají tyto látky různé úlohy, avšak u většiny z nich funkci zatím neznáme. Uplatňují se v kompetici s jinými organismy nebo pomáhají přežít v extrémních podmínkách, mohou působit jako inhibitory růstu rostlin a enzymové aktivity, chrání lišejník před býložravci, symbiotickou řasu chrání před nadměrným UV zářením, mají vliv na propustnost membrán fotobiontů nebo vznikají jako takzvané stresové metabolity (Lumbsch, 1998).

Některé sekundární metabolity však mohou být škodlivé nebo dokonce až toxické. Například lišejník *Letharia vulpina* obsahuje toxin kyselinu vulpinovou. V minulosti byl používán k trávení především lišek a vlků. Metabolit je toxický i pro hmyz a měkkýše. Myši a králíci jsou vůči jedu rezistentní. Lišejníky, které obsahují deriváty kyseliny vulpinové, jsou prudce jedovaté. Kyselina vulpinová působí na centrální nervový systém a prudce zrychluje dýchání, které vede k hyperventilaci a zástavě dechu. Dermatitidy, alergické reakce a podráždění mohou způsobovat kyselina usnová, kyselina evernová, kyselina fumarprotocetrarová, kyselina stiktová a atranorin. Atranorin a kyselina stiktová mohou způsobovat také fotosenzitivaci kůže (Kalina, et al., 2005).

Ne všechny druhy lišejníků obsahují sekundární metabolity, chybějí například u většiny cyanolišejníků (fotobiontem je sinice) a také u pyrenokarpních lišejníků (typem plodnice je perithecium). Zde se při determinaci musíme spoléhat na anatomické a morfologické znaky (Malíček, 2012).

Významnou roli hrají lišejníkové látky také v taxonomii. Používání obsahu chemických látek k determinaci lišejníků se datuje již od 70. let 20. století (Walker, et al., 1980). Možnost detekce sekundárních metabolitů napomohla rozvoji taxonomie mnoha známých druhů lišejníků zejména rodů provazovka (*Usnea*), vousatec (*Bryoria*) a dutohlávka (*Cladonia*) (Malíček, 2012). V taxonomii jsou sekundární metabolity běžně využívány již od konce 2. světové války a dávají naději dalších nových objevů v budoucnu, například v medicíně (Culberson, et al., 1994).

1.3.2 Zkoumané sekundární metabolity

kyselina gyroforová

Kyselina gyroforová se řadí mezi tridepsidy. Pro své cytotoxické účinky se využívá k inhibici růstu buněk (Kumar, et al., 1999). Stavbou patří k nejjednodušším lišejníkovým kyselinám. Působí jako antioxidant, filtr omezeně propouštějící UV záření, je složkou mastí proti stárnutí a také se přidává do přípravků k hojení ran. Své využití našla v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu (Mohammadi, et al., 2022).

kyselina norstiktová

Kyselina norstiktová slouží jako standard pro tenkovrstvou chromatografii. Relativní hodnota retenčního faktoru při použití systému C je 30 (Orange, et al., 2010). Reakcí s KOH vytváří jehlicovité červené krystaly. Barva skvrny kyseliny norstiktové po aplikaci kyseliny sírové a následném vypálení je jasně žlutá (Orange, et al., 2010). Tato kyselina je také významná v medicíně při vývoji léčiv proti rakovině prsu (Ebrahim, et al., 2016).

kyselina usnová

Kyselina usnová se stala jedním z nejrozsáhleji studovaných metabolitů. Její retenční faktor při použití systému C je 71 (Orange, et al., 2010). Najdeme ji u lišejníků *Cladonia diversa*, *Flavoparmelia caperata* nebo *Xanthoparmelia conspersa*. Má antioxidační, ale i silné inhibiční účinky na některé metabolické enzymy. Patří mezi pigmenty chránící buňky fotobionta před nadměrným UV zářením (Rundel, 1978). Mnoho lišejníků obsahujících kyselinu usnovou se využívá pro lékařské, kosmetické a ekologické účely (Ingólfssdóttir, 2002). Pro některé obratlovce je toxická (Dailey, et al., 2008). Také může způsobovat dermatitidy, alergické reakce a podráždění pokožky (Kalina, et al., 2005).

kyselina vulpinová

Kyselina vulpinová je látka, která je toxická pro savce. Dříve se tento toxin používal ve Skandinávii do návnad a sloužil k trávení lišek a vlků. I v Kalifornii si byli lidé vědomi jeho jedovatosti a používali jej k hubení veverek (Svanberg, et al., 2017). Lišejníky, které obsahují deriváty kyseliny vulpinové, jsou prudce jedovaté. Kyselina vulpinová působí na centrální nervový systém a prudce zrychluje dýchání. (Kalina, et al., 2005). V některých zemích se však tento metabolit používal jako barvivo, nebo byl dokonce využit v tradiční lidové medicíně. Antibiotické účinky kyseliny vulpinové byly později prokázány i vědeckou studií (Lauterwein, et al., 1995).

atranorin

Atranorin je jedním z nejrozšířenějších sekundárních metabolitů u lišejníků, který se v tenkovrstvé chromatografii používá jako standard (Malíček, 2012). Retenční faktor atranorinu při použití systému C je 79. Barva skvrny atranorinu po aplikaci kyseliny sírové a následném vypálení je matně žlutá až oranžovožlutá (Orange, et al., 2010). Tento sekundární metabolit má silné schopnosti absorbovat UV záření, ale může také způsobovat alergické reakce nebo fotosenzitivaci kůže (Rundel, 1978), (Kalina, et al., 2005). Atranorin působí jako antioxidant a výrazně mění chování zvířat. Výsledky při zkoumání atranorinu naznačují jeho potenciální antidepresivní účinky (Urbanska, et al., 2022).

kyselina barbatová

Kyselina barbatová spolu s kyselinou difraktovou, kyselinou evernovou a kyselinou usnovou patří mezi takzvané depsidy. Vykonávají širokou škálu biologických funkcí a mají léčivé účinky. Využívají se ve farmacii, kosmetice a potravinářství. Deriváty těchto kyselin se používaly například do krémů, deodorantů nebo opalovacích přípravků (Wang, 2017). Kyselina barbatová má takzvaný schistosomicidní účinek. Velice účinně působí proti krevničce střevní (*Schistosoma mansoni*), která způsobuje střevní schistosomózu. Jedná se o onemocnění, u kterého jsou většinou zasažena játra a tlusté střevo (Silva, et al., 2020).

kyselina squamatová

Tato kyselina se řadí také mezi depsidy. Tvoří ji některé dutohlávky (např. *Cladonia squamosa*). Její hodnota retenčního faktoru při použití systému C je 28 (Orange, et al., 2010). Bylo prokázáno, že kyselina squamatová má antioxidační, antimikrobiální, genotoxické, cytotoxické a protirakovinné účinky v buněčných liniích karcinomu prsu a tlustého střeva (Paluszczak, 2018). Kyselina squamatová patří k přírodním produktům s nízkými toxickými a vedlejšími účinky. Tato kyselina byla vyvinuta jako nové protinádorové léčivo, které se využívá zejména k potlačení jaterních nádorových buněk. Kyselina squamatová je šetrná k životnímu prostředí, a poskytuje tak nové přístupy k léčbě nádorů (Fudan, 2011).

zeorin

Mezi lišejníky vytvářející zeorin patří například červenoplodé dutohlávky (*Cladonia pleurota*, *Cladonia sulphurina*), které rostou kosmopolitně (Steinová, et al., 2013). Zeorin je jedním z nejdéle známých triterpenů. Má silné antibakteriální a antimikrobiální účinky. Našel využití při léčbě různých onemocnění způsobených mikroorganismy (např. bakteriemi a houbami) (Kosanic, et al., 2010).

kyselina kaperátová

Kyselina kaperátová patří mezi polykarboxylové mastné kyseliny. Má cytotoxické, protirakovinné a protizánětlivé účinky. Používá se v kosmetických produktech při péči o pleť a přispívá k rychlejšímu hojení ran (Dieu, et al., 2020), (Paluszczak, 2018). Tuto kyselinu lze považovat za zdroj cenných látek při hledání nových léků a metod u onemocnění centrálního nervového systému, například pro léčbu neurodegenerativních onemocnění (Studzinska-Sroka, 2022).

kyselina evernová

Tato kyselina patří mezi depsidy. Chová se jako inaktivátor ureázy (Cifuentes, et al., 1987). Vyznačuje se antimikrobiálními, antioxidačními, protirakovinnými a protiplísňovými účinky. Příznivě působí na hojení ran. Je biologicky aktivní a silně inhibuje aktivitu patogenních hub (Lee, et al., 2021). Kyselina evernová je dokonce považována za kandidáta na léky u neurodegenerativních onemocnění (Fernández-Moriano, et al., 2017). Využívá se ve farmacii, potravinářství a kosmetice (Wang, 2017).

kyselina rhizokarpová

Kyselina rhizokarpová funguje jako filtr bránící nadměrné radioaktivitě (Villar, et al., 2005). Absorbuje nebezpečné UV-B záření poškozující stélky lišejníků. Akumulace kyseliny rhizokarpové se zvyšuje s nadmořskou výškou – čím vyšší nadmořská výška, tím vyšší hladina UV-B záření (Rubio, et al., 2002). Metabolit chrání před poškozením také buňky fotobiontů (Meessen, et al., 2013).

1.4 Chromatografie

Chromatografie je fyzikálně-chemická separační a analytická metoda. V současné době je jednou z nejpoužívanějších a nejvýznamnějších metod pro separaci a analýzu směsí látek, jejímž základním principem je rozdělování složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi. Využívá se při zkoumání sekundárních metabolitů. Běžně se využívají dva typy chromatografie – tenkovrstvá chromatografie (TLC) a vysokoúčinná chromatografie (HPLC) (Schneiderka, 2000).

1.4.1 Princip chromatografie

Základním a společným principem chromatografických technik je dělení látek na základě postupného mnohonásobně opakovaného rozdělování složek směsi mezi dvěma či více fázemi. Obvykle dochází k separaci látek mezi dvěma fázemi – mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fází. Mezi mobilní a stacionární fází dochází k rozdělování směsi na základě kontinuálního ustanovování rovnovážných stavů (Popl, 1981). Chromatografické metody tedy umožňují vzájemnou separaci látek obsažených ve zkoumané směsi a poskytnou kvalitativní a kvantitativní analýzu směsi. Díky výsledku separace složek směsi můžeme zjistit, z jakých látek se zkoumaná směs skládá. Kvalitativní analýza nám přesně určí, jaké látky jsou obsaženy ve směsi, a kvantitativní analýzou zjistíme přesné koncentrace jednotlivých složek (Schneiderka, 2000). Chromatografické analýzy se zpravidla používají pro složité směsi látek, které mají velice podobné fyzikální a chemické vlastnosti.

Stacionární fáze je vždy nepohyblivá na rozdíl od mobilní fáze, která je pohyblivá, protože se v chromatografickém systému pohybuje. Jako mobilní fáze se používá kapalina nebo plyn. Právě podle mobilní fáze rozdělujeme chromatografii na kapalinovou nebo plynovou chromatografii. Jako stacionární fáze může být použita pevná látka nebo film zakotvený na pevné látce (Štiková, 2015).

Vzorek umístíme na začátek stacionární fáze a pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu mohou zdržovat. Vzorky, které jsou kolonou poutány silněji, jsou separovány později než složky méně zadržované (Novotná, 2017).

Chromatografie má uplatnění ve všech vědeckých odvětvích včetně lékařství.

1.4.2 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Tenkovrstvá chromatografie neboli chromatografie na tenké vrstvě patří mezi nejrozšířenější separační, analytické a preparační metody využívané v biologii, chemii a lékařství. Využívá principu rozdělovací, adsorpční, iontové a afinitní chromatografie. Je jednou z nejvyužívanějších metod sloužící k identifikaci lišejníků (Štiková, 2015).

Tenkovrstvá chromatografie je citlivá a relativně levná metoda prováděná v laboratořích se základním laboratorním vybavením. Vyvíjející systémy tenkovrstvé chromatografie jsou však lidskému zdraví nebezpečné, a proto je zapotřebí dbát důsledně na ochranu při práci. Je důležité pracovat v rukavicích a používat laboratorní plášť. Metodu tenkovrstvé chromatografie není však možné provádět mimo laboratoř (Orange, et al., 2010). Metoda tenkovrstvé chromatografie výrazně zlepšila rychlost a jistotu rozpoznání sekundárních metabolitů obsažených v lišejnících (Schumm, 2016).

U metody TLC pracujeme se stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou) fází. Jako stacionární fázi používáme průmyslově vyráběné hliníkové nebo skleněné desky, které jsou pokryty vrstvou silikagelu nebo oxidem hlinitým. Pohyb mobilní fáze zajišťují různá organická rozpouštědla neboli systémy (Schneiderka, 2000).

Mezi základní systémy patří systém A (toluen, dioxan a kyselina octová v poměru 180:14:5), systém B (hexan, metyl 3-butyl éter a kyselina mravenčí v poměru 140:72:18), systém C (toluen a kyselina octová v poměru 170:30) a systém G (toluen, etyl acetát a kyselina mravenčí v poměru 139:83:8). Pro počáteční analýzy se používají především systém C nebo systém G (Orange, et al., 2010). Pro kontrolu jsou používány atranorin a kyselina norstiktová, s jejímiž retenčními faktory (R_f) jsou srovnávána ostatní data (Slavík, 2015).

2 Metodika

2.1 Postup vyvolání desky

1) Příprava vyvíjející komory

Do vyvíjející komory nalijeme roztok – systém C = 170 ml toluenu + 30 ml kyseliny octové alespoň 30 minut před vložením desky. Výška hladiny roztoku by měla být přibližně 10 mm. Do vyvíjející komory vložíme filtrační papír velikosti desky a komoru přiklopíme víkem, a necháme tak celý prostor nasytit výpary. Po celou dobu pracujeme v digestoři a používáme ochranné pomůcky (plášť a latexové rukavice).

2) Příprava stacionární (nepohyblivé) fáze

Skleněnou desku se silikagelem si pomocí tužky a pravítka rozdělíme na půl, vznikne nám tak ve středu čelo desky. Poté si zakreslíme okraje – 20 mm na obou stranách desky a očíslováme startovní pozice vzorků – 15 mm od levého a pravého okraje desky a 10 mm mezi vzorky. Třetí pozici od obou okrajů desky obsadíme kontrolním vzorkem obsahujícím kyselinu norstiktovou a atranorin.

3) Příprava vzorků

Z vybraných lišejníků si pomocí pinzety odebereme vzorky do plastových mikrozkušavek. Mikrozkušavky očíslováme nebo pojmenujeme podle daného lišejníku a do takto připravených vzorků pipetujeme 150 μ l acetonu (vzorek nesmí plavat, hladina acetonu by měla být maximálně do úrovně zúžení zkušavky). Při pipetování je důležité dbát na to, aby nedošlo ke kontaktu špičky pipety se vzorky. Vzorky by se tak mohly kontaminovat a znehodnotit, a vyšly by nám tak chybné výsledky.

4) Nanášení vzorků na desku

Takto připravené vzorky tenkými kapilárami nanášíme na desku – na startovní pozice. Pro každý vzorek musíme použít vlastní kapiláru, aby nedošlo ke kontaminaci. Vzorky nanášíme po jedné kapce, více kapek najednou by vytvořilo příliš velký kroužek a došlo by ke kontaminaci se vzorky ze sousedních pozic. Ideální velikost jednoho kroužku je přibližně 5–6 mm v průměru. Na každou pozici tenkými kapilárami nanese postupně 15 kapek ze vzorku.

5) Vložení desky se vzorky do vyvíjejí komory

Připravenou desku se vzorky vložíme do vyvíjejí komory a necháme vzorky stoupat po dobu přibližně 20–30 min, dokud se vztlínající hladina se vzorky nepřiblíží k vyznačenému čelu.

6) Vyjmutí desky z vyvíjejí komory

Když vzorky dosáhnou čela desky, desku opatrně vyndáme z vyvíjejí komory, položíme na filtrační papír a necháme vysušit v digestoři. Deska nesmí být cítit po kyselině octové.

7) Příprava trouby na vypékání

Mezitím, co se deska vysouší v digestoři, zapneme si troubu na vypékání. Troubu předehřejeme na 110 °C.

8) Pozorování desky na denním světle

Vysušenou desku si prohlédneme a vyfotíme na denním světle a tužkou označíme pozice a barvu vzniklých skvrn.

9) Pozorování desky pod krátkovlnným UV

Nasadíme si ochranné brýle (krátkovlnné UV světlo poškozují zrak), desku si prohlédneme a vyfotíme pod krátkovlnným UV (254 nm) a nové skvrny zakreslíme na desku vlnovkou.

10) Pozorování desky pod dlouhovlnným UV

Desku si prohlédneme a vyfotíme pod dlouhovlnným UV (366 nm) a pozice dalších skvrn zakreslíme na desku přerušovanou čarou.

11) Zjištění přítomnosti mastných kyselin

Pro zjištění přítomnosti mastných kyselin opatrně stříčkou posprejujeme desku studenou vodou. Znovu desku prohlédneme a vyfotíme na denním světle a nově vzniklé skvrny označíme křížkem uvnitř.

12) Aplikace kyseliny sírové

Nasadíme si silné rukavice, do kádinky si nalijeme 10 % kyselinu sírovou a celou desku pomocí širokého štětce kyselinou opatrně potřeme.

13) Vypékání desky v troubě

Po aplikaci kyseliny sírové desku ihned vložíme do předehřáté trouby a necháme vypálit přibližně 10 min, dokud se zřetelně neobjeví vyvolané skvrny.

14) Opětné pozorování desky na denním světle

Desku znovu prohlédneme a vyfotíme na denním světle a neoznačené skvrny (načervenalé terpenoidy) vyšrafujeme.

15) Opětné pozorování desky pod dlouhovlnným UV

Na závěr desku znovu pozorujeme a vyfotíme pod dlouhovlnným UV (366 nm) a přerušovanou čarou zakreslíme pozice nových skvrn.

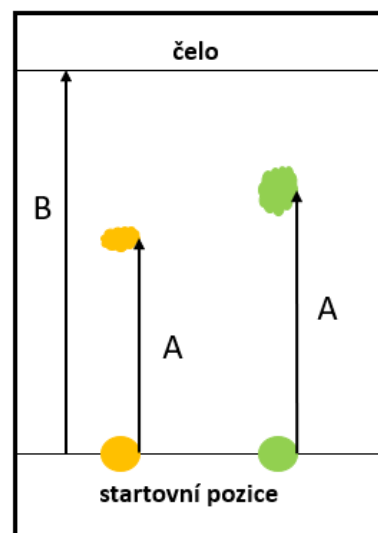
(Orange, et al., 2010)

2.2 Určení sekundárních metabolitů

Pokud již máme vyvolanou desku se vzorky, přejdeme k určování sekundárních metabolitů. Při určování sekundárních metabolitů je nejdříve potřeba vypočítat takzvaný retenční faktor (Rf). Hodnota Rf nám udává, jak daleko zaostává skvrna analyzované látky za čelem rozpouštědla, a vypočítá se následujícím způsobem:

- 1) Nejprve si změříme vzdálenost skvrny vzorku od startovní pozice do její dosažené vzdálenosti po vzlínání. Získáme tím tak hodnotu A.
- 2) Změřením vzdálenosti mezi startovní pozicí a čelem vzorku získáme hodnotu B.
- 3) Obě získané hodnoty dosadíme do následujícího vzorce a vypočítáme tak retenční faktor (Orange, et al., 2010).

$$R_F = \frac{A}{B} \cdot 100$$



Obrázek 1- určení Rf

Pro výsledné určení sekundárních metabolitů potřebujeme znát: hodnotu Rf faktoru, barvu skvrny pod dlouhovlnným UV před vypálením, barvu skvrny po nanesení kyseliny sírové a následném vypálení a barvu skvrny pod dlouhovlnným UV po vypálení. Pokud známe všechny tyto parametry, můžeme tak dle odborné literatury určit danou látku metabolitů (Schumm, 2016).

3 Výsledky

3.1 Izolované sekundární metabolity

LATINSKÝ NÁZEV	ČESKÝ NÁZEV	SEKUNDÁRNÍ METABOLITY
<i>Letharia vulpina</i>	větvičník žlutý	k. vulpinová
<i>Phlyctis argena</i>	měchýřovka stříbřitá	k. norstiktová
<i>Flavoparmelia caperata</i>	terčovka svažštělá	k. usnová
		k. kaperátová
<i>Lecidea confluens</i>	šálečka splývající	k. konfluentová
<i>Lecanora saxicola</i>	misnička zední	k. usnová
		k. murolová
		zeorin
<i>Evernia prunastri</i>	větvičník slívový	k. usnová
		k. evernová
		atranorin
<i>Bryoria fuscescens</i>	vousatec hnědavý	k. usnová
		atranorin
<i>Xanthoparmelia pulla</i>	terčovka tmavá	k. stenosporová
<i>Lepraria membranacea</i>	prášěnka blanitá	atranorin
<i>Cladonia borealis</i>	dutohlávka severní	k. barbatová
		k. usnová
<i>Cladonia bellidiflora</i>	dutohlávka chudobkokvětá	k. squamatová
		k. usnová
<i>Rhizocarpon lecanorium</i>	mapovník misničkovitý	k. rhizokarpová

Tabulka 1- izolované sekundární metabolity

Při práci v laboratoři jsem vytvořila celkem 12 vzorků z různých druhů lišejníků a následně jsem z těchto vzorků pomocí metody TLC chromatografie izolovala jejich sekundární metabolity. Izolované sekundární metabolity jsem poté přiřadila ke konkrétnímu druhu lišejníku a vytvořila jsem přehlednou tabulku (Tabulka 1).

Z 12 vybraných druhů lišejníků jsem izolovala celkem 13 různých sekundárních metabolitů. Nejčastěji vyskytujícím se sekundárním metabolitem byla kyselina usnová, kterou jsem rozpoznala u 6 druhů lišejníků. Druhým nejčastěji se vyskytujícím sekundárním metabolitem byl atranorin, který jsem rozpoznala u 3 druhů. Zbylé izolované sekundární metabolity nalezené u různých druhů lišejníků byly kyselina vulpinová v lišejníku *Letharia vulpina*, kyselina norstiktová v lišejníku *Phlyctis argena*, kyselina kaperátová v lišejníku *Flavoparmelia caperata*, kyselina konfluentová v lišejníku *Lecidea confluens*, kyselina murolová a zeorin v lišejníku *Lecanora saxicola*, kyselina evernová v lišejníku *Evernia prunastri*, kyselina stenosporová v lišejníku *Xanthoparmelia pulla*, kyselina barbatová v lišejníku *Cladonia borealis*, kyselina squamatová v lišejníku *Cladonia bellidiflora* a kyselina rhizokarpová v lišejníku *Rhizocarpon lecanorium*.

4 Diskuse

Při izolaci metabolitů mě překvapilo, kolik látek některé stélky obsahovaly a jak obtížné je všechny přesně identifikovat. Některé látky s podobným Rf faktorem není snadné od sebe odlišit.

Hlavním zdrojem k určování sekundárních metabolitů je publikace (Orange, et al., 2010). Seznam metabolitů v publikaci je omezený a obsahuje jen nejnámější látky. Při identifikaci sekundárních metabolitů z této literatury jsem jasně určila sekundární metabolity u druhu *Letharia vulpina* – kyselinu vulpinovou, která je u tohoto lišejníku velmi dobře rozeznatelná díky své výrazně žluté barvě. Druh *Phlyctis argena* obsahující kyselinu norstiktovou a *Xanthoparmelia pulla* obsahující kyselinu stenosporovou také nebylo obtížné identifikovat.

Dále jsem spolehlivě určila sekundární metabolity lišejníků: *Flavoparmelia caperata* (kyselina kaperátová), *Lecidea confluens* (kyselina konfluentová), *Evernia prunastri* (kyselinou evernová) a *Rhizocarpon lecanorium* (kyselina rhizokarpová).

U lišejníku *Lecanora saxicola* bylo obtížné přesně identifikovat dané metabolity. Identifikovala jsem nejvíce rozšířený metabolit – kyselinu usnovou. Dále zeorin, který se vyskytuje často u rodu *Lecanora*, a kyselinu murolovou.

U rodu *Bryoria fuscescens* jsem identifikovala pouze základní a nejznámější metabolity – kyselinu usnovou a atranorin.

Ze vzorku druhu *Lepraria membranacea* jsem získala pouze atranorin, přestože podle odborné publikace (Orange, et al., 2010) by měl obsahovat také kyselinu roccelovou a panarovou.

Lišejník *Cladonia boreallis* by měl podle použitého zdroje (Steinová, et al., 2015) obsahovat kyselinu barbatovou, kterou jsem také ze vzorku izolovala a identifikovala. Nalezla jsem zde však i kyselinu usnovou, kterou tento lišejník může také obsahovat.

Cladonia bellidiflora je lišejník, u kterého lze nalézt velké množství sekundárních metabolitů. Může obsahovat kyselinu usnovou, kyselinu squamatovou, kyselinu rodokladoniovou nebo belidiflorin. Ze vzorku lišejníku jsem však izolovala pouze kyselinu usnovou a kyselinu squamatovou.

Některé vzorky obsahovaly více metabolitů s podobným faktorem a nedokázala jsem přesně rozhodnout, jaké látky skvrny patří.

Závěr

V úvodní části bakalářské práce jsem představila skupinu lišejníků, které mají schopnost přežívat v extrémních podmínkách bez nutnosti konkurovat jiným druhům organismů. Stručně jsem představila systematické členění lišejníků a vztah složek mezi mykobiontem a fotobiontem.

Vytvořila jsem přehled několika běžných sekundárních metabolitů a představila lišejníky, jejichž stélky je vytvářejí. Popsala jsem význam těchto lišejníkových látek, jejich účinky a praktické využití v různých oblastech.

Představila jsem zde metody chromatografie a detailně popsala metodu tenkovrstvé chromatografie (TLC), která se využívá k detekci sekundárních metabolitů. Tato běžně se používající, relativně levná metoda je velmi efektivní i v laboratořích se základním laboratorním vybavením.

Naučila jsem se používat techniku tenkovrstvé chromatografie (TLC), izolovat a determinovat sekundární metabolity z vybraných druhů lišejníků, a tím jsem splnila všechny cíle bakalářské práce.

Seznam použité literatury

1. **Abas, A. 2021.** A systematic review on biomonitoring using lichen as the biological indicator: a decade of practices, progress and challenges. *Ecological Indicators*. 121(2): 107-197.
2. **Ametrano, C.G., Lumbsch, H.T., Di Stefano, I., Sangvichien, E., Muggia, L. et Grewe, F. 2022.** Should we hail the Red King? Evolutionary consequences of a mutualistic lifestyle in genomes of lichenized ascomycetes. *Ecology and Evolution*. 12(1): e8471.
3. **Balabán, K. 1960.** *Lesnický významné lišejníky, mechorosty, kaprad'orosty*. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 1960.
4. **Bláha, V. 2017.** *UV absorbující látky u terestrických mechů, lišejníků, řas*. [Online] [cit. 14.4.2023], dostupné z: https://is.muni.cz/th/zt7u1/Bakalarska_prace_TISK_1.2.pdf.
5. **Borgato, L., Ertz, D., Van Rossum, F. et Verbeken, A. 2022.** The diversity of lichenized trentepohlioid algal (Ulvophyceae) communities is driven by fungal taxonomy and ecological factors. *Journal of Phycology*. 58: 582-602.
6. **Büdel, B. et Scheidegger, C. 2008.** Thallus morphology and anatomy. In: T.H. Nash. *Lichen Biology*. UK : Cambridge University Press, 2008. ISBN: 978-0-521-87162-4.
7. **Candan, M., Yilmaz, M., Tay, T., Kıvanç, M. et Türk, H. 2006.** Antimicrobial activity of extracts of the lichen *Xanthoparmelia pokornyi* and its gyrophoric and stenosporic acid constituents. *Zeitschrift für Naturforschung*. 61(5-6): 319-23.
8. **Cifuentes, B. et Avalos, A. 1987.** Inactivation of urease by evernic acid. *FYTON*. Buenos Aires. 47(1/2): 89-94.

9. **Culberson, W.L. et Culberson, Ch. F. 1994.** Secondary Metabolites as a Tool in Ascomycete Systematics: Lichenized Fungi. D. L. Hawksworth. *Ascomycete Systematics: Problems and Perspectives in the Nineties*. ISBN: 978-1-4757-9290-4.
10. **Čeněk, M. 2009.** *Mechy a lišejníky*. Praha : Národní zemědělské muzeum. ISBN: 978-80-86874-16-6.
11. **Černajová, I. 2013.** *Lichenofágia na pozadí sekundárnych metabolitov*. [Online] [cit. 19.4.2023], dostupné z: https://botany.natur.cuni.cz/licheno/soubory/prace/Cernajova_2013.pdf.
12. **ČMS 2004.** Česká mykologická společnost. *myko.cz*. [Online] [cit. 20.4.2023], dostupné z: <https://www.myko.cz/myko-atlas/Phlyctis-argena/>.
13. **Dailey, R.D., Montgomery, D.L., Ingram, J.T., Siemion, R., Vasquez, M. et Raisbeck, M.F. 2008.** Toxicity of the lichen secondary metabolite (+)-usnic acid in domestic sheep. *Veterinary pathology*. 45.1: 19-25.
14. **DALIB.CZ 2020.** Atlas českých lišejníků. *dalib.cz*. Botanický ústav, AV ČR [Online] [cit. 30.4.2023], dostupné z: <https://dalib.cz/>.
15. **Dětinský, R. et Bayerová, Š. 2000.** Lišejník větvičník žlutý po 100 letech opět v ČR. *Živa*. 6:249-250.
16. **Dieu, A., Mambu, L., Champavier, Y., Chaleix, V., Sol, V., Goloaguen, V. et Millot, M. 2020.** Antibacterial activity of the lichens *Usnea florida* and *Flavoparmelia caperata* (Parmeliaceae). *Natural Product Research*. 23: 3358–3362
17. **Dostál, V. 2006.** *Lišejníky, skromní dobyvatelé skal*. [Online] [cit. 1.4.2023], dostupné z: <https://www.priroda.cz/clanky.php?detail=774>.
18. **Dreyer, E.M. et Dreyer, W. 2019.** *Velký průvodce lesem*. Brno: Kazda. ISBN: 978-80-88316-30-5.
19. **Ebrahim, H.Y., Elsayed, H.E., Mohyeldin, M.M., Akl, M.R., Bhattacharjee, J., Egbert, S. et El Sayed, K.A. 2016.** Norstictic acid inhibits breast cancer cell proliferation, migration, invasion, and in vivo Invasive growth through targeting C - Met. *Phytotherapy Research*. 4: 557-566.
20. **Esseen, P.A. et Ekström, M. 2023.** Influence of canopy structure and light on the three-dimensional distribution of the iconic lichen *Usnea longissima*. *Forest Ecology and Management*. 529: 120-667.

21. **Fernández-Moriano, C., Kumar Divakar, P., Crespo, A. et Pilar Gómez-Serranillos, M. 2017.** Protective effects of lichen metabolites evernic and usnic acids against redox impairment-mediated cytotoxicity in central nervous systemlike systemlike. *Food and Chemical Toxicology*. 105: 262-277.
22. **Flousek, J., Hartmanová, O., Štursa, J. et Potocki, J. 2007.** *Krkonoše: příroda, historie, život*. Praha : Baset. ISBN: 978-80-7340-104-7.
23. **Fudan, University 2011.** Application of squamatic acid to preparation of antitumor drugs. [Online] [cit. 1.4.2023], dostupné z: <https://patents.google.com/patent/CN103120697A/en>.
24. **Gažovčiak, P. 2017a.** Diskovka hnedočierna – *Xanthoparmelia pulla*. *nahuby.sk*. [Online] [cit. 10.4.2023], dostupné z: <https://www.nahuby.sk/atlas-hub/Xanthoparmelia-pulla/diskovka-hnedocierna/tercovka-tmava/ID12670>.
25. **Gažovčiak, P. 2017b.** *Lepraria membranacea* (Dicks.) Vain. – prášenka blanitá. *nahuby.sk*. [Online] 29. Březen 2017. [cit. 10.4.2023], dostupné z: <https://www.nahuby.sk/atlas-hub/Lepraria-membranacea/lepraria/prasenska-blanita/ID13750>.
26. **Halda, J. et Kučera, J. 2016.** *Atlas krkonošských mechorostů, lišejníků a hub 1 - mechorosty a lišejníky*. Správa KRNAP, Vrchlabí. ISBN: 978-80-7535-027-5.
27. **Honegger, R. 2022.** *Lichens and Their Allies Past and Present*. Springer. Berlin. ISBN: 13 978-3-031-16502-3.
28. **Ingólfssdóttir, K. 2002.** Usnic acid. *Phytochemistry*. 2002, 61(7):729-36.
29. **Jarkovský, M. 1978.** *Lišejníkové látky a jejich identifikace*. Hradec Králové. ISBN 59-220-75.
30. **Kadaňka, P. 2020.** Léčivé rostliny: Větvičník – bylinné kapky (tinktura). [Online] [cit. 18.4.2023], dostupné z: <https://www.tinktura-info.eu/cs/pavlovy-bylinne-kapky-tinktury-z-lecivych-rostlin-bylin/3752-vetvicnik-bylinne-kapky-tinktura-50-ml-8592814054079.html>.
31. **Kalina, T. et Váňa, J. 2005.** *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Praha : Nakladatelství Karolinum. ISBN: 978-80-246-1036-8.

32. **Kosanic, M., Rankovic, B. et Sukdolak, S. 2010.** Antimicrobial activity of the lichen *Lecanora frustulosa* and *Parmeliopsis hyperopta* and their divaricatic acid and zeorin constituents. *African Journal of Microbiology Research*. Academic Journals. ISSN: 1996-0808.
33. **Kossowska, M. 2011.** New, rare and noteworthy lichens in the Giant Mountains. *Biologia*. 66(5): 755-761.
34. **Kremer, B.P., Muhle, H., Gambihler, H. et Janáčková, H. 1998.** *Lišejníky, mechorosty, kaprad'orosty: evropské druhy*. Ikar. Praha. ISBN: 80-7176-804-9.
35. **Kumar, K.C.S. et Müller, K. 1999.** Lichen Metabolites. 2. Antiproliferative and Cytotoxic Activity of Gyrophoric, Usnic, and Diffractaic Acid on Human Keratinocyte Growth. *Journal of Natural Products*. 62(6):821-3.
36. **Lauterwein, M., Oethinger, M., Belsner, K., Peters, T. et Marre, R. 1995.** In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid,(+)-usnic acid, and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 39: 2541–2543.
37. **Lee, S., Suh, Y.J., Yang, S., Hong, D.G., Ishigami, A., Kim, H., Hur, J.S., Chang, S.C. et Lee, J. 2021.** Neuroprotective and Anti-Inflammatory Effects of Evernic Acid in an MPTP-Induced Parkinson's Disease Model. *Molecular Sciences*. 22: 1-18
38. **Liška, J. 2000.** Vázaný a nevázaný život lišejníků - Lichenizace jako příklad úspěšné strategie. *Vesmír*. 79: 623.
39. **Liška, J. 2012.** Lišejníky Průhonického parku a botanické zahrady. [Online] [cit. 30.4.2023], dostupné z: <http://www.ibotky.cz/clanky/pruhonicky-park/127-lisejniky-pruhonickeho-parku-a-botanicke-zahrady.html>.
40. **Lumbsch, H.T. 1998.** *Taxonomic Use of Metabolic Data in Lichen-Forming Fungi*. CRC Press. New York. ISBN: 9781003064626.
41. **Maliček, J. 2012.** Sekundární metabolity lišejníků a jejich význam pro taxonomii. *Živa*. 6: 276-278
42. **Marková, I. 2011.** Vyhynulé a nezvěstné druhy Labských pískovců (Českosaského Švýcarska). Díl 12. Větvičník žlutý (*Letharia vulpina*). *České Švýcarsko – Zpravodaj správy národního parku České Švýcarsko*. 10(2): 7.

43. **Meessen, J., Sánchez, F. J., Sadowsky, A., de la Torre, R., Ott, S. et de Vera, J. P. 2013.** Extremotolerance and Resistance of Lichens: Comparative Studies on Five Species Used in Astrobiological Research II. Secondary Lichen Compounds. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*. 43: 501–526.
44. **Mohammadi, M., Bagheri, L., Badreldin, A., Fatehi, P., Pakzad, L., Suntres, Z. et van Wijnen, A.J. 2022.** Biological Effects of Gyrophoric Acid and Other Lichen Derived Metabolites, on Cell Proliferation, Apoptosis and Cell Signaling pathways. *Chemico - Biological Interactions*. 351: 109-768.
45. **Nash, T.H. 2008.** *Lichen Biology*. Cambridge University Press. ISBN: 978-0521871624.
46. **NatureSpot. 2009.** NatureSpot – Recording the Wildlife of Leicestershire and Rutland. *naturespot.org.uk*. [Online] [cit. 28.4.2023], dostupné z: <https://www.naturespot.org.uk/species/phlyctis-argena>.
47. **Nguyen, K.H., Chollet-Krugler, M., Gouault, N. et Thomasi, S. 2013.** UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. *Natural Product Reports*. 30:1490-1508.
48. **Nimis, P.L. et Martellos, S. 2022.** ITALIC 7.0. *italic.units.it*. [Online] [cit. 1.5.2023], dostupné z: <https://italic.units.it/index.php?procedure=taxonpageetnum=337>.
49. **Novotná, A. 2017.** Stanovení nelegálních látek v kosmetice pomocí moderních chromatografických metod. [Online] [cit. 18.4.2023], dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/91498/120283737.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
50. **Omarsdottir, S., Óladóttir, AK., Árnadóttir, T. et Ingólfssdóttir, K. 2006.** Antiviral compounds from Icelandic lichens. *Planta Medica*. 53: 135–148.
51. **Orange, A., James, P.W. et White, F.J. 2010.** *Microchemical Methods for the Identification of Lichens*. British Lichen Society. ISBN: 9780954041892.
52. **Paluszczak, J. 2018.** Lichen-derived caperatic acid and physodic acid inhibit Wnt signaling in colorectal cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 441:109–124.

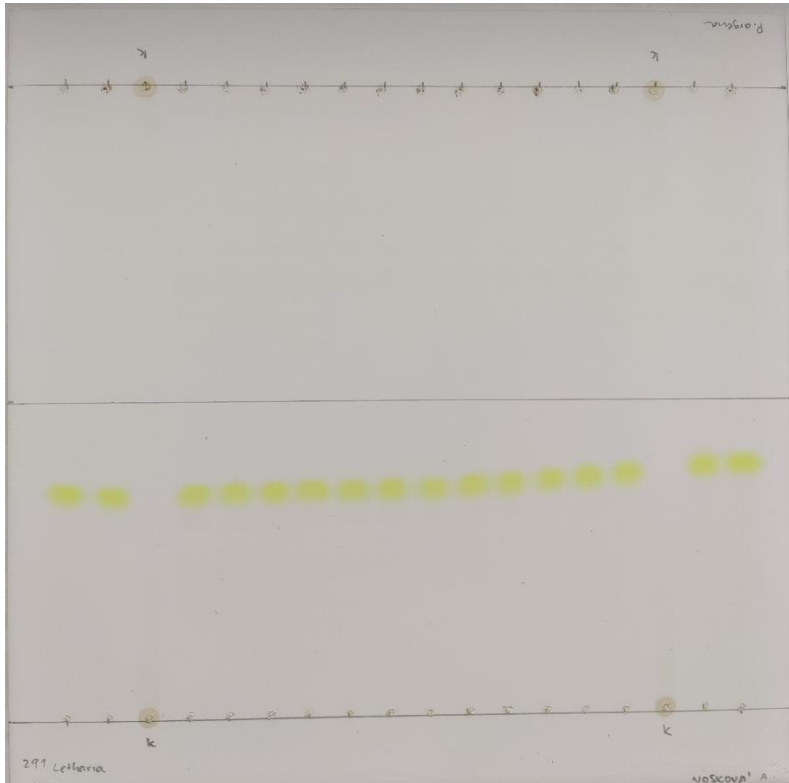
53. **Paoli, L., Corsini, A., Bigagli, V., Vannini, J., Bruscoli, C., et Loppi, S. 2012.** Long-term biological monitoring of environmental quality around a solid waste landfill assessed with lichens. *Environmental Pollution*. 161: 70-75. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749111005525>.
54. **Pavlovičová, A. 2013.** *Využití mechů a lišejníků pro hodnocení kovů v ekosystému.* Bakalářská práce. VUT Brno. 51 s. Dostupné z: <https://core.ac.uk/download/pdf/30278928.pdf>.
55. **Popl, M. 1981.** *Základy chromatografie.* SNTL. Praha.
56. **Printzen, C. 2010.** Lichen Systematics: The Role of Morphological and Molecular Data to Reconstruct Phylogenetic Relationships. *Progress in Botany*. 71: 233-275.
57. **Round, F.E. 1984.** *The ecology of algae.* Cambridge University Press. ISBN: 978-052-1269-063.
58. **Rubio, C., Fernández, E., Hidalgo, M.E. et Quilhot, W. 2002.** Effects of Solar UV-B Radiation in the accumulation of Rhizocarpic Acid in a Lichen Species from Alpine Zones of Chile. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*. 47(1): 67-72. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.4067/S0366-16442002000100012>.
59. **Rundel, P.W. 1978.** The ecological role of secondary lichen substances. *Biochemical systematics and ecology*. 6: 157-170.
60. **Sanders, W.B. et Masumoto, H. 2021.** Lichen algae: the photosynthetic partners in lichen symbioses. *Lichenologist*. 53: 347-393.
61. **Sedlářová, M. et Vašutová, M. 2004.** *Atlas houbových organismů.* [Online]2004. [cit. 25.4.2023], dostupné z: <http://old.botany.upol.cz/atlas/system.php>.
62. **Shrestha, G., Thompson, A., Robison, R. et St. Clair, L.L. 2015.** *Letharia vulpina*, a vulpinic acid containing lichen, targets cell membrane and cell division processes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharmaceutical Biology*. 54(3): 413-8.
63. **Schneiderka, P. 2000.** *Kapitoly z klinické biochemie.* Nakladatelství Karolinum. Praha. ISBN: 80-246-0140-0.
64. **Schumm, F. 2016.** *Atlas of Images of Thin Layer Chromatograms of Lichen Substances.* Norderstedt. ISBN: 978-3-7431-4586-3.

65. **Silva, H.A.M. F., Aires, A.L., Soares, C.L.R., Sá, J.L.F., Martins, M.C.B., Albuquerque, M.C.P.A., Silva, T.G., Brayner, F.A., Alves, L.C., Melo, A.M.M.A. et Silva, N.H. 2020.** Barbatic acid from *Cladia aggregata* (lichen): Cytotoxicity and in vitro schistosomicidal evaluation and ultrastructural analysis against adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Toxicology in Vitro*. 65: 104-771.
66. **Slavík, A. 2015.** *Antioxidační systémy u lišejníků*. Bakalářská práce. PřF Masarykova Univerzita Brno. 41 s. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/wsln5/Antioxidacni_systemy_u_lisejniku_-_FINAL_p.pdf.
67. **Steinová, J., Stenroos, S., Grube, M. et Škaloud, P. 2013.** Genetic diversity and species delimitation of the zeorin-containing red-fruited *Cladonia* species (lichenized Ascomycota) assessed with ITS rDNA and β -tubulin data. *The Lichenologist*. 45: 665-684.
68. **Steinová, J., Bouda, F., Malíček, J., Palice, Z., Peksa, O., Svoboda, D. et Vondrák, J. 2015.** Poznámky k rozšíření a ekologickým preferencím zástupců skupiny *Cladonia coccifera* v České republice. *Bryonora*. 55: 4.
69. **Stocker - Wörgötter, E. 2008.** Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Natural Product Reports*. 25: 188-200.
70. **Studzinska - Sroka, E. 2022.** Is Caperatic Acid the Only Compound Responsible for Activity of Lichen *Platismatia glauca* within the Nervous System? *Antioxidants*. 11: 2069. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox11102069>.
71. **Svanberg, I. et Ståhlberg, S. 2017.** Killing Wolves with Lichens: Wolf lichen, *Letharia vulpina* (L.), Hue. – in Scandinavian folk biology. [Online] [cit. 29.4.2023], dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Ingvar-Svanberg/publication/328837306_Killing_wolves_with_lichens_wolf_lichen_Letharia_vulpina_L_Hue_in_Scandinavian_folk_biology/links/5be587afa6fdcc3a8dc8f83b/Killing-wolves-with-lichens-wolf-lichen-Letharia-vulpina-L-Hue-in-Scandinavian-folk-biology.pdf
72. **Štiková, Š. 2015.** *Lišejníky a jejich obsahové látky*. Bakalářská práce. PdF UK Praha, 53 s. Dostupné z: https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/72663/BPTX_2013_2_11410_0_384207_0_141765.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

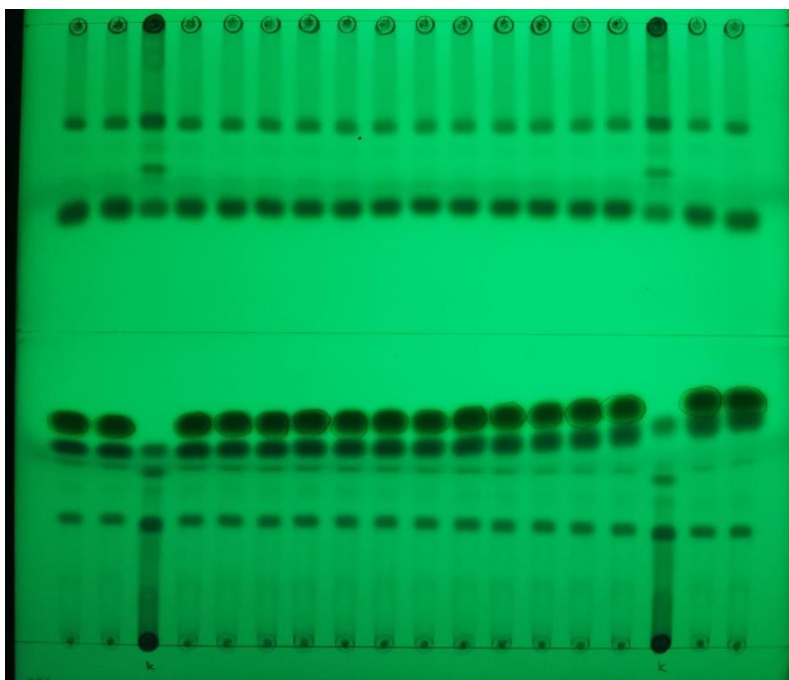
73. Urbanska, N., Simko, P., Leskanicova, A., Karasova, M., Jendzelovska, Z., Jendzelovsky, R., Rucova, D., Kolesarova, M., Goga, M., Backor, M. et Kiskova, T. 2022. Atranorin, a Secondary Metabolite of Lichens, Exhibited Anxiolytic/Antidepressant Activity in Wistar Rats. *Life* 12: 1850. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/life12111850>.
74. Van Beneden, P.J. 1875. *Les commensaux et les parasites*. Biblio Sci Int. Paris.
75. Villar, S.E.J., Edwards, G.M., Seaward, M.R.D. 2005. Raman spectroscopy of hot desert, high altitude epilithic lichens. *Analyst*. 130(5): 730-7.
76. Walker, F. J. et James, P.W. 1980. A Revised Guide to Microchemical Techniques for the Identification of Lichen Products. *British Lichen Society Bulletin*. 46: 13-29.
77. Wang, H. 2017. Simultaneous determination of usnic, diffractaic, evernic and barbatic acids in rat plasma by ultra-high-performance liquid chromatography–quadrupole exactive Orbitrap mass spectrometry and its application to pharmacokinetic studies. *Biomedical Chromatography*. 32(3). Dostupné z: <https://doi: 10.1002/bmc.4123>.
78. Weber, J. et Kotěra, J. 2007. *Přírodou východního Krušnohoří*. Grüne Liga Osterzgebirge. Dresden. ISBN: 978-3-940319-20-3.

Přílohy

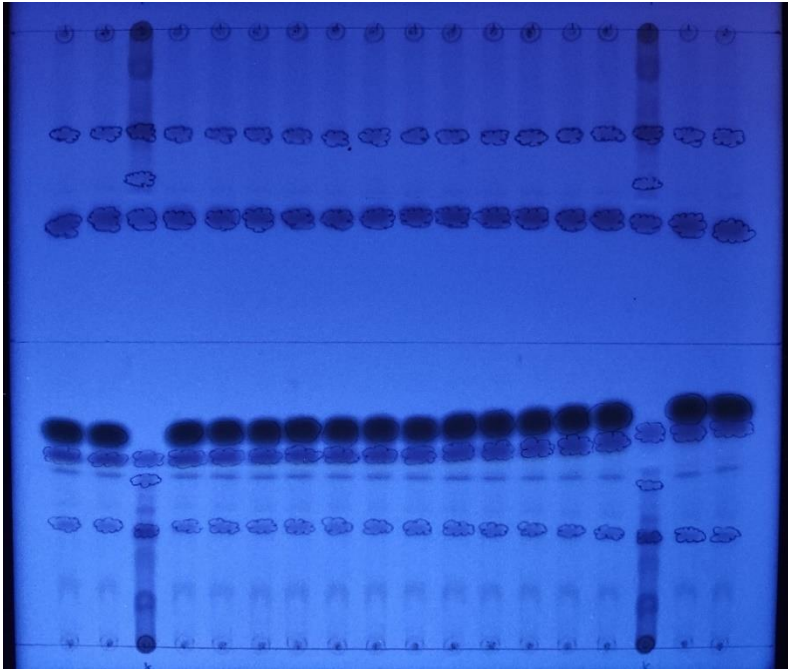
Příloha č. 1: Fotografie desek se vzorky



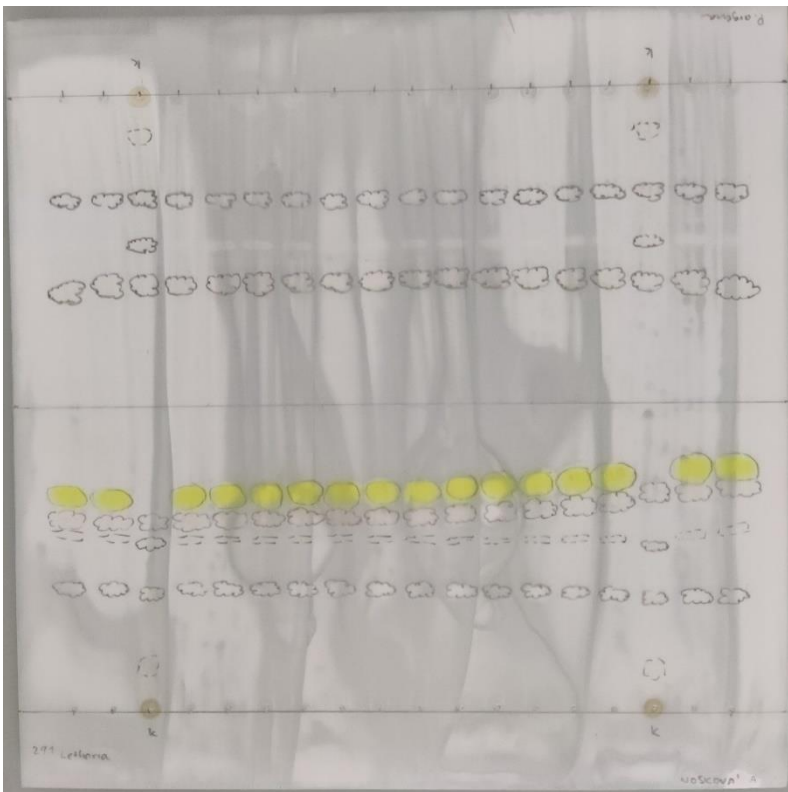
Obrázek 2 - deska po vyjmutí z vyvíjející komory



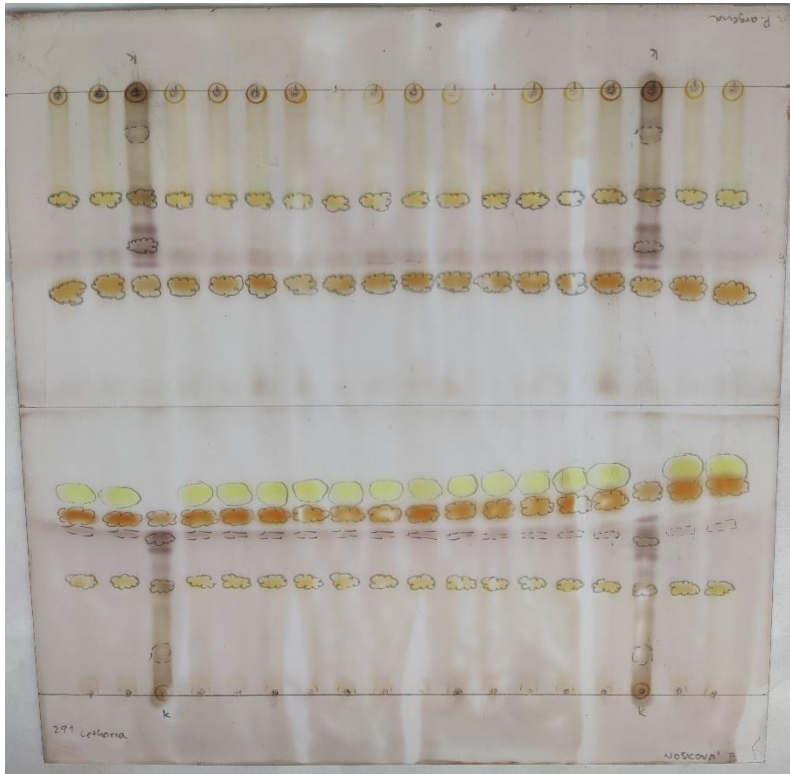
Obrázek 3 - deska pod krátkovlnným UV



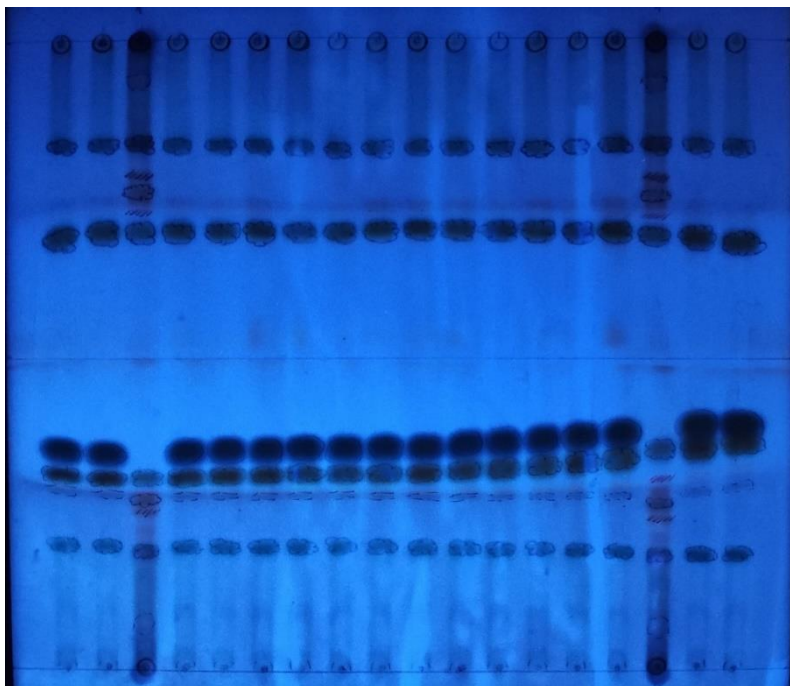
Obrázek 4 - deska pod dlouhovlnným UV



Obrázek 5 - deska po aplikaci vody



Obrázek 6 - deska po aplikaci kyseliny sírové a následném vypálení



Obrázek 7 - deska po vypálení pod dlouhovlnným UV