



Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta

Využití sekundárních metabolitů pro determinaci sterilních stélek lichenizovaných vřeckovýtrusných hub

Bakalářská práce

Autor: Hrubá Johana

Studijní program: B0114A030004

Studijní obor: Biologie a etická výchova se zaměřením na vzdělávání

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

Hradec Králové

2024

Zadání bakalářské práce

Autor: Johana Hrubá

Studium: S22BI101BP

Studijní program: B0114A030004 Biologie se zaměřením na vzdělávání

Studijní obor: Etická výchova se zaměřením na vzdělávání, Biologie se zaměřením na vzdělávání

Název bakalářské práce: **Využití sekundárních metabolitů pro determinaci sterilních stélek lichenizovaných vřeckovýtrusých hub**

Název bakalářské práce AJ: The use of secondary metabolites in chemotaxonomy of sterile thalli of lichenized Ascomycetes

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Práce vyžaduje zvládnutí metodiky tenkovrstevné chromatografie na skleněných deskách, přípravu vzorků z herbářovaných lišejníkových stélek a determinaci izolovaných metabolitů.

Frisvad J.C., Andersen B. & Thrane U. (2008): The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. - *Mycological Research*, 112: 231-240.
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 použité literatury uvedla všechny prameny, ze kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové

Johana Hrubá

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Josefu Haldovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, čas a za podporu při psaní této bakalářské práce.

Anotace:

HRUBÁ, J. *Využití sekundárních metabolitů pro determinaci sterilních stélek lichenizovaných vřeckovýtrusných hub*. Hradec Králové, 2024. Bakalářská práce na přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Josef Halda, Ph.D., 67 s.

Bakalářská práce zkoumá využití sekundárních metabolitů pro determinaci sterilních stélek lichenizovaných vřeckovýtrusných hub. První část bakalářské práce je věnována literární rešerši, která se zaměřuje na sekundární metabolity lišejníků, jejich význam, klasifikaci a metody jejich detekce. Dále se zabývá klíčovými sekundárními metabolity pro determinaci lišejníků rodu *Cladonia* a představuje vybrané zástupce z toho rodu, které lze obtížně identifikovat pouze na základě jejich morfologie či které obsahují typické sekundární metabolity. Praktická část bakalářské práce je výzkumem obsahu sekundárních metabolitů. Izolace byla provedena metodou tenkovrstvé chromatografie. Získané poznatky vedly k vytvoření tabulky, která usnadňuje identifikaci konkrétních druhů rodu *Cladonia* na základě jejich sekundárních metabolitů. Také byly vytvořeny didaktické pomůcky, které mohou integrovat téma determinace sekundárních metabolitů lišejníků do výuky.

Klíčová slova:

Lišejník, sekundární metabolity, TLC chromatografie

Annotation:

HRUBÁ, J. *The Use of Secondary Metabolites in Chemotaxonomy of Sterile Thalli of Lichenized Ascomycetes.*. Hradec Králové, 2024. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor RNDr. Josef Halda, Ph.D., 67 p.

The bachelor thesis examines the use of secondary metabolites in chemotaxonomy of sterile thalli of lichenized Ascomycetes. The first part of the bachelor thesis is devoted to literature research, which focuses on secondary metabolites of lichens, their significance, classification and methods of their detection. It also deals with the secondary metabolites that are key for the determination of lichens of the genus *Cladonia* and reconstructs selected representatives from that genus, which can be difficult to identify only on the basis of their morphology or which contain typical secondary metabolites. The practical part of the bachelor thesis is research into the content of secondary metabolites. The isolation was carried out by the method of thin-layer chromatography. The knowledge gained led to the creation of a table that facilitates the identification of specific species of the genus *Cladonia* based on their secondary metabolites. Didactic aids were also created that can integrate the topic of determination of secondary metabolites of lichens into teaching.

Key words:

Lichen, secondary metabolites, TLC chromatography

Obsah

Obsah	7
Seznam zkratk	10
Seznam obrázků	11
Seznam tabulek	12
1. Úvod a cíle práce	13
2. Literární rešerše	14
2.1 Lišejníky	14
2.2 Sběr lišejníků	15
2.3 Sekundární metabolity lišejníků	15
2.4 Detekce sekundárních metabolitů lišejníků	16
2.4.1 Stélkové reakce a UV světlo	16
2.4.2 Mikrokrytalizační testy	17
2.4.3 Pigmenty a krystaly	17
2.4.4 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	17
2.4.5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	17
2.5 Význam sekundárních metabolitů	18
2.6 Rozdělení sekundárních metabolitů	19
2.7 Sekundární metabolity významné pro determinaci dutohlávek	19
2.7.1 Atranorin	19
2.7.2 Kyselina usnová	20
2.7.3 Kyselina isousnová	20
2.7.4 Kyselina barbatová	21
2.7.5 Kyselina didymová	21
2.7.6 Zeorin	22
2.7.7 Kyselina norstiktová	22
2.7.8 Kyselina vulpinová	23

2.7.9	Kyselina fumarprotocetrarová	24
2.7.10	Kyselina perlatolová	24
2.7.11	Kyselina skvamatová	25
2.7.12	Kyselina rhodokladonová	25
2.7.13	Kyselina thamnolová	25
2.7.14	Kyselina psoromová	26
2.8	Rod Cladonia	26
2.8.1	Cladonia portentosa (dutohlávka ježatá).....	27
2.8.2	Cladonia uncialis (dutohlávka hvězdovitá).....	29
2.8.3	Cladonia cariosa (dutohlávka zetlelá).....	30
2.8.4	Cladonia cryptochlorophaea	31
2.8.5	Cladonia fimbriata (dutohlávka třásnitá)	32
2.8.6	Cladonia digitata (dutohlávka prstítá).....	34
2.8.7	Cladonia deformis (dutohlávka znetvořená).....	35
2.8.8	Cladonia bellidiflora (dutohlávka chudobkokvětá)	36
2.8.9	Cladonia borealis (dutohlávka severní)	37
2.8.10	Cladonia norvegica (dutohlávka červenající)	38
3.	Metodika.....	41
3.1	Princip TLC chromatografie	41
3.2	Příprava vzorků dutohlávek	41
3.3	Postup vyvolání desky se vzorky	42
3.4	Určení sekundárních metabolitů	44
3.5	Použité chemikálie	45
3.6	Příprava didaktických pomůcek.....	45
4.	Praktická část.....	47
5.	Diskuse	52
6.	Závěr.....	54

7. Seznam literatury	55
8. Přílohy	61

Seznam zkratek

UV – ultrafialové

TLC – tenkovrstvá

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

UVB – středněvlnné

Seznam obrázků

Obrázek 1 - <i>Cladonia portentosa</i>	28
Obrázek 2 - <i>Cladonia mitis</i>	29
Obrázek 3 - <i>Cladonia stellaris</i>	29
Obrázek 4 - <i>Cladonia uncialis</i>	30
Obrázek 5 - <i>Cladonia biuncialis</i>	30
Obrázek 6 - <i>Cladonia cariosa</i>	31
Obrázek 7 - <i>Cladonia cryptochlorophaea</i>	32
Obrázek 8 - <i>Cladonia fimbriata</i>	33
Obrázek 9 - <i>Cladonia carneola</i>	33
Obrázek 10 - <i>Cladonia digitata</i>	34
Obrázek 11 - <i>Cladonia polydactyla</i>	35
Obrázek 12 - <i>Cladonia deformis</i>	36
Obrázek 13 - <i>Cladonia sulphurina</i>	36
Obrázek 14 - <i>Cladonia bellidiflora</i>	37
Obrázek 15 - <i>Cladonia borealis</i>	38
Obrázek 16 - <i>Cladonia coccifera</i>	38
Obrázek 17 - <i>Cladonia norvegica</i>	39
Obrázek 18 - <i>Cladonia coniocraea</i>	39
Obrázek 19 - <i>Cladonia ochrochlora</i>	40
Obrázek 20 – Určení Rf	45
Obrázek 21 - Výřez z RVP	46
Obrázek 22 - Počet obsažených sekundárních metabolitů hnědoplodých dutohlávek..	47
Obrázek 23 - Počet obsažených sekundárních metabolitů červenoplodých dutohlávek	48
Obrázek 24 - Deska před vypálením po aplikaci vody.....	61
Obrázek 25 - Deska před aplikací kyseliny sírové a vypálením pod krátkovlnným UV	61
Obrázek 26 - Deska před aplikací kyseliny sírové pod dlouhovlnným UV	62
Obrázek 27 - Deska po aplikaci kyseliny sírové a následném vypálení.....	62
Obrázek 28 - Deska po aplikaci kyseliny sírové a vypálení.....	63
Obrázek 29 - Deska po aplikaci kyseliny sírové a vypálení pod dlouhovlnným UV....	63

Seznam tabulek

Tabulka 1 - Obsah sekundárních metabolitů vybraných lišejníků rodu *Cladonia* 49

Tabulka 2 – Přehled důkazových reakcí sekundárních metabolitů obsažených v lišejnících rodu *Cladonia*..... 51

1. Úvod a cíle práce

Pro svou bakalářskou práci jsem se rozhodla zvolit téma sekundární metabolity lišejníků z toho důvodu, že ráda pracuji v laboratoři a určování metabolitů mi připadá fascinující.

Jako budoucí učitelka věřím, že by v rámci výuky biologie mohly lišejníkové látky zaujmout také mé budoucí studenty. Proto jsem se rozhodla vytvořit působivé materiály a aktivity, které je dokáží zaujmout a přitáhnout k tématu.

Některé z metabolitů je možné detekovat jednoduchými, všude dostupnými, zdraví neohrožujícími činidly, a proto není problém při výuce prezentovat barevné, a tedy i velmi efektní reakce. Mnoho druhů lišejníků se řadí mezi běžné a v přírodě rozšířené druhy a není problém sehnat dostatečné množství vzorků.

Všechny běžně dostupné lupenité i keříčkovité druhy tvoří zajímavé metabolity a velmi často se v jedné stélce vyskytuje více různých metabolitů. Také rozdíly v obsahu metabolitů v rámci určitého rodu (zajímají mě dutohlávky) budou pro studenty zajímavé. Některé mikrolišejníky s korovitou stélkou není možné bez determinace metabolitů určit do druhu.

Cíle teoretické části této bakalářské práce zahrnují představení nejdůležitějších informací o sekundárních metabolitech lišejníků, metod detekce sekundárních metabolitů a významné sekundární metabolity pro určení lišejníků rodu *Cladonia*.

Cíle praktické části této bakalářské práce zahrnují determinaci vybraných druhů dutohlávek na základě analýzy obsahu jejich sekundárních metabolitů pomocí metody tenkovrstvé chromatografie. Dále vytvoření přehledu určitých dutohlávek a jejich sekundárních metabolitů. Dalším cílem je v neposlední řadě vytvoření didaktických pomůcek pro výuku předmětu biologie, se zaměřením na sekundární metabolity a jejich detekci.

2. Literární rešerše

2.1 Lišejníky

Lišejníky nejsou uniformními organismy. Jako komplexní organismus je tvoří dva, někdy i tři odlišní partneři z různých říší. Nejčastěji jsou to vřeckovýtrusné houby, sinice a zelené řasy. Toto koordinované společenství dvou různých organismů se nazývá lichenismus, dříve označovaný jako symbióza. Lichenismus přináší partnerům vzájemně významné výhody. Houba (mykobiont) získává sacharidy nezbytné pro svou existenci od řasy nebo sinice (fotobionta) schopných fotosyntézy. Sinice svým symbiotickým partnerům také dodávají dusík, který fixují ze vzduchu (Wirth et al., 2013).

Dalším pozitivním aspektem vztahu je ochrana buněk fotobionta obalem houbového pletiva. Tento obal ho chrání před rychlou ztrátou vody a nadměrným slunečním zářením. Brání ho také před predátory, kteří se živí buňkami řas. Lišejníky dlouho fascinují badatele svými nejrůznějšími adaptacemi, které jim umožňují přežít na stanovištích pro jiné organismy neobyvatelné. Často se kolonizují substráty velmi chudými na živiny a snášejí extrémní sucho a mráz (Asplund et al., 2016).

Většina běžně se vyskytujících lišejníků kolem nás má strukturovanou stélku. Stélku (tělo) lze rozdělit podle vnitřní struktury na dva typy: stejnorodý (homeomerická) a vrstevnatý (heteromerická). Homeomerickou stélku nalezneme u rosolovitých lišejníků, kde jsou buňky fotobionta a hyfy hub rovnoměrně uspořádány. Snadno ji poznáme za deště, protože ve vlhku nasají vodu a zvětší objem až 40×. Vrstevnatá stélka je složena obvykle ze 3 odlišných vrstev (kůra, dřev a spodní vrstva s rhiziny). Buňky fotobionta se nacházejí pouze ve dřevné střední (Kremer, 1998).

U lišejníků lze podle tvaru rozlišit tři hlavní růstové formy stélky: lupenitá, korovitá a keříčkovitá. Stélku korovitých lišejníků tvoří malé šupiny, bradavky nebo malé lalůčky (stélka areolovitá – políčkovitá, bradavčivá a plakodiodní). Stélka u lupenitých lišejníků je tvořena plochými laloky. Větve keříčkovitých lišejníků jsou ploché, páskovité nebo nitkovité radiální nebo dorsoventrálně souměrné (Jahns, 1973).

Lišejníky se většinou vyskytují v terestrických ekosystémech, kde se vyskytují jako marginální přispěvatelé. Sladkovodních a mořských druhů je málo. V některých lesních a tundrových ekosystémech tvoří lišejníky velkou část biomasy. Lišejníky nalezneme na přibližně 8 % povrchu pevniny Země. Celosvětově existuje více než 18 000 druhů lišejníků. Ohledně výskytu lišejníků, je také vhodné zmínit, že na vyšších zeměpisných šířkách je větší počet druhů lišejníků než druhů cévnatých rostlin. Panuje zde méně příznivé klima, které může být pro rostliny s cévnatými orgány méně vhodné. Lišejníky jsou však schopné přežít v extrémních podmínkách, což jim umožňuje prosperovat v těchto oblastech (Asplund et al., 2016).

2.2 *Sběr lišejníků*

Sběr lišejníků má klíčový význam pro studium biodiverzity, taxonomie a ekologie těchto organismů. Tento proces je relativně jednoduchý, avšak vyžaduje opatrnost a ohleduplnost k životnímu prostředí. Pokud se stélka lišejníku nedá snadno oddělit od substrátu, což je časté u mnoha zemních lišejníků, provede se odebrání pomocí nože nebo kladiva spolu s tenkou vrstvou substrátu. Získané lišejníkové vzorky se poté ukládají do papírových sáčků na místě sběru s uvedením místa nálezu, substrátu a datem sběru. Čerstvý materiál se usuší a poté se ukládá pro další analýzu a determinaci. Při sběru lišejníků je důležité mít na paměti ohrožení určitých druhů. V některých případech by sběr pouhých několika exemplářů mohl mít za následek vyhubení populace na daném stanovišti. Po kompletním odstranění exempláře bude návrat vzácného druhu na stanoviště velmi pomalý. Proto je třeba sběr provádět šetrně a minimalizovat možné škody (Wirth et al., 2013).

2.3 *Sekundární metabolity lišejníků*

Živé organismy produkují celou řadu primárních metabolitů, jako jsou například aminokyseliny, sacharidy a fotosyntetické pigmenty. Tvoří také mnoho látek, které nejsou pro život jedince nezbytné. Rostliny také často produkují různé alkaloidy, glykosidy a mykotoxiny. Lišejníky vytvářejí mnoho sekundárních metabolitů a často je možné je využít při určování některých druhů (Malíček, 2012).

Obsah sekundárních metabolitů ve stélce lišejníků dosahuje 0,1 % až 10 % sušiny stélky, v některých případech může dosáhnout až 30 % obsahu sušiny. Sekundární metabolity vždy vytváří mykobiont (Goga et al., 2018). Více než 700 druhů známých sekundárních metabolitů produkují jen lišejníky. Jen malá část (zhruba 50 až 60

sekundárních metabolitů) se vyskytuje u nelichenizovaných hub a vyšších rostlin (Elix & Stocker-Wörgötter, 2008).

Rozpustnost lišejníkových látek ve vodě je velmi nízká, a proto se pro jejich izolaci využívají organická rozpouštědla, například aceton. Produkce sekundárních metabolitů v lišejnících je ovlivněna faktory prostředí jako je intenzita slunečního záření, množství UV záření, nadmořská výška, teplotní výkyvy a roční období. Věk lišejníku je také při tvorbě lišejníkových látek významný (Goga et al., 2018).

2.4 Detekce sekundárních metabolitů lišejníků

K detekci lišejníkových látek lze využít několik metod. Četné produkty metabolických procesů lišejníků jsou specifické pro jednotlivé druhy. Tím pádem jsou velmi účinnými charakteristickými znaky (Svrček, 1976). V následujících kapitolách stručně představím možné metody pro detekci sekundárních metabolitů u lišejníků.

2.4.1 Stélkové reakce a UV světlo

U stélkových reakcí se jedná o jednoduchý způsob, jak zjistit vybrané látky u lišejníků. K těmto reakcím se využívají roztoky hydroxidu draselného, chlorové vápno (např. Savo) a parafenylendiamin (Smith et al., 2009). K detekci sekundárních metabolitů se malé množství těchto roztoků nanese na stélku lišejníku a v případě přítomnosti hledané látky, dojde k barevné změně (nejčastěji na červenou, oranžovou, žlutou či růžovou). Dále je také možné pro detekci využít Lugolův roztok. Ten obsahuje jód a při kladné reakci s polysacharidy dojde k modrému zbarvení. Nevýhodou těchto reakcí je, že často nedosahují specifické odpovědi (reagují pouze na určitý typ sloučeniny), a proto není pokaždé možné jednoznačně určit konkrétní látku obsaženou ve stélce (Orange et al., 2010).

Pro detekci sekundárních metabolitů lišejníků lze také využít fluorescenci. Krátkovlnné (254 nm) a dlouhovlnné (366 nm) ultrafialové světlo se používá k identifikaci klíčových lišejníkových látek, což umožňuje pozorování oranžové, šedé, hnědé, červené a bílé barvy. Intenzita fluorescence se mění v závislosti na množství a typu přítomných látek. Fluorescence je vyvolána látkami v horní kůře (například xanthyony) nebo v dřevěné vrstvě (například alektoronová a divarikatová kyselina) (McCune, 2017).

2.4.2 Mikrokrystalizační testy

Mikrokrystalizační testy zahrnují rekrystalizaci lišejníkových látek pod mikroskopem. Tyto testy byly široce využívány předtím, než se stala populární pro určování tenkovrstvá chromatografie (McCune, 2017). Tato technika je užitečná pro rozlišení některých párů látek, které se špatně oddělují v běžně používaných systémech TLC. Jimiž jsou například kyselina gyroforová, lekanorová, barbatová a diffraktová. Dalšími mikrochemickými testy, které produkují charakteristické krystaly, jsou testy pro kyseliny norstiktovou (Orange et al., 2010).

2.4.3 Pigmenty a krystaly

Některé z lišejníkových pigmentů nelze rozpustit ani v organických rozpouštědlech, což znemožňuje jejich identifikaci pomocí mikrokrystalizačních testů nebo chromatografie. Na jejich identifikaci se proto používá sledování jejich reakcí na zásadité a kyselé prostředí, kdy přidání kyseliny chlorovodíkové může odhalit barevné změny. Další metodou je reakce s kyselinou dusičnou, díky které dochází ke změně barvy některých pigmentů na červenou (Malíček, 2012).

2.4.4 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Tenkovrstvá chromatografie je široce rozšířenou metodou v lichenologii. Jedná se o relativně jednoduchou a levnou techniku. Vzorky lišejníků se extrahují pomocí acetonu a tento extrakt se aplikuje na skleněné nebo hliníkové desky, které jsou potaženy křemičitým gelem. Takto připravená deska je umístěna do uzavřené nádoby a ponořena do konkrétní směsi organických rozpouštědel. Po ponoření začíná roztok na desce vzlínat a s ním i metabolity. Tyto metabolity jsou po vytažení desky zviditelněny postříkem kyseliny sírové nebo jinými činidly. Vzniklé skvrny jsou dočasně identifikovány podle své barvy a relativní polohy (Orange et al., 2010).

2.4.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie pracuje na stejných principech jako TLC chromatografie. Avšak použité desky jsou potaženy jemnějším křemičitým gelem, což umožňuje lepší rozlišení vzniklých skvrn. Výhody HPLC oproti TLC chromatografií spočívají ve větším rozlišení skvrn, větší citlivosti, rychlosti a menší spotřebou rozpouštědla. Navíc lze aplikovat vzorky na obě strany desky (Orange et al., 2010).

Z toho vyplívají další přednosti HPLC – detekce látek, které jsou zastoupeny pouze ve stopovém množství a možnost rozlišení látek příbuzných, jenž se při TLC

spojují do jedné skvrny. Kapalinová chromatografie také současně určuje absorpční maxima, které představují vlnové délky, při nichž dané metabolity absorbují nejvíce světla. Tím pomáhá při jejich identifikaci, jelikož různé metabolity mají obvykle charakteristická maxima (Malíček, 2012).

2.5 Význam sekundárních metabolitů

Role sekundárních metabolitů pro přežití a růst lišejníků může a nemusí být životně nezbytná. Lišejníkové látky však přinášejí oběma partnerům výhody. Mají vliv na širokou škálu biotických a abiotických interakcí mezi lišejníky a jejich prostředím. Některé ze sekundárních metabolitů například pomáhají chránit stélku před býložravci, patogeny, konkurenty a vnějšími abiotickými faktory, jako je například toxický substrát (Molnár & Farkas, 2010). Už po staletí se lišejníkové látky využívají v mnoha evropských zemích k barvení látek (Casselman, 1994), jako léčiva proti žaludečním chorobám, cukrovce, kašli, kožním onemocněním a na rychlejší hojení ran. Navíc také naleznou uplatnění i v potravinářství, výrobě parfémů, alkoholických nápojů a ve farmaceutickém průmyslu (Ranković et al., 2012).

Sekundární metabolity lišejníků sehrávají důležitou roli ve fotoprotekci. Tyto látky, jako je například kyselina usnová, absorbují škodlivé UVB záření, které by jinak inhibovalo fotosyntézu. Určité sekundární metabolity také přispívají k odolnosti vůči oxidačnímu stresu a expozici znečišťujícími látkami. Řada ze sekundárních metabolitů je také považována za důležité při konkurenci o ekologické niky a mohou působit jako inhibitory růstu a klíčení semen u vyšších rostlin. Studie prokázaly, že kyselina vulpinová a evernová mají schopnost inhibovat klíčení spor konkurenčních druhů (Calcott et al., 2018).

Deriváty orcinolu a β -orcinolu, jako jsou depsidy, depsidony a dibenzofurany pravděpodobně hrají roli při ustanovení lichenismu. Ovlivňují i interakce mezi symbionty a jejich životním prostředím. Navíc bylo prokázáno, že deriváty depsidonů vykazují také antioxidační účinky, o něco méně také depsidy (Haner et al., 2008). Také bylo zaznamenáno, že dochází ke změně množství sekundárních metabolitů v reakci na expozici těžkým kovům nebo anorganickým sloučeninám síry. Existují důkazy, že některé sloučeniny lišejníků se podílejí na udržování rovnováhy kovů (Calcott et al., 2018).

2.6 Rozdělení sekundárních metabolitů

Sekundární metabolity lišejníků lze rozdělit do několika hlavních skupin dle jejich chemické struktury a biologické funkce (Boustie et al., 2011). Mezi základní skupiny patří:

1. **Depsidy**: Obsahují dvě nebo více karboxylových kyselin spojených esterovou vazbou. Mají většinou antioxidační a antibakteriální účinky. Také mohou hrát roli při ochraně proti UV záření. Do této skupiny lze zařadit například atranorin, lekanorovou a norstiktovou kyselina.
2. **Depsidony**: Jsou podobné depsidům, ale obsahují navíc ketonovou skupinu. Mezi depsidony lze zařadit kyselinu alektoronovou.
3. **Dibenzofurany**: Obsahují dvě aromatické kružnice spojené kyslíkovým atomem. Jejich význam je spojen s fotoprotekcí. Jako příklad lze uvést kyselinu evernovou.
4. **Anthrachinony**: Tvoří skupiny barevných sloučenin s aromatickou strukturou. Jsou charakteristické pro své antioxidační vlastnosti. Do této skupiny patří kyselina usnová.
5. **Xanthony**: Ve své struktuře mají kyselé skupiny a mají antioxidační a antimikrobiální účinky. Do této skupiny lze zařadit vulpinovou kyselinu.

Toto rozdělení není zcela kompletní, ale představuje základní přehled o hlavních typech sekundárních metabolitů lišejníků (Elix et Stocker-Wörgötter, 2008).

2.7 Sekundární metabolity významné pro determinaci dutohlávek

U některých skupin dutohlávek mají sekundární metabolity klíčovou roli pro determinaci. Tato kapitola představuje vybrané významné sekundární metabolity, které mohou napomoci k jejich určení.

2.7.1 Atranorin

Atranorin je depsid, složený ze dvou aromatických kruhů spojených pomocí esterové vazby. Analýza celkového reaktivního antioxidačního potenciálu a celkové reaktivity antioxidantů prokázala, že atranorin působí jako obecný antioxidant (Kosanić et al., 2018). Další vlastností atranorinu je jeho protinádorová aktivita proti buněčným liniím rakoviny (Goga, 2018). Tento depsid je fluorescenční látkou, která absorbuje UVB záření. Pokud je atranorin osvětlen tímto zářením, pohlcuje vzniklou energii a následně eliminuje světlo o nižší energii, což je viditelné jako fluorescence. Toto světlo může být

využito chlorofylem v řasách při fotosyntéze k syntéze organických látek (Calcott et al., 2018).

Orange et al. (2010) uvádí, že retenční faktor atranorinu při TLC chromatografii s použitím systému C je 70. Výsledná barva skvrny po potření kyselinou sírovou a vypálení je žlutá až oranžovožlutá.

2.7.2 Kyselina usnová

Kyselina usnová je jedním z nejvíce zkoumaných sekundárních metabolitů v oblasti lišejníků. Díky svým rozmanitým biologickým a ekologickým aktivitám nachází uplatnění v kosmetickém průmyslu a lékařství (Goga, 2018).

Strukturální charakteristika a fyzikálně–chemické vlastnosti kyseliny usnové mají klíčovou roli v biologických účincích. Vykazuje široké spektrum bioaktivit, zahrnující antimikrobiální, protinádorové, protizánětlivé a analgetické vlastnosti. Jedná se o sekundární metabolit s jedinečnou strukturou dibenzofuranu, který je často přítomen v lišejnících rodů *Usnea*, *Lecanora* a *Cladonia*. Tato rozmanitá biologická aktivita a častý výskyt v různých typech lišejníků naznačuje potenciál kyseliny usnové v lékařském výzkumu (Luzina et al., 2018).

Dle Orange et al. (2010) má kyselina usnová při TLC chromatografii s použitím systému C retenční faktor 71. Po potření kyselinou sírovou a vypálení se skvrna zbarví do žluté barvy. Tato metoda umožňuje efektivně oddělit a určit kyselinu usnovou v analytických procesech.

2.7.3 Kyselina isousnová

Kyselina isousnová je řazena do skupiny dibenzofuranů. Je známá převážně svými antibakteriálními, antifungálními a cytotoxickými účinky. Studie prokázaly, že kyselina isousnová má také protizánětlivé účinky, jelikož inhibuje produkci oxidu dusnatého. Tato protizánětlivá aktivita může být důležitá při léčbě různých zánětlivých onemocnění (Mendili et al., 2022).

Orange et al. (2010) uvádí, že kyselina isousnová dosahuje retenčního faktoru 79 při TLC chromatografii s použitím systému C. Po potření kyselinou sírovou a následném vypálení se skvrna při této metodě zbarví do odstínu velmi světle žluté až šedozelené barvy.

2.7.4 Kyselina barbatová

Kyselina barbatová patří mezi depsidy a prokázala se jako vysoce multifunkční látka s protinádorovými účinky a schopností inhibovat růst rostlin. Využívá se jako herbicid, antioxidant a moluskocid (Wang, 2017). V nedávném výzkumu provedeném Yu et al. (2023) bylo zjištěno, že tato kyselina projevuje diuretický účinek na laboratorních myších. Tyto nové poznatky o jejím diuretickém účinku naznačují potenciál těchto sloučenin jako možných diuretik pro léčbu nefrolitiázy v budoucnosti.

Výzkum Silva et al. (2020) přinesl zajímavé poznatky ohledně kyseliny barbatové a její schistosomicidní účinnosti. Tato látka se ukázala jako účinný prostředek proti krevničce střevní (*Schistosoma mansoni*), jedná se o parazitického ploštěnce ze třídy motolic, který způsobuje střevní schistosomózu. Toto onemocnění obvykle postihuje játra a tlusté střevo. Kromě toho studie prokázala, že kyselina barbatová není toxická pro lidské mononukleární buňky periferní krve v koncentracích, které jsou účinné proti krevničce střevní.

Dle Orange et al. (2010) má kyselina barbatová retenční faktor 52 při TLC chromatografii s použitím systému C. Když je skvrna potřena kyselinou sírovou a poté je vypálena, přechází barva skvrny od bledě až do jasně žluté, přičemž její okraj získává růžový až růžvooranžový nádech.

2.7.5 Kyselina didymová

Kyselina didymová je jedním z fenolických sekundárních metabolitů lišejníků. Její přítomnost svědčí o složitých biochemických procesech probíhajících v rámci symbiotického systému lišejníků. Vzájemná interakce mezi mykobiontem a fotobiontem při tvorbě kyseliny didymové nám poskytuje vhled do složitého metabolismu lišejníků. Její význam však nespočívá jen v hledisku fyziologie, ale také z ekologického hlediska a možného využití v lékařství, jelikož prokázala antimikrobiální, antioxidantní nebo protizánětlivé vlastnosti (Jeong et al., 2021).

Dle Orange et al. (2010) má kyselina didymová v systému C (TLC) retenční faktor 52. Tato hodnota je shodná s retenčním faktorem kyseliny barbatové. Oba sekundární metabolity lze však odlišit pomocí výsledné barvy po potření desky kyselinou sírovou a vypálení. Kyselina didymová nevykazuje žádnou specifickou barvu na rozdíl od kyseliny barbatové. Pro její identifikaci je proto nezbytná UV lampa, kde se po ozáření zobrazí modrofialový nádech.

2.7.6 Zeorin

Zeorin je chemická sloučenina, která se spadá do skupiny látek nazvaných triterpeny (Goga, 2018). Strukturně se však odlišuje od ostatních triterpenů. Hlavním rozdílem je absence karboxylové skupiny, která je považována za zásadní rys související s inhibiční aktivitou. Tento strukturální rozdíl může mít vliv na další biologické vlastnosti zeorinu, což naznačuje potenciální zajímavost této sloučeniny v oblasti léčby a výzkumu (Thadhani & Karunaratne, 2017).

Zeorin prokázal antibakteriální účinky (Goga, 2018). Výzkum provedený Kosanic et al. (2010) navíc ukázal, že má relativně silnou antimikrobiální aktivitu a účinnost proti houbách a bakteriím.

Thadhani & Karunaratne (2017) ve své studii také zdůraznili hypoglykemický účinek zeorinu. Během jejich výzkumu na streptozocinem indukovaných diabetických krysách se ukázalo, že zeorin v dávce 50 mg/kg dokázal během dvou hodin snížit hladinu krevního cukru z 500 mg/dL na 400 mg/dL. Díky tomu by bylo možné využití zeorinu při regulaci glykemie u pacientů s diabetem.

Při provádění tenkovrstvé chromatografie s použitím systému C má zeorin retenční faktor 43. Výsledná barva zobrazená na TLC desce je popsána jako fialová, avšak s tlumeným tónem, což znamená, že není zcela jasná nebo sytá, ale spíše má jemnější odstín fialové (Orange et al., 2010).

2.7.7 Kyselina norstiktová

Kyselina norstiktová se řadí do skupiny depsidů. Patří mezi časté sekundární metabolity lišejníků (Nash, 2008). Tato fenolická sloučenina často krystalizuje přímo na povrchu hyf lišejníků. Struktura kyseliny norstiktové je často velmi podobná jiným lišejníkovým metabolitům a díky tomu může být těžká její identifikace (Hauck et al., 2010).

Výzkum Ebrahim et al. (2016) poukázal, že se kyselina norstiktová projevuje potenciální protinádorové účinky. Tato studie se zaměřila na zkoumání možnosti využití kyseliny norstiktové jako možného léčiva proti rakovině prsu. Experimenty provedené na laboratorních myších potvrdily, že tento sekundární metabolit dokáže účinně zpomalovat růst a šíření nádorových buněk rakoviny prsu, přičemž má minimální vedlejší účinky na ostatní zdravé buňky.

Orange et al. (2010) uvádí, že retenční faktor kyseliny norstiktové při TLC chromatografii se systémem C je 30. Pokud dále desku potřebe kyselinou sírovou a následně ji vypálíme skvrna se zobrazí jako sytě žlutá barva.

2.7.8 Kyselina vulpinová

Kyselina vulpinová je známá svou širokou škálu biologických účinků, které zahrnují antifungální, protinádorové a antioxidační vlastnosti (Yi et al. 2019). Nicméně se jedná i o látku toxickou. Je toxická pro různé druhy zvířat, nejen pro savce, ale také pro hmyz a měkkýše. Její účinky mají široký dosah a zasahují do chování mnoha živočichů (Elix & Stocker-Wörgötter, 2008).

Ve výzkumu provedeném Yi et al. (2019) byly zkoumány účinky kyseliny vulpinové na chování buněk, které se podílejí na tvorbě kostí a tukové tkáně. Studie prokázala, že kyselina vulpinová má schopnost ovlivňovat procesy diferenciacce buněk. U kmenových buněk bylo pozorováno zvýšení exprese genů, které souvisí s tvorbou kostí a snížením tvorby tukových buněk. Naopak u buněk předurčených k tukové diferenciaci došlo k urychlení procesu jejich přeměny na zralé buňky. Výsledky studie naznačují, že by kyselina vulpinová mohla být využita jako léčivo pro nemoci spojené s kosterní tkání a poruchami tukové tkáně.

V posledních letech získávají sekundární metabolity značnou pozornost díky jejich potencionálnímu využití v boji proti rakovině. Tento fakt reflektuje i výzkum vedený Cansaran-Duman et al. (2021), který se zaměřil právě na kyselinu vulpinovou. Jelikož tato látka má silný účinek proti různým typům rakoviny. Cílem studie bylo detailně prozkoumat, jaký vliv má kyselina vulpinová na buňky s metastatickým karcinomem prostaty. Bylo zjištěno, že může snížit životaschopnost rakovintvorných buněk a vést k jejich předčasné smrti. Dále byl v nedávném výzkumu Buda et al. (2024) zkoumán vliv kyseliny vulpinové a difraktové na rakovinu děložního čípku. Tato studie přinesla zajímavé poznatky, kdy bylo zjištěno, že zkoumané látky vykazují schopnost potlačit růst rakovintvorných buněk a vést ke jejich předčasné smrti. Zmíněné sekundární metabolity by tedy mohly poskytnout perspektivní přístup v léčbě rakoviny děložního čípku.

Kyselina vulpinová dosahuje v systému C retenčního faktoru 76 (TLC) a výsledná barva po vypálení je žlutá (Orange et al., 2010).

2.7.9 Kyselina fumarprotocetrarová

Kyselina fumarprotocetrarová patří mezi depsidony a strukturně je odvozena od kyseliny protocetrarové. Tato sloučenina je známá svými možnými farmaceutickými účinky (Sánchez et al., 2022).

Ve výzkumu Ureña-Vacas (2022) byla tato sloučenina zkoumána především pro antimikrobiální vlastnosti. Zjistilo se, že má účinky proti různým druhům bakterií a hub. Kromě toho byla prokázána také její schopnost potlačit aktivitu Trypanozomy svapičné (*Trypanosoma brucei*), což je parazitický organismus.

Dalším důležitým aspektem je funkce kyseliny fumarprotocetrarové jako antioxidantu. Tato látka byla také identifikována jako možnost léčby respiračních onemocnění. Výzkum prokázal pozitivní účinek na zlepšení vykašlávání hlenu v dýchacích cestách (de Barros Alves et al., 2014).

Orange et al. (2010) uvádí pro retenční faktor kyseliny fumarprotocetrarové v systému C hodnotu 7. Tato nízká hodnota značí, že kyselina fumarprotocetrarová má tendenci zůstat na koloně déle, což činí její identifikaci těžší. Výsledná barva se objevuje mírně nad startovní pozicí. Po vypálení se zobrazuje jako šedá.

2.7.10 Kyselina perlatolová

Kyselina perlatolová je zařazována do skupiny depsidů. Tento sekundární metabolit má antibakteriální a antimykotickou aktivitu, což znamená, že dokáže potlačovat růst a šíření určitých bakterií a plísní. Díky těmto vlastnostem byla kyselina v minulosti využívána k ošetřování ran a proti infekci (Gianini et al., 2008).

Z výsledků studie, která byla provedená v roce 2015 vyplývá, že kyselina perlatolová prokázala také pozitivní účinky na růst nervových buněk a je schopna inhibovat enzym acetylcholinestrázu. Což je důležité pro správnou funkci mozku. Toto zjištění by mohlo být užitečné při léčbě onemocnění centrálního nervového systému (Reddy et al., 2016).

V roce 2023 byl proveden výzkum, který se zaměřil na testování několika tříd sloučenin produkovaných lišejníky nebo přidruženými bateriemi a houbami na jejich účinnost proti lidskému koronaviru (HCoV-229E). Během tohoto výzkumu byla zaznamenána antivirová aktivita u čtyř zkoumaných sloučenin. Mezi tyto sloučeniny

patřila právě kyselina perlatolová, u které byla prokázána schopnost potlačit replikaci viru SARS-CoV-2 způsobující onemocnění COVID-19 (Desmarests et al., 2023).

Retenční faktor kyseliny perlatolové v systému C odpovídá hodnotě 54. Výsledná barva po dokončení procesu se zobrazuje jako žlutá až oranžová (Orange et al., 2010).

2.7.11 Kyselina skvamatová

Kyselina skvamatová se také řadí do skupiny depsidů. Stejně jako další sekundární metabolity z této skupiny má antimikrobiální a antioxidační vlastnosti. Její význam spočívá v možných léčebných účincích.

Ve výzkumu Nguyen et al. (2014) byla zkoumána cytotoxická aktivita kyseliny skvamatové společně s dalšími sekundárními metabolity lišejníků na rakovinových buňkách. Bylo zjištěno, že extrakt obsahující kyselinu skvamatovou vykazuje výraznou schopnost zabít rakovinné buňky. Kromě toho, když byla aplikována odděleně, vykazovala obdobnou aktivitu jak extrakt s vyšším počtem sloučenin. Díky tomuto zjištění by mohla najít uplatnění v protinádorových účincích.

Retenční faktor kyseliny skvamatové v systému C odpovídá hodnotě 28. Zobrazená barva po potření TLC desky kyselinou sírovou a následném vypálení je světle oranžová (Orange et al., 2010).

2.7.12 Kyselina rhodokladonová

Kyselina rhodokladonová je červený pigment, který se vyskytuje v mnoha druzích lišejníků, zejména rodu *Cladonia*. Svou barvou často přispívá k nápadnému zabarvení lišejníků. Je derivátem naftochinonu. Tato kyselina byla z lišejníků identifikována a izolována pravděpodobně jako jedna z prvních (Baker & Bullock, 1969).

Při využití TLC chromatografie (systém C) má kyselina rhodokladonová nízký retenční faktor, jehož hodnota činí 4. Tato skutečnost komplikuje přesné určení této látky. Avšak jednou z charakteristických vlastností této látky je výrazná barva, která se během chromatografického procesu projevuje odstíny od červené po fialovou (Orange et al., 2010).

2.7.13 Kyselina thamnolová

Kyselina thamnolová se řadí do skupiny depsidů a projevuje potencionální antibakteriální, antituberkulózní a antifungální účinky. Byl zaznamenán silný účinek proti

bakteriím a kvasinkám. Vzhledem k tomu by mohla být využita jako antimikrobiální činidlo v potravinářském průmyslu (Goga et al., 2018).

Kyselina thamnolová je známá u lišejníků, které prokazují odolnost vůči kyselému prostředí, jako je široce rozšířený druh *Cladonia digitata*. Její přítomnost je spojena se schopností lišejníků růst na substrátech s nízkým pH a s odolností vůči znečištění ovzduší (Hauck et al., 2009).

Podle Orange et al. (2010) dosahuje kyselina thamnolová při TLC chromatografii se systémem C hodnotu retenčního faktoru 13. Po aplikaci kyseliny sírové a vypálení se skvrna zobrazí jako oranžovožlutá až oranžová.

2.7.14 Kyselina psoromová

Kyselina psoromová je organickou látkou, která se vyznačuje biologickou aktivitou, jako jsou antioxidační účinky a působící jako ochrana kardiovaskulárního systému (Behera et al., 2012). Vykazuje také antimykobakteriální aktivitu proti působení enzymů *Mycobacterium tuberculosis*. Proto je považována za potencionálně terapeuticky významnou při léčbě tuberkulózy (Hassan et al., 2018).

Ve výzkumu provedeném Hassan et al. (2019) byla kyselina psoromová zkoumána pro své schopnosti potlačit šíření viru herpes simplex typu 1 (HSV-1) a typu 2 (HSV-2). HSV-1 často vyvolávající opary na tváři, zatímco HSV-2 je hlavním faktorem genitálního oparu. Byla prokázána vysoká účinnost této látky v potlačení obou typů viru, přičemž dosáhla lepších výsledků než standardní léčivo acyklovir. Studie rovněž ukázala, že kyselina psoromová brání fungování enzymu HSV-1 polymeráza a HSV-2 polymeráza, které jsou klíčové pro replikaci viru.

Elix (2014) uvádí retenční faktor při TLC chromatografii s využitím systému C jako 41 a výsledná skvrna je charakterizována jako hnědá.

2.8 Rod *Cladonia*

Rod *Cladonia* je jedním z největších rodů lichenizovaných hub. Rod je známý svou rozmanitostí, zahrnuje téměř 500 druhů (Stenroos et al., 2018). Zástupce nalezneme v oblastech s vysokou vlhkostí, od nížinných tropických oblastí po pobřeží oblasti Antarktidy a Arktidy, nevyskytují se však na suchých a polosuchých pouštích (Burgaz et al., 2020). V současnosti se dutohlávky stávají stále více studovanými organismy, jelikož

poskytují důležité poznatky o biodiverzitě, ekologii a fylogenezi lišejníků (Stenroos et al., 2018).

U dutohlávek se vyskytuje tzv. dvoutvará (dimorfní) stélka. Primární stélku (*thallus horizontalis*) tvoří šupiny. Sekundární stélka (*thallus verticalis*) je tvořen pohárky různého tvaru (podetiemi nebo pseudopodetiemi) (Ahti et al., 2013). Podetia jsou větvené výrůstky, které vyrůstají ze stélky a nemají dřevnou vrstvu. Povrchová struktura těchto pohárků je druhově specifická, hladká, moučnatě sořediosní nebo vláknitá, připomínající pavučinu (Pino-Bodas et al., 2016).

Dutohlávky představují významnou skupinu lišejníků obývajících ekosystémy boreálních lesů a arktické tundry. Jsou specializované na život na zemi (terikolní druhy) a na mrtvém dřevě (lignikolní druhy). Tento adaptativní způsob dutohlávkám umožňuje prosperovat v různých prostředích, jako jsou lesní půdy a mrtvé dřevo. Některé druhy rostou i epifyticky (Ahti et al., 2013).

V rodu dutohlávek bylo identifikováno okolo 70 sekundárních metabolitů (Burgaz et al., 2020). Mezi tyto látky patří rozmanité skupiny, včetně depsidů, několik depsidonů, dibenzofuranů a jejich derivátů, dále také anthrachinony, vyšší alifatické kyseliny a triterpenoidy (Ahti et al., 2013). Pro identifikaci těchto metabolitů je možné využít různé analytické metody. Jednou z nich je využití UV záření, které umožňuje pozorování fluorescence některých depsidů a depsidonů. Kromě toho se tradičně využívají barevné testy skvrn s reagenty (například s hydroxidem draselným). Avšak tyto testy mohou selhat při nízké koncentraci nebo při detekci specifických látek. Vzhledem k citlivosti a spolehlivosti je stále považována za nejefektivnější techniku tenkovrstvá chromatografie (Burgaz et al., 2020).

Dutohlávky mohou být rozděleny buď podle typu stélky nebo podle barvy plodnic na červenoplodé a hnědoplodé (Ahti et al., 2013).

KEŘÍČKOVITÉ DUTOHLÁVKY

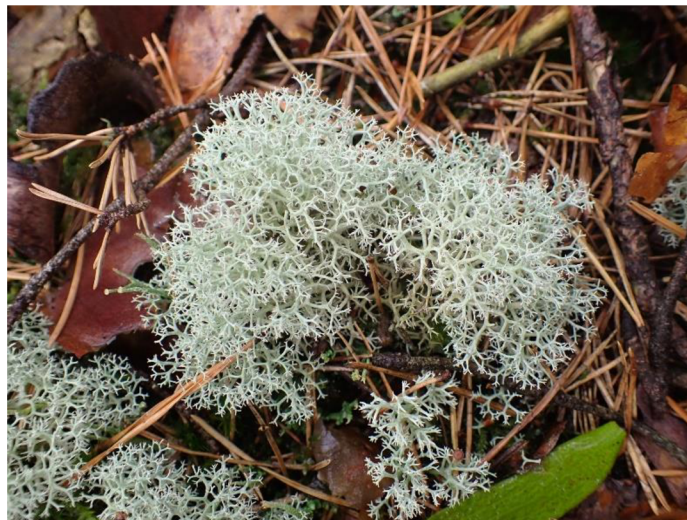
2.8.1 *Cladonia portentosa* (dutohlávka ježatá)

Cladonia portentosa se v Evropě vyskytuje na kyselé půdě v rozmezí nadmořské výšky od 0 do 1 500 metrů. Nejčastější je v eurosibiřské oblasti, ale roztroušeně se objevuje i ve Středomoří (Burgaz et al., 2020). Druh patří do rozsáhlé skupiny tzv. keříčkovitých dutohlávek, které nevytváří šupiny, ale bohatě větvenou strukturu keříčků.

Keříčky dorůstají do výšky až 11 centimetrů, obvykle mají světle žlutozelenou až popelavě šedou barvu a jejich povrch je hladký a bez kůry. Vzácně vytváří plodnice (apothecia) hnědé barvy (Ahti et al., 2013).

Dutohlávka ježatá vytváří sekundární metabolity kyselinu usnovou a perlatolovou, vykazující výraznou fluorescenci při osvětlení UV záření. Zvláště významná je přítomnost kyseliny perlatolové, která slouží k odlišení od *Cladonia mitis*, jenž tuto kyselinu neobsahuje. Chemicky a částečně i morfologicky podobným druhem je také dutohlávka horská (*Cladonia stellaris*), rovněž obsahující kyselinu perlatolovou. Na první pohled však lze pozorovat rozdíly, jako jsou hustší větvení a více kompaktní struktura, která připomíná květákovité hlavičky (Burgaz et al., 2020).

Cladonia portentosa byla identifikována jako jedna z možných látek pro inhibici acetylcholinestrázy, což naznačuje, že může obsahovat látky s potenciální léčebnou účinností při léčbě neurodegenerativních onemocnění (např. Alzheimerova choroba) (Nagar et al., 2023).



Obrázek 1 - *Cladonia portentosa*

Zdroj: (Malíček, 2022), online



Obrázek 2 - *Cladonia mitis*

Zdroj: (Maliček, 2021), online



Obrázek 3 - *Cladonia stellaris*

Zdroj: (Maliček, 2023), online

HNĚDOPLODÉ DUTOHLÁVKY

2.8.2 *Cladonia uncialis* (dutohlávka hvězdovitá)

Cladonia uncialis se často vyskytuje na půdě mezi mechy, na dobře osvětlených a obnažených místech. Je běžná v jehličnatých lesích, na vřesovištích a písčinych dunách v Evropě, Severní Americe a Asii. Stélka dutohlávky hvězdovitá má barvu žlutozelenou nebo zelenou, často přecházející do hnědé směrem ke špičatým koncům větví (Studzińska-Sroka et al., 2015). U této dutohlávky převažuje tripolytomické až tetrapolytomické větvení (Ahti et al., 2013).

Podobá se druhu *Cladonia biuncialis*, ale v kontrastu k tomuto lišejníku nevytváří *Cladonia uncialis* práškovitý povrch v centrální dutině podetií a obsahuje pouze vzácně kyselinu skvamatovou, zatímco *Cladonia biuncialis* ji zpravidla tvoří (Ahti et al., 2013). U *Cladonia uncialis* se také vyskytuje kyselina usnová (Burgaz et al., 2020).



Obrázek 4 - *Cladonia uncialis*

Zdroj: (Malíček, 2008), online



Obrázek 5 - *Cladonia biuncialis*

Zdroj: (Sanderson, 2013), online

2.8.3 *Cladonia cariosa* (dutohlávka zetlelá)

Cladonia cariosa představuje pionýrský terikolní druh, který preferuje půdy s nízkým obsahem živin. Jeho rozšíření zahrnuje různé nadmořské výšky, od nížin až do hor, včetně stanovišť jako jsou vřesoviště, písčné pláně a mělké minerální půdy (Rola,

2020). Stélka dutohlávky zetlelé je charakterizována primární šupinovitou stélkou, slouženou z drobných šupin s okraji buď celistvými nebo s jemnými zářezy. Při pozorování podetí jsou patrné podélné trhliny, jejichž povrch je tvořený rozpraskanou kůrou. Apothecia mají tmavě hnědou barvu a dosahují průměru až 3 mm. Jsou nahloučené do skupin a vytvářejí útvar připomínající hrozen (Burgaz et al., 2020).

V rámci druhu *Cladonia cariosa* byla pozorována značná variabilita jak z morfologického, tak z hlediska chemismu, což vede k vytvoření rozmanité škály sekundárních metabolitů. Tato variabilita se projevuje přítomností několika různých chemotypů (Ahti et al., 2013). Tyto chemotypy často obsahují atranorin spolu s rangiformovou nebo fumarprotocetrarovou kyselinou, případně i bez nich. Kromě toho jsou známy i chemotypy, obsahující norstiktovou a psoromovou kyselinou (Pino-Bodas et al., 2012).



Obrázek 6 - *Cladonia cariosa*

Zdroj: (Malíček, 2008), online

2.8.4 *Cladonia cryptochlorophaea*

Cladonia cryptochlorophaea roste na tlejícím dřevě, na spodních částech listnatých stromů, v humusu nebo výjimečně na holé půdě (Burgaz et al., 2020). Primární stélka je složená z drobných a trvalých šupin. Podetia mají zelenošedou barvu, tvarem připomínají široké nálevky. Plodnice, které jsou u *Cladonia cryptochlorophaea* velmi vzácné, mají tmavě hnědou barvu. V rámci struktury plodnic jsou pozorovatelné pyknidy, což jsou drobné útvary sloužící k produkci nepohlavně vznikajících konidií (spor). Pro přenos a udržení spor se tvoří hyalinní sliz (Ahti et al., 2013).

Druh *Cladonia cryptochlorophaea* je možné spolehlivě rozlišit od ostatních druhů pomocí analýzy jeho specifických sekundárních metabolitů. Dutohlávka vytváří kryptochlorofaeovou a paludosovou kyselinu. Dále obsahuje komplex kyseliny fumarprotocetrarové, který je téměř vždy přítomen v evropských populacích (Ahti et al., 2013). Zmíněné specifické sekundární metabolity pro *Cladonia cryptochlorophaea* lze účinně identifikovat pomocí tenkovrstvé chromatografie. Kyselina kryptochlorofaeová dosahuje při využití systému C retenčního faktoru 37 a barva po potření kyselinou sírovou a vypálení je tmavě oranžová s růžovým až fialovým okrajem (Orange et al., 2010). U kyseliny paludosové je uváděn retenční faktor 33. Po provedení tenkovrstvé chromatografie je zobrazená výsledná skvrna popsána barvou červenou (Elix, 2014).



Obrázek 7 - *Cladonia cryptochlorophaea*

Zdroj: (Sanderson, 2021), online

2.8.5 *Cladonia fimbriata* (dutohlávka třásnitá)

Cladonia fimbriata je běžným druhem všech bioklimatických pásů středomořských zemí. Vyskytuje se na holé půdě, humusu, vzácněji na rozkládajícím se dřevě a bázích stromů. Jedná se o druh rozšířený na obou polokoulích (Burgaz et al., 2020). Vyznačuje se hnědoplodými pohárky a dutými podecií, které se v horní části náhle rozšiřují. Okraj podetií je v ideálním stavu mírně zubatý, což odpovídá názvu této dutohlávky (Ahti et al., 2013).

Z hlediska sekundárních metabolitů obsahuje dutohlávka třásnitá kyselinu kvesitovou a komplex kyseliny fumarprotocetrarové. V oblasti střední Evropy byl zaznamenán chemotyp obsahující navíc kyselinu bourgeanovou. *Cladonia fimbriata* vykazuje podobnost s *Cladonia cryptochlorophaea*, ta však obsahuje již

zmíněné specifické sekundární metabolity (krytochlorofaeová a paludosová kyselina). Další podobnost lze nalézt s druhem *Cladonia carneola* (dutohlávka pleťová). Rozdíl je v celkovém žlutém zbarvení dutohlávky pleťové, které je způsobeno přítomností kyseliny usnové (Burgaz et al., 2020).



Obrázek 8 - *Cladonia fimbriata*

Zdroj: (Sanderson, 2007), online



Obrázek 9 - *Cladonia carneola*

Zdroj: (Timdal, 2015), online

ČERVENOPLODÉ DUTOHLÁVKY

2.8.6 *Cladonia digitata* (dutohlávka prstítá)

Cladonia digitata běžně roste na rozkládajícím se dřevě a na bázích listnatých a jehličnatých stromů. Často se vyskytuje v lesích biotopech s vyšší vlhkostí a dlouhou ekologickou stabilitou. V Evropě patří mezi hojně rozšířené druhy (Burgaz et al., 2020). Primární stélka je trvalá a tvoří ji sorediózní přizemní šupiny. Podetia jsou tvarem proměnlivá, s povrchem pokrytým kůrou a sorediózními útvary v horní části. Rumělkově červená apothecia obvykle nejsou vytvořena. Červené pyknidy mají obvykle vejčité až kuželovité tvar a obsahují červený sliz (Ahti et al., 2013).

Sekundární metabolity dutohlávky prstíté zahrnují kyselinu thamnolovou a rhodokladonovou (důvod červeného zbarvení). Tento druh dutohlávky může být zaměněn s *Cladonia polydactyla* (dutohlávka mnohoprstá). Ta má však menší šupiny s hlubokými zářezy, na okraji méně sorediózními. Dále je v sekundárních metabolitech tohoto druhu obsažena kyselina usnová (Burgaz et al., 2020).



Obrázek 10 - *Cladonia digitata*

Zdroj: (Sanderson, 2015), online



Obrázek 11 - *Cladonia polydactyla*

Zdroj: (Sanderson, 2016), online

2.8.7 *Cladonia deformis* (dutohlávka znetvořená)

Cladonia deformis se vyskytuje na humusu s bohatou půdou, v hustě zarostlých lesích a na kamenech, občas i na rozkládajícím se dřevě. Vykazuje širokou škálu stanovišť, což zahrnuje i různé typy přírodních prostředí. Přítomnost dutohlávky znetvořené na humusu a skalách naznačuje schopnost přizpůsobit se různým podmínkám a prostředím (Ahti et al., 2013). Thallus tohoto lišejníku představuje šupinatou strukturu. Podetia mají obvykle zelenožlutou až šedozelenou barvu a mají trumpetový tvar. Plodnice jsou červené, ale jejich výskyt je velmi vzácný. Přítomné pyknidy mají uvnitř červený sliz (Burgaz et al., 2020).

Cladonia deformis vytváří několik specifických látek, mezi které patří kyselina usnová, isousnová, rhodokladonová, zeorin, bellidiflorin a stopové množství neznámých terpenoidů. Zeorin se na povrchu těla lišejníku ukládá ve formě krystalických jehlic, které je možné pozorovat na herbářových exemplářích (Ahti et al., 2013). Některé formy tohoto lišejníku jsou robustnější a připomínají druh *Cladonia sulphurina*, ten má však typicky podetia s podélnými trhlinami, a navíc obsahuje kyselinu skvamatovou (Steinová et al., 2013).



Obrázek 12 - *Cladonia deformis*

Zdroj: (Bouda, 2017), online



Obrázek 13 - *Cladonia sulphurina*

Zdroj: (Sanderson, 2009), online

2.8.8 *Cladonia bellidiflora* (dutohlávka chudobkokvětá)

Cladonia bellidiflora se vykytuje na kyselých půdách, ve vysokohorských rašeliništích, na mechem pokrytých skalách nebo v borovicových lesích. Preferuje oblasti s mikroklimaticky vyšší vlhkostí, jako jsou například lokality s dlouhodobě zasněženým povrchem (Burgaz et al., 2020).

Stélka dutohlávky chudobkokvěté je charakterizována výraznou šupinovitou stélkou. Podetia mají žlutozelenou barvu a dosahují výšky 3 až 8 centimetrů. Na koncích pohárků vyrůstají hojně červená polokulovitá apothecia (Ahti et al., 2013).

Cladonia bellidiflora vytváří kyselinu usnovou, která pouze výjimečně chybí. Dále kyseliny skvamatovou, rhodokladonovou a belidiflorin. V oblasti Severní a Jižní Ameriky se vyskytují další chemotypy, obsahující tamnolovou nebo fumarprotocetrarovou kyselinu (Ahti et al., 2013).



Obrázek 14 - *Cladonia bellidiflora*

Zdroj: (Maliček, 2022), online

2.8.9 *Cladonia borealis* (dutohlávka severní)

Dutohlávka severní je v Evropě často zaznamenávána zejména v horských a boreálních regionech, kde se vyskytuje na minerální půdě, ale také na humusu nebo tenkých vrstvách půdy na skalnatých podkladech z křemence. Obecně preferuje otevřená stanoviště (Steinová et al., 2015). Stélku této dutohlávky tvoří šupiny s vlnitým okrajem a zaoblenými laloky. Šupiny jsou na svrchní straně zbarveny do šedo zelené, zatímco na spodní straně převažuje barva bílá. Podetia jsou obvykle žlutozelená až šedo zelená a na jejich vrcholu lze pozorovat ploché destičky. Apotecia jsou zřídka k vidění a mají výraznou červenou barvu (Burgaz et al., 2020).

Mezi sekundární metabolity, které jsou obsaženy ve stélce *Cladonia borealis*, patří kyselina usnová, barbatová, rhodokladonová a často i některá z mastných kyselin (Ahti et al., 2013). Právě přítomnost kyseliny barbatové má významnou roli při rozlišení této dutohlávky od podobného druhu *Cladonia coccifera* (dutohlávka červcová), který tuto kyselinu neobsahuje. Dalším rozlišovacím prvkem jsou puchýřnaté destičky na povrchu podetií, které jsou u *Cladonia coccifera* šupinovité (Steinová et al., 2015).



Obrázek 15 - *Cladonia borealis*

Zdroj: (Bouda, 2007), online



Obrázek 16 - *Cladonia coccifera*

Zdroj: (Timdal, 2007), online

2.8.10 *Cladonia norvegica* (dutohlávka červenající)

Cladonia norvegica je druhem vyskytujícím se převážně v lesích s vlhkým mikroklimatem a starými jehličnatými stromy. Nejčastěji ji nalezneme na tlejícím dřevě pařezů a klád (Ahti et al., 2013). Primární stélku dutohlávky červenající tvoří šupiny poseté nápadnými červenými skvrnami způsobenými kyselinou rhodokladonovou. Šupiny jsou malé, lalokovité a jemně rozdělené, jejich barva na horní straně je šedozeleň a na spodní bílá. U tohoto druhu jsou patrná šídlovitá podetia (Burgaz et al., 2020).

Cladonia norvegica sdílí některé charakteristiky s dalšími příbuznými druhy, jako je *Cladonia coniocraea* (dutohlávka jehlicovitá) a *Cladonia ochrochlora* (dutohlávka okrozelená). Tyto druhy mohou být na první pohled podobné, avšak jejich rozlišení je

možné pomocí analýzy obsahu sekundárních metabolitů. Kyselina barbatová a 4-O-demetylbarbatová jsou přítomny pouze u dutohlávky červenající, u dutohlávky jehlicové a okrozelené chybí. Tato podobnost s těmito častěji se vyskytujícími druhy může být jeden z důvodů, proč byla *Cladonia norvegica* v minulosti přehlížena nebo nedostatečně zkoumána (Schram et al., 2013).



Obrázek 17 - *Cladonia norvegica*

Zdroj: (Maliček, 2023), online



Obrázek 18 - *Cladonia coniocraea*

Zdroj: (Bouda, 2007), online



Obrázek 19 - *Cladonia ochrochlora*

Zdroj: (Sanderson, 2022), online

3. Metodika

V praktické části byla pro postup při TLC chromatografii využita publikace Orange et al. (2010).

3.1 *Princip TLC chromatografie*

Při technice tenkovrstvé chromatografie (TLC) jsou klíčovými stacionární (nepohyblivá) a mobilní (pohyblivá) fáze. Jako stacionární část jsou nejčastěji využívány hliníkové nebo skleněné desky pokryté sorbentem – silikagelem nebo oxidem hlinitým. Pro pohyb mobilní fáze se využívají různá organická rozpouštědla. Tyto látky jsou schopné se pohybovat přes stacionární fázi a oddělovat složky analytu na základě jejich interakcí s oběma fázemi (Schneiderka, 2000).

Vzhledem k nízké rozpustnosti sekundárních metabolitů ve vodě je pro jejich extrakci preferován aceton. Extrakt je poté aplikován na desku (stacionární fáze) pomocí tenkých kapilár a umístěn do vyvíjející komory s vhodným organickým rozpouštědlem (mobilní fáze) (Orange et al., 2010).

Mobilní fáze stoupá po stacionární fázi společně s látkami obsaženými v lišejníku. Tyto látky se liší v jejich afinitě ke stacionární fázi a mobilní fázi, což způsobuje jejich rozdělení a pohyb různými rychlostmi. Látky, které mají větší afinitu ke stacionární fázi, se pohybují pomaleji než ty, které mají větší afinitu k mobilní fázi (Santiago & Strobel, 2013). Po dokončení TLC chromatografie lze pozorovat stopy metabolitů ve formě charakteristických skvrn. Tyto skvrny jsou výsledkem různých rychlostí, kterými se látky pohybovaly po tenké vrstvě sorbentu (Orange et al., 2010).

Pro identifikaci sekundárního metabolitu je nezbytné nejprve vypočítat retenční faktor. Následně je důležité vizuálně pozorovat barvu vzniklých skvrn. Pro zjištění přesnosti a případně správnosti výpočtu se používá kontrolní vzorek. Ten je nanášen na třetí pozici od obou okrajů desky. Typicky se jako kontrolní vzorek volí kyselina norstíkotvá nebo atranorin (Orange et al., 2010).

3.2 *Příprava vzorků dutohlávek*

V rámci praktické části byly herbářové vzorky dutohlávek vybrány ze soukromé sbírky RNDr. Josefa Haldy, Ph.D. Z těchto vybraných vzorků byla pomocí pinzety odstraněna malá část dutohlávky, která byla následně vložena do mikrozkušavky o objemu 2 ml. Dále bylo do zkumavky pipetováno 150 μ l acetonu s důrazem na to, aby

vzorek neplaval a hladina acetonu nepřesáhla úroveň zúžení zkumavky. Je třeba zdůraznit opatrnost při pipetování acetonu ke vzorku, aby nedošlo ke kontaktu špičky se vzorkem. To by mohlo způsobit kontaminaci a znehodnocení vzorku. Po této přípravě byl vzorek označen číslem a názvem druhu.

3.3 Postup vyvolání desky se vzorky

1. Příprava vyvíjející komory

Byl připraven roztok pro systém C složený ze 170 ml toluenu a 30 ml kyseliny octové. Část připraveného roztoku byla jako medium do vyvíjející komory do výšky hladiny zhruba 10 mm. Pro dosažení optimálních podmínek byla vyvíjející komora přiklopena víkem alespoň 30 minut před vložením desky, aby byl prostor nasycen výparů z roztoku.

2. Příprava stacionární fáze

Stacionární fázi je skleněná deska pokrytá silikagelem. Na horní a dolní část okraje desky byla zakreslena čára ve vzdálenosti 20 mm od kraje a uprostřed desky bylo vyznačeno čelo. Následně byla definována startovní pozice pro aplikaci vzorků. První a poslední pozici byla umístěna 15 mm od krajů, mezi ostatními byl zachován rozestup 10 mm. Pro kontrolní vzorek byla označena třetí pozici z obou stran.

3. Nanesení vzorků

Připravené vzorky s acetonem byly aplikovány pomocí tenkých kapilár na startovní pozice. Každý vzorek byl nanášen samostatnou kapilárou, aby se předešlo možné kontaminaci vzorků. Na startovní pozice byla nanesena jedna až dvě kapky, aby nedošlo ke spojení se vzorkem na sousední pozici. Tento proces byl opakován minimálně 15x.

4. Vložení desky do vyvíjející komory

Připravená deska s aplikovanými vzorky byla vložena do vyvíjející komory a vyvíjena po dobu zhruba 30 až 60 minut, dokud se hladina vztlínání nepřiblížila k označenému čelu. Doba vyvíjení se může lišit v závislosti na staří používaného systému C, okolní teplotě a dalších atmosférických podmínkách v danou chvíli. Následně byla deska otočena a druhá strana vyvíjen stejným způsobem.

5. Vyjmutí desky z vyvíjející komory

Desku byla vyjmuta z vyvíjející komory a umístěna na filtrační papír v digestoři. Poté byla deska nechána důkladně vyschnout, dokud byl zcela eliminován jakýkoliv zápach octové kyseliny.

6. Příprava trouby

Během procesu vysoušení desky v digestoři byla trouba předehřata na teplotu 110 °C.

7. Pozorování desky na denním světle

Po vysušení a odpaření desky byla pečlivě prohlédnuta a vyfocena zblízka za běžného osvětlení. Pozice vzniklých skvrn na desce byly označeny pomocí tužky kroužkem.

8. Pozorování desky pod krátkovlnným UV

Vzhledem k potenciálnímu poškození zraku krátkovlnným UV světlem je nezbytné použít ochranné brýle. Deska byla umístěna pod UV lampu (nastavena na 254 nm), byly pořízeny fotografie a nově zobrazené skvrny byly identifikovány a zakresleny pomocí vlnovky.

9. Pozorování desky pod dlouhovlnným UV

Je třeba si ponechat ochranné brýle kvůli možnému poškození zraku dlouhovlnným světlem. UV lampa byla nastavena na dlouhovlnné UV (366 nm). Dále byla deska znovu vyfocena a nové skvrny zakresleny přerušovanou čarou.

10. Zjištění přítomnosti mastných kyselin

Pro detekci mastných kyselin byla deska opatrně pomocí stříčky polita studenou vodou. Pokud jsou přítomny mastné kyseliny, objeví se bílé skvrny na průsvitném pozadí, které byly případně zakresleny křížkem. Deska byla znovu vyfotografována.

11. Ředění kyseliny sírové

Pro přípravu 250 ml 10% kyseliny sírové byla ředěna 96% kyselina sírová destilovanou vodou. Do kádinky bylo nejprve nalito 225 ml destilované vody a následně opatrně přilito 25 ml 96% kyseliny sírové.

12. Aplikace kyseliny sírové

Z důvodu zachování bezpečnosti při práci byly nasazeny silné rukavice a do kádinky nalita 10% kyselina sírová. Celá deska byla pomocí širokého štětce s hustými štětinami potřena připravenou kyselinou.

13. Vypékání v troubě

Ihned po potřetí kyselinou sírovou byla deska vložena do přehřáté trouby. Deska byla vypékána přibližně 10 minut a následně vyjmuta z trouby, jakmile se vyvinou požadované skvrny. Příliš dlouhé vypalování nebo příliš vysoká teplota mohou způsobit zmatnění barev skvrn a zhnědnutí celé desky.

14. Pozorování desky na denním světle

Během vypékání mohly vzniknout nové načervenalé skvrny, které patří terpenoidům. Deska byla znovu vyfocena na denním světle a tyto skvrny byly identifikovány vyšrafováním.

15. Pozorování desky pod dlouhovlnným UV

Jako poslední krok byla deska opět vystavena dlouhovlnnému UV záření (366 nm) a nově zobrazené skvrny byly zakresleny přerušovanou čarou.

(Orange et al., 2010)

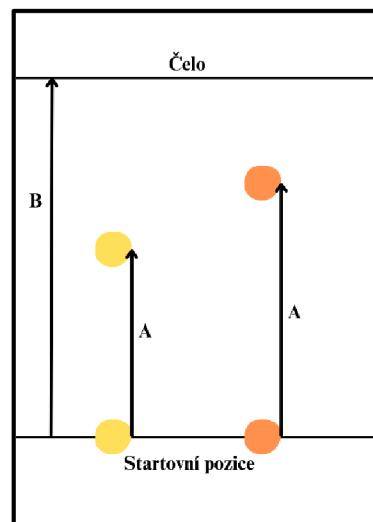
3.4 Určení sekundárních metabolitů

Pro vyvolání desky je možné přistoupit k určení sekundárních metabolitů. Pro jejich identifikaci se používá metoda výpočtu retenčního faktoru (zkráceně Rf). Představuje hodnotu, která umožňuje porovnat pohyb analytu na desce s pohybem rozpouštědla.

Vypočítání retenčního faktoru probíhá podle následujícího postupu:

1. Změříme vzdálenost skvrny od startovní pozice, čímž získáme hodnotu A.
2. Změříme vzdálenost mezi čelem a startovní pozicí, čímž získáme hodnotu B.
3. Obě tyto hodnoty dosadíme do následujícího

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



(Orange et al., 2010)

Obrázek 20 – Určení Rf

Zdroj: vlastní

Pro správnou identifikaci sekundárních metabolitů je nezbytné získat následující informace: hodnotu retenčního 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. S těmito údaji je možné podle odborné literatury přesně identifikovat daný sekundární metabolit (Schumm, 2016).

3.5 Použité chemikálie

Kyselina octová CH_3COOH (PENTA s.r.o., Praha, Česká republika)

Toluen $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ (PENTA s.r.o., Praha, Česká republika)

Aceton CH_3COCH_3 (PENTA s.r.o., Praha, Česká republika)

Kyselina sírová H_2SO_4 , 96 %, čistá (PENTA s.r.o., Praha, Česká republika)

3.6 Příprava didaktických pomůcek

Dle aktuálního rámcově vzdělávacího programu pro gymnázia a tématu mé bakalářské práce jsem vytvořila soubor plakátů (Příloha 2) a tabulku (Tabulka 2) s přehledem důkazových reakcí sekundárních metabolitů lišejníků rodu *Cladonia*, které nabízejí užitečné materiály pro výuku biologie na středních školách. Plakáty a důkazové reakce je možné využít ve vzdělávací oblasti biologie hub, konkrétně v učivu stavba a funkce lišejníků.

5.3.3 Biologie

BIOLOGIE HUB

Očekávané výstupy

žák

- ▶ pozná a pojmenuje (s možným využitím různých informačních zdrojů) významné zástupce hub a lišejníků
- ▶ posoudí ekologický, zdravotnický a hospodářský význam hub a lišejníků

Učivo

- stavba a funkce hub
- stavba a funkce lišejníků

Obrázek 21 - Výřez z RVP

Zdroj: <https://www.msmt.cz/vzdelavani/stredni-vzdelavani/ramcove-vzdelavaci-programy>

Plakáty byly vypracovány za pomoci rešerše odborné dostupné literatury s pomocí programu Canva. Možností jejich využití je vylepení ve třídě, využití v hodinách s tématem biologie hub, případně jako rozšíření učiva například v biologickém kroužku. Téma a obsah plakátů také nabízí mezipředmětové vztahy a jejich využití je možné i v předmětu chemie při hodinách s tématem separačních metod, jako je například tenkovrstvá chromatografie.

Důkazové reakce vycházejí z publikace Orange et al. (2010) a byly zpracovány v programu Microsoft Excel. Mohou poskytnout studentům interaktivní pohled na detekci sekundárních metabolitů lišejníků. Tyto reakce lze prezentovat nejen v hodinách biologie s tématem biologie hub, ale také například v rámci biologického kroužku. Reakce také nabízejí možnosti pro mezipředmětové propojení v rámci výuky chemie.

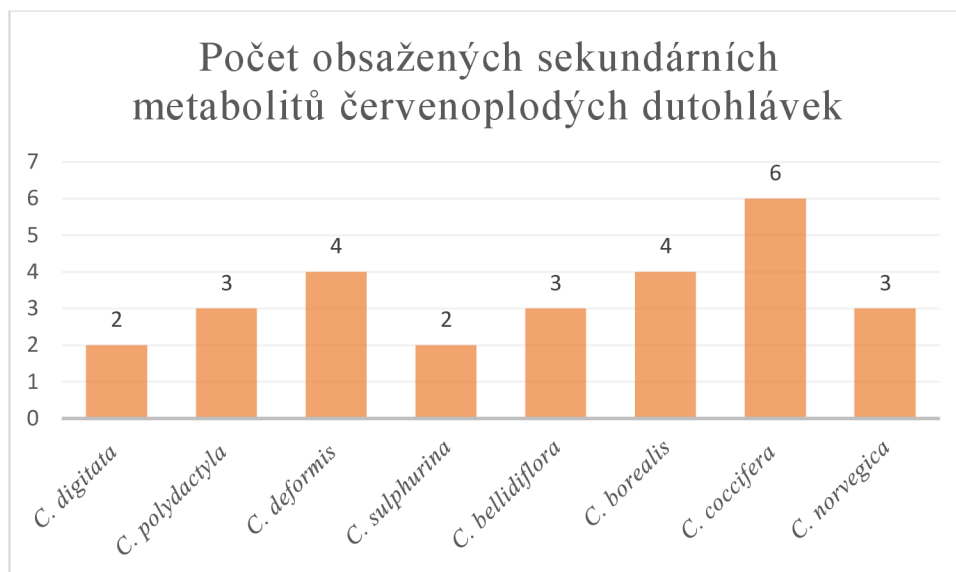
4. Praktická část

V rámci praktické části byly pomocí metody TLC chromatografie izolovány sekundární metabolity vybraných lišejníků rodu *Cladonia*. Jednalo se o druhy často obtížně identifikovatelné pouze na základě jejich morfologie nebo mohou být vizuálně podobné jiným druhům. Sekundární metabolity představují klíčový faktor při rozlišování těchto druhů.

Po izolaci sekundárních metabolitů bylo provedeno jejich přiřazení ke konkrétnímu druhu. Následně byl vytvořen graf zobrazující počet sekundárních metabolitů u každého druhu. Druhy byly rozděleny na hnědoplodé dutohlávky (Obrázek 22) a červenoplodé dutohlávky (Obrázek 23). Dále bylo vytvořena tabulka, která prezentuje obsah sekundárních metabolitů u vybraných druhů rodu *Cladonia*. (Tabulka 1). Tato tabulka může usnadnit identifikaci konkrétních druhů lišejníků.



Obrázek 22 - Počet obsažených sekundárních metabolitů hnědoplodých dutohlávek



Obrázek 23 - Počet obsažených sekundárních metabolitů červenoplodých dutohlávek

Tabulka 1 - Obsah sekundárních metabolitů vybraných lišejníků rodu *Cladonia*

	k. rhodokladonová Rf = 4	k. fumarprotocetrarová Rf = 7	k. thamnolová Rf = 13	k. skvamátová Rf = 28	k. norsfiktová Rf = 30	k. psoromová Rf = 41	zeorin Rf = 43	k. didymová Rf = 52	k. barbatová Rf = 52	k. perlatolová Rf = 54	atranorin Rf = 70	k. usnová Rf = 71	k. vulpinová Rf = 76	k. isounová Rf = 79
<i>C. portentosa</i>										+		+		+
<i>C. mitis</i>		+										+		+
<i>C. stellaris</i>										+		+		+
<i>C. uncialis</i>				+								+		
<i>C. biuncialis</i>				+					+			+		
<i>C. fimbriata</i>		+												
<i>C. carneola</i>		+				+	+		+			+		+
<i>C. digitata</i>			+											
<i>C. polydactyla</i>	+		+									+		
<i>C. deformis</i>	+						+					+		+
<i>C. sulphurina</i>				+								+		
<i>C. borealis</i>	+								+			+		
<i>C. coccifera</i>	+						+					+		+
<i>C. norvegica</i>	+								+					
<i>C. coniocraea</i>		+												
<i>C. ochrochlora</i>		+												
<i>C. arbuscula</i>						+						+		+
<i>C. bellidiflora</i>	+			+								+		
<i>C. caespiticia</i>		+												
<i>C. cariosa</i>		+			+	+					+			
<i>C. cenotea</i>			+	+					+					
<i>C. cervicornis</i>		+									+			
<i>C. chlorophaea</i>		+									+			
<i>C. ciliata</i>		+												
<i>C. convoluta</i>		+										+		
<i>C. cornuta</i>		+									+			
<i>C. crispata</i>				+					+					
<i>C. cyanipes</i>							+		+			+		
<i>C. decorticata</i>										+				
<i>C. diversa</i>							+					+		+
<i>C. floerkeana</i>	+		+					+	+					
<i>C. foliacea</i>		+				+	+					+		
<i>C. furcata</i>		+												

	k. rhodokladonová Rf = 4	k. fumarprotocetrarová Rf = 7	k. thamnolová Rf = 13	k. skvamátová Rf = 28	k. norstíktová Rf = 30	k. psoromová Rf = 41	zeorin Rf = 43	k. didymová Rf = 52	k. barbatová Rf = 52	k. perlatolová Rf = 54	afranorin Rf = 70	k. usnová Rf = 71	k. vulpinová Rf = 76	k. isounová Rf = 79
<i>C. glauca</i>			+	+					+					
<i>C. gracilis</i>		+												
<i>C. grayi</i>		+												
<i>C. humilis</i>		+					+				+			
<i>C. incrassata</i>	+			+				+				+		
<i>C. macilenta</i>			+						+					
<i>C. macroceras</i>		+									+			
<i>C. macrophylla</i>						+								
<i>C. metacorallifera</i>				+				+				+		
<i>C. monomorpha</i>		+												
<i>C. parasitica</i>			+	+					+					
<i>C. peziziformis</i>		+												
<i>C. phyllophora</i>		+					+							
<i>C. pleurota</i>	+						+					+		+
<i>C. pocillum</i>		+					+							
<i>C. polycarpoides</i>					+									
<i>C. pulvinata</i>						+								
<i>C. pyxidata</i>		+									+			
<i>C. ramulosa</i>		+									+			
<i>C. rangiferina</i>		+									+			
<i>C. stygia</i>		+									+			
<i>C. subcervicornis</i>		+									+			
<i>C. subulata</i>		+												
<i>C. symphycarpia</i>						+					+			
<i>C. turgida</i>		+									+			
<i>C. verticillata</i>		+												
<i>C. zopfii</i>												+		

Mezi vybranými druhy rodu *Cladonia* byly nejčastěji zjištěny kyselina usnová a kyselina fumarprotocetrarová. Naopak kyselina norstiktová, didymová a perlatolová se vyskytovaly méně často. Kyselina vulpinová nebyla identifikována u žádného z vybraných druhů.

Dále byla v rámci praktické části vytvořena pomocí publikace Orange et al. (2010) tabulka s přehledem důkazových reakcí sekundárních metabolitů obsažených v lišejnících rodu *Cladonia*. Tato tabulka byla koncipována s ohledem na její didaktické využití, aby poskytla vyučujícím ucelený nástroj pro praktické cvičení.

Tabulka 2 – Přehled důkazových reakcí sekundárních metabolitů obsažených v lišejnících rodu *Cladonia*

Činidlo	Barevná reakce	Sekundární metabolit	Lišejník - příklad
K	Tmavě červená	Kyselina rhodokladonová	<i>Cladonia floerkeana</i> (apothecia)
K	Žlutá	Atranorin	<i>Cladonia polydactyla</i>
K	Světle žlutá	Kyselina thamnolová	<i>Cladonia polydactyla</i>
C	Žlutá	Kyselina usnová	<i>Cladonia portentosa</i>
C	Růžová	Kyselina kryptochlorofaeová	<i>Cladonia chlorophaea</i>
PD	Rudohnědá	Kyselina fumarprotocetrarová	<i>Cladonia pyxidata</i>
UV	Bílá	Kyselina skvamatová	<i>Cladonia glauca</i> (dřeň)
UV	Modrobílá	Kyselina perlatolová	<i>Cladonia portentosa</i>

Činidlo:

- K = roztok hydroxidu draselného (10 g KOH + 100 ml destilované vody)
- C = roztok chlornanu sodného (např. Savo)
- PD = parafenyldiamin (dva nebo tři krystaly rozpuštěné v několika kapkách ethanolu)
- UV = osvětlení UV lampou dlouhovlnným ultrafialovým zářením (350 nm)

5. Diskuse

Během zpracování této bakalářské práce jsem objevila mnoho zajímavých poznatků týkajících se lišejníků a jejich sekundárních metabolitů. Překvapilo mě, jak velkou rozmanitost těchto metabolitů je možné pozorovat v různých druzích lišejníků. Fascinuje mě nejen jejich škála, ale také jejich účinky, které nejsou relevantní pouze v přírodním prostředí, ale také ve směru cíleného výzkumu.

Zajímavým příkladem je kyselina barbatová, která prokazatelně působí jako účinná látka proti krevničce střevní (Silva et al., 2020), což je zajímavý příklad využití přírodních látek v medicíně. Dalším zajímavých aspektem je skutečnost, že některé sekundární metabolity (např. atranorin, kyselina norstiktová, usnová, barbatová, vulpinová a skvamatová) vykazují protinádorové účinky. Tento poznatek poukazuje na potencionální léčebné využití lišejníků a jejich sekundárních metabolitů v boji proti nádorovým onemocněním.

Pro zkoumání sekundárních metabolitů jsem vybrala rod *Cladonia*, který se vyznačuje svou vysokou rozmanitostí. Tato rozmanitost se odráží i v obsahu sekundárních metabolitů, dokonce existují druhy s různými chemotypy (např. *Cladonia cariosa* a *Cladonia bellidiflora*). Zaujalo mě, že díky těmto metabolitům je možné rozlišit druhy, které mohou vykazovat určitou podobnost (např. *Cladonia fimbriata* a *Cladonia cryptochlorophaea*). Právě *Cladonia cryptochlorophaea* mě zaujala svými charakteristickým sekundárním metabolitům, díky kterým je snadnější její určení (Ahti et al., 2013).

V rámci praktické části jsem provedla izolaci sekundárních metabolitů některých druhů dutohlávek. Během této izolace jsem narazila na několik problémů. Jeden z nich nastal u vyvíjení desky, kde při konci procesu začala mobilní fáze stoupat ve tvaru písmene U. To by mohlo způsobit mylný výpočet retenčního faktoru. Tento problém se vyřešil, když jsem naředila médium ve vyvíjející komoře starším roztokem. Také jsem měla potíže s identifikací určitých sekundárních metabolitů, zejména kvůli jejich podobným hodnotám Rf faktorů. Pro dosažení přesných výsledků jsem při identifikaci některých izolovaných metabolitů provedla srovnání se známými standardy získanými z určitých druhů lišejníků.

Během analýzy grafů počtu sekundárních metabolitů mě zaujalo zjištění, že druhy, které jsou v České republice hojně rozšířené, obsahují nízký počet těchto metabolitů.

Konkrétně u hnědoplodého druhu *Cladonia fimbriata* byly zjištěny pouze dva sekundární metabolity, to samé platí i pro červenoplodý druh *Cladonia digitata*.

Při srovnání výsledků praktické části s odbornou literaturou rešeršní části jsem objevila několik rozdílů. Podle Ahti et al. (2013) druh *Cladonia uncialis* obsahuje pouze vzácně kyselinu skvamatovou. Nicméně já kyselinu skvamatovou u tohoto druhu izolovala. V literární rešerši jsem uvedla kyselinu vulpinovou jako významnou pro determinaci dutohlávek, avšak žádná z vybraných dutohlávek tuto kyselinu neobsahovala. Navzdory tomu jsem se rozhodla zachovat zmínku o kyselině vulpinové vzhledem k jejím zajímavým účinkům.

Výsledkem této práce je poznání významné role sekundárních metabolitů při identifikaci sterilních stélek lišejníků. K tomuto poznání přispívá i vytvořená tabulka, která poskytuje přehled o přítomnosti sekundárních metabolitů u vybraných druhů dutohlávek. Poskytuje ucelený pohled na různorodost sekundárních metabolitů v kontextu jednotlivých rodů a může pomoci v taxonomii dutohlávek.

6. Závěr

V teoretické části jsem popsala různé možnosti detekce sekundárních metabolitů lišejníků a představila jsem vybrané sekundární metabolity významné pro determinaci dutohlávek. Dále jsem se zaměřila na dutohlávky, které vykazují podobnost s jinými druhy či obsahují specifické sekundární metabolity.

V metodologické části mé práce jsem detailně popsala proces metody tenkovrstvé chromatografie, včetně základního principu. Tento popis zahrnuje podrobné vysvětlení, jak TLC funguje a jak je používána k analýze sekundárních metabolitů lišejníků. Dále jsem se věnovala postupu tvorby didaktických pomůcek, které zahrnují plakáty a tabulku s důkazovými reakcemi dutohlávek.

V rámci této práce jsem vytvořila tabulku, která poskytuje přehled o přítomnosti sekundárních metabolitů u vybraných druhů dutohlávek. Dále jsem připravila didaktické pomůcky pro výuku předmětu biologie s důrazem na sekundární metabolity a jejich detekci. Během práce jsem získala dovednosti v používání techniky tenkovrstvé chromatografie a determinaci sekundárních metabolitů lišejníků. Tím jsem zvolené cíle bakalářské práce splnila.

7. Seznam literatury

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

ASPLUND, J.; WARDLE, D. A. How lichens impact on terrestrial community and ecosystem properties. *Biological Reviews*, 2016, 92(3): 1720–1738.

BAKER, P.M.; BULLOCK, E. Structure of rhodocladonic acid. *Canad. Jour. Chem.*, 1969 47: 2733-2734

BEHERA, B. C.; MAHADIK, N.; MOREY, M. Antioxidative and cardiovascular-protective activities of metabolite usnic acid and psoromic acid produced by lichen species *Usnea complanata* under submerged fermentation. *Pharmaceutical Biology*, 2012, 50(8): 968–979. doi:10.3109/13880209.2012.654396

BOUSTIE, J.; TOMASI, S.; GRUBE, M. Bioactive lichen metabolites: alpine habitats as an untapped source. *Phytochemistry Reviews*, 2011, 10: 287-307

BURGAZ, A. R.; AHTI, T.; PINO-BODAS, R. *Mediterranean Cladoniaceae.* Spanish Lichen Society (SEL), 2020. ISBN 978-84-09-21610-9.

CALCOTT, M. J.; ACKERLEY, D. F.; KNIGHT, A.; KEYZERS, R. A.; OWEN, J. G. Secondary metabolism in the lichen symbiosis. *Chemical Society Reviews*, 2018, 47(5): 1730–1760. doi:10.1039/c7cs00431a

CANSARAN-DUMAN, D.; GUNAY ESKILER, G.; COLAK, B.; SOZEN KUCUKKARA, E. Vulpinic acid as a natural compound inhibits the proliferation of metastatic prostate cancer cells by inducing apoptosis. *Molecular Biology Reports*, 2021, 48(8): 6025–6034. doi:10.1007/s11033-021-06605-5

CASSELMAN, K.L. Lichen Dyes: Preparation and Dyeing. *Maine Naturalist*, 1994, 2(2): 105-110.

DE BARROS ALVES, G. M.; DE SOUSA MAIA, M. B.; DE SOUZA FRANCO, E.; GALVÃO, A. M.; DA SILVA, T. G.; GOMES, R. M.; DA SILVA, N. H. Expectorant and antioxidant activities of purified fumarprotocetraric acid from *Cladonia verticillaris* lichen in mice. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 2014, 27(2): 139–143. doi:10.1016/j.pupt.2013.07.002

DESMARETS, L.; MILLOT, M.; CHOLLET-KRUGLER, M.; BOUSTIE, J.; CAMUZET, C.; FRANÇOIS, N.; ROUILLÉ, Y.; BELOUZARD, S.; TOMASI, S.; MAMBU, L.; SÉRON, K. Lichen or Associated Micro-Organism Compounds Are Active against Human Coronaviruses. *Viruses*, 2023 Aug 31;15(9):1859. doi: 10.3390/v15091859. PMID: 37766264; PMCID: PMC10536056.

ELIX, J. A.; STOCKER-WÖRGÖTTER, E. Biochemistry and secondary metabolites. In: *Nash III*, T. H. (ed) Lichen Biology. Cambridge University Press, 2008: 104-133.

ELIX, J.A. *A Catalogue of Standardized Chromatographic Data and Biosynthetic Relationships for Lichen Substances*. Third Edition. Published by the author, Canberra, 2014.

GIANINI, A.S.; MARQUES M.R.; CARVALHO N.C.; HONDA N.K.; Activities of 2,4-dihydroxy-6-n-pentylbenzoic acid derivatives. *Z Naturforsch C J Biosci*, 2008 Jan-Feb;63(1-2):29-34. doi: 10.1515/znc-2008-1-206. PMID: 18386484.

GOGA, M.; ELEČKO, J.; MARCINČINOVÁ, M.; RUČOVÁ, D.; BAČKOR, M. Lichen Metabolites: Overview of Some Secondary Metabolites and Their Biological Potential. *Co-Evolution of Secondary Metabolites*, 2018: 1–36.

HANGER, A.; BRUNAUER, G.; TÜRK, R.; STOCKER-WÖRGÖTTER, E. Production and Bioactivity of Common Lichen Metabolites as Exemplified by *Heterodea muelleri* (Hampe) Nyl. *Springer Science + Business Media*, LLC. 2008, č. 34: 113-120.

HASSAN, S. T. S.; ŠUDOMOVÁ, M.; BERCHOVÁ-BÍMOVÁ, K.; ŠMEJKAL, K.; ECHEVERRÍA, J. Psoromic Acid, a Lichen-Derived Molecule, Inhibits the Replication of HSV-1 and HSV-2, and Inactivates HSV-1 DNA Polymerase: Shedding Light on Antiherpetic Properties. *Molecules*, 2019, 24(16): 2-12 doi:10.3390/molecules24162912

HASSAN, S.; ŠUDOMOVÁ, M.; BERCHOVÁ-BÍMOVÁ, K.; GOWRISHANKAR, S.; RENGASAMY, K. Antimycobacterial, Enzyme Inhibition, and Molecular Interaction Studies of Psoromic Acid in Mycobacterium tuberculosis: Efficacy and Safety Investigations. *Journal of Clinical Medicine*, 2018, 7(8): 1-14. doi:10.3390/jcm7080226

HAUCK, M.; JÜRGENS, S.-R.; HUNECK, S.; LEUSCHNER, C. High acidity tolerance in lichens with fumarprotocetraric, perlatolic or thamnolic acids is correlated with low pKa1 values of these lichen substances. *Environmental Pollution*, 2009, 157(10): 2776–2780. doi:10.1016/j.envpol.2009.04.022

HAUCK, M.; JÜRGENS, S.R.; LEUSCHNER, C. Norstictic acid: Correlations between its physico-chemical characteristics and ecological preferences of lichens producing this depsidone. *Environmental and Experimental Botany*, 2010, 68(3): 309–313. doi:10.1016/j.envexpbot.2010.01.0

JAHNS, H.M. Chapter 1 - ANATOMY, MORPHOLOGY, AND DEVELOPMENT. In: *The Lichens. Academic Press*, 1973: 3-5. ISBN 9780120449507.

JEONG, M.H.; PARK, C.H.; KIM, J.A.; CHOI, E.D.; KIM, S.; HUR J.S.; PARK, S.Y. Production and activity of cristazarin in the lichen-forming fungus *Cladonia metacorallifera*. *Journal of Fungi*, 2021, 7(8): 601 <https://doi.org/10.3390/jof7080601>

KOSANIĆ, M.; RANKOVIĆ, B.; SUKDOLAK, S. Antimicrobial activity of the lichen *Lecanora frustulosa* and *Parmeliopsis hyperopia* and their divaricatic acid and zeorin constituents. *African Journal of Microbiology Research. Academic Journals*, 2010. ISSN: 1996-0808.

KOSANIĆ, M.; RISTIĆ, S.; STANOJKOVIĆ, T.; MANOJLOVIĆ, N.; a RANKOVIĆ, B. Extracts of five cladonia lichens as sources of biologically active compounds. *FARMACIA*, 2018, 66(4): 644-649.

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

LUZINA, O. A.; SALAKHUTDINOV, N. F. Usnic acid and its derivatives for pharmaceutical use: a patent review (2000–2017). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2018. 28(6): 477–491. doi:10.1080/13543776.2018.1472239

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

MCCUNE, B. *Microlichens of the Pacific Northwest*. Wild Blueberry Media, 2017: 9-21. ISBN 9-780998-710808.

MENDILI, M.; KHADHRI, A.; JEMÂA, J. M.-B.; ANDOLFI, A.; TUFANO, I.; et al. Anti-Inflammatory Potential of Compounds Isolated from Tunisian Lichens Species. *Chemistry & Biodiversity*, 2022, 19(8): 3-10.

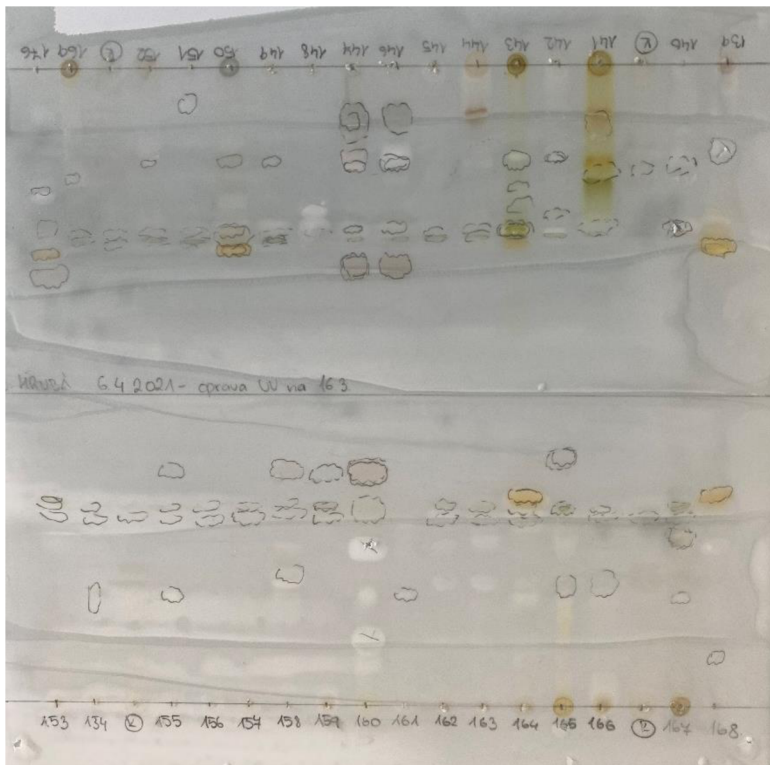
- MOLNÁR, K.; FARKAS, E. Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites: a Review. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 2010, 65(3-4): 161-162
- NAGAR, S.; PIGOTT, M.; KUKULA-KOCH, W.; SHERIDAN, H. Unravelling Novel Phytochemicals and Anticholinesterase Activity in Irish *Cladonia portentosa*. *Molecules.*, 2023, 28(10): 4145. doi: 10.3390/molecules28104145. PMID: 37241886; PMCID: PMC10222842.
- NASH, T.H. Nutrients, elemental accumulation, and mineral cycling. In: *Nash III, T. H. (ed) Lichen Biology*. Cambridge University Press, 2008: 246-248.
- NGUYEN, T. T.; YOON, S.; YANG, Y.; LEE, H.-B.; OH, S.; JEONG, M.-H.; KIM, H. Lichen Secondary Metabolites in *Flavocetraria cucullata* Exhibit Anti-Cancer Effects on Human Cancer Cells through the Induction of Apoptosis and Suppression of Tumorigenic Potentials. *PLoS ONE*, 2014, 9(10). doi:10.1371/journal.pone.0111575
- ORANGE, A.; JAMES, P. W.; WHITE, F. J. *Microchemical Methods for the Identification of Lichens*. 2nd edition. London: British Lichen Society, 2010. ISBN 978 0 9540418 9 2.
- PINO-BODAS, R.; BURGAZ, A. R.; MARTÍN, M. P.; LUMBSCHE, H. T. Species delimitations in the *Cladonia cariosa* group (*Cladoniaceae*, *Ascomycota*). *Lichenologist*, 2012, 44: 121–135.
- PINO-BODAS, R.; PÉREZ-VARGAS, I.; STENROOS, S.; AHTI, T.; BURGAZ, A. R. Sharpening the species boundaries in the *Cladonia mediterranea* complex (*Cladoniaceae*, *Ascomycota*). *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 2016, 37(1): 1–12. doi:10.3767/003158516x688081
- RANKOVIĆ, B.; KOSANIĆ, M.; STANOJKOVIĆ, T.; VASILJEVIĆ, P.; MANOJLOVIĆ, N. Biological Activities of *Toninia candida* and *Usnea barbata*. Together with Their Norstictic Acid and Usnic Acid Constituents. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(12): 14707–14722. doi:10.3390/ijms131114707
- REDDY, R. G.; VEERAVALLI, L.; MAITRA, S.; CHOLLET-KRUGLER, M.; TOMASI, S.; DÉVÉHAT, F. L.-L.; CHAKRAVARTY, S. Lichen-derived compounds show potential for central nervous system therapeutics. *Phytomedicine*, 2016, 23(12): 1527–1534. doi:10.1016/j.phymed.2016.08.010

- ROLA, K. Insight into the pattern of heavy-metal accumulation in lichen thalli. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2020, 61. doi:10.1016/j.jtemb.2020.126512
- SÁNCHEZ, M.; UREÑA-VACAS, I.; GONZÁLEZ-BURGOS, E.; DIVAKAR, P.K.; GÓMEZ-SERRANILLOS, M.P. The Genus *Cetraria*. A Review of Its Botany, *Phytochemistry, Traditional Uses and Pharmacology*. *Molecules*, 2022; 27(15):4990. <https://doi.org/10.3390/molecules27154990>
- SANTIAGO, M.; STROBEL, S. Thin Layer Chromatography. *Laboratory Methods in Enzymology: Cell, Lipid and Carbohydrate*, 2013: 303–324. doi:10.1016/b978-0-12-420067-8.00024-6
- SCHNEIDERKA, P. 2000. Kapitoly z klinické biochemie. Nakladatelství Karolinum. Praha. ISBN: 80-246-0140-0.
- SCHRAM, L. J.; MCMULLIN, R. T.; ANAND, M. *Cladonia norvegica* Tønsberg & Holien (*Cladoniaceae*), a New Lichen Record for Ontario. *Evansia*, 2013, 30(2): 69–71. doi:10.1639/079.030.0205
- SCHUMM, F. *Atlas of Images of Thin Layer Chromatograms of Lichen Substances*. Norderstedt 2016. ISBN: 978-3-7431-4586-3.
- 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.; SILVA, N.H. Barbatic acid from *Ciadia aggregata* (liehen): Cytotoxicity and in vitro schistosomicidal evaluation and ultrastructural analysis against adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Toxicology in Vitro*, 2020, 65: 104–771.
- SMITH, C.W.; APTROOT, A.; COPPINS, B. J.; FLETCHER, A.; GILBERT, O.L.; JAMES, P.W.; WOLSELEY P.A. *The Lichens of Great Britain and Ireland*. British Lichen Society. ISBN 978 0 9540418 8 5.
- STEINOVÁ, J.; BOUDA, F.; MALÍČEK, J.; PALICE, Z.; PEKSA, O.; SVOBODA, D.; VONDRÁK, J. Poznámky k rozšíření a ekologickým preferencím zástupců skupiny *Cladonia coccifera* v České republice. *Bryonora*, 2015, 55: 4–19.

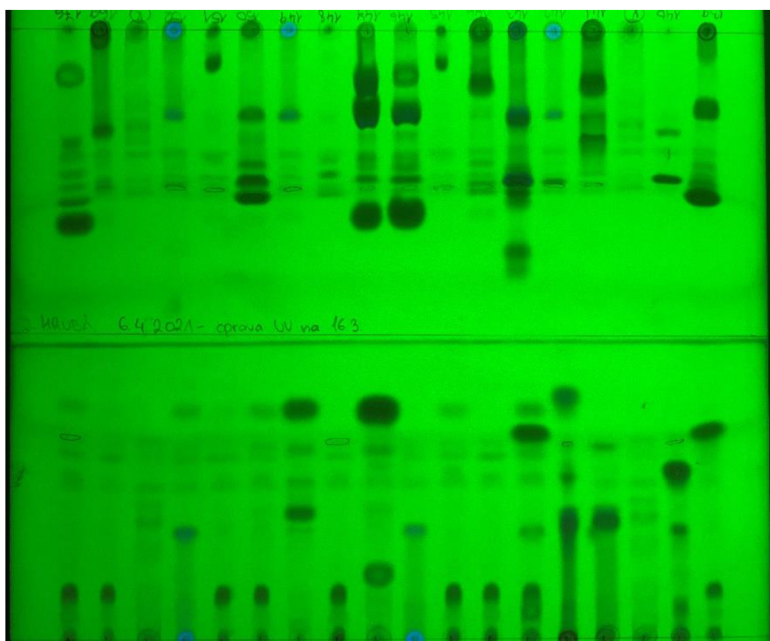
- STEINOVÁ, J.; STENROOS, S.; GRUBE, M.; ŠKALOUD, P. Genetic diversity and species delimitation of the zeorin-containing red-fruited *Cladonia* species (lichenized *Ascomycota*) assessed with ITS rDNA and β -tubulin data. *Lichenologist*, 2013, 45: 665–684.
- STENROOS, S.; PINO-BODAS, R.; HYVÖNEN, J.; LUMBSCH, H. T.; AHTI, T. Phylogeny of the family *Cladoniaceae* (*Lecanoromycetes*, *Ascomycota*) based on sequences of multiple loci. *Cladistics*, 2019, 35: 351–384. doi:10.1111/cla.12363
- STUDZIŃSKA-SROKA, E.; HÖLDERNA-KĘDZIA, E.; GALANTY, A.; BYLKA, W.; KACPRZAK, K.; ĆWIKLIŃSKA, K. In vitro antimicrobial activity of extracts and compounds isolated from *Cladonia uncialis*. *Natural Product Research*, 2015. 29(24): 2302–2307. doi:10.1080/14786419.2015.1005616
- SVRČEK, M. a kol. *Klíč k určování bezcévných rostlin*. 1976, Praha: SPN, 579 s.
- THADHANI, V. M.; KARUNARATNE, V. Potential of Lichen Compounds as Antidiabetic Agents with Antioxidative Properties: A Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017: 1–10. doi:10.1155/2017/2079697
- UREÑA-VACAS, I.; GONZÁLEZ-BURGOS, E.; DIVAKAR, P.K.; GÓMEZ-SERRANILLOS, M.P. Lichen Depsidones with Biological Interest. *Planta Med.*, 2022, 88(11): 855-880. doi: 10.1055/a-1482-6381. Epub 2021 May 25. PMID: 34034351.
- WANG, H. Simultaneous determination of usnic, diffractaic, evernic and barbatic acids in rat plasma by ultra-high-performance liquid chromatographyquadrupole exactive Orbitrap mass spectrometry and its application to pharmacokinetic studies. *Biomedical Chromatography*, 2017, 32(3).
- WIRTH, V.; HAUCK, M.; SCHULTZ, M. *Die Flechten Deutschlands*. 2013: 9-12. ISBN 978-3-8001-5903-1.
- YI, S. A.; NAM, K. H.; KIM, S.; SO, H. M.; RYOO, R.; HAN, J.-W.; LEE, J. Vulpinic Acid Controls Stem Cell Fate toward Osteogenesis and Adipogenesis. *Genes*, 2019, 11(1): 1-15 doi:10.3390/genes11010018
- YU, X.; SUI, Y.; XI, Y.; ZHANG, Y.; LUO, G.; LONG, Y.; YANG, W. Semisynthesis, biological evaluation and molecular docking studies of barbatic acid derivatives as novel diuretic candidates. *Molecules*, 2023, 28(10): 4010 [20 p.]

8. Přílohy

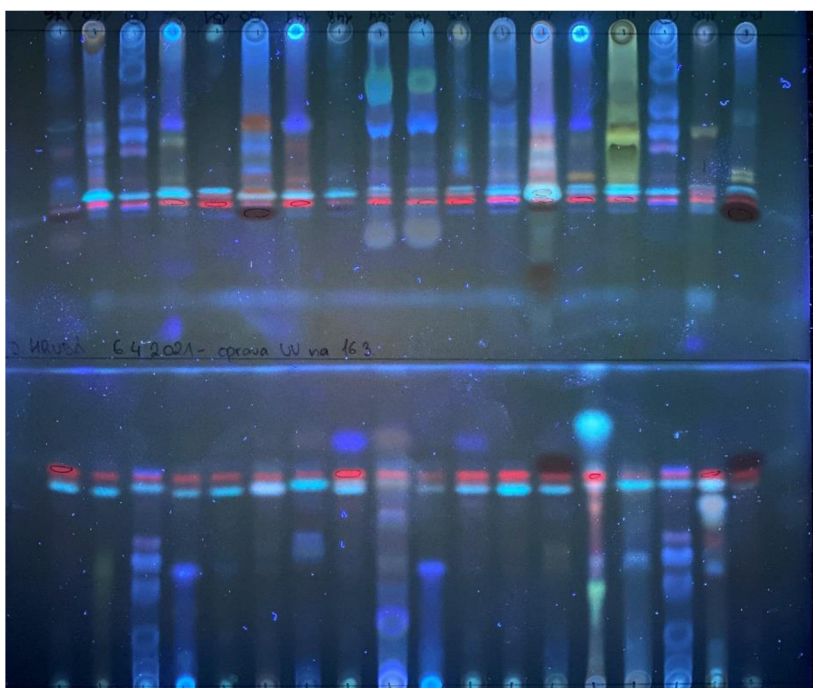
Příloha 1: Fotky vyvolaných desek (TLC chromatografie)



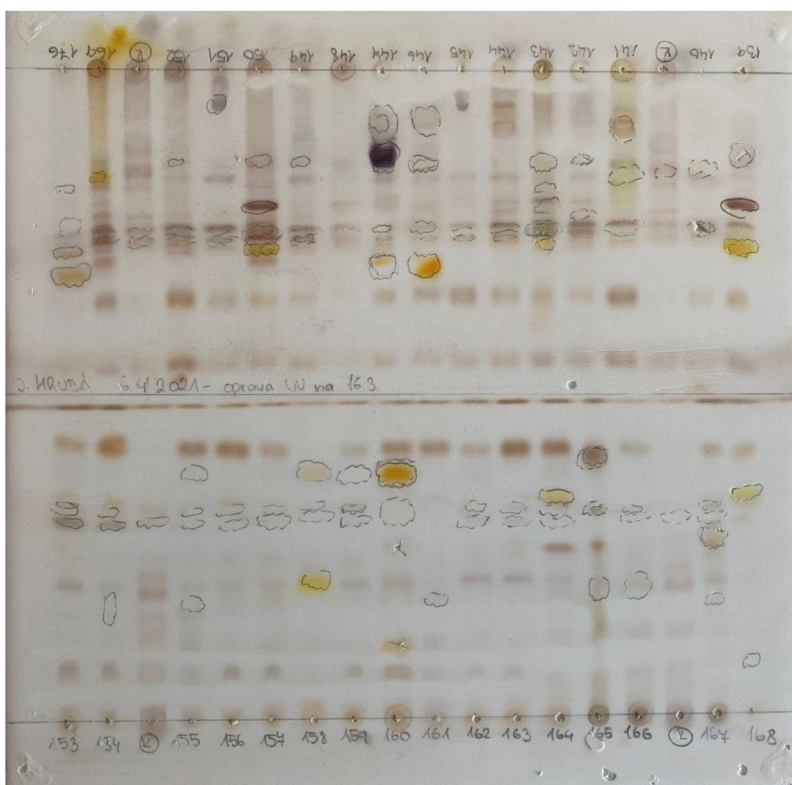
Obrázek 24 - Deska před vypálením po aplikaci vody



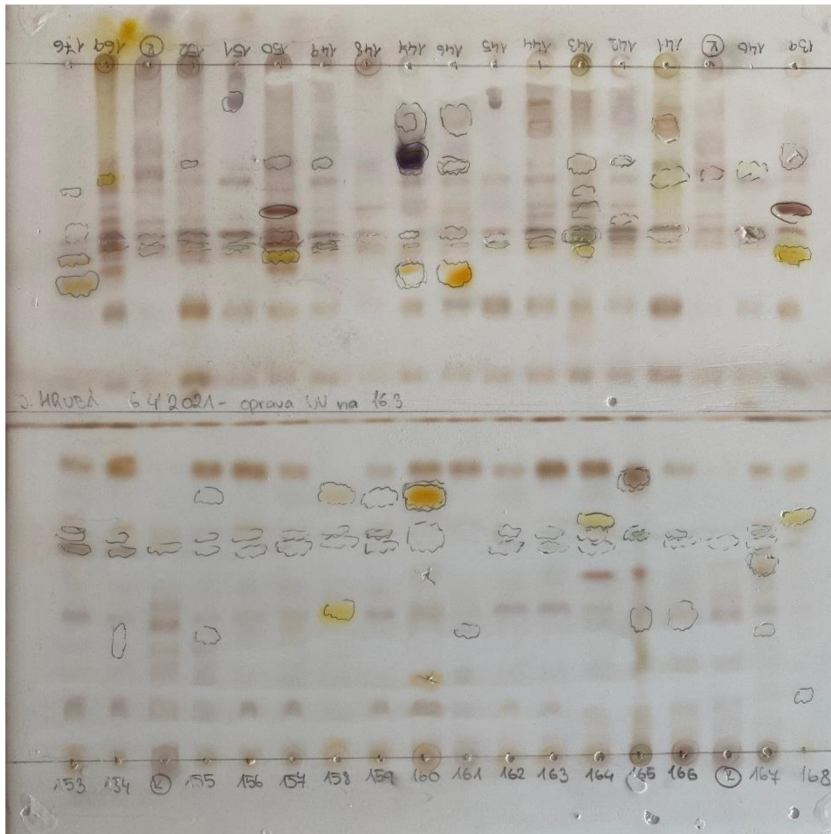
Obrázek 25 - Deska před aplikací kyseliny sírové a vypálením pod krátkovlnným UV



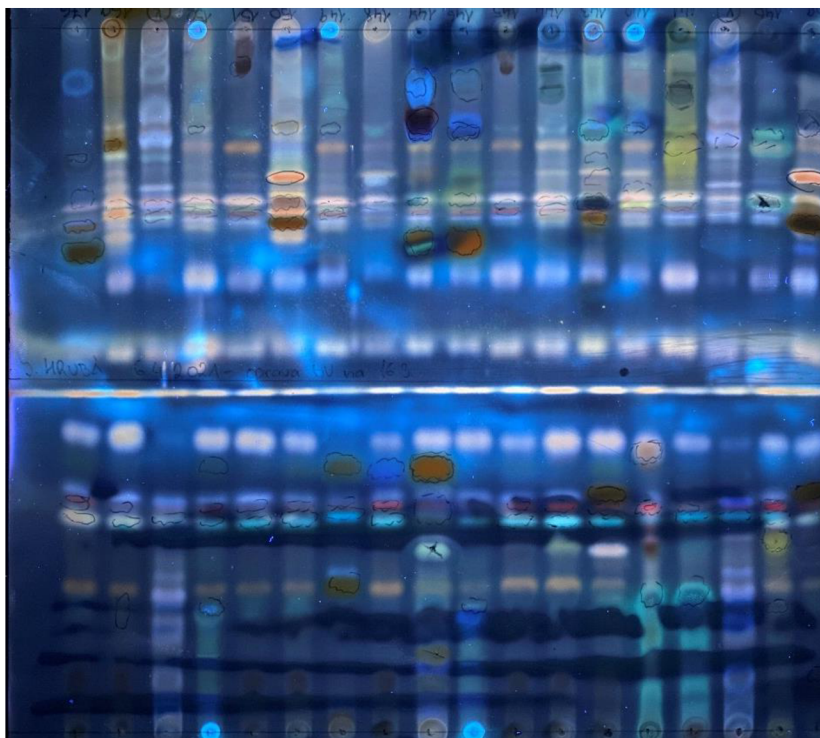
Obrázek 26 - Deska před aplikací kyseliny sírové pod dlouhovlnným UV



Obrázek 27 - Deska po aplikaci kyseliny sírové a následném vypálení



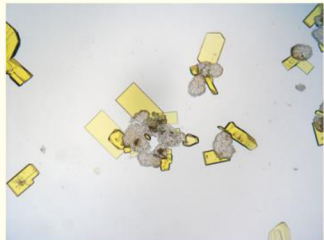
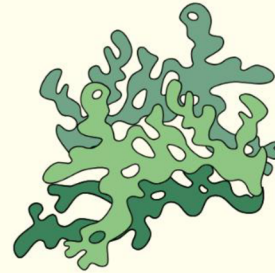
Obrázek 28 - Deska po aplikaci kyseliny sírové a vypálení



Obrázek 29 - Deska po aplikaci kyseliny sírové a vypálení pod dlouhovlnným UV

SEKUNDÁRNÍ METABOLITY LIŠEJNÍKŮ

Role sekundárních metabolitů pro přežití a růst lišejníků může a nemusí být životně nezbytná.



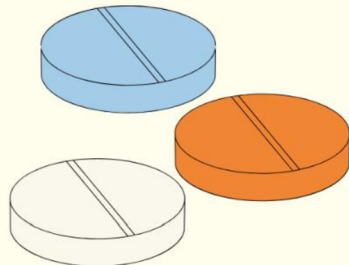
KRYSTALY KYSELINY VULPINOVÉ

Většinou krystalické sloučeniny, uložené na povrchu hyf - houbových vláken
Barevné – uložené v kůře
Bezbarvé – uložené ve dřeni

Kyselina usnová
Kyselina barbatová
Zeorin
Atranorin
Kyselina norstiktová
Kyselina rhodokladonová



Dutohlávka severní



VÝZNAM
Barvení látek
Léčiva
Ochrana před UV
Antibiotické účinky
Ochrana před býložravci

SEKUNDÁRNÍ METABOLITY LIŠEJNÍKŮ

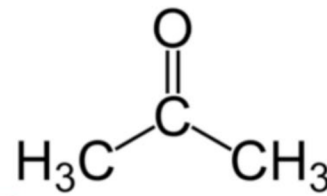
Taxonomie
Mohou pomoci při určení
druhu lišejníků



700+

Je známo okolo 700
sekundárních metabolitů
Převážná většina je pouze u
lišejníků

Jsou nerozpustné ve vodě
Ze stélky lišejníku
extrahovány pouze
organickými rozpouštědly



Aceton



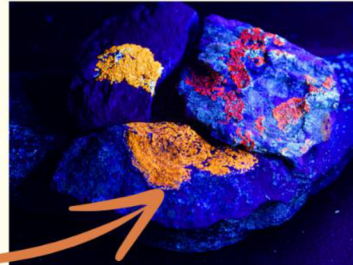
Děratka hořká

Jsou příčinou výrazně
hořké chuti většiny druhů
lišejníků

DETEKCE SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ LIŠEJNÍKŮ

Stélkové reakce a UV světlo

- Barvená změna (pomocí např. KOH, Sava)
- Fluorescence (krátkovlnné a dlouhovlnné UV)



Krystaly kyseliny norstiktové

Mikrokrystalizační testy

Krystaly specifických tvarů a velikostí, které jsou charakteristické pro jednotlivé sekundární metabolity

Pigmenty a krystaly

Některé sekundární metabolity nerozpustné organickými rozpouštědly
Pomocí např. HCl barevné reakce pigmentů



Zelený pigment



Chromatografie

Technika oddělování a analýzy sekundárních metabolitů na základě jejich různé afinitě k mobilní fázi a stacionární fázi

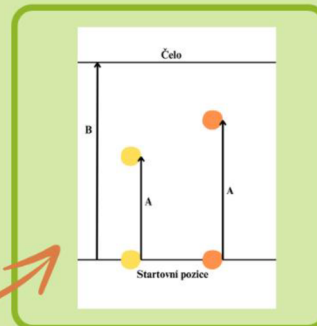
DETEKCE SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ LIŠEJNÍKŮ

Tenkvrstvá chromatografie (TLC)

- Stacionární (nepohyblivá) fáze - skleněná deska pokrytá silikagelem
- Mobilní (pohyblivá) fáze - organická rozpouštědla

POSTUP:

1. nanesení vzorku na stacionární fázi
2. vložení desky do vyvíjející komory - mobilní fáze začne vzlínat silikagelem vzhůru
3. výpočet retenčního faktoru ($R_f = A/B * 100$)
4. pozorování barvy výsledné skvrny

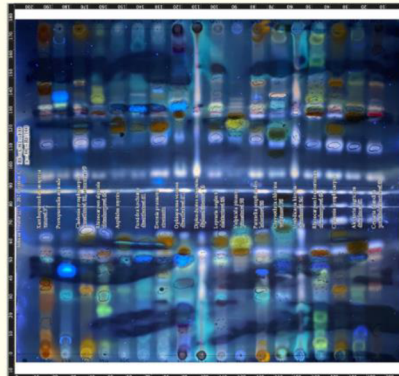


PRINCIP:

Látky s větší afinitou k stacionární fázi se pohybují pomaleji než ty s větší afinitou k mobilní fázi, což umožňuje jejich rozdělení



Výsledná deska



Deska pod dlouhovlnným UV