Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Studijní program: Biologie
Studijní obor: Protistologie

Bc. Iva Jadrná

Diverzita fotobiontů ve stélkách lišejníku *Psora decipiens*

Photobiont diversity in lichen thallus *Psora decipiens*

Diplomová práce

Školitel práce: doc. Mgr. Pavel Škaloud, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15.8.2017

Podpis

Poděkování

Děkuji především svému školiteli Pavlovi Škaloudovi za inspirativní nápady a neocenitelně pozitivní přístup. Děkuji za laskavost všem algologům, především Zuzce Vaiglové, a lichenologům, Ondrovi Peksovi, Jirkovi Malíčkovi, Zdeňku Palicemu a Kubovi Starostovi za půjčení herbářových položek. Děkuji Lukáši Falteiskovi za pomoc s designem primerů, Lence Flaškové za rady v molekulární laboratoři a Ondrovi Šebestovi za pomoc s konfokální mikroskopií.
Chtěla bych poděkovat své rodině a kamarádům.
A taky své levé ruce, která všechno zvládla, když ta pravá ležela v sádře.

Abstract

Psora decipiens is a characteristic species of the terricolous lichen community *Toninio-Psoretum decipientis* distributed mostly on calcareous or basic substrates. The community consists in various modifications of lichens *Placidium squamulosum, Toninia sedifolia, T. opuntioides, Fulgensia fulgens, F. bracteata* and others.

Photobionts of the lichen *Psora decipiens* were determined. *Psora decipiens* shared with *Placidium* sp. the single photobiont species, a common terrestrial alga *Myrmecia israeliensis*. Cloning of ITS rDNA revealed high intrathalline variability in *M. israeliensis* within a single lichen thallus. Several genotypes were often found in a thallus, uncovering either a high mutation rate of the algae or constant relichenization processes.

Saxicolous *Psora* species (*P. testacea, P. himalayana, P. valesiaca* and *P. rubiformis*) had *M. biatorellae* as a photobiont, indicating a possible photobiont influence on substrate specifity of *Psora* lichens.

Finally, the proper methodology used for identification of lichen photobionts is discussed. For a correct photobiont identification, morphological investigations of intrathaline diversity combined with coherent molecular techniques are needed. Such procedure was not applied in the former studies of *Psora decipiens*, resulting in a poor characterization of photobiont inventory.

Key words: lichen, photobiont, ITS rDNA, cloning, genetic diversity, *Psora*, *Placidium*, *Myrmecia*.

Abstrakt

Psora decipiens je charakteristickým druhem společenstva terikolních lišejníků *Toninio-Psoretum decipientis* rostoucím na vápenitých nebo bazických substrátech. Společenstvo sestává v různých modifikacích z lišejníků *Placidium squamulosum, Toninia sedifolia, T. opuntioides, Fulgensia fulgens, F. bracteata* a dalších.

Fototobionti lišejníku *Psora decipiens* byli determinováni. *Psora decipiens* a *Placidium* sp. společně sdílí jeden druh fotobionta, běžnou terestrickou řasu *Myrmecia israeliensis*. Klonování ITS rDNA odhalilo velkou variabilitu *M. israeliensis* v rámci jedné lišejníkové stélky. Ve stélce bylo často nalezeno několik genotypů ve stélce, což odhaluje buď vysokou mutační rychlost řasy nebo neustálou relichenizaci.

Saxikolní druhy *Psora* (*P. testacea, P. himalayana, P. valesiaca* a *P. rubiformis*) mají na rozdíl od terikolního druhu *P. decipiens* jako fotobionta *M. biatorellae*, což naznačuje možný vliv fotobiontů na substrátovou specifitu lišejníků rodu *Psora* .

Práce se mimo jiné zamýšlí nad vhodnou metodikou používanou pro identifikaci fotobiontů. Není možné popsat pravého fotobionta bez morfologické determinace řasy přímo ve stélce nebo kultuře kombinované s jasnými molekulárními metodami. Postup identifikace fotobiontů byl dřív podceněn v případě lišejníku *Psora decipiens.*

Klíčová slova: lišejník, fotobiont, ITS rDNA, klonování, genetická diverzita, *Psora, Placidium, Myrmecia*.

OBSAH

1. ÚVOD 1
   1.1. Výběr partnerů pro lišejníkovou symbiózu 3
   1.2. Vliv podmínek prostředí na výběr fotobiontů 5
   1.3. Lišejníkové gildy 6
   1.4. Další faktory ovlivňující výběr fotobiontů 7
   1.5. Společenstvo řas na lokalitě 8
2. DIVERZITA FOTOBIONTŮ V LIŠEJNÍKU *PSORA DECIPIENS* 9
   2.1. Lišejníky rodu *Psora* 11
3. CÍLE PRÁCE 14
4. METODIKA 15
   4.1. Sběr a získávání materiálu 15
   4.2. Kultivace a pozorování fotobiontů 16
   4.3. Izolace DNA, PCR a přečišťování PCR produktů 17
   4.4. Klonování 19
   4.5. PCR a přečišťování PCR produktů po klonování 20
   4.6. Sekvenování 21
   4.7. Fylogenetické analýzy 21
5. VÝSLEDKY 23
   5.1. Mikroskopická pozorování 23
      5.1.1. Světelná mikroskopie 23
      5.1.2. Fluorescenční mikroskopie 25
      5.1.3. Konfokální mikroskopie 27
   5.2. Fylogenetické analýzy 28
      5.2.1. 18S rDNA 28
      5.2.2. ITS rDNA 30
6. DISKUZE 33
   6.1. Genetická variabilita fotobiontů v lišejníku *Psora decipiens* 33
   6.2. Interakce ve společenstvu *Toninio-Psoretum decipientis* 35
   6.3. Řasy rodu *Myrmecia* 38
   6.4. Optimální metodika pro studium fotobiontů 40
      6.4.1. Odlišnosti lichenizovaných a volně žijících řas 40
      6.4.2. Kultivace fotobiontů *in vitro* 41
      6.4.3. Nejčastější problémy molekulárních metod 42
7. ZÁVĚR 44
8. POUŽITÁ LITERATURA 45
9. PŘÍLOHA 55

1. ÚVOD

Stélka lišejníku je ve skutečnosti komplikované společenství houby (mykobionta), autotrofního partnera (fotobionta) a zřejmě i dalších organismů jako kvasinek (Spribille et al. 2016) a bakterií (Grube & Berg 2009). Tento křehký vztah je pro ně nejspíš prospěšný, fotobiont dodává mykobiontu organické látky, zatímco ten obstarává příjem vody a anorganických látek (Honegger 1992) a oba vytváří pro bakterie vhodné zázemí. Možná je společné soužití řasy a houby spíše řízeným parazitismem ze strany mykobionta (Ahmadjian 1993), který stimuluje růst a rozmnožování fotobionta (Chapman & Waters 2004). K parazitismu možná dochází za nestandartních podmínek, například při zvýšeném přísunu živin se fotobiontům daří výrazně lépe na úkor houbové složky lišejníku (Dahlman et al. 2003).

Přestože můžeme pěstovat *in vitro* fotobionta a mykobionta zvlášť, jedině spolu vytváří jedinečnou stélku lišejníku a mykobiont produkuje sekundární metabolity (Brunauer et al. 2006), které poskytují ochranu před nadměrným zářením, herbivorům, velkému příjmu těžkých kovů a mají antimikrobiální a antioxidační účinky (Molnár & Farkas 2010). Součástí lišejníku jsou bionti odolnější než samostatní a chránění pouze slizovou vrstvou (de Vera et al. 2008), vydrží i extrémní a stresové podmínky (Kranner et al. 2005, Catalá et al. 2010). Mykobiont tvoří většinu lišejníku, dává mu jeho vědecký název a strhává na sebe většinu pozornosti lichenologů.

Lichenizované houby patří zhruba z 98 % do vřeckovýtrusných (Ascomycota), zbytek jsou stopkovýtrusné houby (Basidiomycota; Feuerer & Hawksworth 2007). Řasy v lišejníku nazýváme fykobionty a sinice cyanobionty. Další variantou soužití jsou tripartitní lišejníky, kde nalézáme všechny tři symbionty. Ahmadjian (1993) přiznává 23 známých rodů fotobiontů a mezi nejčastější řadí fykobionty *Trebouxia*, *Trentepohlia* a cyanobionta *Nostoc*. O deset let později bylo evidováno přes 40 rodů (De Priest 2004) a toto číslo se stále zvětšuje.

Lišejník je z větší části tvořen právě mykobiontem a právě jemu byla v minulosti věnována největší část pozornosti. Avšak je stále jasnější, že pro úspěšný symbiotický vztah jsou důležití všichni partneři, a tak jsou zkoumáni i fotobionti a objevují se nové poznatky o jejich fyziologii (Henskens et al. 2012, Nash et al. 1990, Sadowsky & Ott 2016), ekologii (Yahr et al. 2006, Dal Grande et al. 2012, Voytsekhovich et al. 2014) a taxonomii (Vančurová et al. 2015, Moya et al. 2015, Škaloud & Peksa 2010). Navíc mnoho lišejníkových hub nemůže žít bez řasy, zatímco lichenizované řasy se nejspíš můžou vyskytovat i jako volně žijící (Ahmadjian 1988, Mukhtar et al. 1994).

Mechanismy kospeciace u symbiotických organismů není jednoduché vysledovat. Speciační faktory působí jak na každého partnera zvlášť nezávisle na ostatních, tak na všechny dohromady jako na holobionta (Rosenberg & Zilber-Rosenberg 2011).

Dříve se předpokládalo, že dlouhodobý úzký vztah mezi dvěma symbionty vede k jejich koevoluci (Ahmadjian 1987). Řada studií např. u rodu *Physconia* (Wornik & Grube 2010), *Caloplaca* (Castillo &

Beck 2012), široce rozšířených dutohlávek *Cladonia* (Piercey-Normore & DePriest 2001) i u prášenek *Lepraria* (Nelsen & Gargas 2008) zavrhuje společný vývoj fotobionta a mykobionta na základě jejich odlišné speciační/mutační rychlosti.

Lišejník potřebuje zachovat kompatibilitu mezi symbionty a optimalizovat produktivitu obou symbiontů (Beiggi & Piercey-Normore 2007). Mykobiont si vybírá svého fotobionta nenáhodně a my můžeme nahlížet na výběr optimálního symbionta jako na určitý způsob koevoluce (De Priest 2004). Zcela jistě mezi nimi existuje nějaká genetická závislost, jak potvrzují například experimenty s resyntézou (Schaper & Ott 2003). Fotobionti by mohli být potenciálními indikátory fylogenetických vztahů mezi mykobionty (Rambold et al. 1998). Základním přehledem vztahů mezi mykobionty a fotobionty jsou souhrnné studie jako Tschermak-Woess (1988), Miadlikowska et al. (2014).

Pro taxonomické rozpětí vhodných symbiotických partnerů se používá termín specifita (Smith & Douglas 1987), zato četnost výskytu symbiotického spojení nazýváme selektivitou (Galun & Bubrick 1988). Pojmy selektivita a specifita jsou klíčové při definování vztahu mezi lišejníkovou řasou a houbou (Leavitt et al. 2015). Často byly uchopovány různě, například jak z pohledu mykobionta tak i fotobionta, shrnutí najdeme v pracích Honegger (1998) a Yahr et al. (2004).

Ve většině případů můžeme pozorovat spojení se zástupci pouze jedné skupiny (Rambold et al. 1998). Generalisté nebo také málo specifičtí mykobionti jsou schopní asociovat s širokou škálou příbuzných řas, zatímco specialisté jsou vysoce specifičtí a přijímají pouze jediného partnera (Muggia et al. 2013).

Nízkou specifičnost můžeme pozorovat u velmi hojných lišejníků např. u urbánního druhu *Protoparmeliopsis muralis* (Guzow-Krzeminska 2006). Snad nejkomatibilnějším mykobiontem je *Verrucaria* sp., který roste společně se zelenými řasami *Dilabifilum, Elliptochloris, Diplosphaera* a *Heterococcus* (Thüs et al. 2011). Spousta jiných studií ukazuje vysokou specifitu, kdy existuje pouze jediná dvojice symbiotických partnerů, jsou to např. *Omphalina-Coccomyxa* (Zoller & Lutzoni 2003), *Lobaria-Dictyochloropsis* (Dal Grande et al. 2014), a *Graphis-Trentepohlia* (Hametner et al. 2014).

V jednom druhu lišejníku nejčastěji nalézáme genotypy řas patřící do stejného rodu (del Campo et al. 2013, Piercey-Normore 2006). Ve většině případů jsou řasy ve stélce monokulturou (Piercey-Normore & Deduke 2011), jen občas se v symbióze s jedním mykobiontem nalézá více fotobiontů. Již zmíněným příkladem jsou tripartitní lišejníky jako je *Peltigera aphthosa* se zelenou řasou *Coccomyxa* a sinicí *Nostoc* ve specializovaných útvarech na lupenité stélce, takzvaných cephalodiích (Hällbom & Bergman, 1983). Vzácnější případ je sdílení více zelených řas v jedné stélce lišejníku. Různé linie *Trebouxia* v *Ramalina farinacea* (Casano et al. 2011, del Campo et al. 2013), *Rinodina* (Helms et al. 2001) a *Evernia* (Piercey-Normore 2006) a dokonce u rodu *Stereocaulon* byly doloženy druhy *Asterochloris* sp. a současně *Chloroidium ellipsoideum* (Vančurová 2012). Známe případy, kdy jeden druh houby je schopen vytvořit s odlišnými fotobionty dva různé morfotypy lišejníků s různou životní

strategií, tzv. chiméry (Brodo & Richardson 1978). Například mykobiont *Peltigera* může vytvářet odlišné stélky podle toho, zda roste se sinicí nebo se zelenou řasou (Goffinet & Bayer 1997).

Samotné mechanismy selekce partnerů jsou zřejmě komplexní a podstatná část diverzity fotobiontů nám zůstává skryta. Přesto ve výběru fotobionta a mykobionta nacházíme určité zákonitosti. Pozorované vztahy jsou výsledkem vnitřních (fylogenetické zábrany a úzká genetická kompatibilita) a vnějších faktorů (dostupnost partnerů a jejich fitness na lokalitě) (Yahr et al. 2006).

1.1. Výběr partnerů pro lišejníkovou symbiózu

Abychom pochopili taxonomické vztahy mezi symbionty, je potřeba znát také životní cyklus lišejníku.

V průběhu vývoje lišejníkové stélky spolu podstupují složitou sérii fyziologických, biochemických a morfologických změn.

Lišejníky jsou schopní se rozšiřovat a kolonizovat nová místa pomocí rhizomorf, což jsou komplexní, ale jemná houbová vlákna ukotvující lišejník k podkladu (Malone 1977). Kontakt houbového prothallu (hypothallu) s řasami probíhá neustále a je nezbytnou součástí při zahájení tvorby stélky nebo jejího růstu (Sanders & Rico 1992). Uvedení do symbiotického stavu vyžaduje dramatické změny v genové expresi obou organismů, které pak můžou být impulsem pro mnoho morfologických změn (Trembley et al. 2002), ale mechanismy rozpoznávání odpovídajících biontů nejsou zcela prozkoumány.

Při rozpoznávání správné řasy mykobiontem může hrát roli ribitol (Meeßen et al. 2013), lektin (Schaper & Ott 2003) nebo různé enzymy (Bubrick & Galun 1980). Úspěšné zahájení metabolické interakce mezi symbionty můžeme detekovat při zjištění sekundárních metabolitů, např. antrachinonu v terčovníku *Xanthoria parietina* (Honegger 1990).

Při kontaktu s potencionálním fotobiontem se začíná organizovat paraplektenchymatická kůra a vzniká „prethallus“, u kterého můžeme rozpoznat jeho polaritu (Honegger 1993). Překvapivě však může vzniknout i po kontaktu s méně kompatibilní řasou (Ahmadjian & Jacobs 1981, Ott 1987a). Takto může mykobiont dočasně spolupracovat s méně vhodnou řasou a přežít po vyklíčení spor do doby než objeví vhodného partnera (Beck et al. 1998).

Plně funkční stélka se vytváří pouze při nalezení vhodného fotobionta, kterého si mykobiont přinese na nové místo sám v případě nepohlavního rozmnožování anebo ji musí odněkud rekrutovat (Beck et al. 1998). Vyklíčená askospora může socializovat s volně žijícími řasami, které se tam už dlouho vyskytují nebo byly na místo přineseny větrem, vodou a živočichy. Stejně tak může začínat svůj život jako lichenikolní lišejník, který svého fotobionta přebírá přímo z cizí stélky, zejména z mladých nebo naopak starých poškozených stélek. Takové parazitní chování bylo popsáno u terčovníku *Xanthoria parietina*, který někdy roste přímo na stélkách mísničky *Lecidella elaeochroma* (Ott 1987b), u blýskavky

Fulgensia fulgida přerůstající stélku *Toninia sedifolia* (Beck et al. 2002) nebo u *Chaenothecopsis consociata*, který zpočátku přebírá řasu *Trebouxia* od svého hostitele *Chaenotheca chrysocephala* (Tschermak-Woess 1980). Friedl (1987) pozoroval výměnu fotobiontů u džbánovky *Diploschistes muscorum*, která začíná růst jako parazit na různých druzích dutohlávky *Cladonia*. Později se *D. muscorum* se osamostatňuje, ale může přerůstat okolní lišejníky a fotobionty v průběhu životního cyklu vyměnit. Průnik hyf mykobionta *Parmotrema tinctorum* do jiné stélky a jeho následnou asociaci pozoroval například Ohmura et al. (2006). Výměna fotobiontů mezi stélkami sousedních lišejníků (photobiont switching) je mechanismem pro optimalizaci symbiotického složení v lokálních podmínkách (Piercey-Normore & DePriest 2001).

U pohlavně se rozmnožujících druhů lišejníků se šíří pouze mykobiont, a proto relichenizace, kdy vyklíčená spora riskuje a musí najít na nového kompatibilního partnera, je nezbytnou součástí životního cyklu (Beck et al. 2002). Fotobiont podstupuje horizontální přenos a mykobiont má tedy větší možnost chytit si jiného (Honegger & Scherrer 2008). Bylo by pro něj zajisté výhodné, umět asociovat se širší škálou řas nebo běžnou všudypřítomnou řasou (Rikkinen 2003) a nebýt tak omezen čekáním na náhodu, že k němu doputuje optimální řasa.

Zato u lišejníků s nepohlavním způsobem rozmnožování probíhá tzv. vertikální přenos fotobiontů. Řasa se rozptýlí společně s houbou jako součást vegetativní propagule. Mezi tyto propagule řadíme práškovité izídie s několika buňkami fotobionta obalené hyfami, větší výrůstky na stélce lišejníku s diferencovanými vrstvami nazývané sorédie a konečně blastidie, což jsou stélkové fragmenty určené k rozmnožování zpravidla větší než 1 mm. Získání jiných volně žijících řas než s kterými se mykobionti sami šíří je v tomto případě méně pravděpodobné než u pohlavně se rozmnožujících (Werth et al. 2006, Cassie & Piercey-Normore 2008). Teoreticky by tyto lišejníky měli být specifičtější ve svém výběru a my bychom měli pozorovat těsnější genetické vazby a symbiotické vzory, dokonce klonální genetickou strukturu (Walser et al. 2004). Klonalita zaručuje, že na místě budou oba partneři v již vyzkoušené a úspěšné variantě. Přesto společně se šířící symbiózy můžou vykazovat negativní znaky klonálních organismů, tj. nemohou se jednoduše adaptovat na nové podmínky, obsazovat nové niky a úspěšně odolávat novým selekčním tlakům (Scheidegger & Werth 2009). I u zcela sterilních lišejníků nebo těch s málo častým sexuálním rozmnožováním může probíhat výměna fotobiontů (photobiont switching) (Helms et al. 2001, Ohmura et al. 2006, Nelsen & Gargas 2009, Dal Grande et al. 2012, Magain & Sérusiaux 2014).

Vyvstává tedy otázka, jestli zde opravdu existuje nějaký vztah mezi způsobem rozmnožování a přítomností linie fotobionta. Pokud je tedy lišejník schopný šířit se oběma způsoby, v optimálním prostředí by měl preferovat vegetativní šíření a udržovat si svého fotobionta. Naopak v suboptimálním prostředí by mělo být výhodnější sexuální rozmnožování, kdy houba podstupuje vlastní genetickou rekombinaci a může si najít vhodnějšího, lépe přizpůsobeného fotobionta na místní podmínky. Castillo & Beck (2012) tuto myšlenku dokládají na krásnici *Caloplaca* – když je ve stresu kvůli malé dostupnosti

vody tvoří menší stélky a více apothecií, zatímco při dostatečném přísunu vody roste do větších rozměrů a zakládání nových lišejníků je podpořené produkcí konidií a fragmentací stélky.

Můžeme předpokládat, že na určitém měřítku se odehrává vertikální přenos a výměna fotobiontů; schopnost spojit se s různými místně přizpůsobenými řasami by měla pomoci při kolonizaci nových a třeba i odlišných habitatů (Beck 1999, Beck et al. 2002, Piercey-Normore 2004, 2006, 2009, Yahr et al. 2006, Del Campo et al. 2013).

Situaci, kdy se jeden lišejník šíří disperzně s oběma symbionty, zatímco u druhého se šíří pouze samotný mykobiont meiotickými sporami, zkoumali také Wornik a Grube (2010) u rodu *Physconia* s širokým geografickým rozšířením. Nenašli spojitost mezi genotypem fotobionta a typem šíření, sterilní druhy nevykazovali vyšší specificitu než sexuálně se šířící lišejníky.

1.2. Vliv podmínek prostředí na výběr fotobiontů

Ekologické podmínky jako **teplota, množství světla, dostupnost vody, typ substrátu a geografická distribuce** jsou zřejmě klíčovými pro výběr fotobionta. Dnešním fenoménem je sledovat, jak environmentální podmínky ovlivňují morfologii, reprodukční strategii lišejníku, celou lišejníkovou komunitu a především fotobionta a vzájemnou symbiózu.

Dostatek srážek v kombinaci se stabilními podmínkami substrátu preferují lišejníky se zelenou řasou, cyanolišejníky jsou nejhojnější na deštivých oblastech a lišejníkům s druhy rodu *Trentepohlia* nejvíce vyhovují teplé a deštivé podmínky s přímořským klimatem (Marini et al. 2011).

Příliš teplé klima v nížinách Středomoří, nevhodné pro rozmnožování fotobiontů *Trebouxia simplex* vyskytujících se spíše na studených stanovištích, by mohlo způsobovat, že málo specifická *Lecanora rupicola* v takových oblastech s řasou *T. simplex* neasociuje (Blaha et al. 2006). Podobně krustozní lišejník *Tephromela atra* roste v chladných horských podmínkách Alp a Peru nejvíce s komplexem *T. simplex/ jamesii*, i když jinde je schopný asociovat až s 12 liniemi *Trebouxia* (Muggia et al. 2014).

Cordeiro et al. (2005) poukázali na existenci linie *Trebouxia* z lišejníků *Ramalina*, která se preferenčně vyskytuje v tropických oblastech. Castillo a Beck (2012) pozorovali odlišné haplotypy *Trebouxia* v krásnici *Caloplaca* a interpretovali vyšší selektivitu jako důsledek místní adaptace, kdy s rostoucí nadmořskou výškou a zvětšující se mlhou je lišejník stresován nadbytkem vody. Potřebuje si tedy vybrat genotyp *Trebouxia*, který je na tyto podmínky dobře přizpůsoben a vyhovuje mu vyšší vzdušná vlhkost. Některé genotypy jsou lépe přizpůsobené k životu při nadbytku vody a vyskytují se v různých nadmořských výškách. Zásadní pro některé fotobionty bude právě jejich expozice k přímému dešti a světlu, stejné linie rodu *Asterochloris* se vyskytují v taxonomicky odlišných ale ekologicky podobných lišejnících rodů *Lepraria* a *Stereocaulon* (Peksa & Škaloud 2011). Fernández-Mendoza et al. (2011) dokonce rozdělili fotobionty z *Cetraria aculeata* na populace mírného a polárního podnebného pásu.

Diverzitu fotobiontů ve stélkách *Protoparmeliopsis muralis* může ovlivňovat typ substrátu, protože na betonu měly tyto lišejníky větší spektrum druhů *Trebouxia* než na žule nebo vápenci (Guzow-Krzemiňska 2006).

Také genotypy fotobiontů v rožďovce *Ramalina menzesii* se zdají mít silnou substrátovou specifitu, protože rostou na různých druzích dubu *Quercus* (Werth & Sork 2010). Jako klíčový faktor je ale v tomto případě **množství světla**, které je zřejmě důležitější než fyzické a chemické vlastnosti kůry. Některé linie rodu *Trebouxia* rostou pouze na stále zastíněných kmenech a jiným se naopak daří lépe na dubech, které v zimě opadávají (Werth & Sork 2010).

1.3. Lišejníkové gildy

Pokud fylogeneticky příbuzné druhy sdílí podobné environmentální podmínky, pak by lišejníky rostoucí na stejném místě mohly mít společný fond fotobiontů. Pojem lišejníkové gildy, kdy je vykazována specifita na úrovni společenstva, popsali Rikkinen et al. (2002) pro cyanolišejníky s ekologicky podobnými požadavky a blízce příbuznými fotobionty. Autoři vymezili dvě podskupiny cyanolišejníků se sinicí *Nostoc*, přičemž první podskupina, gilda s rodem *Peltigera*, zahrnuje pouze cyanobionty epifytických lišejníků. Druhá gilda *Nephroma* zahrnuje sinice *Nostoc* z terikolních lišejníků, symbiontů cykasů a volně žijících kmenů; pokud některé druhy z této gildy rostou epifyticky, jsou omezené spíše na báze kmenů pokryté mechem. Společný fond fotobiontů umožňuje rozlišení lišejníků na *core species* (jádrové druhy), které produkují hodně vegetativních propagulí obsahující oba dva bionty a *fringe species* (okrajové druhy), u kterých se šíří pouze spory mykobionta a musí si najít volného fotobionta z místních zdrojů (Rikkinen et al. 2002).

Vegetativně se rozmnožující lišejníky jsou schopní přinést fotobionta na nové území. Propagule lišejníků *Physcia adscendens* a *Phaeophyscia orbicularis* by mohly sloužit jako zdroj fotobiontů pro klíčící askospory *Xanthoria parietina* (Beck et al. 1998). Pokud mísnička *Lecanora rupicola* rostla v blízkosti lišejníků *Lecidella* a *Protoparmelia*, pak společně sdílely fond fotobiontů (Blaha et al. 2006).

Velkým zdrojem pro řadu lišejníků s rodem *Asterochloris* by mohly být dutohlávky *Cladonia*, které rostou v širokém spektru habitatu a na různých substrátech (Bačkor et al. 2010). S touto hypotézou nesouhlasí Piercey-Normore a DePriest (2001), které vypozorovaly, že dutohlávky rostou jen s několika málo genotypy rodu *Asterochloris*.

1.4. Další faktory ovlivňující výběr fotobiontů

Genetická variabilita druhů je odrazem mnoha faktorů, mezi které patří přirozený výběr a genetický drift, demografická historie včetně zakládajících událostí, prostorového rozmístění a izolaci populací, či náhoda (Nei et al. 1975). Existují tedy situace, ve kterých by mohly být ekologické faktory méně důležité.

Například Domaschke et al. (2012) popisují, že diverzita fotobiontů *Trebouxia* v pukléřce *Cetraria aculeata* je největší v mírném pásmu a směrem k Antarktidě klesá výrazněji než směrem k Arktidě. Vyvozují z toho, že první diverzifikace fotobiontů proběhla na severní polokouli a poté se pravděpodobně fotobionti šířili přes Andy do Antarktidy, kde právě efekt kolonizace snižuje jejich genetickou variabilitu.

Romeike et al. (2002) popisují případ antarktické pupkovky *Umbilicaria,* která kooperuje s 5 genotypy řas, přičemž jeden z nich je nejčastější. Přítomnost jednotlivých genotypů na studovaných místech vysvětlují jako velmi nedávnou kolonizaci nebo naopak pozůstatek kolonizací z dávných teplejších období. Další příklad efektu úzkého hrdla kombinovaného s efektem zakladatele zjistili Ohmura et al. (2006). Ti vysledovali, že diverzita fotobiontů *Trebouxia corticola* v terčovce *Parmotrema tinctorum* je v městských částech velmi chudá v porovnání s předměstím. Tento rozdíl je vysvětlen silným znečištěním SO2. Podle autorů je navíc v limitujících podmínkách nutná pouze ta nejkompatibilnější řasa.

Může to však být i naopak a na místě se může vyskytovat pouze omezený výběr řas a lišejník se musí spokojit se suboptimálním partnerem. Lišejníky rostoucí na **extrémních stanovištích** mají omezený počet dostupných druhů řas, ze kterých si mykobiont může vybírat a zakomponovat je do své stélky, proto je pro ně výhodnější být geneticky kompatibilní s mnoha různými řasami (Doering & Piercey-Normore 2009). Nízká specifita byla popsána u antarktických cyanolišejníků spolupracujících s volně žijícími liniemi sinice *Nostoc*, kterých je v takovém limitujícím prostředí méně (Wirtz et al. 2003). Podobně Engelen et al. (2010) zjistil, že prášenka *Lepraria borealis* rostoucí na Antarktidě je schopná asociovat s fotobionty Trebouxia nebo Asterochloris, které se nachází v okolních lišejnících. V tomto případě autorům není jasné, jak dochází k předávání fotobiontů, protože interakce mezi *L. borealis* a asociovanými lišejníky není pevná a její hyfy zřejmě hlouběji do jiných stélek vůbec nepronikají.

K odlišnému řasovému společentvu a specifitě lišejníku přispívá i různá míra kontinentality a vzájemná **geografická izolovanost**. Model ostrovní evoluce s vysokou geografickou izolovaností otevírá nový prostor pro větší genetickou diverzitu a specializaci mladých populací. Například *Ramalina farinacea,* schopná symbiotického vztahu se dvěmi liniemi řas, si na Kanárských ostrovech vybírá pouze linii *Trebouxia* T9, která je zde hojná a spojovaná s několika dalšími lišejníky (del Campo et al. 2013).

Často však nenalézáme žádné zřetelné vzory v geografickém rozmístění fotobiontů, například u cyanobiontů *Nostoc* (Elvebakk et al. 2008) nebo fykobiontů v lišejnících *Flavocetraria nivalis*

(Opanowicz & Grube 2004). Také Leavitt et al. (2013) nenašli žádný geografický vzor u *Trebouxia arboricola* a *T. gigantea* nacházející se v lišejníku *Xanthoparmelia*, přesto ukazují lokálně specifické rozdíly v rozmanitosti fotobiontů zřejmě díky nízké selektivitě mykobionta a rozdílné fitness řas na lokalitách.

Důležitým faktorem pro úspěšné šíření a kolonizaci nových odlehlých míst je mimo jiné závislé na velikosti rozmnožovacích propagulí. Menší propagule s oběma bionty je schopná kolonizovat vzdálenější oblasti (Armstrong 1990) s odlišnými podmínkami, ve kterých může mít původní fotobiont sníženou fitness. V takovém případě by pro mykobionta bylo výhodnější asociovat s jinou řasou adaptovanou na lokální podmínky.

Rozšíření lišejníku ovlivňuje životaschopnost řasy, která je vnímána jako citlivější symbiont. Stres způsobený znečištěním při těžbě mědi nijak neovlivnil produkce spor u sexuální *Tuckermanopsis sepincola*, ale měl velký vliv na vegetativně se množící populaci terčovky *Hypogymnia physodes*, který se stával méně sorediátní až esorediátní s menší stélkou, a to zřejmě kvůli špatnému dělení buněk fotobiontů (Mikhailova 2007).

1.5. Společenstvo řas na lokalitě

Výběr fotobiontů může být omezen jednoduše přítomností dané řasy na určitém místě, tedy lokálním dostupným řasovým fondem (Beck 1999, Fernández-Mendoza et al. 2011, Muggia et al. 2014). Pro dlouhodobější přetrvávání druhu na určitém místě musí být dostatečně velká zásoba symbiontů (Scheidegger & Werth 2009). Teoreticky by se špatná dostupnost fotobiontů mohla vyřešit třeba společným šířením, které je vhodnější pro rychlou kolonizaci, ale zužuje výběr vhodné niky (Wornik & Grube 2010). Množstvím dostupných řas si např. Blaha et al. (2006) vysvětlují situaci, kdy na jedné lokalitě v misničce *Lecanora rupicola* nalezli více linií rodu *Trebouxia* než na ostatních lokalitách se stejnými environmentálními podmínkami.

Předpokládáme, že tytéž řasy můžou být **samostatně aeroterestricky žijící** a zároveň jsou schopné lichenizovat (Bubrick et al. 1984, Ahmadjian 1988, Mukhtar et al. 1994). Pokud by fotobionti byli striktně vázáni na soužití s mykobiontem v přírodě, k jejich šíření by mohlo dojít při poškození stélky lišejníku nebo při vhodných podmínkách díky tvorbě zoospor (Friedl & Büdel 2008). Omezená existence pouze ve stélce lišejníku (a případném krátkodobém uvolnění) by teoreticky mohla způsobovat velkou genetickou diferenciaci fotobionta, ale protože jsou nejspíše schopní žít také volně a volně se šířit, tak bychom měli zaznamenávat menší genetickou variabilitu mezi lokalitami (Werth & Sork 2014).

2. DIVERZITA FOTOBIONTŮ V LIŠEJNÍKU *PSORA DECIPIENS*

K vytvoření úspěšné symbiozy je potřeba najít si optimálního partnera. Výběr fotobiontů je nenáhodný a pozorujeme v něm určité zákonitosti, které závisí na kombinaci biotických a abiotických podmínek. Tato práce se zaměřuje na případ, který je atypický a nezapadá do našich dosavadních znalostí. Je jím lišejník *Psora decipiens*, u kterého se identifikace fotobiontů ukázala jako diskutabilní.

Ruprecht et al. (2014) určili jako jeho fotobionty řasy rodů *Asterochloris* a *Trebouxia*, a blíže nespecifikovanou linii označenou jako Chlorophyta spp. Autoři poukázali na dosud nevídanou diverzitu řas, která by se mohla skrývat v rámci jednoho druhu a dokonce v jedné jeho stélce.

Hypotéza formulovaná Ramboldem et al. (1998) tvrdí, že podřád Cladoniineae tvoří symbiózu s rodem *Asterochloris*, zatímco zástupci podřádu Lecanorineae dávají přednost rodu *Trebouxia.* Když zařadíme stroupku (*Psora* sp.) do fylogenetického systému, tak patří mezi bazální skupiny Lecanorales (Miadlikowska et al. 2014). *Psora* by tak s oběma rody řas *Asterochloris* i *Trebouxia* mohla tvořit základní vývojový stupeň pro korunní skupiny Cladoniineae-Lecanorineae. Asociace s těmito dvěma řasovými rody by mohla být plesiomorfním znakem Lecanorineae, který zůstal v lišejníku *Psora* zachovaný, zatímco zástupci skupin Cladoniineae a Lecanorineae jsou už schopni asociovat pouze s jedním rodem. Zcela jistě by bylo zajímavé zjistit, zda stejnou vlastnost sdílí více členů čeledě Psoraceae.

Předtím Schaper a Ott (2003), kteří sledovali selektivitu a interakce mykobionta *Fulgensia* s jinými řasami, se zmínili o fotobiontovi *P. decipiens* jako o *Asterochloris* sp.

Zcela odlišně identifikoval fotobionta *P. decipiens* Geitler (1963) jako *Myrmecia biatorellae* pozorováním ve stélce a kultuře a Galun et al. (1971) pomocí elektronové mikroskopie jako *Myrmecia* sp. Také Tschermak-Woess (1988) se zmiňuje o *M. biatorellae* v souvislosti s lišejníky *Psora decipiens* a *P. globifera.*

Nedávno Williams et al. (2017) určili jako jediného fotobionta rod *Myrmecia* sp., což je překvapivě nízká diverzita v porovnání s dřívější literaturou (Ruprecht et al. 2014). Pomocí transplantačních pokusů Williams et al. (2017) navíc zjistili, že řasová vrstva lišejníku *P. decipiens* není schopná přežít na novém místě, pokud se klimatické podmínky zřetelně liší od místa původního. *P. decipiens* tedy zřejmě obsahuje různé genotypy řas, které se neumí dobře aklimatizovat.

Psora decipiens je druhem vyskytující se ve společenstvu lišejníků *Toninio – Psoretum decipientis* (= *Thalloedema-caeruleonigricans–Lecidea–decipiens association*, tab. 1) rostoucí na bazických, vápenitých substrátech. V němčině je toto společenstvo označováno jako "Bunte Erdflechtengesellschaft", tedy jako „společenstvo barevných zemních lišejníků" snad kvůli různě barevným stélkám jednotlivých lišejníků. Červeno-růžové squamuly stroupky *P. decipiens* (obr. 1) se velmi často nachází v přítomnosti nitroplodky *Placidium* nebo *Claviscidium* s hnědými squamuly, což

barevně doplňuje oranžovo-žlutá až krémová stélka blýskavky *Fulgensia* a modro-zelené squamuly lišejníku *Toninia* (obr. 2)

Seznam druhů společenstva *Toninio-Psoretum decipientis* a jemu podobných společenstev

	Stodiek (1937)	Gams (1938)	Llimona (1982)	Scholz (1995)	Beck et al. (2002)
Catapyrenium michelii (A. Massal.) R. Sant.				+	+
Catapyrenium squamulosum (Ach.) O. Breuss				+	
Collema fuscovirens (With.) J. R. Laudoun	vzácně				
Collema cristatum (L.) Wigg.					+
Diploschistes ocellatus (Vill.) Norman			+		
Endocarpon pusillum Hedw.				+	
Fulgensia bracteata (Hoffm.) Räsänen				+	
Fulgensia fulgens (Sw.) Elenkin		+		+	
Fulgensia fulgida (Nyl.) Szatala			+		+
Psora decipiens (Ehrh.) Hoffm.	+	+	+	+	
Psora saviczii (Tommin) Follm. & Crespo				+	
Squamarina cartilaginea (With.) P. James in Hawksw.		+			
Squamarina lentigera (Weber) Poelt		+			+
Toninia sedifolia (Scop.) Timdal	+	+	+	+	+

tab. 1: Charakteristické druhy společenstva *Toninio-Psoretum decipientis* (Beck et al. 2002, upraveno)

obr.1: Lišejník *Psora decipiens* (Hedw.) Hoffm. (1794) (*Lecidea d.* (Hedw.) Ach.), vyzn. měřítko má 1 cm.
Squamuly až průměru 3-4 mm, okrouhlé, roztroušené nebo blízko u sebe až překrývající se, od růžové, červené až do hnědé, můžou být místy pokryté bílou pruinou. Okraje jsou obvykle bílé, celistvé, někdy zoubkované.
Apothecia do 2 mm v průměru, přisedlé, s okraji, černé a někdy s bílo- žlutou pruinou.
Askospory 11-18 x 6-8 um. Konidie 6-7 x 1um.
(podle Smith et al. 2009)

obr. 2: Příklad dalších lišejníků společenstva *Toninio-Psoretum decipientis*: a) hnědé squamuly nitroplodky šupinaté *Placidium squamulosum* (Ach.) Breuss (= *Catapyrenium squamulosum* (Ach.) Breuss); b) žlutá korovitá stélka s oranžovými apotheciemi blýskavky žluté *Fulgensia fulgens* (Sw.) Elenkin a c) modro-zelené squamuly promíchané s černými apotheciemi toninie bublinaté *Toninia sedifolia* (Scop.) Timdal; vyznačené měřítko má 1 cm.

2.1. Lišejníky rodu *Psora*

Rod *Psora* (tab. 2) zahrnuje asi 40 druhů a je kosmopolitní, typicky roste na bazických nebo vápenitých substrátech. V této práci popisuji a porovnávám fotobionty získané ze šesti druhů *Psora*, v tabulce (tab. 3) jsou uvedeny společně se svými sekundárními metabolity. U druhu *P. decipiens* nebyla zjištěna žádná korelace mezi morfologií a produkovanými sekundárními metabolity (Timdal 1984). V České republice jsou známé pouze lokality stroupek *P. decipiens* a *P. testacea* (obr. 3).

obr.3: Lišejník *Psora testacea* s šedivými squamulami a výraznými oranžovo-hnědými apothecii, vyznačené měřítko má 1 cm.

Přehled základních morfologických znaků definujících rod *Psora* sp.

Stélka je squamulozní matná i lesklá v barvách od žluté, šedé, jasně červené po červenohnědou, bez, částečně nebo zcela pokryté pruinou, se squamulami nepravidelně oblými převážně 2-6 mm širokými, rostoucí blízko vedle sebe nebo i rozptýleně, **okraje** můžou být lehce rozpraskané až krenulátní ve stejné barvě kortexu nebo bílé. Stélka je heteromerická, vrchní kůra a medula (I-) jsou dobře vyvinuté, **medula** obsahuje krystaly štavelanu vápenatého, někdy další sekundární metabolity (depsidy, depsidony, antrachinony, aliphatická, pulvinická a usnic kyselina, triterpeny). **Řasová vrstva** je kontinuální. **Spodní kůra** je málo vyvinutá od bílé až po světle hnědou nebo chybí.

Apothecia jsou přisedlá, marginální nebo laminární, hnědá až černá do 2 mm, v raných stadiích plochá nebo slabě konvexní, starší konvexní, zakulacené. Pruina na apotheciích bílá do žluta nebo chybí. Bezbarvé, elipsoidní **askospory. Vřecka** klavátní, osmisporická, typu Porpidia. Častá **konidiomata**, zanořená ve squamulách, konidie jednoduché, bezbarvé, elongátní.

Stélkový okraj nepřítomen, **pravý okraj** bezbarvý do světle hnědé s radiálními hyfami, epithecium červeno hnědé až hnědé, obsahuje antrachinony (především parietin), K+ červená až fialovo-červená, N-. Hypothecium světle hnědé až bezbarvé s častými krystaly štavelanu vapenátého. Hamathecium tvořené parafýzami jednoduchými nebo málo větvenými, silně držící u sebe, vrchní buňka trochu zbytnělá.

tab. 2: Základní morfologické znaky definující rod *Psora* (Smith et al. 2009)

lišejník		**sekundární metabolity**	**primární reál rozšíření**
Psora decipiens (Hedw.) Hoffm.	kmen I	žádné	nejčastější v Evropě, jediný ve Skanidnávii
	kmen II	kys. norsticticová	nejčastější ve středomoří
	kmen III	kys. hyposalazinová a kys. hypostictiková	Rakousko, Maďarsko, Španělsko
	kmen IV	kys. hypoprotocetrarová	Austrálie
Psora globifera (Ach.) Massal.	kmen I	žádné	Evropa, Gronsko, S Amerika
	kmeni	kys. gyropová, antrachinonové látky	Kalifornie
Psora himalayana (Church. Bab.) Timdal		žádné	
Psora rubiformis (Ach.) Hooker	kmen I	ky. usnová a gyropová	
	kmen II	pouze kys. usnová	
Psora testacea Hoffm.		atranorin	
Psora vallesiaca (Schaerer) Timdal		kys. norstiktová	

tab. 3: Soupis zkoumaných druhů *Psora* v této práci společně se svými sekundárními metabolity. Lišejníky jsou zařazeny do kmenů podle sekundárních metabolitů včetně primárního areálu rozšíření, na kterém byl také určen sekundární metabolit lišejníku (Timdal 1984, 1986).

3. CÍLE PRÁCE

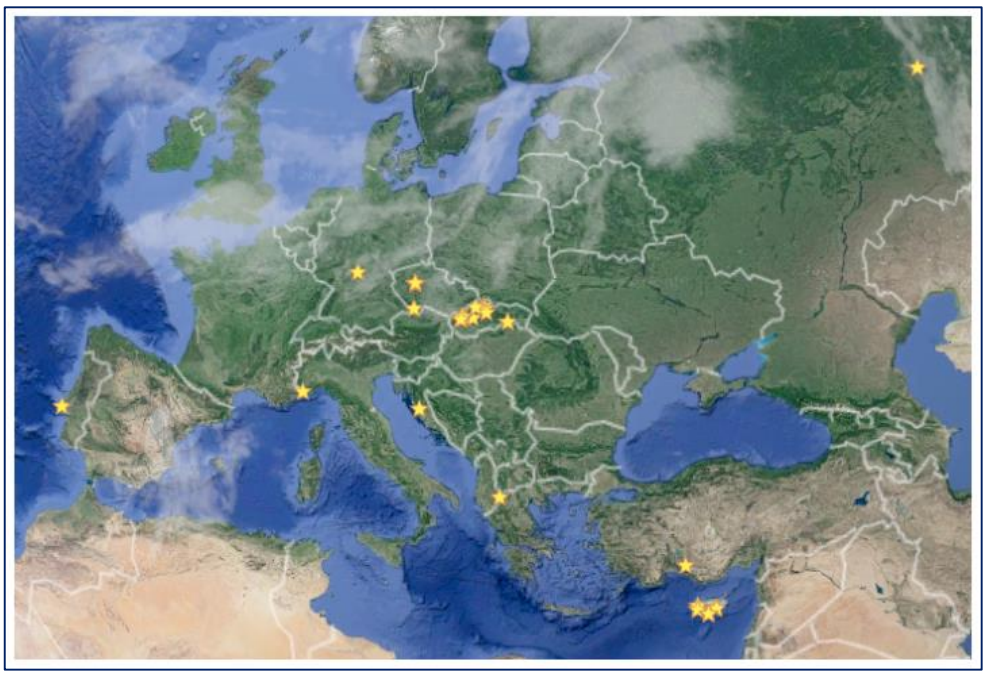
Tato práce se zaměřuje se především na diverzitu fotobiontů v lišejníku *Psora decipiens*. Klade si za cíl odpovědět na následující otázky:

1. Jaká je genetická variabilita fotobiontů *P. decipiens*? Můžeme tyto fotobionty rozlišit i morfologicky?
2. Jsou populace fotobiontů *P. decipiens* od sebe geneticky izolovány? Jsou v rodě *Psora* odlišné preference ve výběru fotobionta?
3. Pozorujeme nějakou výměnu fotobiontů mezi *P. decipiens* a dalšími členy společentva *Toninio-Psoretum*?
4. Jaký postup je nejoptimálnější pro zjišťování diverzity fotobiontů?

4. METODIKA

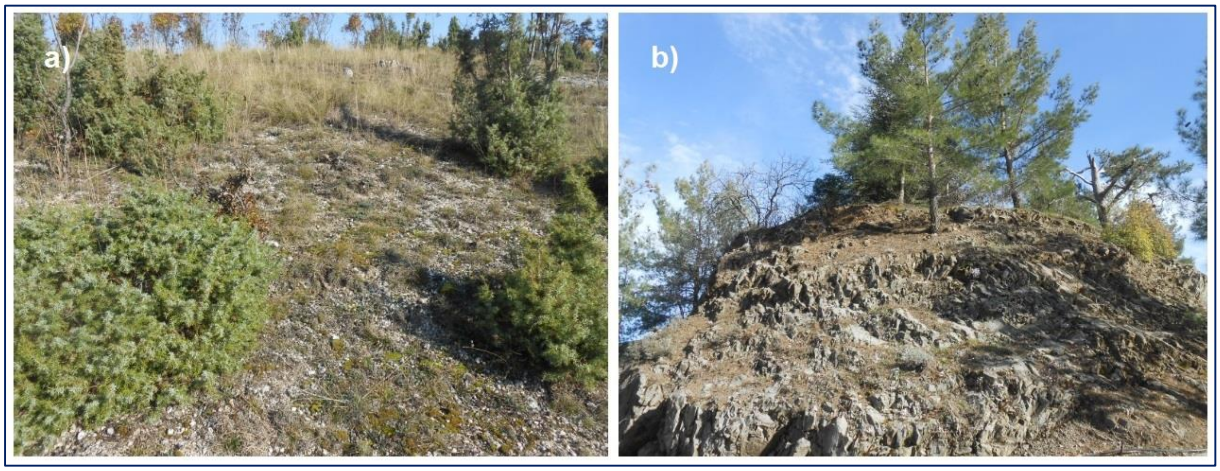
4.1. Sběr a získávání materiálu

Podařilo se mi shromáždit materiál celkem ze 41 lokalit z České republiky, Slovenska, Německa, Francie, Portugalska, Albánie, Chorvatska, Kypru, Turecka a Ruska (obr. 4). Některé položky byly zapůjčeny z herbářů soukromých lichenologických sbírek.



obr. 4: Lokality studovaných lišejníků (https://www.google.cz/maps/).

Studované společenstvo *Toninio-Psoretum decipientis* sestává v různých modifikacích z lišejníků *P. decipiens, Placidium squamulosum, Pl. rufescens, Pl. pilloselum, Toninia sedifolia, T. opuntioides, Fulgensia fulgens, F. bracteata* a další. Typické jsou pro něj vápenité a bazické substráty biologických půdních krust („biological soil crust“, BSC). Nacházejí se často na xerotermních lokalitách (obr. 5), která nejsou disturbovaná. BSC je složitý ekosystém plnící mnoho funkcí - zvyšuje stabilitu a úrodnost půdy, hraje roli ve fixaci dusíku a uhlíku, akumulaci živin a v jejich koloběhu, snižuje erozi a zadržuje vodu v krajině (Belnap et al. 2001). Nebezpečím pro terikolní lišejníky je acidifikace, eutrofizace a následné zarůstání lokality cévnatými rostlinami, eroze a také antropogenní činnosti, jako je například stavba komunikací, budov nebo těžba (společenstvo *Toninio-Psoretum decipientis* bývá na okrajích vápencových lomů).



obr. 5: Typická stanoviště společenstva *Toninio-Psoretum decipientis* ve střední Evropě: a) vápencové skalky, Komjatná–Studničná, SR; b) xerotermní svah s dominantním *Juniperus communis*, Nitrica, SR.

4.2. Kultivace a pozorování fotobiontů

Fotobionty jsem izolovala převážně z čerstvě nasbíraných stélek, abych zajistila vysokou životaschopnost řas. Prvně je nutné pečlivě očistit vybraný kousek stélky pod binokulární lupou pomocí ostré žiletky a zbavit ho všech kontaminací. Poté jsem cíleně vybírala řasovou vrstvu ideálně s malým množstvím mykobionta. Fragment jsem umístila na agarové médium stejně jako Ahmadjian (1993). Fotobionti rostli na agarovém modifikovaném BBM médiu (Bold's Basal Medium) na Petriho miskách nebo zkumavkách se šikmým agarem. Kultury byly uchovávány při pokojové teplotě 20 ºC při 24 hodinovém osvětlení. Dále jsem je pravidelně kontrolovala, při případné houbové kontaminaci přeočkovala. Po šesti týdnech jsem fotobionty přemístila na nové médium. Kultivované řasy byly morfologicky identifikovány pomocí světelného mikroskopu Olympus BX 51 (Olympus Corporation) a vyfoceny kamerou Olympus DP72 (Olympus Corporation).

Pro další analýzy jsem potřebovala kolonie narostlé z jedné buňky. Několik buněk kultury z fragmentu lišejníku jsem důkladně zvortexovala v 0,5 ml tekutého BBM média, nakapala na agarové médium na Petriho misky, kterými jsem zatřásla tak, aby se vortexovaná suspenze rovnoměrně rozprostřela po misce. Každá vyrostlá kolonie by měla být z jediné buňky. Podobný způsob je často uplatňovaný v mikrobiologických pracích, kde je potřeba práce s jednou buňkou (single-cell mechanical micromanipulation; Fröhlich & König 1999).

Důležitým bodem pro studium fotobiontů je determinace řasy přímo ve stélce lišejníku. Tento bod jsem naplnila pozorováním fotobiontů pomocí fluorescenčního mikroskopu (Olympus CX21 camera with LED Fluorescent Illuminator) a konfokálního mikroskopu (Leica TCS SP2 with AOBS system).

Fotografie byly zpracovávány v programu ImageJ (Schneider et al. 2012) nebo Adobe Photoshop CC 2015.

4.3. Izolace DNA, PCR a přečišťování PCR produktů

DNA z axenických řasových kultur jsem získávala použitím kitu InstaGene matrix (Bio-Rad) a z pečlivě očištěné lišejníkové stélky pod binolupou pomocí protokolu CTAB (Doyle & Doyle 1987) s drobnými úpravami. Při přípravě materiálu ze stélky jedince jsem použila jednu až čtyři squamuly.

Pro PCR amplifikaci jsem vybrala úsek ITS (Internal Transcribed Spacer) rDNA, který je často používaným molekulárním markerem pro fylogenetickou analýzu řas a fotobiontů na rodové a nižší úrovni.

Jedním z důležitých bodů je výběr správných primerů. Ideálně by měly fungovat na velkou škálu řas, abychom se vyhnuli biasu způsobenému příliš specifickými primery a nepřehlédli tak skrytou genetickou variabilitu. Vytvořením dostatečně specifického primeru, který při PCR amplifikuje pouze fotobionty a vyhýbá se ostatním organismům, bychom mohli zjišťovat diverzitu řas pomocí jaderného markeru přímo z půdy, a tak popsat celé řasové společenstvo na lokalitě. Jeho výčet by měl být kompletnější a přesnější než pomocí kultivace řas ze vzorku substrátu. Na jakémkoli médiu totiž vyroste pouze zlomek reálné diverzity terestrických řas. Bylo navrženo několik nových primerů (tab. 4), které by měly ideálně amplifikovat pouze řasovou DNA bez jakýchkoli houbových kontaminací.

Sekvence primerů byly sestaveny podle alignmentu vytvořeného ze stažených známých sekvencí hub (od kterých se primer měl co nejvíc lišit) a všech důležitých linií řas ze tříd Trebouxiophyceae a Chlorophyceae dostupných v databázi GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Abych mohla vyřadit široké spektrum hub nejběžněji se vyskytujících v půdě, tak byl seznam houbových sekvencí inspirován studiemi Wang et al. (2009), Viaud et al. (2000) a doplněn sekvencemi mykobiontů. Pomocný alignment obsahoval 130 sekvencí různých druhů zelených řas společně s několika nejčastějšími rody fotobiontů a 100 sekvencí různých druhů hub.

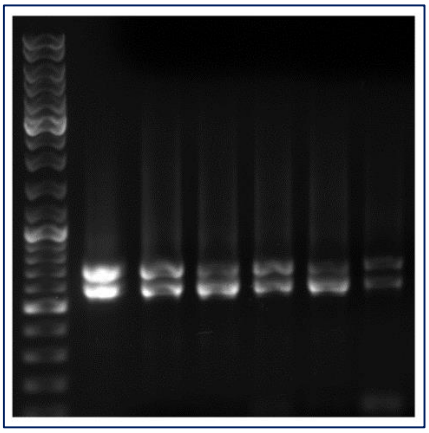
Sekvence navržených primerů	
GreenF1	5´-ATC AAG AAC GAA AGT TG-3´
GreenF2	5´-AAA CTT SCC AGG TCC AGA CA-3´
GreenF3	5´-AGG AAG GAG AAG ZCG TAA CAA-3´
zelenyF1	5´-TGT TGG TCT GTR GGA CCG GA-3´
zelenyF2	**5´-TTC TTA GTT GGT GGG TTG CC-3´**

tab. 4: Nově navržené primery schopné amplifikovat široké spektrum řas. Primer, který byl nakonec vybrán, je vyznačen tučně.

Známé řasové primery totiž nebyly vyhovující, protože nesplňovaly důležitou podmínku a tou je nasedat na templáty širokého spektra možných fotobiontů. Takovým primerem je například nr SSU -1780-5´ (5´-CTG CGG AAG GAT CAT TGA TTC-3´; Piercey-Normore & DePriest 2001), který neamplifikuje ITS rDNA u fotobiontů *Asterochloris* sp. a *Myrmecia* sp.

Jiné používané řasové primery často nasedají na místa, kde se řasy od hub liší pouze několika málo bázemi. V praxi se ukázala tato změna jako nedostatečná a zjišťovala jsem se sekvence mykobiontů, kterých je v lišejníkové stélce více. Jako příklad můžu uvést primer Klebs-ITS-F (5‘-GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG G-3‘; Škaloud & Rindi 2013) vytvořený původně pro rod *Klebsormidum*, který je dobře konzervovaný téměř ve všech vybraných řasových sekvencích. Houbové sekvence se však liší pouze jednou až dvěmi bázemi na páté a šesté pozici primeru, které může být CT případně GT (nacházíme v nich tedy velmi často 5‘-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3‘ nebo 5‘-GGA ACT AAA AGT CGT AAC AAG G-3‘).

Avšak i některé nově navrhnuté primery amplifikovaly dohromady houbový i řasový úsek. A to i při vyšších teplotách annealingu, při kterém by primery měly být specifičtější (obr. 6).



Obr. 6: Elektoforetický agarózový gel s teplotním gradientem (zleva 52°C až 57°C) málo specifických primerů. Každý vzorek měl 2 proužky - je vidět oddělenou naamplifikovanou DNA mykobionta a fotobionta (žebříček GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Biogene).

Jako nejlepší se ukázal primer zelenyF2 (5‘-TTC TTA GTT GGT GGG TTG CC-3‘) v kombinaci s univerzálním reverzním primerem ITS4 (5‘- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3‘; White et al. 1990). Polymeraze chain reaction jsem připravovala v reakčním objemu 20 µl na vzorek: 14,2 µl rH_2O, 4 µl MyTaq reakční pufr (Bioline), 0,3 µl reverse a forward primer (25 nM), 0,2 µL MyTaq™ HS DNA polymerázy (Bioline) a 1 µl DNA.

Reakce probíhala v termocykleru (Mastercycler gradient, Eppendrorf) s iniciální denaturací 94 °C 4 min; a 35 cykly denaturace 94 °C 1 min, annealing 55 °C 1 min, elongace 72 °C 2 min; zakončených extensí 72 °C 10 min.

Získané PCR produkty byly zkontrolovány na 0,8% agarozovém gelu s ethidiumbromidem a přečištěny pomocí MagJET Magnetic Bead-Based Nucleic Acid Purification (ThermoFischer Scientific). Koncentrace již přečištěné DNA byly přeměřeny na spektrofotometru NanoDrop 1000.

4.4. Klonování

Klonování je běžně používané k vytvoření kopií určitého genu pro další účely, jako jsou sekvenování, mutageneze, genotypování nebo exprese proteinů (Brown 2016). Hlavním principem je přenesení zájmové oblasti DNA do bakteriálního plasmidu, který je schopný se namnožit.

Důvody, proč bylo zapotřebí provést klonování u některých vzorků, jsou rozvedeny v kapitole *Výsledky/Fylogenetické analýzy/ITS rDNA*. Klonovala jsem DNA získanou přímo ze stélek lišejníků a také kolonie narostlé z jedné buňky, abych zjistila možnou intragenomickou variabilitu fotobiontů (Thornhill et al. 2007).

Před klonováním je potřeba připravit tekuté médium, které slouží jako potrava pro buňky. Použila jsem tedy 12,5 g Luria – Bertani (LB) broth powder medium doplněné do 250 ml rrH_2O. Nutné je také připravit misky, na kterých bakterie *E. coli* rostou. Smíchala jsem 12,5 g LB broth powder medium a 10 g Agar bacteriological a doplnila do 500 ml redestilovanou vodou. Obě média je zapotřebí vyklávovat (autoclave 3150EL Tuttnauer) 20 min při 120°C. Při ochlazení na 65 °C se do pevného média přidá 0,025 g ampicilinu rozpuštěného v 5 ml rrH_2O a rozlije se na Petriho misky.

V průběhu celého procesu je potřeba dodržovat striktní sterilitu, nástroje musí být očištěny ethanolem, navíc je vhodné pracovat ve flowboxu (Telstar FlowBox J1001) a box i nástroje vysvítit UV světlem.

K zabudování přečištěného PCR produktu do plasmidu bakterií dochází během ligace. Ligační reakce byla připravena v polovičním objemu, než je uvedeno v originálním návodu u kitu (Promega Corporation). Na jeden vzorek tedy bylo použito 2,5 µl klonovacího pufru, 0,5 µl pGEM (R)-T Easy Vector System II, 0,5 µl T4 DNA ligase (5U/µl) a konečně 1,5 µl přečištěného PCR produktu (ideálně o koncentraci 20ng/ml a vyšší). Ligace poté probíhala 2 hodiny při 22°C v termocykleru (Mastercycler gradient, Eppendrorf).

Dalším krokem je transformace, kdy dochází k zanesení plasmidu do kompetentních buněk.

Připravovala jsem 12 vzorků z jedné dávky 200 µl kompetentních buněk, tj. promíchala jsem 1 µl ligační směsi s 16,6 µl kompetentních buněk a inkubovala je 20 min na ledu.

Poté bakterie podstupují teplotní šok, kdy jsou inkubovány v termomixeru (Thermomixer® Comfort, Eppendorf) 50 s při 42 °C, praskne jim membrána a vektor s amplifikovaným zkoumaným úsekem DNA pronikne do buňky. Aby se membrána zpátky zacelila, tak se vzorky vloží na 2 min na led a ke každému se přidá 475 µl tekutého LB média. Směs jsem inkubovala 90 min při 37 °C a 150 otáčkách za min

(RPM) na třepačce (311DS Shaking Incubator, Labnet International), aby buňky měly optimální podmínky a dostatečný styk se vzduchem. V buňkách jsou exprimovány rezistenční geny proti antibiotikům a buňky jsou poté schopné přežít na agarovém médiu s ampicilinem. V případě, že bakterie nebyly transformovány správně, obsahují pouze plasmidové vektory a jsou schopné syntetizovat β- galaktosidázu. Tento enzym pomáhá odbourávat laktósový analog X-gal, což způsobuje zbarvení neúspěšně transformovaných kolonií namodro. Na každou agarovou misku jsem před začátkem klonování nanesla 50 µl X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranose, Bioline) a 50 µl jeho induktoru IPTG (isopropylthiogalactoside, Bioline).

Před nanesením bakterií na Petriho misky jsem provedla ještě krok pro zahuštění, vzorky jsem stočila na centrifuze (Centrifuge 5415D, Eppendorf) 3 min při 3 500 RPM, tekuté LB médium jsem opatrně odstranila a nahradila novým o objemu 100 µl. Bakterie jsem pěstovala 16 hod v sušičce při 37 °C.

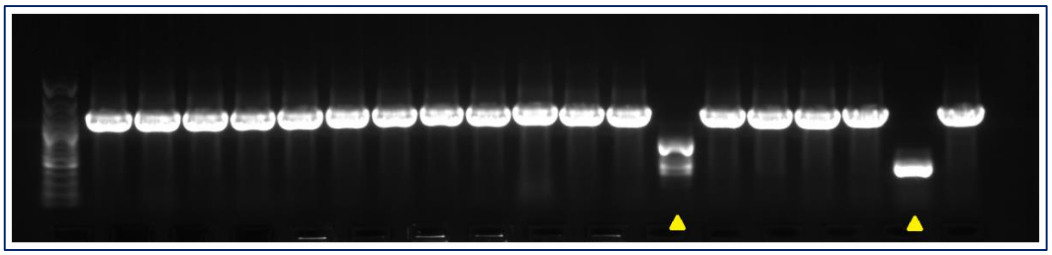
Poté jsem misky dala na 30 min do ledničky (cca 5 °C) pro zvýraznění modrobílé selekce a následně pracovala pouze s bílými bakteriálními koloniemi. Každá kolonie v sobě nese zakomponovanou odlišnou molekulu DNA.

4.5. PCR a přečišťování PCR produktů po klonování

Bílé kolonie bakterií jsem přenesla párátkem přímo do reakční směsi PCR, kterou jsem napipetovala o objemu 19 µl pro jeden vzorek: 14,2 µl rH2O, 4 µl MyTaq reakční pufr (Bioline), 0,3 µl reverse a forward primer (25 nM), 0,2 µL MyTaq™ HS DNA polymerázy (Bioline). Pro amplifikaci jsem používala univerzální bakteriální primery, jako forward primer M13F (5‘- GTA AAA CGA CGG CCA GT-3‘) a jako reverse primer M13R (5‘- GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G -3‘).

Reakce probíhala s počáteční denaturací 95 °C po dobu 1 min; a 35 cykly denaturace 95 °C 20 s, annealing 60 °C 30 s, elongace 72 °C 90 s; a finální extenzí 72°C 10 min v termocykleru (Mastercycler gradient, Eppendrorf).

Délka amplifikovaných PCR produktů byla zkontrolována na 0,8% agarozovém TAE gelu s ethidiumbromidem, obrázek (obr. 7) ukazuje rozlišení PCR produktu na špatně a úspěšně transformovaných bakterií.



Obr.7: Elektroforetická separace na agarosovém gelu. Amplifikovaný úsek neúspěšně transformovaných bakterií (označen žlutými trojúhelníčky) je zřetelně kratší v porovnání s úspěšně zaklonovanými vzorky. (žebříček GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Biogene)

Pro přečištění vzorků jsem vybrala metodu ethanolového přesrážení.

K PCR produktu jsem přidala 2 µl octanu sodného a 50 µl 96 % etanolu, promíchala a zcentrifugovala (Centrifuge 5415D, Eppendorf) 1 min při 490 RPM. Směs se inkubovala 10 min při pokojové teplotě a poté byla centrifugována 30 min při 13 200 RPM. Supernatant jsem slila a k precipitátu jsem přidala 100 µl 70 % etanolu. Následovala 10-ti minutová centrifugace při 13 200 rpm. Supernatant jsem znovu odsála a zkumavky dala do termobloku (Thermomixer Comfort, Eppendorf) na 10 min při 65 °C, aby se všechen zbytkový ethanol odpařil. Precipitát jsem rozpustila v 20 µl ddH_2O nahřáté na 65°C.

4.6. Sekvenování

Přečištěné PCR produkty jsem poslala na sekvenaci do firmy Macrogen Inc. (Soul, Korea; Amsterodam, Holandsko).

4.7. Fylogenetické analýzy

Získané sekvence jsem prohlížela v programu SeqAssem ver. 09/2004 (Hepperle 2004) nebo MEGA7 (Kumar et al. 2016). Podobnost a identitu sekvencí jsem zkontrolovala pomocí algoritmu BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/). Původní alignment byl vytvořen pomocí online programu MAFFT ver. 7 (http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/) s automatickým výběrem strategie.

Sekvence získané klonováním byly zkontrolovány pomocí programů RDP2 (Recombination detection program, Martin et al. 2004), UCHIME (Edgar et al. 2011). Tyto programy jsou schopné odhalit chimerické sekvence, které můžou nejen při klonování vzniknout spojením nepříbuzných sekvencí a je potřeba je vyřadit z jakýchkoli analýz.

Bayesiánská analýza dat proběhla v programu MrBayes 3.2.2 (Ronquist et al. 2012) pomocí evolučního modelu GTR+ Γ (General time reversible model s rozdělením gamma). Byly použity dva

paralelní běhy Monte Carlo Markovových řetězců (MCMC), analýza u každého běhu trvala 3 miliony generací. Fylogenetický strom byl zaznamenáván každých sto generací, prvních 25 % stromů bylo odstraněno jako „burn-in. Stejný dataset jsem analyzovala také metodou Maximum Likelihood v programu MEGA7 (Kumar et al. 2016) s použitím modelu GTR s rozdělením gamma a invariantními pozicemi. Fylogenetické stromy byly zobrazeny v programu FigTree (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/).

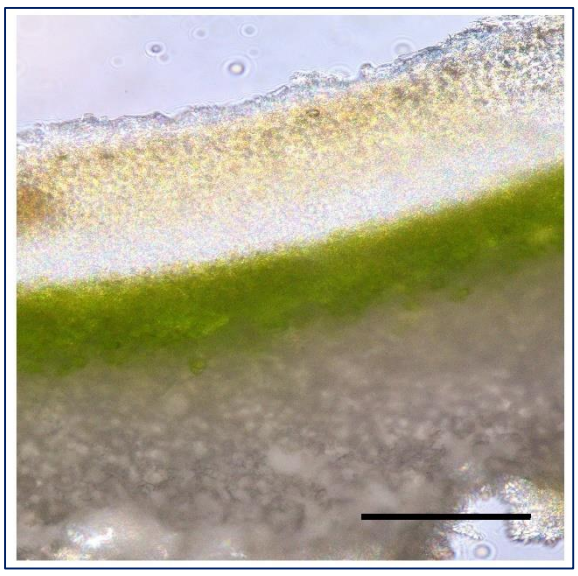
5. VÝSLEDKY

Do analýz byly take zařazeny lišejníky *Placidium squamulosum, Pl. rufescens* a *Placidium* sp. Často rostou v těsné blízkosti lišejníku *Psora decipiens* a předběžná šetření (viz kapitola *Interakce ve společenstvu Toninio-Psoretum decipientis*) upozorňovala na jejich bližší provázanost.

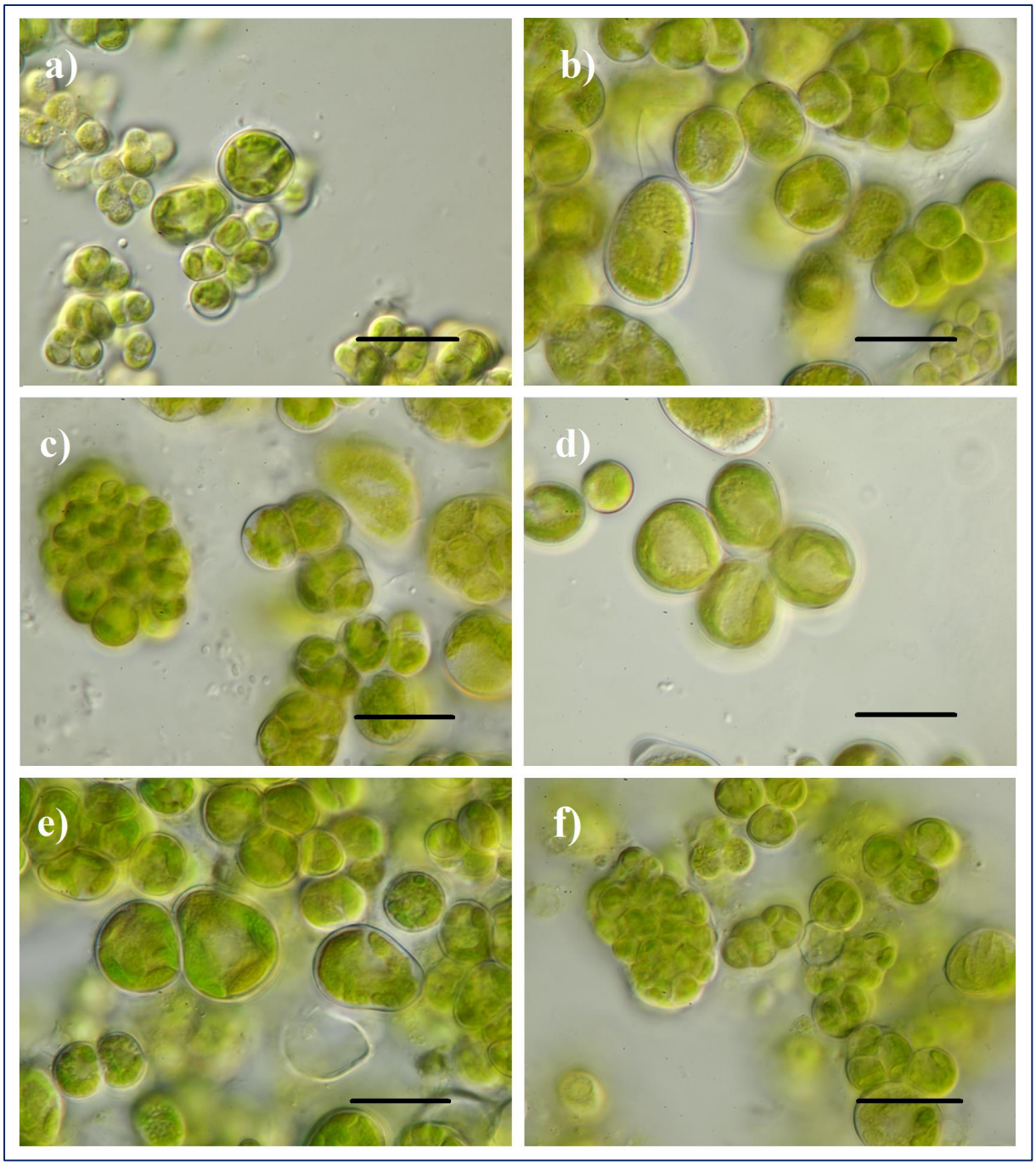
5.1. Mikroskopická pozorování

5.1.1. Světelná mikroskopie

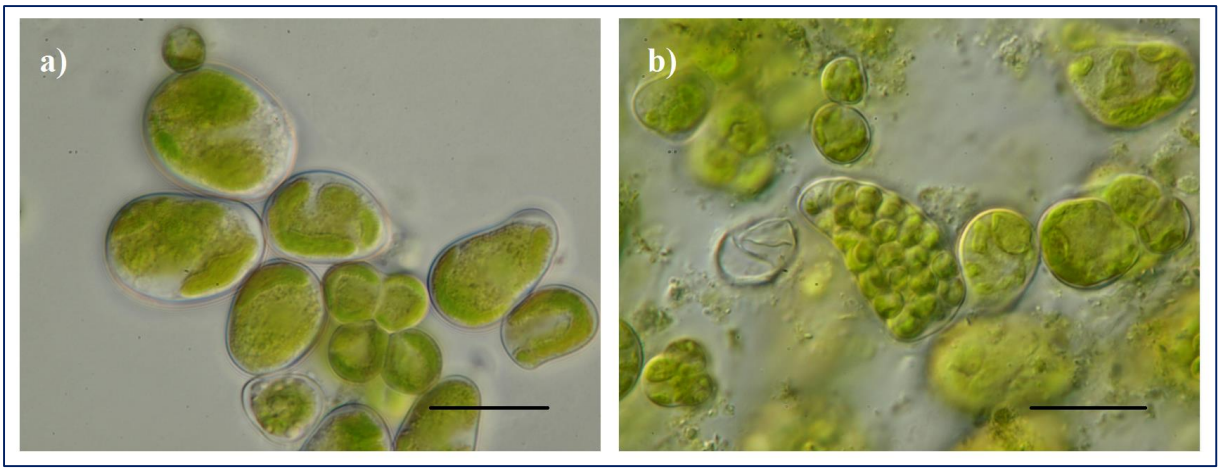
Stélky *Psora decipiens* a *Placidium* spp. jsou heteromerické (obr. 8) a pro kultivaci *in vitro* je možné preferenčně vyříznout kousek stélky s řasovou vrstvou. Minimální doba kultivace z fragmentu stélky pro jakoukoli další práci s kulturou se ukázala být dlouhá 4-6 týdnů. Fotobionti se zpravidla vyznačují pomalým růstem, a tak jsou často přerůstáni kontaminacemi. Makromorfologie fotobiontů vyrostlých na pevném médiu mají typickou kopečkovitou strukturu, zatímco kontaminace většinou sinicemi jsou slizkého charakteru. Úspěšně jsem vykultivovala fotobionty z 27 lišeníků. Celkem 26 kultur *M. israeliensis* pocházelo ze stélek *P. decipiens*/ *Placidium.* Všechny kultury se vyznačovaly stejnou morfologií (obr. 9). Jednu kulturu s *M. biatorellae* jsem vypěstovala z lišejníku *P. testacea* (obr. 10). Pozorované druhy řas netvoří slizové obaly v lišejníku ani v kultuře.



obr. 8: Lišejník *Psora decipiens* je tvořený separátními squamulami připojenými k substrátu hyfovými vlákny. Na obrázku je řez jeho heteromerickou stélkou s vysokým stupněm diferenciace. Vrchní kortex je zbarvený do oranžova, pod ním se nachází zřetelná řasová vrstva zespod pokrytá medulou.
Vyznačené měřítko má 100 µm.



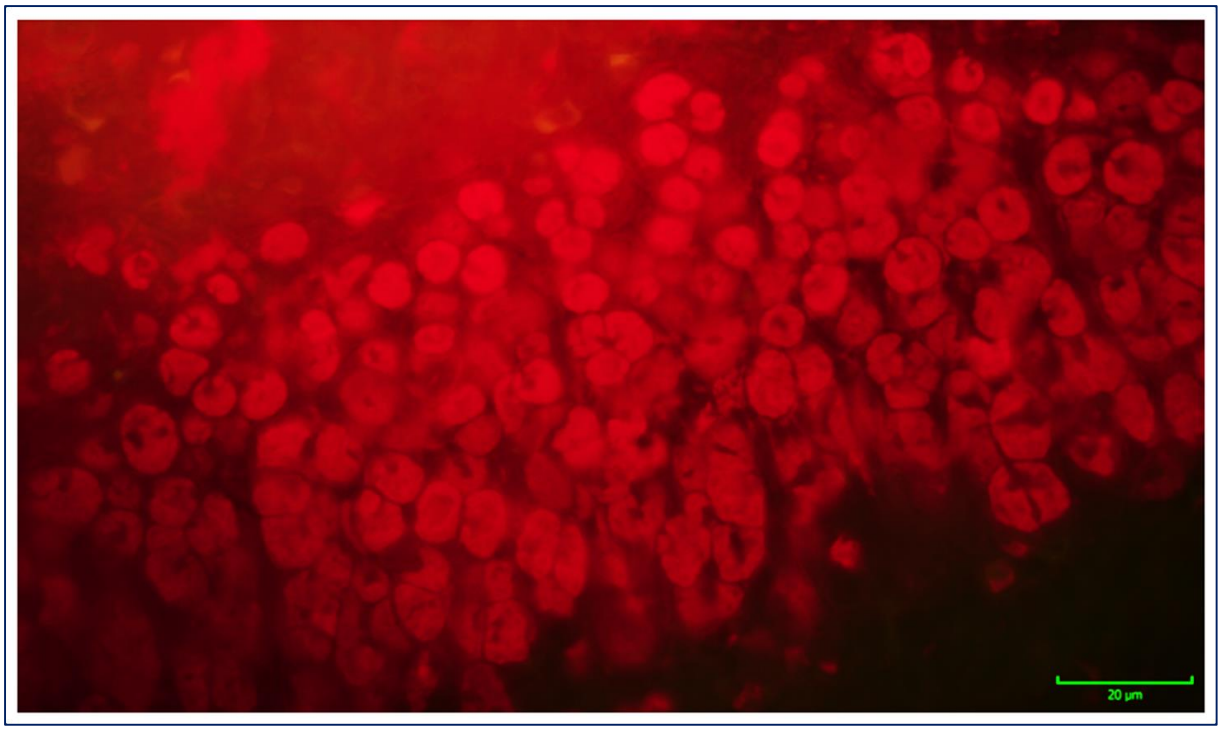
obr. 9: *Myrmecia israeliensis* je kokální, má kulovité až mírně elipsoidní/ hruškovité buňky veliké 12 – 24 µm; roste jednotlivě, někdy v tetrádách nebo skupinách. Jádro se nachází uprostřed, chloroplast je parietální s dvěma až čtyřmi laloky, bez pyrenoidu. Aplanospory (f) jsou v aplanosporangiích po 16-32-64, mají jeden nástěnný chloroplast a jsou uvolňované trhlinou v mateřské stěně. Autospory můžou zůstávat po uvolnění z mateřské buňky ve shlucích (c). Zoospory (nezobrazeny) mají dva dlouhé bičíky, jsou bez stigmatu a bez pyrenoidu. Vyznačené měřítko má 20 µm.



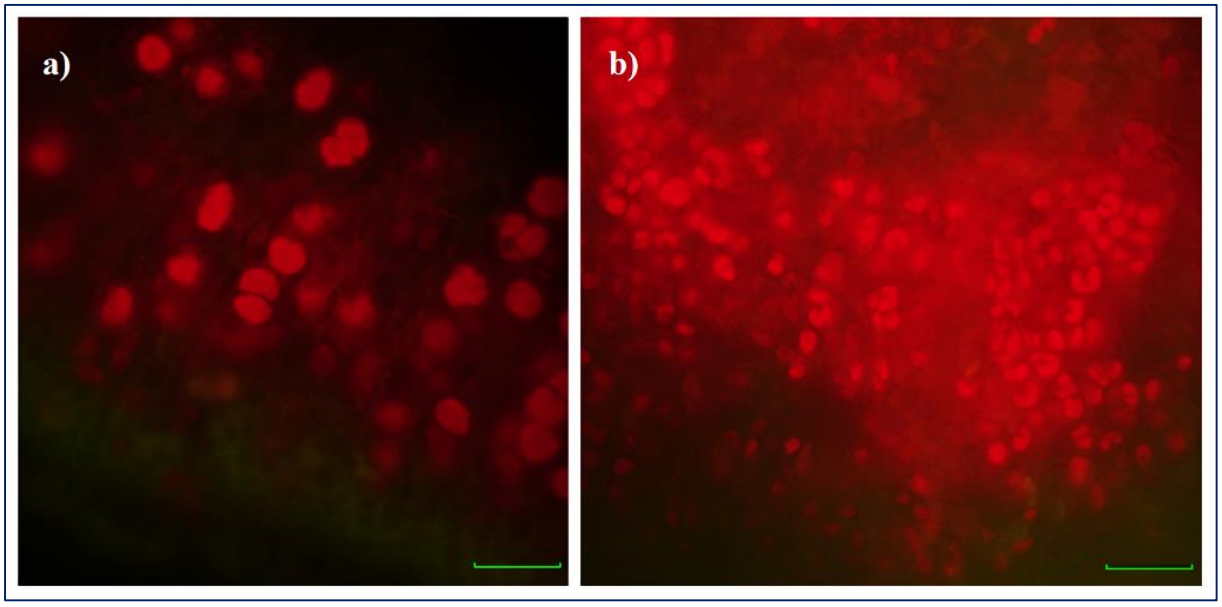
obr. 10: *Myrmecia biatorellae*. Kokální buňky jsou zamlada kulovité, postupně elipsoidní až hruškovité, 13-30 µm velké. Buněčná stěna někdy tloustne, především v místě hlavního vrcholu (a). Chloroplast je parietální, laločnatý, nemá pyrenoid. Uprostřed buňky se nachází výrazné jádro. Aplanosporangium (b) obsahuje 16-32-64 aplanospor s jedním chloroplastem. Vyznačené měřítko má 20 µm.

5.1.2. Fluorescenční mikroskopie

Morfologická identifikace fotobiontů přímo ve stélce je důležitá, abychom potvrdili, že vyizolované řasy jsou opravdu uvnitř stélky a nejedná se o kontaminace. V lichenizovaném stavu řasy *Myrmecia* dorůstají do menší velikosti, frekvence rozmnožování je nižší. Přestože identifikace fotobionta může být ztížena pozměněnou morfologií, ve stélkách zkoumaných lišejníků můžeme pozorovat vcelku typický parietální dvojlaločný chloroplast pro rod *Myrmecia* (obr. 11, 12). Většina řas ve stélkách *P. decipiens* byla ve své morfologii chloroplastu uniformní. Žádný chloroplast nikdy neměl rysy rodů *Asterochloris* a *Trebouxia*.



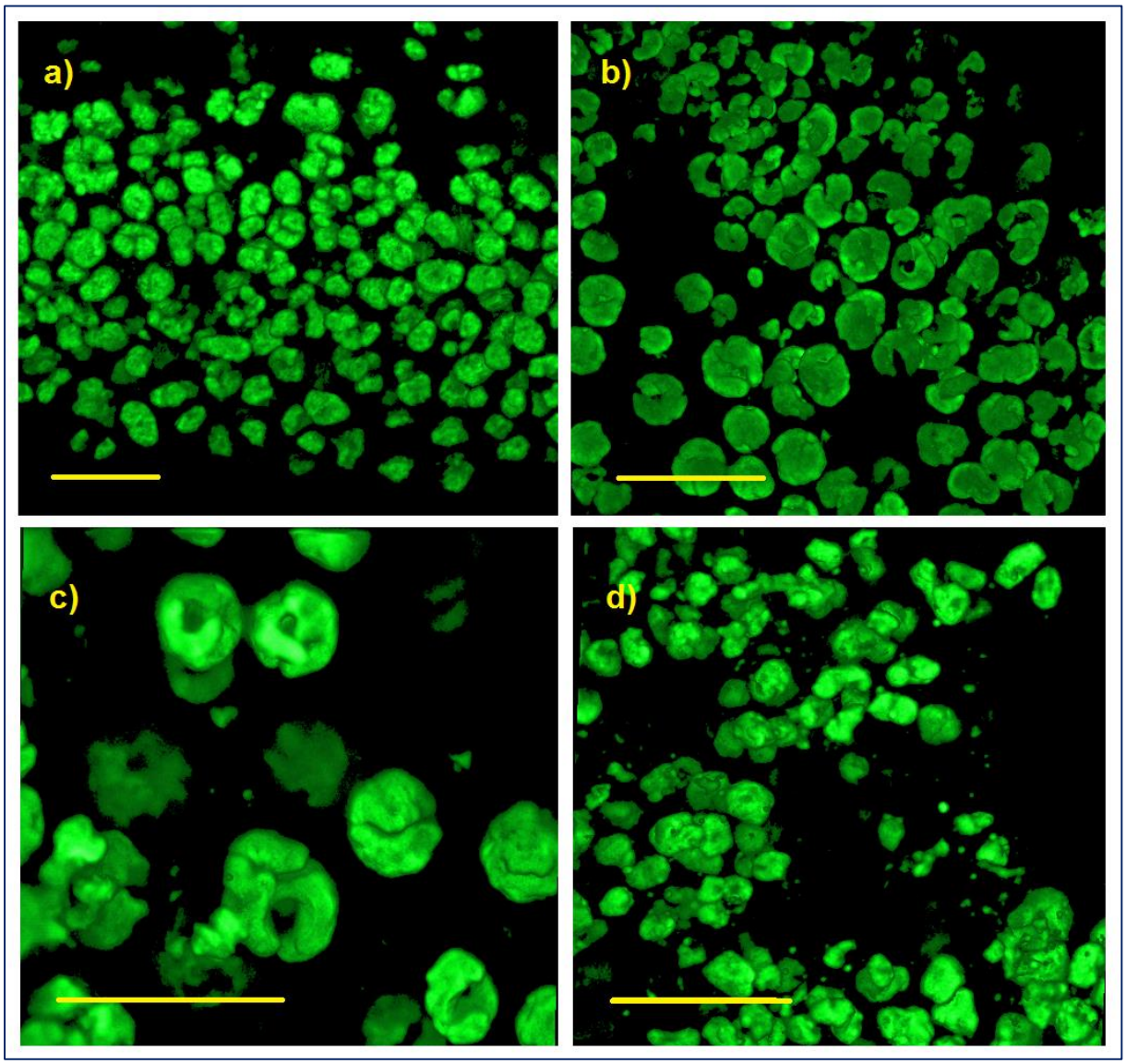
obr. 11: Řez stélkou *P. decipiens* ve fluorescenčním mikroskopu. Řasy *Myrmecia israeliensis* pozorované autofluorescencí svítí červeně.



obr. 12: Autofluorescence řas ve stélkách lišejníku: a) *Myrmecia israeliensis* v nitroplodce *Placidium* je skoro dvojnásobně větší než b) *M. biatorellae* v saxikolní stroupce *Psora testacea*. Vyznačené měřítko má 20 µm.

5.1.3. Konfokální mikroskopie

Pro úplnost uvádím také fotky vyfocené pomocí konfokálního mikroskopu (obr. 13).



obr. 13: Průřez stélkou lišejníku *Psora decipiens* s řasou *M. israeliensis* (a, b, c) a lišejníku *Psora testacea* s řasou *M. biatorellae* (d). Na fotce s menším zvětšením je vidět jednotná morfologie plastidů (a). S větším přiblížením je zřetelný parietální lalokovitý chloroplast s hladkým povrchem *M. israeliensis* (c). Vyznačené měřítko má 20 µm.

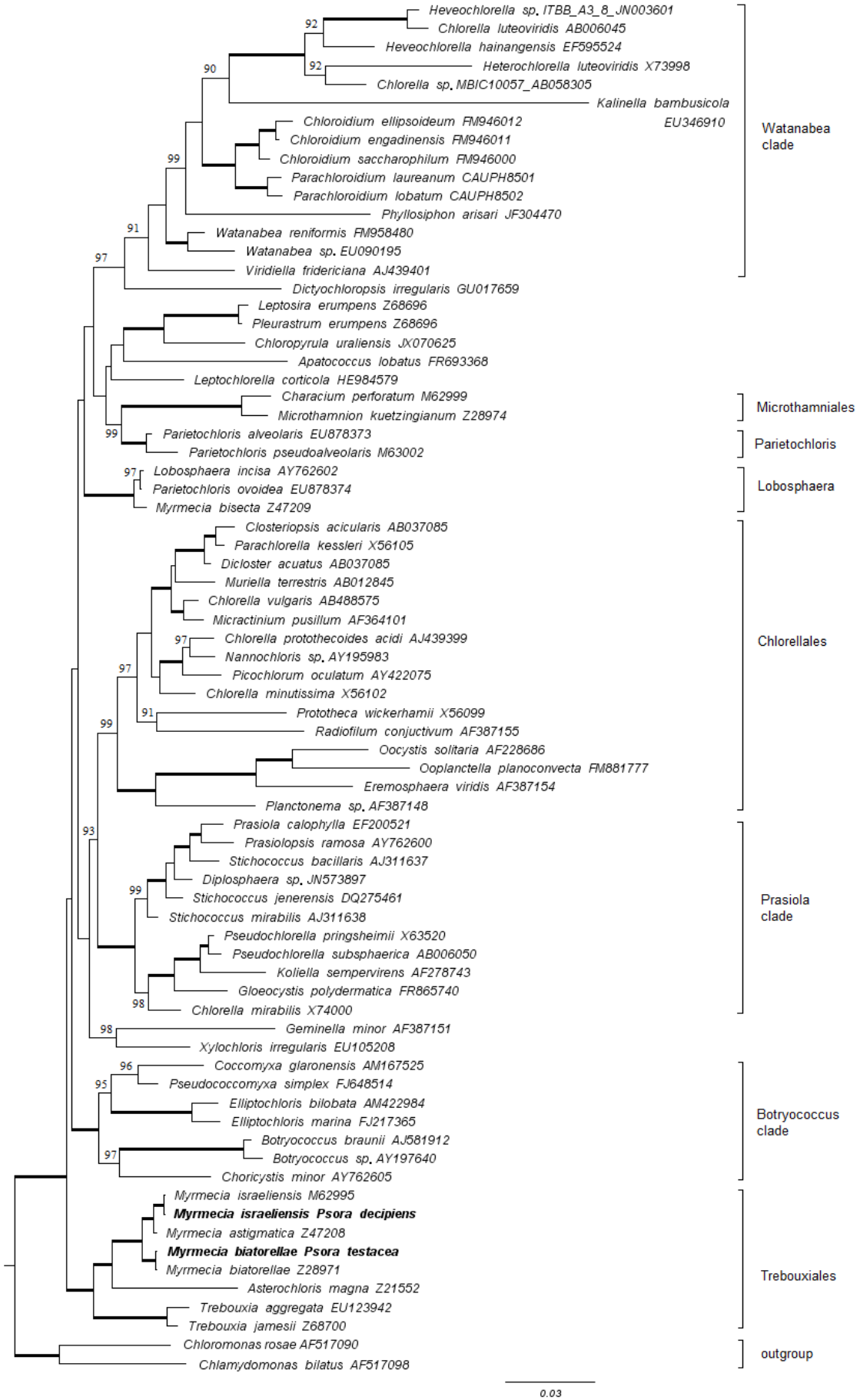
5.2. Fylogenetické analýzy

Topologie podpořených linií v analýzách 18S rRNA i ITS rDNA vyšla pomocí programů MrBayes 3.2.2 (Ronquist et al. 2012) i MEGA7 (Kumar et al. 2016) stejně.

5.2.1. 18S rDNA

Analýza malé ribosomální podjednotky zobrazuje sekvence řas získaných z lišejníků *Psora* a *Placidium* v rámci známých zástupců třídy Trebouxiophyceae. Alignment byl dlouhý 1 758 bází a obsahoval celkem 81 unikátních sekvencí, jak vlastních, tak stažených z GenBanku.

Fylogenetická analýza 18S rDNA jasně potvrdila identitu zkoumaných fotobiontů a přiřadila je k druhům *Myrmecia israeliensis* a *M. biatorellae* (obr. 14)



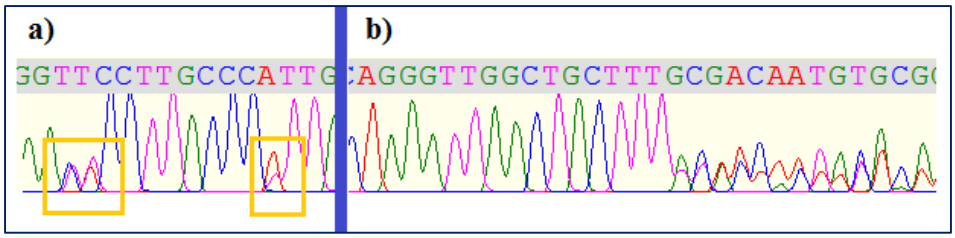
obr.14: Fylogenetický strom vybraných zástupců v třídě Trebouxiophyceae (Chlorophyta) založený na 18S rDNA. Tučně jsou vyznačené sekvence zástupců fotobiontů *Myrmecia israeliensis* a *M. biatorellae* získaných ze stélek zkoumaných lišejníků. Jako outgroup byly vybrány sekvence z třídy Chlorophyceae. Číselně jsou zobrazeny bayesiánské posteriorní pravděpodobnosti (BPP) větší než 95 %. Silně vyznačené větve mají 100% BPP.

5.2.2. ITS rDNA

Analýza založená na ITS rDNA markeru byla důležitá zejména kvůli srovnání s ostatními studiemi, které pracují s fotobionty lišejníků. Ke konstrukci fylogenetického stromu jsem použila sekvence získané z řasových kultur, přímo ze stélek lišejníků, tak i z klonování.

Ruprecht et al. (2014) přinesli podezření, že i v jedné stélce *Psora decipiens* se vyskytuje více rodů řas. V této práci jsem přistoupila k metodě klonování DNA ze stélek lišejníků, abych zvýšila pravděpodobnost nasekvenování všech řas a vyhnula se tak situaci, kdy PCR naamplifuje pouze jednoho a nejčastějšího fotobionta. Ke zjištění reálné diverzity by byla nejvhodnější NGS (Next generation sequencing), ale klonování s málo specifickým primerem je dostupnější a uspokojující variantou.

Navíc některé sekvence získané z DNA stélek a někdy i kultur byly přes všechnu snahu omezit kontaminace nečitelné, což naznačovalo, že se ve vzorku opravdu vyskytuje více variant ITS/ genotypů (obr. 15).



obr. 15: Příklad problematických sekvencí zobrazených v programu SeqAssem ver. 09/2004 (Hepperle 2004): a) žlutě vyznačené nečitelné báze, tzv. doublepeak; b) indel a posunutí sekvence.

Fylogenetický strom ITS rDNA jsem vytvořila ze 141 vlastních sekvencí, počet a způsob jejich získání je shrnut v následující tabulce (tab. 5). Celkový alignment byl o délce 750 bazí.

Bohužel v GenBanku nejsou žádné ITS rDNA řas *Myrmecia* a sekvence *Trebouxia* a *Asterochloris* jsou příliš odlišné, aby byly vhodné ke srovnání.

lišejník	**počet získaných sekvencí**		
	z řasové kultury	**ze stélky**	**z klonování**
Placidium spp.	3	8	22
Psora decipiens	20	11	68
Psora globifera	-	1	-
Psora himalayana	-	1	-
Psora rubiformis	-	1	-
Psora testacea	-	5	-
Psora vallesiaca	-	1	-
celkem	23	28	90

tab. 5: Způsob získaných sekvencí využitých ve fylogenetických stromech pro ITS rDNA.

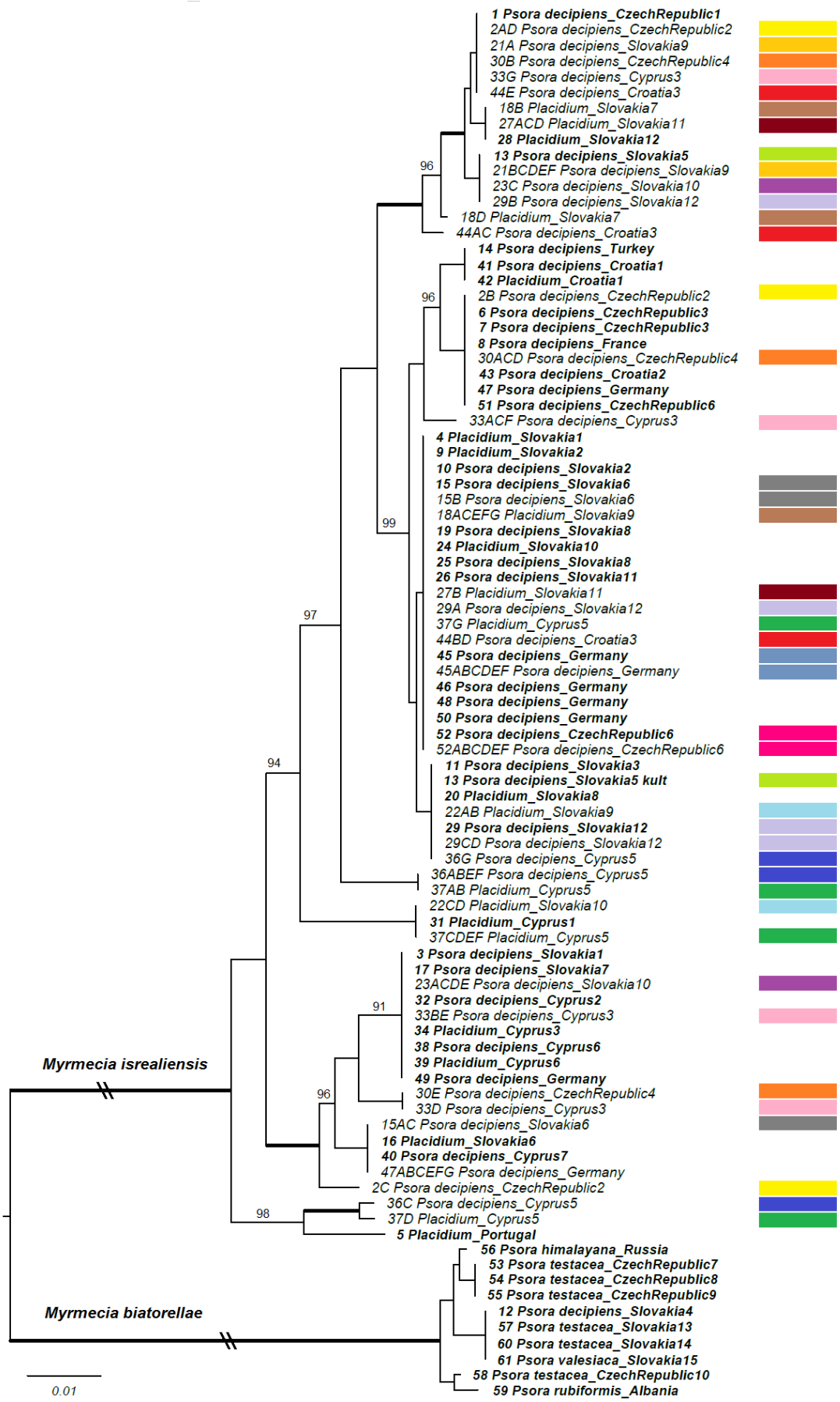
V jedné stélce se může vyskytovat i několik genotypů řasy. Při porovnání sekvencí získaných z kultury a přímo ze stélky jsem např. u lišejníku č. 13 získala různé genotypy. Klonování vzorků potvrdilo, že je tato situace u lišejníků s fotobiontem *M. isrealiensis* běžná. Sekvence řas získané z jednoho lišejníku jsou označeny stejným číslem a zvýrazněny barevným spektrem (obr. 16). Každá sekvence získaná klonováním je navíc popsána písmenem (např. označení vzorku 2AB *Psora decipiens*_CzechRepublic2 znamená, že dvě identické sekvence řasy získané klonováním pochází z lišejníku *Psora decipiens* sebraném na lokalitě CzechRepublic2) .

Data poukazují na vysokou vnitrodruhovou variabilitu druhu *M. israeliensis* - mezi vzorky z 61 lišejníků jsem našla 24 unikátních sekvencí. Původ řasy, tedy jestli pochází z lišejníku *P. decipiens* a *Placidium* sp., nijak neodráží její identitu.

Abychom vyloučili přítomnost intragenomové variability kopií ITS rDNA, byly zaklonovány kolonie narostlé z jedné buňky (vzorky č. 44, 47 a 52). Bez tohoto pokusu bychom mohli váhat, jestli není naamplifikovaná a zjištěná pouze ta nejčastější varianta ITS jedné řasy. Všechny opakování z kolonie z jediné řasy však měly identickou sekvenci, a proto si můžeme být jistí, že *M. israeliensis* není intragenomicky variabilní, a obsahuje pouze jednu kopii ITS rDNA.

Druhou hlavní větev fylogenetického stromu tvoří jasně vymezená linie *M. biatorellae,* která tvoří asociace s dalšími druhy rodu *Psora*. *M. biatorellae* byla nalezena pouze v jediném vzorku *P. decipiens* (č. 12).

Po vyznačení lokalit, odkud pochází jednotlivé vzorky, nevidíme žádnou zákonitost mezi jednotlivými genotypy a jejich geografickým pozadím, která by zobrazenou topologii vysvětlila.



obr. 16: Fylogenetický strom založený na ITS rDNA fotobiontů zkoumaných lišejníků. Sekvence řas získané z jedné stélky jsou uvedené pod jedním číslem a označené stejnou barvou. Tučně zobrazené jsou sekvence získané přímo z lišejníku nebo kultury. Číselně jsou zobrazeny posteriorní pravděpodobnosti větší než 90 %. Silně vyznačené větve mají 100% bayesiánskou posteriorní pravděpodobnost.

6. DISKUZE

6.1. Genetická variabilita fotobiontů v lišejníku *Psora decipiens*

Pouze mikroskopickým pozorováním řas přímo ve stélce lišejníku kombinovaným s molekulárními metodami můžeme s jistotou určit pravé fotobionty. Nasekvenováním jaderného ITS markeru, který je často používán pro identifikaci fotobiontů a zároveň díky fluorescenční a konfokální mikroskopii řas přímo ve stélkách je možné spolehlivě determinovat fotobionty vybraných lišejníků a eliminovat chybné určení způsobené kontaminací volně žijících řas z okolí.

Zkoumané lišejníkové položky se ukázaly být ve svém výběru fotobionta specifické. Všechny fotobionty lišejníků *Psora decipiens* a *Placidium squamulosum, Pl. rufescens* a *Placidium* sp. jsem zařadila do systému jako *Myrmecia israeliensis*. Fotobionty *P. decipiens* popsali na základě 26S rDNA a *rbcL* jako *Myrmecia israeliensis* ale i *M. biatorellae* už Williams et al. (2017). Obě práce (tato a Williams et al. 2017) dokládají jasně menší diverzitu řas ve stélkách *Psora decipiens* než Ruprecht et al. (2014).

Fotobionty nitroplodky *Placidium squamulosum* v rámci rodiny Verrucariaceae určili pomocí *rbcL* a SSU rRNA již dříve Thüs et al. (2011) také s výsledkem *M. israeliensis*.

Ověřovala jsem také fotobionty některých sesterských druhů lišejníků *Psora decipiens* jako je *P. testacea, P. globifera, P. valesiaca, P. himalayana*. V těchto položkách jsem našla řasu *Myrmecia biatorellae*. Stejně tak Geitler (1963) označil fotobionta *P. globifera* jako *M. biatorellae*.

Culberson et al. (1985) podotkli, že řasa by mohla ovlivňovat chemotyp lišejníku. Avšak fotobiont *M. biatorellae* na typ sekundárních metabolitů u různých lišejníků rodu *Psora* zřejmě nebude mít vliv. *P. testacea, P. globifera, P. valesiaca* i *P. himalayana* obsahují různé sekundární metabolity (viz kap. *Lišejníky rodu Psora.*), ale pouze jednu linii řasy. Podobně Blaha et al. (2006) nepotvrdili korelaci mezi chemotypem a linií fotobionta *Trebouxia* v misničce *Lecanora rupicola*

Lišejníky *Psora* s *M. biatorellae* rostou všechny saxikolně, zatímco *P. decipien*s s *M. israeliensis* je terikolní. Z toho lze vyvozovat, že *Psora decipiens* vyskytující se v biologických půdních krustách potřebuje jiný druh fotobionta než její příbuzní okupující jiné substráty, nejčastěji vápencové skály a kameny. Překvapivě jsem objevila výjimku, kdy položka *P. decipiens* z vysokých hor (vzorek 12) s jistotou obsahovala jeden genotyp *M. biatorellae*. Předpokládejme, že lokální společenstvo řas *M. israeliensis* neobsahuje kvůli nepříznivým podmínkám hor, kde je v porovnání s ostatními xerotermními lokalitami chladno a často deštivo. *P. decipiens* se v tomto případě dokázala přizpůsobit a růst s jindy neoptimální řasou *M. biatorellae.*

Můžeme tedy formulovat hypotézu, že *M. israeliensis* preferenčně asociuje s lišejníky na biologických půdních krustách, zatímco *M. biatorellae* je typická pro lišejníky rostoucí na kameni.

Takovou hypotézu by podporovaly i informace o terikolním lišejníku *Psora saviczii* rostoucím na biologických půdních krustách, u kterého byla zjištěna řasa *M. israeliensis* (Moya et al. in prep).

Hypotéza substrátové specifity lichenizovaného rodu *Myrmecia* formulovaná pro lišejníky Psoraceae zřejmě neplatí pro rod *Placidium* a *Heteroplacidium* – oba jsou squamulózní z jedné linie Verrucariaceae. V této práci sice mají položky *Placidium* sp. rostoucí na biologických půdních krustách vždy *M. israeliensis*, ale zástupci zkoumaní v práci Thüs et al. (2011) mají fotobionta *Myrmecia israeliensis* nebo *M. biatorellae* nezávisle na typu substrátu (tab. 6). Také např. Flechtner et al (2008) uvádí, že *M. biatorellae* se nachází v biologických půdních krustách. Spíše než druh rodu *Myrmecia* bude mykobiont ovlivňovat substrátovou specifitu lišejníků *Psora*.

lišejníková položka	**fotobiont**	**očekávaný substrát podle druhu fotobionta**	**reálný substrát**
Heteroplacidium contumescens	*M. israeliensis*	půda	půda
Heteroplacidium imbricatum	*M. israeliensis*	půda	kámen
Placidium arboreum	*M. biatorellae*	kámen	kmen stromu
Placidium lachneum	*M. biatorellae*	kámen	půda
Placidium squamulosum	*M. israeliensis*	půda	půda
Placidium umbrinum	*M. israeliensis*	půda	půda

tab. 6: Porovnání reálného typu substrátu, na kterém rostli zkoumaní zástupci třídy Verrucariaceae ve studii Thüs et al. (2011) a substrátu, kde bysme mohli druh lišejníku očekávat na základě hypotézy formulované pro substrátovou specifitu fotobiontů lišejníků rodu *Psora*. Červeně obarvené položky hypotéze odporují.

Vysoká heterogenita genotypů řas ve stélkách *P. decipiens* a *Placidium* podporuje hypotézu navrhnutou studiemi Ekman (2001), Wornik a Grube (2010), že korovité/krustózní lišejníky jsou schopní měnit fotobionty častěji než ty s keříčkovitou stélkou.

M. israeliensis je běžnou půdní řasou (Friedl 1995), a proto jsou lišejníky *Psora decipien*s a *Placidium* rozšíření kosmopolitně. Více nalezených genotypů jednoho druhu odpovídá hypotéze, že lišejníky s širokou ekologickou amplitudou jsou méně specifičtí (Wornik & Grube 2010, Muggia et al. 2013). Zároveň se *P. decipiens* v České republice vyskytuje pouze na několika místech. Realizovanou niku lišejníku jako celku určují ekologické nároky fotobionta i mykobionta.

Celý rod *Myrmecia* podobně jako sinice preferuje vyšší pH nezávisle na dalších chemických nebo fyzikálních vlastnostech půdy (Flechtner et al. 1998). Lišejník *Psora decipiens* se proto vyskytuje na vápenitých nebo bazických substrátech.

*Psora decipien*s a *Placidium* jsou terikolní lišejníky se squamulózní stélkou a moje výsledky ukazují, že asociují pouze s jedním druhem řasy, přestože mají ve své stélce více jeho genotypů. Velkou

genetickou heterogenitu vysvětluje buď vysoká mutační rychlost ITS rDNA řasy *Myrmecia* v lišejníku a časté relichenizační události. Jak *Psora,* tak *Placidium* se rozmnožují pouze sexuálně, tudíž se očekává horizontální přenos řas a větší diverzita fotobiontů. Hyfy mykobionta, ze kterých vyroste jedna squamula, můžou chytit a asociovat s odlišnými genotypy řas.

Známe i jiné případy, kdy se vyskytuje více genotypů řas v lišejníku najednou. Dva genotypy *Trebouxia* se nacházely v jedné stélce lišejníku *Tephromela atra* rostoucím ve středomoří (Muggia et al. 2008), v pupkovce *Umbilicaria* na Antarktidě (Romeike et al. 2002), v epifytickém větvičníku *Evernia mesomorpha* (Piercey-Normore 2006) i v málo selektivních lišejnících *Rinodina atrocinerea, R. tunicata* a *Rinodinella controversa* (Physciaceae) Helms et al. (2001). Tyto lišejníky jsou zřejmě tripartitní nebo se druhá linie dostala do vzorku prorůstáním a spojením s jiným lišejníkem, podobně jak popisují Ohmura et al. (2006). Dva druhy *Trebouxia* byly nalezeny v průběhu života ve džbánovce *Diploschistes muscorum* (Friedl 1987). Podobně více genotypů *Nostoc* bylo ve stélce málo selektivních důlkatců *Lobaria pulmonaria* (Myllys et al. 2007). Del Campo et al. (2013) zachytili, že ve stélkách epifytů *Ramalina farinacea* koexistují dvě linie *Trebouxia*, které se liší ve své fyziologii. Modelováním sekundární struktury ITS2 RNA ukázali citlivost na zvýšenou teplotu u rozšířenější linie *T1*, zatímco druhá linie *T9* byla schopna ustát relativně vysoké teploty. Autoři navrhují model, kdy před ekologickou diverzifikací lišejník prochází výhodnou fází s více genotypy fotobionta.

Konečně Park et al. (2015) odhalili pomocí NGS pyrosekvenování více řasových genotypů v každém zkoumaném antarktickém lišejníku.

Při zpracovávání vzorků v této práci jsem používala malé množství původního materiálu, a přesto se mi podařilo nasekvenovat spolehlivá data většinou až po kultivaci řas nebo pomocí klonování. Proto se domnívám, že v jedné stélce je zcela běžně více genotypů řasy *M. israeliensis*, která je geneticky variabilnější než *M. biatorellae.*

Stélku *P. decipiens* zcela běžně tvoří několik genotypů fotobiontů a možná nemá smysl uvažovat ani o blízce rostoucích squamulách lišejníku jako o jedinci, spíš popisujeme fond fotobiontů asociující s mykobiontem *Psora,* který se vyskytuje na jedné lokalitě. Samozřejmě souhlasím s výše uvedenými studiemi, které navrhují, že schopnost asociovat s různými genotypy a měnit fotobionty je výhodnou adaptací lišejníku na měnící se přírodní podmínky. Možná více řas v jedné stélce lišejníku běžnější, než jsme si dosud mysleli a konečně odhadujeme reálnou diverzitu fotobiontů v lišejníku.

6.2. Interakce ve společenstvu *Toninio-Psoretum decipientis*

Toninio-Psoretum decipientis je součástí biologických půdních krust („biological soil crust“, BCS), složitého ekosystému půdního povrchu těsně provázaného interakcemi s živou složkou, jako jsou například mechy, lišejníky, řasy, sinice, houby, protista ale i mikro a makrofauna (Belnap et al. 2001). Tyto organismy schopné tolerovat extrémní podmínky jsou často ve stejném složení na celém světě, přestože se jednotlivé lokality liší klimatem i typem stanoviště. Jsou vzájemně propojeny, a proto jsou

ideální ke zkoumání různých interakcí a existenci lišejníkových gild, ve kterých i odlišné taxony ve společném prostředí můžou sdílet jednoho fotobionta (viz kap. *Lišejníkové gildy*).

Právě *Psora decipiens* patří mezi druhy lišejníků rostoucí snad na všech kontinentech společně s lišejníky *Microcoleus vaginatus, Collema tenax, Collema coccophorum* a *Placidium squamulosum* (Belnap 2003).

Stanoviště upravuje například cyanolišejník *Collema*, který může být využíván dalšími druhy jako potencionální zdroj dusíku a zadržované vody (Beck et al. 2002). Vhodným substrátem pro lišejníky jsou mechové polštáře, které vodu zadržují a ochraňují mladé stélky před vysokou intenzitou světla a erozí. Pro lišejník *Toninia* je výhodné mít squamuly ponořené v mechu více než je schopná blýskavka *Fulgensia* se svojí celistvou stélkou (Ott et al. 1995). Výhodná životní strategie blýskavky je kolonizace míst s rostoucími lišejníky *Toninia*. *Fulgensia* umí přijmout fotobionta lišejníku *Toninia*, následně jeho stélku přerůstat a dále aktivně neparazitovat, jen používat jako vhodný substrát (Ott et al. 1995, Beck et al. 2002). Případ počátečního parazitického růstu, kdy askospory *Fulgensia bracteata* vnikají do stélky *Toninia sedifolia* (= *T. caeruleonigricans)* podrobně popsali a indikovali Ott et al. (1995), a to jak vizuálně, tak chemicky přítomností sekundárních metabolitů parietinu nebo emodinu ve stélce *T. sedifolia*. Podobně Beck et al. (2002) zjistili provázanost mezi vysoce selektivní *Fulgensia fulgida* a *Toninia sedifolia* a určili jejich společného fotobionta jako *Trebouxia asymetrica*. U pouze sexuálně se šířící *F. fulgida* může *T. sedifolia* být významným zdrojem vhodných řas nezbytných pro lichenizaci ve svém životním cyklu. Jiné druhy blýskavky jako *F. bracteata* se rozmnožují taky vegetativně a nemusely by parazitovat, protože jsou schopné si vlastního fotobionta přinést s sebou.

Řasa *Trebouxia asymetrica* je nespíš hojná na lokalitách studovaných Beckem et al. (2002), protože ji kromě lišejníků *Toninia* a *Fulgensia* měl také *Diploschistes diacapsis.* Autoři však nepopsali žádnou větší interakci mezi těmito třemi lišejníky. Džbánovka *Diploschistes* je však známá svým parazitním chováním. *D. muscorum* zpočátku parazituje na různých druzích dutohlávky *Cladonia* a zatímco se stélka dutohlávky postupně rozpadá, lišejník *D. muscorum* se osamostatňuje, je schopný přerůstat okolní lišejníky nebo mechy a své fotobionty v průběhu životního cyklu vyměnit (Friedl 1987).

Schaper a Ott (2003) navíc podrobili blýskavku *F. bracteata* testům, kdy ji zkoušeli vypěstovat s fotobionty běžně se vyskytujícími na místech společenstva *Toninio- Psoretum decipientis*. *F.bracteata* byla schopná vytvářet primární stadia se všemi testovanými fotobionty, ale způsob a četnost kontaktu mezi bionty se lišil a někteří by zjevně nebyli schopni vytvořit plnohodnotnou stélku.

Mezi lišejníky *Fulgensia* a *P. decipiens* nenastává hlubší parazitický kontakt. Přestože Ruprecht et al. (2014) určují fotobionty *P. decipiens* jako *Asterochloris* sp., *Trebouxia* sp. nebo *Chlorophyta* spp., které by mohly sloužit jako rozmanitý zdroj fotobiontů pro *Fulgensia* a další lišejníky, já jsem nepozorovala viditelný parazitismus, ani přerůstání *P. decipiens* blýskavkou *Fulgensia.* Toto tvrzení souhlasí s popisem Otta et al. (1995), kteří nezjistili žádné sekundární metabolity vylučované blýskavkou *F. bracteata*, i když *P. decipiens* přerůstala. Také Schaper a Ott (2003) při syntéze lišejníku popisují velmi pomalý a celkem neúspěšný kontakt mykobionta *F. bracteata* a fotobionta izolovaného

z *P. decipiens* nebo *Lecidea lurida* (= *Psora lurida*) *in vitro*. Pozorovali, že hyfy blýskavky *F. bracteata* penetrovaly a zřejmě parazitovaly na buňkách fotobionta *L. lurida*.

P. decipiens se často vyskytuje v těsné blízkosti lišejníků *Placidium*, někdy jsou jejich squamuly promíchané nebo spíše jen okrajově rostou přes sebe, přesto jsem nepozorovala vysloveně parazitický kontakt, který je běžný mezi dvojicí *Fulgensia* - *Toninia*.

Placidium a *P. decipiens* mají stejného fotobionta *M. israeliensis*, a proto je velmi pravděpodobné, že si můžou navzájem sloužit jako případný nový zdroj fotobiontů, který oba rody jako striktně sexuálně se rozmnožující potřebují nutně najít.

Placidium je běžnější a nacházela jsem ho častěji než *P. decipiens*. Už z toho lze usuzovat, že řasa *M. israeliensis* má mnohem větší ekologickou niku než mykobiont, který může za omezené rozšíření lišejníku. Mykobiont *P. decipiens* tedy může ve svém mládí získávat fotobionty od na nitroplodky *Placidium*, ale spíše je rekrutuje z volně žijících řas, protože rod *Myrmecia* roste běžně na bazických substrátech (Flechtner et al. 1998), které jsou pro společenstvo *Toninio-Psoretum decipientis* typické.

Podobný vztah jako mají lišejníky *Placidium* a *Psora decipiens* je nejspíš i mezi *P. decipiens* a *Claviscidium* sp. (Moya et al. in prep.).

Následující tabulka (tab. 7) přiřazuje fotobionty k lišejníkům, které bývají součástí společenství *Toninio-Psoretum decipientis*.

lišejník	**fotobiont**	**studie**
Collema	*Nostoc*	Oksanen et al. (2002)
Endocarpon	*Diplosphaera*	Thüs et al. (2011)
Squamarina	*Asterochloris*	Beck et al. (2002), Voytsekhovich & Beck (2016)
Cladonia	*Asterochloris*	Piercey-Normore a DePriest (2001)
Diploschistes	*Trebouxia*	Friedl (1987)
Fulgensia	*Trebouxia*	Beck et al. (2002), Ott et al. (1995)
Toninia	*Trebouxia*	Beck et al. (2002), Ott et al. (1995)
Claviscidium	*Myrmecia*	Moya et al. (in prep.)
Placidium	*Myrmecia*	tato práce
Psora	*Myrmecia*	tato práce

tab. 7: Souhrnný přehled terikolních lišejníkových rodů, které bývají součástí společenstva *Toninio-Psoretum decipientis*, společně s jejich fotobionty. Stejnou barvou jsou vyznačeny lišejníky, u nichž byla zaznamenaná nějaká interakce.

6.3. Řasy rodu *Myrmecia*

Myrmecia Printz (1921) spadá do třídy *Trebouxiophyceae* společně s rody *Trebouxia* Puymaly (1924), *Asterochloris* Tschermak-Woess (1980), *Coccomyxa* Schmidle (1901). Tyto řasy jsou nejčastějšími fykobionty lišejníků (Friedl & Büdel 2008).

Z tohoto rodu byla poprvé popsána aeroterestrická řasa *Myrmecia globosa* (Printz 1921). Řasa má charakteristické znaky rodu - kulovité, mírně oválné až hruškovité buňky, je kokální, někdy roste ve shlucích. Obsahuje parietální chloroplast s hladkým povrchem bez pyrenoidu, který je rozdělen do dvou až čtyř laloků. Někdy je chloroplast popisovaný jako šálkovitý, hrncovitý nebo dokonce miskovitý. Buněčná stěna bývá na jednom místě ztloustlá. Rozmnožuje se zoosporami, autosporami i aplanosporami.

Přestože jsem zjistila vysokou genetickou variabilitu ITS u *M. israeliensis*, tak jsem nepozorovala žádné měnící se morfologické znaky. Pozorovaná stadia životního cyklu odpovídají tomu, co již podrobně popisuje Řeháková (1968) (tab. 8).

Autospory se tvoří v mateřské buňce v počtu 4-16, jsou velké 7,5-15,5 µm kulovité nebo zaoblené a obsahují jeden nástěnný chloroplast ve tvaru dvou vrchlíků spojených můstkem. Po prasknutí mateřské buněčné stěny se uvolňují samostatně, ale také zůstávají ve shlucích.

Zoospory se formují v počtu 16-32-64 a jsou variabilního tvaru, menší než autospory, 2,5-6,5 x 1,5-4 µm. Mají jeden nástěnný chloroplast bez stigmatu, pulsující vakuolu a dva bičíky delší než jejich vlastní buňka. Po prasknutí mateřské buněčné stěny v místě apikální ztlustliny se uvolňují v jemném slizovém obalu, který se poté rozplyne.

Aplanospory se vyvíjí v počtu 16-32-64 s jedním nástěnným chloroplastem v jedné mateřské buňce. Jednotlivé aplanospory jsou různé velikosti - od 2,5 do 6,5 µm. Od zoospory se liší tím, že nemají bičíky ani pulsující vakuolu a při uvolnění nejsou ve slizovém obalu. Na rozdíl od autospor netvoří kolonie, ale rostou samostatně.

tab. 8: Životní cyklus rodu Myrmecia (Řeháková 1968, upraveno).

Dříve byl rod *Myrmecia* považován za příbuzný rodu *Dictyochloropsis*, do kterého byl později zahrnut častý fotobiont *M. reticulata* Tsch.-Woess (Friedl 1995). Postupně byl rod upravován a dnes zahrnuje jedenáct intraspecifických druhových jmen, z nichž devět je obecně akceptováno – patří mezi ně *Myrmecia aquatica* G. M. Smith, *Myrmecia astigmatica* Vinatzer, *Myrmecia biatorellae* J. B. Petersen, *Myrmecia bisecta* Reisigl, *Myrmecia globosa* Printz, *Myrmecia irregularis* (J. B. Petersen) Ettl & Gärtner, *Myrmecia israeliensis* (S. Chantanachat & H. Bold) T. Friedl, *Myrmecia macronucleata*

(Deason) V. M. Andreeva, *Myrmecia pyriformis* J. B. Petersen (Guiry & Guiry 2014). Rod nebyl v posledních letech již podrobněji studován pomocí molekulárních metod.

Rod *Myrmecia* se vyskytuje jako volně žijící (Geitler 1962, Friedl & Bhattacharya 2001, Fučíková et al. 2014), nalezneme ho rostoucí epifyticky na borkách stromů, terestricky a pro zajímavost také v srsti lenochodů žijících v latinské Americe (Suutari et al. 2010). *Myrmecia* je kosmopolitní, existují záznamy o jejím výskytu mimo jiné jak v Bangladéši (Islam et al. 2001), tak i na Antarktidě (Worland & Lukešová 2000). Bývá součástí biologických půdních krust. Častou terikolní řasou je *M. astigmatica* (Flechtner et al. 1998) a *M. biatorellae* (Flechtner et al. 2008). Také *M. israeliensis* byla prvně popsána jako terestrická *Friedmannia israeliensis* v Negevské poušti (Chantanachat & Bold 1962).

Poprvé zjistily Tschermak-Woess a Plessl (1948) lichenizaci u *M. pyriformis*. Z rodu *Myrmecia* jsou schopné lichenizovat také řasy *M. biatorellae* (tab. 9) a *M. israeliensis* (Thüs et al. 2011, Moya et al. in prep.).

lišejník s řasou *M. biatorellae*/ *Myrmecia* sp.	**návrh jiného fotobionta**	**lišejník**
Catapyreneum rufescens (Tschermak-Woess 1988)	*Diplosphaera*	*Catapyreneum daedaleum, C. cinereum* (Thüs et al. 2011)
Dermatocarpon hepaticum, D. tuckermanii, D. velebiticum (Tschermak-Woess 1988)	*Diplosphaera*	*Dermatocarpon luridum, D. miniatum* (Thüs et al. 2011, Fontaine et al. 2012)
Lecidea berengeriana (Tschermak-Woess 1988)	*Trebouxia*	*Lecidea cancriformis* (Ruprecht et al. 2012) *L. silacea, L. lapicida* (Beck 1999)
Baeomyces rufus (Honegger & Brunner 1981)	*Elliptochloris*	*Baeomyces rufus* (Trembley et al. 2002)
Sarcogyne privigna var calcicola, Polysporina simplex (Tschermak-Woess 1988)	*Trebouxia*	*Sarcogyne privigna* (Hestmark et al. 2016)
Pannaria hypnorum (Tschermak-Woess 1988) *P. leproloma* (Elvebakk & Fritt-Rasmussen 2007)		
Verrucaria submersella/submersa (Tschermak-Woess 1988)		
Lobaria linita (Tschermak-Woess 1988, Cordeiro et al. 2013)		

tab. 9: Přehled lišejníků, u kterých byla někdy zjištěná řasa *M. biatorellae*. Ve zlatě označených řádcích jsou lišejníky, ve kterých byla později nalezená jiná řasa (viz pravá část tabulky) - tyto lišejníkové rody zřejmě s *M. biatorellae* neasociují. V tabulce nejsou zaznamenány lišejníky řešené v této práci (*Psora, Placidium*).

6.4. Optimální metodika pro studium fotobiontů

Cílem práce není podat kompletní přehled všech možných moderních metod používaných na studie týkající se lišejníků a jeho složek, ale zamyslet se nad klíčovými momenty, které jsou pro výzkum fotobiontů zásadní.

Tato kapitola rozvádí následující zásadní body pro správné určení fotobiontů, díky kterým v této práci úspěšně řeším kontroverzní otázku řasové diverzity v stroupce *P. decipiens*

a) určení fotobionta přímo ve stélce lišejníku - je nutné si uvědomit, že morfologie fotobionta může být symbiózou značně pozměněna, proto může být vhodná kultivace řas
b) zařazení fotobionta do systému pomocí DNA informace (příp. proteinů) – v případě použití sekvenace je nutné užití správných primerů atd.

Vždycky musíme mít na paměti, že se při determinaci omezujeme pouze na určitou část lišejníku, a přestože stélka na první pohled vypadá homogenně, může být tvořena větším počtem biontů.

6.4.1. Odlišnosti lichenizovaných a volně žijících řas

Tradiční morfologické určování fotobiontů je poněkud problematické. Mykobiont chrání svého partnera před UV zářením, vysušováním a dalšími nepříznivými podmínkami, a proto mají fotobionti ve stélkách lišejníků ve srovnání s volně žijícími řasami pozměněné některé důležité poznávací znaky (Tschermak-Woess 1995).

Změny morfologie sinic a řas při přechodu do lichenizovaného stavu jsou již dlouho známy a shrnuty v práci Bubricka (1988). U některých rodů fykobiontů je zjednodušen tvar chloroplastu (Škaloud & Peksa 2008), zvětšuje se jim průměr buňky (Ahmadjian 1973) a někteří jsou jednobuněční, přestože se jako volně žijící vyznačují větvenou vláknitou stélkou (Friedl & Büdel 2008). U řas z lišejníků s pigmentovaným kortexem byl prokázán značný pokles rychlosti fotosyntézy při vysokém osvětlení, zatímco řasy z nepigmentovaných lišejníků k němu byly tolerantnější (Showman 1972).

Donedávna vládlo přesvědčení, že fotobionti podstupují pouze vegetativní buněčné dělení a aplanosporogenezi a to méně často než v kulturách, kde navíc u některých druhů můžeme pozorovat zoosporogenezi. Poté bylo pozorováno izogamní rozmnožování s tvorbou zygoty u fotobiontů *Trebouxia* (Ahmadjian 1960) a bylo potvrzeno u rodu *Asterochloris* (Škaloud et al. 2015).

Fykobionti se od svých volně žijících příbuzných liší velikostí, počtem i rozmístěním organel jako jsou pyrenoidy, thylakoidy, strukturou chloroplastu a počtem diktyosomů (Galun 1988). Některé ultrastrukturní znaky (přítomnost škrobu, počet a pozice pyrenoglobul) jsou ovlivněny vnějšími podmínkami, například stavem vodního režimu (Ascaso et al. 1986). Průřez buňkou a popis ultrastruktury řasy *Myrmecia* sp. poskytuje Galun et al. (1970) a řasy *M. israeliensis* pak Moya et al. (in prep.).

Typický parietální dvojlaločný tvar chloroplastu jako hlavní určovací znak *M. israeliensis* zůstává i v lichenizovaném stavu zachován. Buňky *Myrmecia biatorellae* jsou znatelně menší a tvar chloroplastu již není tak nápadně dvojlaločný nebo šálkovitý.

Mezi řasou a mykobiontem musí být indukován export živin, a tak můžeme pozorovat změnu v buněčné stěně fotobiontů (Honegger & Brunner 1981), stejně jako ztrátu tvorby slizových obalů (König & Peveling 1984). Na rozdíl od kultury můžeme ve stélce pozorovat haustoria, což jsou houbová vlákna pronikající přímo do řasových buněk. Haustoria mají funkci absorpční, komunikační, strukturální a mechanickou, kdy pomáhají držet oba bionty pohromadě a organizovat lišejníkovou stélku; současně s haustorii se mohou vyskytovat také apresoria, kdy zploštělé houbové hyfy řasové buňky pouze obklopují (Sanders et al. 2004). Rod *Myrmecia* má sporopolenin ve svých buněčných stěnách, a proto ve stélce hyfy řasu obepínají, ale dovnitř nijak nepronikají (Honegger & Brunner 1981).

6.4.2. Kultivace fotobiontů *in vitro*

Determinaci řas pomocí molekulárních metod by kvůli výše popsaným morfologickým změnám při lichenizaci měla doprovázet kultivace fotobiontů (Ahmadjian 1987, Yoshimura et al. 2002). Fotobionti pěstovaní *in vitro* obnoví svoji morfologii a jsou lépe srovnatelní s volně žijícími řasami a tedy i lépe určitelní (Ahmadjian 1982). Kultivace je může mít také význam pro získání čistého referenčního vzorku (kultury z jedné buňky) důležitého například při popisu nového druhu řasy.

Ideální izolace řas ze stélky má být rychlá, snadná a získaní fotobionti by měli být bez kontaminace, nepoškození a stále fotosynteticky aktivní. Je spousta různých způsobů převedení fotobionta do kultury a jsou založeny na chemických, fyzikálních i molekulárních přístupech. Hlavní nevýhodou kultivace je její velká časová náročnost a náchylnost na houbové a bakteriální kontaminace. Izolace je dobře popsána již v "Handbook of Lichenology" (Galun 1988).

Jednou z původních metod jak získat jedinou buňku fotobionta z lišejníkového homogenátu je použití mikropipety (Waren 1918-1919). Pro další práci s kulturou je potřeba větší biomasy, a tak se tato buňka musí kultivovat, což je dost pomalé. Můžeme pěstovat i celý homogenát, ale je obtížnější se zbavit kontaminace. Jinou možností je kultivovat fragmenty stélky. Už Ahmadjian (1958) navrhuje vybrat čistou část stélky, případně ji ještě očistit a opláchnout proudem vody, pak ji rozdrtit mezi dvěma podložními sklíčky a drť kultivovat. Pro jednoduchost a nízké riziko kontaminace v porovnání s níže popsanými postupy jsem touto metodou zpracovávala své vzorky s drobnou úpravou. Fragment hlavně řasové vrstvy jsem řezala dostatečně malý, a proto ho již nebylo zapotřebí více drtit.

Jiná, zdánlivě rychlá metoda získání fotobiontů je pomocí diferenční centrifugace. Princip spočívá v nadrcení lišejníku s izotonickým pufrem v třecí misce, směs se přefiltruje přes jemnou tkaninu a zcentrifuguje. Peleta se dále zpracovává, resuspenduje se v malém množství pufru a před další centrifugací se na ni nanese roztok umožňující přesné rozdělení látky podle hustoty. Ascaso (1980) využívá roztok chloridu cesného (CsCl) nebo jodidu draselného (KI). Pérez et al. (1985) doporučují

metodu gelové filtrace, Calatayud et al. (2001) zase tzv. Percoll gradient, jenž se zakládá na roztoku koloidních částic oxidu křemičitého potažených polyvinylpyrrolidonem (PVP). Tyto metody však vyžadují velké množství lišejníku, který není epifyticky porostlý jinými řasami.

Základem pěstování v kultuře je tekuté nebo pevné médium. I zde je však potřeba mít se na pozoru. Hametner et al. (2014) prokázali, že použití odlišného kultivačního média má vliv na látkovou výměnu a morfogenezi fotobiontů Trentepohliaceae. Odlišná morfologie může vést k chybnému určení, a proto autoři doporučují používat různé druhy média. Předpokládám, že u kultur řas *Myrmecia* jsou podobné obavy zbytečné. Také vzhled narostlých makrokolonií fotobiontů na pevném médiu se mění v závislosti na kultivačních podmínkách (Ahmadjian 1967).

6.4.3. Nejčastější problémy molekulárních metod

DePriest (2004) udává jako klíčový rok 1995, od kterého se začal počet prací zabývající se fylogenetikou značně navyšovat a to především větší dostupností molekulárních metod.

Fotobionti jsou studováni především pomocí Sangerova sekvenování, ale výsledky, které nám tento postup přináší, mohou být chybné. Na snižování zjištěné diverzity se podílí malý počet vzorků, zpracování pouze části stélky, protože různé řasové genotypy zřejmě nejsou v lišejníku rozmístěny rovnoměrně a my zkoumáme jenom její část. Helms et al. (2001) popisují, že pokud použili velmi malý (jediné apothecium) vzorek, pak detekovali pouze jednu linii ze dvou, které se běžně nacházeli v lišejnících Physciaceae.

Pro úspěšné analýzy je zapotřebí DNA podrobit určitým přípravným krokům. Například před stále oblíbeným Sangerovým sekvenováním je nutné nechat zkoumaný úsek naamplifikovat polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Hlavní problém vetšiny molekulárních metod je extrakce kvalitní a čisté DNA, protože PCR reakce je často inhibována sekundárními metabolity. Samotná extrakce by proto měla obsahovat krok jejich odstranění. Tato tématika je rozpracovaná ve spoustě studií (např. Martín & Winka 2000).

Významným problémem je oddělení houbové, řasové složky DNA a kontaminací. Nutnost správného očištění povrchu lišejníku zdůrazňují Muggia et al. (2014) a ukazují velkou diverzitu řas, které se vyskytují na povrchu stélek. Abychom zabránili jakékoli vnější kontaminaci jako je půda, epifytické řasy, fragmenty okolních hub a rostlin, tak by lišejník měl být prohlédnut pod binolupou a omyt například proudem destilované vody, 1 M roztokem HCl (Armaleo & Clerc 1995) nebo 96% ethanolem (10 s), následovaným 0.5% NaOCl (2 min) a 70% ethanolem (2 min) (Arnold et al. 2009).

Pokud se chceme vyhnout naamplifikování obou hlavních symbiontů, musí izolaci předcházet jejich oddělení nebo musí být zkoumaný úsek ze směsi DNA vybraný použitím selektivních primerů. Pokud si nejsme jistí specifičností primerů – jestli je zkoumaný DNA úsek ve skutečnosti řasy nebo houby, tak můžou být výsledky mylně interpretovány. Tuto otázku řeší např. Widmer et al. (2010).

V této práci jsem se nejvíce potýkala právě s problémem, kdy primery vybírají preferenčně mykobionta. Může však nastat i situace, kdy primery budou sice specifické pro řasy, ale budou natolik selektivní, že nebudou amplifikovat všechny fotobionty ze stélky. Další odlišné sekvence řas můžou být zakryty v průběhu PCR exponenciální amplifikací té nejběžnější sekvence (Grube & Muggia 2010). Důležitá je volba primerů, které z celkové směsi DNA vyberou pouze komplementární úseky a odlišné genotypy nám zůstanou utajeny. Můžeme detekovat pouze jednoho fotobionta ve stélce a to právě kvůli neoptimálním primerům (U'Ren et al. 2014). Casano et al. (2011) stejně jako del Campo et al. (2013) popisují situaci, kdy při použití obecných nebo univerzálních primerů ze stélky vždy vyizolovali pouze jednu linii, která ve stélce převažovala, a řasu, která byla v menším množství, vyizolovali až po amplifikaci se specifickými primery.

Ruprecht et al. (2014), kteří zaznamenali přítomnost rodů *Asterochloris, Trebouxia* a/ nebo Chlorophyta spp. v *P. decipiens,* nejspíše vybrali příliš specifický řasový primer neamplifikující marker řasy *Myrmecia*. Popsali spíše kontaminace - řasy, které rostou epifyticky na povrchu lišejníku a jsou zjevně časté na místech výskytu *Toninio-Psoretum decipientis* a ze kterých si mykobiont pečlivě vybírá svého partnera.

7. ZÁVĚR

Lišejníky *Psora decipiens, Placidium squamulosum* a *Pl. rufescens* bývají součástí společenstva *Toninio – Psoretum decipientis*.

Psora decipiens a Placidium často rostou v těsné blízkosti a sdílí jediný druh fotobionta *Myrmecia israeliensis.* Je proto pravděpodobné, že si můžou navzájem sloužit jako případný zdroj fotobiontů, který oba rody jako striktně sexuálně se rozmnožující lišejníky potřebují. Nejspíše ale nové fotobionty rekrutují z volně žijících řas, protože rod *Myrmecia* běžně roste na bazických substrátech, které jsou pro společenstvo *Toninio-Psoretum decipientis* typické. Znalosti lišejníkové specifity můžou pomoci pochopení rozšíření lišejníků a jejich ekologických nároků.

Klonování odhalilo, že ačkoli lišejníky *Psora decipien*s a *Placidium* asociují pouze s jedním druhem řasy, tak mají ve své stélce více jeho genotypů. Velkou genetickou heterogenitu řas v jedné stélce vysvětluje vysoká mutační rychlost ITS rDNA řasy *Myrmecia* a časté relichenizační události, kdy lišejník v průběhu svého života kontinuálně přijímá nové fotobionty. Schopnost mykobionta *P. decipiens* vytvářet lišejníkovou symbiózu s několika řasovými genotypy může být výhodná pro život v měnících se podmínkách prostředí a také při kolonizaci nových lokalit. Nejlepší fitness lišejník dosáhne, pokud asociuje s řasou adaptovanou na lokální podmínky a přitom je udržovaná dobrá kompatibilita mezi symbionty. Různé genotypy *M. israeliensis* nalezené ve stélkách lišejníku *P. decipiens* mohou být evolučně mladými druhy nebo geneticky diferenciovanými populacemi adaptovanými na lokální podmínky.

Ostatní saxikolní lišejníky rodu *Psora (P. testacea, P. globifera, P. valesiaca, P. himalayana)* asociují s řasou *M. biatorellae*. Zdá se, že *M. israeliensis* preferenčně asociuje s lišejníky rodu *Psora* z biologických půdních krust, zatímco *M. biatorellae* je typická pro rod *Psora* rostoucí na kameni. Spíše však než druh rodu *Myrmecia* bude mykobiont ovlivňovat substrátovou specifitu lišejníků *Psora*. Realizovanou niku lišejníku jako celku určují ekologické nároky fotobionta i mykobionta.

V této práci využívám kombinaci mikroskopických a molekulárních metod k prozkoumání řasové diverzity lišejníku *P. decipiens.* Část získaných dat byla použita do publikace sepsané s kolegy ve Valencii (viz Příloha 2), která určuje řasu *M. israeliensis*, neobvyklého fotobionta asociujícího s terikolními squamulózními lišejníky.

Determinace řasy se však vždy omezuje na určitou část lišejníku a je možné, že teprve sofistikovanější molekulární metody (jako Next Generation Sequencing) nám odhalí více dosud přehlížených případů, kdy se v jedné stélce lišejníku nachází více genotypů, linií nebo druhů. Nové informace by měly být interpretovány s rozmyslem a nejlépe podpořeny pozorováním řasy přímo ve stélce, aby byla vyloučena možnost kontaminace.

8. POUŽITÁ LITERATURA

Ahmadjian, V. (1958). A guide for the identification of algae occurring as lichen symbionts. *Botaniska Notiser*,111,632-644.

Ahmadjian, V. (1960). Some new and interesting species of *Trebouxia*, a genus of lichenized algae. *American Journal of Botany*, 677-683.

Ahmadjian, V. (1967). A guide to the algae occurring as lichen symbionts: isolation, culture, cultural physiology, and identification. *Phycologia*, *6*(2), 127-160.

Ahmadjian, V. (1982). Algal/fungal symbioses. *Progress in phycological research*,*1*,*171-231*.

Ahmadjian, V. (1987). Coevolution in lichens. *Annals of the New York Academy of sciences*, *503*(1), 307-315.

Ahmadjian, V. (1988). The lichen alga *Trebouxia*: does it occur free-living?. *Plant Systematics and Evolution*, *158*(2), 243-247.

Ahmadjian, V. (1993). The lichen photobiont: What can it tell us about lichen systematics?. Bryologist, 310-313.

Ahmadijian, V. (2012). Resynthesis of lichens. *The lichens. Elsevier*, 565-580.

Ahmadjian, V., & Jacobs, J. B. (1981). Relationship between fungus and alga in the lichen *Cladonia cristatella* Tuck. *Nature*, *289*(94), 169-172.

Armaleo, D., & Clerc, P. (1995). A rapid and inexpensive method for the purification of DNA from lichens and their symbionts. *The Lichenologist*, *27*(3), 207-213.

Armstrong, R. A. (1990). Dispersal, establishment and survival of soredia and fragments of the lichen, *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. *New phytologist*, *114*(2), 239-245.

Arnold, A. E., Miadlikowska, J., Higgins, K. L., Sarvate, S. D., Gugger, P., Way, A., Hofstetter, V., Kauff, F., & Lutzoni, F. (2009). A phylogenetic estimation of trophic transition networks for ascomycetous fungi: are lichens cradles of symbiotrophic fungal diversification?. *Systematic Biology*, *58*(3), 283-297.

Ascaso, C. (1980). A rapid method for the quantitative isolation of green algae from lichens. *Annals of botany*, *45*(4), 483-483.

Ascaso, C., Brown, D. H., & Rapsch, S. (1986). The ultrastructure of the phycobiont of desiccated and hydrated lichens. *The Lichenologist*, *18*(1), 37-46.

Bačkor, M., Peksa, O., Škaloud, P., & Bačkorová, M. (2010). Photobiont diversity in lichens from metal-rich substrata based on ITS rDNA sequences. *Ecotoxicology and environmental safety*, *73*(4), 603-612.

Beck, A. (1999). Photobiont inventory of a lichen community growing on heavy-metal-rich rock. *The Lichenologist*, *31*(5), 501-510.

Beck, A., Friedl, T., & Rambold, G. (1998). Selectivity of photobiont choice in a defined lichen community: inferences from cultural and molecular studies. *The New Phytologist*, *139*(4), 709-720.

Beck, A., Kasalicky, T., & Rambold, G. (2002). Myco-photobiontal selection in a Mediterranean cryptogam community with *Fulgensia fulgida*. *New Phytologist*, *153*(2), 317-326.

Beiggi, S., & Piercey-Normore, M. D. (2007). Evolution of ITS ribosomal RNA secondary structures in fungal and algal symbionts of selected species of *Cladonia* sect. *Cladonia* (Cladoniaceae, Ascomycotina). *Journal of molecular evolution*, *64*(5), 528-542.

Belnap, J., Büdel, B., & Lange, O. L. (2001). Biological soil crusts: characteristics and distribution. *Biological soil crusts: structure, function, and management*. Springer Berlin Heidelberg, 3-30.

Belnap, J. (2003). The world at your feet: desert biological soil crusts. *Frontiers in Ecology and the Environment*, *1*(4), 181-189.

Bischoff, H. W., & Bold, H. C. (1963). *Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species* (No. 4). University of Texas.

Blaha, J., Baloch, E., & Grube, M. (2006). High photobiont diversity associated with the euryoecious lichen-forming ascomycete *Lecanora rupicola* (Lecanoraceae, Ascomycota). *Biological Journal of the Linnean Society*, *88*(2), 283-293.

Brodo, I. M., & Richardson, D. H. S. (1978). Chimeroid associations in the genus *Peltigera*. *The Lichenologist*, *10*(2), 157-170.

Brown, T. A. (2016). Gene cloning and DNA analysis: an introduction. John Wiley & Sons.

Brunauer, G., Hager, A., Grube, M., Türk, R., & Stocker-Wörgötter, E. (2007). Alterations in secondary metabolism of aposymbiotically grown mycobionts of *Xanthoria elegans* and cultured resynthesis stages. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(2), 146-151.

Bubrick, P. (1988). Effects of symbiosis on the photobiont. *CRC Handbook of Lichenology*, *2*, 133-144.

Bubrick, P., & Galun, M. (1980). Symbiosis in lichens: differences in cell wall properties of freshly isolated and cultured phycobionts. *FEMS Microbiology Letters*, *7*(4), 311-313.

Bubrick, P., Galun, M., & Frensdorff, A. (1984). Observations on free-living *Trebouxia* de Puymaly and *Pseudotrebouxia* Archibald, and evidence that both symbionts fom *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. can be found free-living in nature. *New Phytologist*, *97*(3), 455-462.

Calatayud, A., Guera, A., Fos, S., & Barreno, E. (2001). A new method to isolate lichen algae by using Percoll® gradient centrifugation. *The lichenologist*, *33*(4), 361-366.

Casano, L. M., del Campo, E. M., García-Breijo, F. J., Reig-Armiñana, J., Gasulla, F., Del Hoyo, A., Guéra, A. & Barreno, E. (2011). Two *Trebouxia* algae with different physiological performances are ever-present in lichen thalli of *Ramalina farinacea*. Coexistence versus Competition?. *Environmental microbiology*, *13*(3), 806-818.

Cassie, D. M., & Piercey-Normore, M. D. (2008). Dispersal in a sterile lichen-forming fungus, *Thamnolia subuliformis* (Ascomycotina: Icmadophilaceae). *Special Issue on Systematics Research*. *Botany*, *86*(7), 751-762.

Castillo, R. V., & Beck, A. (2012). Photobiont selectivity and specificity in *Caloplaca* species in a fog-induced community in the Atacama Desert, northern Chile. *Fungal Biology*, *116*(6), 665-676.

Catalá, M., Gasulla, F., del Real, A. E. P., García-Breijo, F., Reig-Armiñana, J., & Barreno, E. (2010). Fungal-associated NO is involved in the regulation of oxidative stress during rehydration in lichen symbiosis. BMC microbiology, 10(1), 297.

Chapman, R., & Waters, D. (2004). Lichenization of the *Trentepohliales*. *Symbiosis*, 359-371.

Chantanachat, S., & Bold, H. C. (1962). *Some algae from arid soils* (Vol. 2). University of Texas.

Cordeiro, L. M., Reis, R. A., Cruz, L. M., Stocker-Wörgötter, E., Grube, M., & Iacomini, M. (2005). Molecular studies of photobionts of selected lichens from the coastal vegetation of Brazil. *FEMS Microbiology Ecology*, *54*(3), 381-390.

Cordeiro, L. M., Beilke, F., de Fátima Reinhardt, V., Sassaki, G. L., & Iacomini, M. (2013). Rhamnogalactofuranan from the microalga *Myrmecia biatorellae*, symbiotic partner of *Lobaria linita*. *Phytochemistry*, *94*, 254-259.

Culberson, C. F., Culberson, W. L., & Johnson, A. (1985). Does the symbiont alga determine chemotype in lichens?. *Mycologia*, *77*(4), 657-660.

Dahlman, L., Persson, J., Näsholm, T., & Palmqvist, K. (2003). Carbon and nitrogen distribution in the green algal lichens *Hypogymnia physodes* and *Platismatia glauca* in relation to nutrient supply. *Planta*, 217(1), 41-48.

Dal Grande, F., Widmer, I., Wagner, H. H., & Scheidegger, C. (2012). Vertical and horizontal photobiont transmission within populations of a lichen symbiosis. *Molecular ecology*, *21*(13), 3159-3172.

Dal Grande, F., Beck, A., Cornejo, C., Singh, G., Cheenacharoen, S., Nelsen, M. P., & Scheidegger, C. (2014). Molecular phylogeny and symbiotic selectivity of the green algal genus *Dictyochloropsis* sl (Trebouxiophyceae): a polyphyletic and widespread group forming photobiont-mediated guilds in the lichen family Lobariaceae. *New Phytologist*, *202*(2), 455-470.

del Campo, E. M., Catalá, S., Gimeno, J., del Hoyo, A., Martínez-Alberola, F., Casano, L. M., Grube, E. & Barreno, E. (2013). The genetic structure of the cosmopolitan three-partner lichen *Ramalina farinacea* evidences the concerted diversification of symbionts. *FEMS microbiology ecology*, *83*(2), 310-323.

DePriest, P. T. (2004). Early molecular investigations of lichen-forming symbionts: 1986–2001. *Annual Review of Microbiology*, *58*, 273-301.

deVera, J. P., Rettberg, P., & Ott, S. (2008). Life at the limits: capacities of isolated and cultured lichen symbionts to resist extreme environmental stresses. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 38(5), 457-468.

Doering, M., & Piercey-Normore, M. D. (2009). Genetically divergent algae shape an epiphytic lichen community on Jack Pine in Manitoba. *The lichenologist*, *41*(1), 69-80.

Domaschke, S., Fernández-Mendoza, F., A. García, M., Martín, M., & Printzen, C. (2012). Low genetic diversity in Antarctic populations of the lichen-forming ascomycete *Cetraria aculeata* and its photobiont. *Polar Research*, *31*(1), 17353.

Doyle, J. J., & Doyle, I. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Buletin*, 19, 11—15.

Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, *27*(16), 2194-2200.

Ekman, S. (2001). Molecular phylogeny of the Bacidiaceae (Lecanorales, lichenized Ascomycota). *Mycological Research*, *105*(7), 783-797.

Elvebakk, A., & Fritt-Rasmussen, J. (2007). The New Zealand lichen *Pannaria leproloma* (Nyl.) PM Jørg. and its panaustral relative *P. farinosa* nom. nov. *The Lichenologist*, 39(4), 349-359.

Elvebakk, A., Papaefthimiou, D., Robertsen, E. H., & Liaimer, A. (2008). Phylogenetic patterns among *Nostoc* cyanobionts within bi-and tripartite lichens of the genus *Pannaria*. *Journal of Phycology*, *44*(4), 1049-1059.

Engelen, A., Convey, P., & Sieglinde, O. T. T. (2010). Life history strategy of *Lepraria borealis* at an Antarctic inland site, Coal Nunatak. *The Lichenologist*, *42*(3), 339-346.

Fernández-Mendoza, F., Domaschke, S., García, M. A., Jordan, P., Martín, M. P., & Printzen, C. (2011). Population structure of mycobionts and photobionts of the widespread lichen *Cetraria aculeata*. *Molecular Ecology*, *20*(6), 1208-1232.

Feuerer, T., & Hawksworth, D. L. (2007). Biodiversity of lichens, including a world-wide analysis of checklist data based on Takhtajan's floristic regions. *Biodiversity and Conservation*, *16*(1), 85-98.

Flechtner, V. R., Johansen, J. R., & Clark, W. H. (1998). Algal composition of microbiotic crusts from the central desert of Baja California, Mexico. *The Great Basin Naturalist*, 295-311.

Flechtner, V. R., Johansen, J. R., & Belnap, J. (2008). The biological soil crusts of the San Nicolas Island: enigmatic algae from a geographically isolated ecosystem. *Western North American Naturalist*, *68*(4), 405-436.

Fontaine, K. M., Beck, A., Stocker-Wörgötter, E., & Piercey-Normore, M. D. (2012). Photobiont relationships and phylogenetic history of *Dermatocarpon luridum* var. *luridum* and related *Dermatocarpon* species. *Plants*, *1*(2), 39-60.

Friedl, T. (1987). Thallus development and phycobionts of the parasitic lichen *Diploschistes muscorum*. *The Lichenologist*, *19*(2), 183-191.

Friedl, T. (1995). Inferring taxonomic positions and testing genus level assignments in coccoid green lichen algae: a phylogenetic analysis of 18S ribosomal RNA sequences from *Dictyochloropsis reticulata* and from members of the genus *Myrmecia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae cl. nov.) 1. *Journal of Phycology*, *31*(4), 632-639.

Friedl, T., & Bhattacharya, D. (2001). Origin and evolution of green lichen algae. In *Symbiosis*. Springer Netherlands, 341-357.

Friedl, T., & Büdel, B. (2008). Photobionts. *Lichen biology*, *2*, 9-26.

Fröhlich, J., & König, H. (1999). Rapid isolation of single microbial cells from mixed natural and laboratory populations with the aid of a micromanipulator. *Systematic and Applied Microbiology*, *22*(2), 249-257.

Fučíková, K., Lewis, P. O., & Lewis, L. A. (2014). Widespread desert affiliation of trebouxiophycean algae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) including discovery of three new desert genera. *Phycological research*, *62*(4), 294-305.

Galun, M. (1988). *CRC handbook of lichenology* (Vol. 2). CRC Press.

Galun, M., Paran, N., & Ben-Shaul, Y. (1970). The fungus-alga association in the Lecanoraceae: an ultrastructural study. *New Phytologist*, *69*(2), 599-603.

Galun, M., & Bubrick, P. (1984). Physiological interactions between the partners of the lichen symbiosis. In *Cellular interactions* (pp. 362-401). Springer Berlin Heidelberg.

Geitler, L. (1962). Über die Flechtenalga *Myrmecia biatorellae*. *Plant Systematics and Evolution*, *109*(1), 41-44.

Geitler, L. (1963). Über Haustorien bei Flechten und über *Myrmecia biatorellae* in *Psora globifera*. *Plant Systematics and Evolution*, *110*(2), 270-280.

Goffinet, B., & Bayer, R. J. (1997). Characterization of mycobionts of photomorph pairs in the Peltigerineae (lichenized ascomycetes) based on internal transcribed spacer sequences of the nuclear ribosomal DNA. *Fungal Genetics and Biology*, *21*(2), 228-237.

Grube, M., & Berg, G. (2009). Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis. *Fungal biology reviews*, 23(3), 72-85.

Grube, M., & Muggia, L. (2010). Identifying algal symbionts in lichen symbioses. *Edizioni Università di Trieste*.

Guiry, M. D., Guiry, G. M. (2014). *Algaebase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway, http://www.algaebase.org.

Guzow-Krzemińska, B. (2006). Photobiont flexibility in the lichen *Protoparmeliopsis muralis* as revealed by ITS rDNA analyses. *The Lichenologist*, *38*(5), 469-476.

Hametner, C., Stocker-Wörgötter, E., Rindi, F., & Grube, M. (2014). Phylogenetic position and morphology of lichenized *Trentepohliales* (Ulvophyceae, Chlorophyta) from selected species of Graphidaceae. *Phycological research*, *62*(3), 170-186.

Hällbom, L., & Bergman, B. (1983). Effects of inorganic nitrogen on C_2H_2 reduction and CO^2 exchange in the *Peltigera praetextata-Nostoc* and *Peltigera aphthosa-Coccomyxa-Nostoc* symbioses. *Planta*, *157*(5), 441-445.

Helms, G., Friedl, T., Rambold, G., & Mayrhofer, H. (2001). Identification of photobionts from the lichen family Physciaceae using algal-specific ITS rDNA sequencing. *The Lichenologist*, *33*(1), 73-86.

Henskens, F. L., Green, T. A., & Wilkins, A. (2012). Cyanolichens can have both cyanobacteria and green algae in a common layer as major contributors to photosynthesis. *Annals of botany*, *110*(3), 555-563.

Hepperle, D. (2004). *SeqAssem©*. A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. *URL: http://www. sequentix. de*.

Hestmark, G., Lutzoni, F., & Miadlikowska, J. (2016). Photobiont associations in co-occurring umbilicate lichens with contrasting modes of reproduction in coastal Norway. *The Lichenologist*, 48(5), 545-557.

Honegger, R. (1990). Mycobiont-photobiont interactions in adult thalli and in axenically resynthesized prethallus stages of *Xanthoria parietina* (Teloschistales, lichenized Ascomycetes). *Bibliotheca Lichenologica*, *38*, 191-208.

Honegger, R. (1992). Lichens: mycobiont-photobiont relationships. Algae and Symbioses: Plants, Animals, Fungi, Viruses, Interactions Explored. *BioPress* Ltd., Bristol, UK, 255-275.

Honegger, R. (1993). Developmental biology of lichens. *New Phytologist*, *125*(4), 659-677.

Honegger, R. (1998). The lichen symbiosis—what is so spectacular about it?. *The Lichenologist*, *30*(3), 193-212.

Honegger, R., & Brunner, U. (1981). Sporopollenin in the cell walls of *Coccomyxa* and *Myrmecia* phycobionts of various lichens: an ultrastructural and chemical investigation. *Canadian Journal of Botany*, *59*(12), 2713-2734.

Honegger, R., & Scherrer, S. (2008). Sexual reproduction in lichen-forming ascomycetes. *Lichen Biology. Cambridge University Press, Cambridge*, 94-103.

Islam, A. K., Nrul, M. & Irfanullah, H. M. (2001). Some new records of algae for Bangladesh: *Cyanarcus*, *Chloremys*, *Myrmecia*, *Selenodictyum*, *Tetraplektron* and *Pseudostaurastrum*. *Bangladesh J. Plant Taxon*, *8*(2), 1-7.

König, J., & Peveling, E. (1984). Cell walls of the phycobionts *Trebouxia* and *Pseudotrebouxia*: constituents and their localization. *The Lichenologist*, *16*(2), 129-144.

Kranner, I., Cram, W. J., Zorn, M., Wornik, S., Yoshimura, I., Stabentheiner, E., & Pfeifhofer, H. W. (2005). Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 102(8), 3141-3146.

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, *33*(7), 1870-1874.

Leavitt, S. D., Nelsen, M. P., Lumbsch, H. T., Johnson, L. A., & Clair, L. L. S. (2013). Symbiont flexibility in subalpine rock shield lichen communities in the Southwestern USA. *The Bryologist*, *116*(2), 149-161.

Leavitt, S. D., Kraichak, E., Nelsen, M. P., Altermann, S., Divakar, P. K., Alors, D., Alors, D., Esslinger, T. L., Crespo, A., & Lumbsch, T. (2015). Fungal specificity and selectivity for algae play a major role in determining lichen partnerships across diverse ecogeographic regions in the lichen-forming family Parmeliaceae (Ascomycota). *Molecular ecology*, *24*(14), 3779-3797.

Magain, N., & Sérusiaux, E. (2014). Do photobiont switch and cephalodia emancipation act as evolutionary drivers in the lichen symbiosis? A case study in the Pannariaceae (Peltigerales). *PLoS One*, *9*(2), e89876.

Malone, C. P. (1977). Observations on *Endocarpon pusillum*: the role of rhizomorphs in asexual reproduction. *Mycologia*, *69*(5), 1042-1045.

Marini, L., Nascimbene, J., & Nimis, P. L. (2011). Large-scale patterns of epiphytic lichen species richness: photobiont-dependent response to climate and forest structure. *Science of the Total Environment*, *409*(20), 4381-4386.

Martin, D. P., Williamson, C., & Posada, D. (2004). RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics*, *21*(2), 260-262.

Martín, M. P., & Winka, K. (2000). Alternative methods of extracting and amplifying DNA from lichens. *The Lichenologist*, *32*(2), 189-196.

Meeßen, J., Eppenstein, S., & Ott, S. (2013). Recognition mechanisms during the pre-contact state of lichens: II. Influence of algal exudates and ribitol on the response of the mycobiont of *Fulgensia bracteata*. *Symbiosis*, *59*(3), 131-143.

Miadlikowska, J., Kauff, F., Högnabba, F., Oliver, J. C., Molnár, K., Fraker, E., Gaya, E., Hafellner, J., Hofstetter, V., Gueidan, C., Otálora, M. A. G., Hodkinson, B., Kukwa, M., Lücking, R., Björk, C., Sipman, H., Burgaz, A. R., Thell, A., Passo, A., Myllys, L., Goward, T., Fernández-Brime. S., Hestmark, G., Lendemer, J., Lumbsch, H. T., Schmull, M., Schoch, C. L., Sérusiaux, E., Maddison, D. R., Arnoldm E. A., Lutzoni, F. & Stenroos, S. (2014). A multigene phylogenetic synthesis for the class Lecanoromycetes (Ascomycota): 1307 fungi representing 1139 infrageneric taxa, 317 genera and 66 families. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *79*, 132-168.

Mikhailova, I. N. (2007). Populations of epiphytic lichens under stress conditions: survival strategies. *The Lichenologist*, *39*(1), 83-89.

Molnár, K., & Farkas, E. (2010). Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Zeitschrift für Naturforschung* C, 65(3-4), 157-173.

Moya, P., Škaloud, P., Chiva, S., García-Breijo, F. J., Reig-Arminana, J., Vančurová, L., & Barreno, E. (2015). Molecular phylogeny and ultrastructure of the lichen microalga *Asterochloris mediterranea* sp. nov. from Mediterranean and Canary Islands ecosystems. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *65*(6), 1838-1854.

Moya, P., Chiva, S., Molins, A., Jadrná, I., Škaloud, P., Peksa, O., & Barreno, E. (in prep.). *Myrmecia israeliensis* as symbiotic microalga. (viz Příloha 2.)

Muggia, L., Grube, M., & Tretiach, M. (2008). Genetic diversity and photobiont associations in selected taxa of the *Tephromela atra* group (Lecanorales, lichenised Ascomycota). *Mycological Progress*, *7*(3), 147.

Muggia, L., Vančurová, L., Škaloud, P., Peksa, O., Wedin, M., & Grube, M. (2013). The symbiotic playground of lichen thalli–a highly flexible photobiont association in rock-inhabiting lichens. *FEMS Microbiology Ecology*, *85*(2), 313-323.

Muggia, L., Pérez-Ortega, S., Kopun, T., Zellnig, G., & Grube, M. (2014). Photobiont selectivity leads to ecological tolerance and evolutionary divergence in a polymorphic complex of lichenized fungi. *Annals of botany*, *114*(3), 463-475.

Mukhtar, A., Garty, J., & Galun, M. (1994). Does the lichen alga Trebouxia occur free-living in nature: further immunological evidence. *Symbiosis*, *17*(2-3), 247-253.

Myllys, L., Stenroos, S., Thell, A., & Kuusinen, M. (2007). High cyanobiont selectivity of epiphytic lichens in old growth boreal forest of Finland. *New phytologist*, *173*(3), 621-629.

Nash, T. H., Reiner, A., Demmig-Adams, B., Kilian, E., Kaiser, W. M., & Lange, O. L. (1990). The effect of atmospheric desiccation and osmotic water stress on photosynthesis and dark respiration of lichens. *New Phytologist*, *116*(2), 269-276.

Nei, M., Maruyama, T., & Chakraborty, R. (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, *29*(1), 1-10.

Nelsen, M. P., & Gargas, A. (2008). Dissociation and horizontal transmission of codispersing lichen symbionts in the genus *Lepraria* (Lecanorales: Stereocaulaceae). *New Phytologist*, *177*(1), 264-275.

Nelsen, M. P., & Gargas, A. (2009). Symbiont flexibility in *Thamnolia vermicularis* (Pertusariales: Icmadophilaceae). *The Bryologist*, *112*(2), 404-417.

Ohmura, Y., Kawachi, M., Kasai, F., Watanabe, M. M., & Takeshita, S. (2006). Genetic combinations of symbionts in a vegetatively reproducing lichen, *Parmotrema tinctorum*, based on ITS rDNA sequences. *The Bryologist*, *109*(1), 43-59.

Oksanen, I., Lohtander, K., Paulsrud, P., & Rikkinen, J. (2002). A molecular approach to cyanobacterial diversity in a rock-pool community involving gelatinous lichens and free-living Nostoc colonies. In *Annales Botanici Fennici*, 93-99.

Opanowicz, M., & Grube, M. (2004). Photobiont genetic variation in Flavocetraria nivalis from Poland (Parmeliaceae, lichenized Ascomycota). *The Lichenologist*, *36*(2), 125-131.

Ott, S. (1987)a. The juvenile development of lichen thalli from vegetative diaspores. *Symbiosis (USA)*.

Ott, S. (1987)b. Reproductive strategies in lichens. *Bibliotheca Lichenologica*, *25*, 81-93.

Ott, S., Meier, T., & Jahns, H. M. (1995). Development, regeneration, and parasitic interactions between the lichens *Fulgensia bracteata* and *Toninia caeruleonigricans*. *Canadian Journal of Botany*, *73*(S1), 595-602.

Park, C. H., Kim, K. M., Elvebakk, A., Kim, O. S., Jeong, G., & Hong, S. G. (2015). Algal and fungal diversity in Antarctic lichens. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *62*(2), 196-205.

Peksa, O., & Škaloud, P. (2011). Do photobionts influence the ecology of lichens? A case study of environmental preferences in symbiotic green alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae). *Molecular Ecology*, *20*(18), 3936-3948.

Pérez, M. J., Vicente, C., & Legaz, M. E. (1985). An improved method to isolate lichen algae by gel filtration. *Plant cell reports*, *4*(4), 210-211.

Piercey-Normore, M. D. (2004). Selection of algal genotypes by three species of lichen fungi in the genus *Cladonia*. *Canadian Journal of Botany*, *82*(7), 947-961.

Piercey-Normore, M. D. (2006). The lichen-forming ascomycete *Evernia mesomorpha* associates with multiple genotypes of *Trebouxia jamesii*. *New phytologist*, *169*(2), 331-344.

Piercey-Normore, M. (2009). Vegetatively reproducing fungi in three genera of the Parmeliaceae share divergent algal partners. *The Bryologist*, *112*(4), 773-785.

Piercey-Normore, M. D., & Deduke, C. (2011). Fungal farmers or algal escorts: lichen adaptation from the algal perspective. *Molecular ecology*, *20*(18), 3708-3710.

Piercey-Normore, M. D., & DePriest, P. T. (2001). Algal switching among lichen symbioses. *American Journal of Botany*, *88*(8), 1490-1498.

Printz, H. (1921). Subaerial algae from South Africa. *Det Kongelige Norske Videnskabers Selskabs Skrifter*.

Rambold, G., Friedl, T., & Beck, A. (1998). Photobionts in lichens: possible indicators of phylogenetic relationships?. *Bryologist*, 392-397.

Rikkinen, J., Oksanen, I., & Lohtander, K. (2002). Lichen guilds share related cyanobacterial symbionts. *Science*, *297*(5580), 357-357.

Rikkinen, J. (2003). Ecological and evolutionary role of photobiont-mediated guilds in lichens. *Symbiosis*, *34*(2), 99-110.

Romeike, J., Friedl, T., Helms, G., & Ott, S. (2002). Genetic diversity of algal and fungal partners in four species of *Umbilicaria* (lichenized ascomycetes) along a transect of the Antarctic Peninsula. *Molecular Biology and Evolution*, *19*(8), 1209-1217.

Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A. & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, *61*(3), 539-542.

Rosenberg, E., & Zilber-Rosenberg, I. (2011). Symbiosis and development: the hologenome concept. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, *93*(1), 56-66.

Ruprecht, U., Brunauer, G., & Printzen, C. (2012). Genetic diversity of photobionts in Antarctic lecideoid lichens from an ecological view point. The Lichenologist, 44(5), 661-678.

Ruprecht, U., Brunauer, G., & Türk, R. (2014). High photobiont diversity in the common European soil crust lichen *Psora decipiens*. *Biodiversity and conservation*, *23*(7), 1771-1785.

Řeháková, H. (1968). Lišejníkové řasy z rodu *Trebouxia*, *Diplosphaera* a *Myrmecia*. Diplomová práce: Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze.

Sadowsky, A., & Ott, S. (2016). Symbiosis as a successful strategy in continental Antarctica: performance and protection of *Trebouxia* photosystem II in relation to lichen pigmentation. *Polar Biology*, *39*(1), 139-151.

Sanders, W. B., & Rico, V. J. (1992). Lichenizing rhizomorphs and thallus development in the squamulose lichen *Aspicilia crespiana* Rico ined.(Lecanorales, Ascomycetes). *Plant Biology*, *105*(6), 449-456.

Sanders, W. B., Moe, R. L., & Ascaso, C. (2004). The intertidal marine lichen formed by the pyrenomycete fungus *Verrucaria tavaresiae* (Ascomycotina) and the brown alga *Petroderma maculiforme* (Phaeophyceae): thallus organization and symbiont interaction. *American journal of botany*, *91*(4), 511-522.

Schaper, T., & Ott, S. (2003). Photobiont selectivity and interspecific interactions in lichen communities. I. Culture experiments with the mycobiont *Fulgensia bracteata*. *Plant Biology*, *5*(04), 441-450.

Scheidegger, C., & Werth, S. (2009). Conservation strategies for lichens: insights from population biology. *Fungal biology reviews*, *23*(3), 55-66.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, *9*(7), 671-675.

Showman, R. E. (1972). Photosynthetic response with respect to light in three strains of lichen algae.

Smith, D. C., & Douglas, A. E. (1987). *The biology of symbiosis*. Edward Arnold (Publishers) Ltd..

Smith, C.W., Aproot, A., Coppins, B.J. , Fletcher, A., Gilbert, O.L., James , P. W. & Wolseley P. A. 2009. The Lichens of Great Britain and Ireland. *The British Lichen Society*. 761-765.

Suutari, M., Majaneva, M., Fewer, D. P., Voirin, B., Aiello, A., Friedl, T., Chiarello, A.G. & Blomster, J. (2010). Molecular evidence for a diverse green algal community growing in the hair of sloths and a specific association with *Trichophilus welckeri* (Chlorophyta, Ulvophyceae). *BMC evolutionary biology*, *10*(1), 86.

Škaloud, P., & Peksa, O. (2008). Comparative study of chloroplast morphology and ontogeny in *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Biologia*, *63*(6), 873-880.

Škaloud, P., & Peksa, O. (2010). Evolutionary inferences based on ITS rDNA and actin sequences reveal extensive diversity of the common lichen alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *54*(1), 36-46.

Škaloud, P., & Rindi, F. (2013). Ecological differentiation of cryptic species within an asexual protist morphospecies: a case study of filamentous green alga *Klebsormidium* (Streptophyta). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *60*(4), 350-362.

Škaloud, P., Steinová, J., Řídká, T., Vančurová, L., & Peksa, O. (2015). Assembling the challenging puzzle of algal biodiversity: species delimitation within the genus *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Journal of phycology*, *51*(3), 507-527.

Thornhill, D. J., Lajeunesse, T. C., & Santos, S. R. (2007). Measuring rDNA diversity in eukaryotic microbial systems: how intragenomic variation, pseudogenes, and PCR artifacts confound biodiversity estimates. *Molecular ecology*, *16*(24), 5326-5340.

Thüs, H., Muggia, L., Pérez-Ortega, S., Favero-Longo, S. E., Joneson, S., O'Brien, H., Nelsen, M. P., Duque-Thüs, R., Grube, M., Friedl, T., Brodie, J., Andrew, C. J., Lcking, R., Lutzoni, F. & Gueidan, C. (2011). Revisiting photobiont diversity in the lichen family Verrucariaceae (Ascomycota). *European Journal of Phycology*, *46*(4), 399-415.

Timdal, E. (1984). The delimitation of *Psora* (Lecideaceae) and related genera, with notes on some species. *Nordic Journal of Botany*, *4*(4), 525-540.

Timdal, E. (1986). A revision of *Psora* (Lecideaceae) in North America. *Bryologist*, 253-275.

Tschermak-Woess, E. (1980). *Chaenothecopsis consociata*—kein parasitischer oder parasymbiontischer Pilz, sondern lichenisiert mit *Dictyochloropsis symbiontica*, spec. nova. *Plant Systematics and Evolution*, *136*(3-4), 287-306.

Tschermak-Woess, E. (1988). The algal partner. *CRC handbook of lichenology*, *1*, 39-92.

Tschermak-Woess, E. (1995). *Dictyochloropsis splendida* (Chlorophyta), the correct phycobiont of *Phlyctis argena* and the high degree of selectivity or specificity involved. *The Lichenologist*, *27*(3), 169-187.

Tschermak-Woess, E., & Plessl, A. (1948). Über zweierlei Typen der sukzedanen Teilung und ein auffallendes Teilungsverhalten des Chromatophors bei einer neuen *Protococcale*, *Myrmecia pyriformis*. *Österreichische botanische Zeitschrift*, *95*(2), 194-207.

Trembley, M. L., Ringli, C., & Honegger, R. (2002). Morphological and molecular analysis of early stages in the resynthesis of the lichen Baeomyces rufus. *Mycological Research*, *106*(7), 768-776.

U'Ren, J. M., Riddle, J. M., Monacell, J. T., Carbone, I., Miadlikowska, J., & Arnold, A. E. (2014). Tissue storage and primer selection influence pyrosequencing-based inferences of diversity and community composition of endolichenic and endophytic fungi. *Molecular Ecology Resources*, *14*(5), 1032-1048.

Vančurová, L. (2012): Diverzita fotobiontů ve stélkách lišejníků rodu *Stereocaulon* (Lecanoromycetes, Ascomycota). Diplomová práce: Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze.

Vančurová, L., Peksa, O., Němcová, Y., & Škaloud, P. (2015). *Vulcanochloris* (Trebouxiales, Trebouxiophyceae), a new genus of lichen photobiont from La Palma, Canary Islands, Spain. *Phytotaxa*, *219*(2), 118-132.

Viaud, M., Pasquier, A., & Brygoo, Y. (2000). Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS. *Mycological Research*, *104*(9), 1027-1032.

Voytsekhovich, A., Dymytrova, L., Rai, H., & Upreti, D. K. (2014). Photobiont Diversity of Soil Crust Lichens Along Substrate Ecology and Altitudinal Gradients in Himalayas: A Case Study from Garhwal Himalaya. In *Terricolous Lichens in India* (pp. 73-87). Springer New York.

Voytsekhovich, A., & Beck, A. (2016). Lichen photobionts of the rocky outcrops of Karadag massif (Crimean Peninsula). Symbiosis, 68(1-3), 9-24.

Walser, J. C., Gugerli, F., Holderegger, R., Kuonen, D., & Scheidegger, C. (2004). Recombination and clonal propagation in different populations of the lichen *Lobaria pulmonaria*. *Heredity*, *93*(4), 322.

Wang, H., Xu, Z., Gao, L., & Hao, B. (2009). A fungal phylogeny based on 82 complete genomes using the composition vector method. *BMC evolutionary biology*, *9*(1), 195.

Warén, H. (1918-19). Reinkulturen von Flechtengonidien. *Finska Vetenskaps-Societeten*. 61(14),1-79. In: Friedl, T., & Büdel, B. (2008). Photobionts. *Lichen biology*, *2*, 9-26.

Werth, S., & Sork, V. L. (2010). Identity and genetic structure of the photobiont of the epiphytic lichen *Ramalina menziesii* on three oak species in southern California. *American Journal of Botany*, *97*(5), 821-830.

Werth, S., & Sork, V. L. (2014). Ecological specialization in *Trebouxia* (Trebouxiophyceae) photobionts of *Ramalina menziesii* (Ramalinaceae) across six range-covering ecoregions of western North America. *American journal of botany*, *101*(7), 1127-1140.

Werth, S., Wagner, H. H., Gugerli, F., Holderegger, R., Csencsics, D., Kalwij, J. M., & Scheidegger, C. (2006). Quantifying dispersal and establishment limitation in a population of an epiphytic lichen. *Ecology*, *87*(8), 2037-2046.

Widmer, I., Dal Grande, F., Cornejo, C., & Scheidegger, C. (2010). Highly variable microsatellite markers for the fungal and algal symbionts of the lichen *Lobaria pulmonaria* and challenges in developing biont-specific molecular markers for fungal associations. *Fungal biology*, *114*(7), 538-544.

Williams, L., Colesie, C., Ullmann, A., Westberg, M., Wedin, M., & Büdel, B. (2017). Lichen acclimation to changing environments: Photobiont switching vs. climate-specific uniqueness in *Psora decipiens*. *Ecology and evolution*, *7*(8), 2560-2574.

Wirtz, N., Lumbsch, H. T., Green, T. G., Türk, R., Pintado, A., Sancho, L., & Schroeter, B. (2003). Lichen fungi have low cyanobiont selectivity in maritime Antarctica. *New Phytologist*, *160*(1), 177-183.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, *18*(1), 315-322.

Worland, M. R., & Lukešová, A. (2000). The effect of feeding on specific soil algae on the cold-hardiness of two Antarctic micro-arthropods (*Alaskozetes antarcticus* and *Cryptopygus antarcticus*). *Polar Biology*, *23*(11), 766-774.

Wornik, S., & Grube, M. (2010). Joint dispersal does not imply maintenance of partnerships in lichen symbioses. *Microbial Ecology*, *59*(1), 150-157.

Yahr, R., Vilgalys, R., & Depriest, P. T. (2004). Strong fungal specificity and selectivity for algal symbionts in Florida scrub *Cladonia* lichens. *Molecular Ecology*, *13*(11), 3367-3378.

Yahr, R., Vilgalys, R., & DePriest, P. T. (2006). Geographic variation in algal partners of *Cladonia subtenuis* (Cladoniaceae) highlights the dynamic nature of a lichen symbiosis. *New Phytologist*, *171*(4), 847-860.

Yoshimura, I., Yamamoto, Y., Nakano, T., & Finnie, J. (2002). Isolation and culture of lichen photobionts and mycobionts. *Protocols in lichenology*, 3-33.

Zoller, S., & Lutzoni, F. (2003). Slow algae, fast fungi: exceptionally high nucleotide substitution rate differences between lichenized fungi *Omphalina* and their symbiotic green algae Coccomyxa. *Molecular phylogenetics and evolution*, *29*(3), 629-640.

9. PŘÍLOHA

Příloha 1.: Seznam položek použitých pro molekulární analýzy včetně informací o lokalitě sběru (a případně sběratele). Přiřazená čísla odpovídají položkám ve fylogenetickém stromu. Je zaznamenán i způsob získání sekvence, tj. sekvenace DNA přímo ze stélky lišejníku/ z narostlé kultury/ po klonování.

Příloha 2. Část dat získaných v této diplomové práci byla použita pro manuskript s názvem „*Myrmecia israeliensis* as the primary symbiotic microalga in squamulose lichens growing in European and Canary Island terricolous communities“

Příloha 1.: Seznam položek použitých pro molekulární analýzy včetně informací o lokalitě sběru (a případně sběratele). Přiřazená čísla odpovídají položkám ve fylogenetickém stromu. Je zaznamenán i způsob získání sekvence, tj. sekvenace DNA přímo ze stélky lišejníku/ z narostlé kultury/ po klonování.

no.		lokalita/ souřadnice/ nadm. výška/ expozice svahu/ sběr	původ sekvence
1	*Psora decipiens*	CzechRepublic1, Sbrsko, NPR Karlštejn/ N49º55'56" E14º08'11" / 230-250 / JZ/ Malíček	kultura
2	*Psora decipiens*	CzechRepublic2, PR Čepičná// Peksa	klonování
3	*Psora decipiens*	Slovakia1, Tematín, Považský Inovec/ N48º40'03" E17º54'57" / 350/ JZ/ Peksa	kultura
4	*Placidium* sp.	Slovakia1, Tematín, Považský Inovec/ N48º40'03" E17º54'57" / 350/ JZ/ Peksa	kultura
5	*Placidium* sp.	Portugal, Sintra/ N38°47'32" W9°23'21"/410-430/ Peksa	kultura
6	*Psora decipiens*	CzechRepublic3, Nové Dobrkovice/ N48º49'09" E14º17'32" /521/ J	kultura
7	*Psora decipiens*	CzechRepublic3, Nové Dobrkovice/ N48º49'09" E14º17'32" /521/ J	kultura
8	*Psora decipiens*	France, Alpes-Maritimes, La Brigue/ N44°04'02" E7°38'17"/800-820/ Malíček	kultura
9	*Placidium squamulosum*	Slovakia2, Lúka 1, Považský Inovec/ N48º39'43" E17º53'37" / 221/ JZ	kultura
10	*Psora decipiens*	Slovakia2, Lúka 1, Považský Inovec/ N48º39'43" E17º53'37" / 221/ JZ	kultura
11	*Psora decipiens*	Slovakia3, Lúka 2, Považský Inovec/ N48º40'03" E17º54'54" / 337/ Z	ze stélky
12	*Psora decipiens*	Slovakia4, Pod Tanečnicou/ N49°14'35" E19°6'18" / 1175/ V	ze stélky
13	*Psora decipiens*	Slovakia5, Za Šípem, Stankovany/ N49º09'54" E19º10'23" / 1092/	kultura, ze stélky
14	*Psora decipiens*	Turkey, Akseki/ N37°08'11 E1" 31°47'51" / 1228/	ze stélky
15	*Psora decipiens*	Slovakia6, Račice, Nitrica/ N48°42'22" E18°27'39" / 269/ J	klonování, kultura
16	*Placidium* sp.	Slovakia6, Račice, Nitrica/ N48°42'22" E18°27'39" / 269/ J	ze stélky
17	*Psora decipiens*	Slovakia7, Turnianský hradný vrch/ N48º36'35" E20º52'34" / 319/ JV	ze stélky
18	*Placidium* sp.	Slovakia7, Turnianský hradný vrch/ N48º36'35" E20º52'34" / 319/ JV	klonování
19	*Psora decipiens*	Slovakia8, Lančár/ N48º35'58" E17º38'49" / 247/ Z	ze stélky
20	*Placidium rufescens*	Slovakia8, Lančár/ N48º35'58" E17º38'49" / 247/ Z	ze stélky
21	*Psora decipiens*	Slovakia9, Čachtický hradní vrch, Višňové/ N48°43'24" E17°45'37"/ 320/ Z	klonování
22	*Placidium* sp.	Slovakia9, Čachtický hradní vrch, Višňové/ N48°43'24" E17°45'37"/ 320/ Z	klonování
23	*Psora decipiens*	Slovakia10, Pustá Ves/ N48º38'28" E17º36'48" / 295/ JZ	klonování
24	*Placidium* sp.	Slovakia10, Pustá Ves/ N48º38'28" E17º36'48" / 295/ JZ	ze stélky
25	*Psora decipiens*	Slovakia10, Pustá Ves/ N48º38'28" E17º36'48" / 295/ JJZ	ze stélky
26	*Psora decipiens*	Slovakia11, Velký Plešivec/ N48°42'5" E17°44'12" / 465/ JZ	ze stélky
27	*Placidium* sp.	Slovakia11, Velký Plešivec/ N48°42'5" E17°44'12" / 465/ JZ	klonování
28	*Placidium* sp.	Slovakia12, Dolný Lopašov/ N48º35'18" E17º38'02" / 250/ JZ	ze stélky
29	*Psora decipiens*	Slovakia12, Dolný Lopašov/ N48º35'18" E17º38'02" / 250/ JZ	klonování
30	*Psora decipiens*	CzechRepublic4, Srbsko, Na Chlumu/ N49°56'48" E14°8'3"E /330/J	klonování
31	*Placidium* sp.	Cyprus1, Dipotamos Reservoir/ N34º51'09" E33º21'05" / 195 /JJZ	ze stélky
32	*Psora decipiens*	Cyprus2, Avkas gorge/ N34º55'26" E32º20'32" / 85/	ze stélky
33	*Psora decipiens*	Cyprus3, Akamas peninsula, Neo Chorio/ N35º03'02" E32º21'16" / 12/	klonování
34	*Placidium* sp.	Cyprus3, poloostrov Akamas, Neo Chorio/ N35º03'02" E32º21'16" / 12/	ze stélky

35	*Psora decipiens*	Cyprus4, Alaminos/ N34°48'43" E33°25'32"/ 75/	ze stélky
36	*Psora decipiens*	Cyprus5, Paphos/ N34°51'26" E32°21'14"/5/	klonování
37	*Placidium* sp.	Cyprus5, Paphos/ N34°51'26" E32°21'14"/5/	klonování
38	*Psora decipiens*	Cyprus6, Akrotiri/ N34º36'03" E32º58'15" / 1/	ze stélky
39	*Placidium rufescens*	Cyprus6, Akrotiri/ N34º36'03" E32º58'15" / 1/	ze stélky
40	*Psora decipiens*	Cyprus7, Akrotiri/ N34º36'01" E32º58'21" / 1/	kultura
41	*Psora decipiens*	Croatia1, Mts Velebit, Starigrad Paklenica/ N44º17'34" E15º27'24" / 30// Malíček	kultura
42	*Placidium squamulosum*	Croatia1, Mts Velebit, Starigrad Paklenica/ N44º17'34" E15º27'24" / 30// Malíček	ze stélky
43	*Psora decipiens*	Croatia2, Mts Velebit, Starigrad Paklenica/ N44°20'49" E15°28'58" / 540/ J/ Malíček	kultura
44	*Psora decipiens*	Croatia3, Mts Velebit, Starigrad Paklenica/ N44°20'04" E15°28'33"" / 390/ Malíček	klonování
45	*Psora decipiens*	Germany, ruine Homburg/ N50º01'38" E09º47'58" / 300/ JV	klonování, kultura
46	*Psora decipiens*	Germany, ruine Homburg/ N50º01'38" E09º47'58" / 300/ JV	kultura
47	*Psora decipiens*	Germany, ruine Homburg/ N50º01'38" E09º47'58" / 300/ JV	klonování, kultura
48	*Psora decipiens*	Germany, ruine Homburg/ N50º01'38" E09º47'58" / 300/ JV	kultura
49	*Psora decipiens*	Germany, ruine Homburg/ N50º01'38" E09º47'58" / 300/ JV	kultura
50	*Psora decipiens*	Germany, ruine Homburg/ N50º01'38" E09º47'58" / 300/ JV	kultura
51	*Psora decipiens*	Czech Republic6, Beroun, Merhoutoutova skála/ N49º57'26" E14º05'50" / 250-260 / JZ	kultura
52	*Psora decipiens*	Czech Republic6, Beroun, Merhoutoutova skála/ N49º57'26" E14º05'50" / 250-260 / JZ	klonování, kultura
53	*Psora testacea*	Czech Republic7, Tetín/ N49°56'11" E14°05'12" / 407/ JZ/ Peksa	kultura
54	*Psora testacea*	Czech Republic8, Kačák, rock Pupek/ N49°56'52" E14°7'41"/ 235/ Z/ Vaiglová	ze stélky
55	*Psora testacea*	Czech Republic9, Srbsko, Na Závěrce/ N49°55'52" E14°8'21"/ 235/ J/ Viaglová	ze stélky
56	*Psora himalayana*	Russia, Mts Ural, river valley Chusovaya, Pjat' brat'ev// 180// Palice	ze stélky
57	*Psora testacea*	Slovakia13, Súlovské skály / N49°10'26" E18°34'56"/565/JJZ	ze stélky
58	*Psora testacea*	Czech Republic10, NPR Karlštejn, Beroun/ N49°57'20" E14°07'20"/ 280-300/ JZ/ Malíček	ze stélky
59	*Psora rubiformis*	Albania, Kombëtar Bredhi i Drenovës Korça County/ N40°35'25" E20°50'53"/ 1490//Malíček	ze stélky
60	*Psora testacea*	Slovakia14, Šíp, Stankovany/ N49°9'51" E19°10'44" / 1130/V	ze stélky
61	*Psora valesiaca*	Slovakia15, Liptovská Lúžná/ N48°56'29" E19°17'54"E /695/JJZ	ze stélky