

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní obor: Botanika

Studijní plán: Bryologie a lichenologie



Taxonomická studie okruhu terčovníku *Physconia muscigena*

Vedoucí práce: RNDr. David Svoboda, Ph.D.

Diplomant: Ing. Jakub Starosta

2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Davida Svobody, Ph.D., a že jsem uvedl všechny literární prameny, ze kterých jsem čerpal.

V Praze dne

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval své rodině za podporu při studiu, svému školiteli za trpělivost i cenné rady a ostatním kolegům zejména za sběr položek, kterými podpořili mou studii.

Abstrakt

Hlavním cílem studie bylo najít rozdíly v ekologii a v produkci sekundárních metabolitů v různých populacích lišejníku *Physconia muscigena* a zjistit, zda je druh dobře definován i chemicky a molekulárně. Pro studii jsem použil hlavně populace z Evropy a Kanady. Pro rekonstrukci fylogenetických stromů jsem využil data ze tří sekvenovaných úseků DNA (ITS rDNA, mtSSU rDNA a TEF1). Dalším cílem studie bylo zjistit taxonomické postavení blízce příbuzných druhů *P. muscigena*, *P. bayeri*, *P. rossica*, a *P. isidiomuscigena*. Vzhledem ke vzácnosti *P. muscigena* a *P. bayeri* na našem území jsem prozkoumal i všechny historické lokality, kde byl druh v minulosti z ČR udáván.

Výsledky ukázaly, že (1) sekvenční data z úseků ITS rDNA a TEF1 ukazují velikou vnitrodruhovou variabilitu u populací *P. muscigena*. S touto variabilitou nekoreluje geografické rozložení populací ani chemie stélek, (2) druh *Physconia bayeri* popsáný v roce 1947 J. Nádvorníkem je synonymní s druhem *P. muscigena*, (3) některé položky *P. muscigena* obsahují zatím neurčený sekundární metabolit, (4) *P. muscigena* se v současné době vyskytuje pouze na třech lokalitách v ČR.

Klíčová slova: *Physconia muscigena*, *Physconia bayeri*, vnitrodruhová variabilita, taxonomie, TEF1, ITS rDNA, mtSSU

Abstract

The principal goal of my study was to find if ecologically and chemically different populations of lichens in the *Physconia muscigena* (Ach.) Poelt group belong to several species or a single one. This study focused on the molecular and chemical investigations of mostly European and Canadian populations. I use sequence data from three genes (ITS rDNA, mtSSU rDNA and TEF1) for the reconstruction of phylogenetic trees. I investigate phylogenetic relationships among the closely related species *P. muscigena*, *P. bayeri*, *P. rossica*, and *P. isidiomuscigena*. Also, I wanted to detect any possible geographical or ecological trends among chemotypes and haplotypes. As an additional goal I checked the recent localities of *P. muscigena* in the Czech Republic for valorising its conservation status.

Results show that: (1) sequenced data of ITS rDNA and TEF1 show high intraspecific variability in *P. muscigena* samples. This genetic variability does not correlate neither with geographical distribution nor thallus chemistry; (2) *P. bayeri* is synonymous with *P. muscigena*; (3) some samples *P. muscigena* contain new undetermined secondary metabolite, (4) *Physconia muscigena* has only three recent localities in Czech Republic.

Key words: *Physconia muscigena*, *Physconia bayeri*, infraspecific variability, taxonomy, TEF1, ITS rDNA, mtSSU

Obsah

1	Úvod	3
1.1	Všeobecný úvod a cíle práce	3
1.2	Rod <i>Physconia</i>	4
1.3	Shrnutí základních znaků rodu <i>Physconia</i>	7
1.3.1	Znaky odlišující rod <i>Physconia</i> od <i>Physcia</i>	7
1.4	Ekologická a morfológická charakteristika vybraných zástupců.....	8
1.4.1	<i>Physconia bayeri</i> (Nádv.) Poelt	8
1.4.2	<i>Physconia detersa</i> (Nyl.) Poelt	9
1.4.3	<i>Physconia distorta</i> (With.) J. R. Laundon	9
1.4.4	<i>Physconia enteroxantha</i> (Nyl.) Poelt	9
1.4.5	<i>Physconia grisea</i> (Lam.) Poelt	10
1.4.6	<i>Physconia isidiomuscigena</i> Essl.....	11
1.4.7	<i>Physconia muscigena</i> (Ach.) Poelt.....	11
1.4.8	<i>Physconia perisidiosa</i> (Erichsen) Moberg	14
1.4.9	<i>Physconia rossica</i> Urbanav.....	14
1.4.10	<i>Physconia venusta</i> (Ach.) Poelt.....	15
2	Metodika	15
2.1	Revize herbářového materiálu a vlastní sběry.....	15
2.2	Tenkovrstvá chromatografie	16
2.3	Molekulární analýzy	16
2.3.1	Izolace DNA	16
2.3.2	Amplifikace studovaných genů	17
3	Výsledky	19
3.1	Revize herbářového materiálu.....	19
3.2	Současný stav populací	19
3.2.1	Praha – Butovice.....	20
3.2.2	CHKO Jeseníky – Petrovy kameny	20
3.2.3	CHKO Pálava – Pavlovské vrchy	20
3.2.4	Zaniklé lokality	21
3.3	Stanovištní charakteristiky a doprovodné druhy	22

3.1	Tenkvrstvá chromatografie - TLC	23
3.2	Molekulární analýzy	24
3.2.1	ITS rDNA.....	24
3.2.2	mtSSU	27
3.2.3	TEF1	27
3.2.4	Spojený soubor ITS rDNA – TEF1	30
3.2.5	Postavení <i>Physconia bayeri</i>	30
3.2.6	Pozice ekologicky podobných druhů	30
4	Diskuse	33
4.1	Výskyt druhu <i>Physconia muscigena</i> na území ČR	33
4.2	Kyselina sekalonová A	34
4.3	Pozice druhů <i>P. rossica</i> a <i>P. isidiomuscigena</i>	34
4.4	Vnitrodruhová variabilita <i>Physconia muscigena</i>	35
4.5	Linie <i>Physconia venusta/Physconia perisidiosa</i>	36
5	Závěr.....	38
6	Seznam použité literatury	39
7	Přílohy.....	43

1 Úvod

1.1 Všeobecný úvod a cíle práce

Lišejníky tvoří oproti rostlinám poměrně malou a opomíjenou skupinu, ať už se jedná o výzkumné nebo ochranné aktivity. S tím souvisí i počet lidí, kteří se o danou skupinu zajímají. V České republice je malý počet lichenologů, kteří se věnují tomuto oboru. Oproti botanikům neexistuje ani amatérská základna nadšenců, kteří by se lišejníkům věnovali ve volném čase a to přesto, že se mnohdy jedná o nápadné a velké druhy, které umějí zaujmout pozorovatele svou barevností nebo tvarem.

K nápadným lišejníkům patří i rod terčovníků *Physconia*. Rod *Physconia* je v České republice zastoupen šesti druhy s lupenitou stélkou a převážně epifytickým růstem. Druh *P. bayeri* popsal český lichenolog Josef Nádvorník v roce 1947 z našeho území. *P. bayeri* se stejně jako morfologicky podobný druh *P. muscigena* vyskytuje v oblasti českého termofytika na vápnitých skalách. Vztah těchto dvou druhů není do dnešní doby zcela vyřešen a není jasné, zda je *P. bayeri* dobře vymezený druh, či se jedná pouze o synonymum k druhu *P. muscigena*. K vyřešení této situace je nutné využít moderních taxonomických metod a zhodnotit postavení obou druhů.

Do taxonomické studie jsem zahrnul i nově popsané druhy *P. isidiomuscigena* a *P. rossica*, které se svou ekologií a morfologií velice podobají již zmíněným druhům a byly popsány z USA a Ruska. V žádné z fylogenetických prací se tyto druhy současně nevyskytují a jejich vzájemná pozice uvnitř rodu není známa.

Hlavními cíli práce jsou:

1. Ověřit současné a historické lokality výskytu *P. muscigena* a *P. bayeri* na území ČR.
2. Zjistit vnitrodruhovou variabilitu taxonu *Physconia muscigena*. Bude genetická variabilita korelovat s některou z doposud pozorovaných odlišností (chemotyp, areál)?
3. Určit příbuzenské vztahy mezi ekologicky podobnými druhy *P. muscigena*, *P. bayeri*, *P. rossica* a *P. isidiomuscigena*. Je *P. bayeri* pouze lokální chemotyp *P. muscigena*?

1.2 Rod *Physconia*

Lišejníkový rod *Physconia* Poelt patří k nápadným makrolišejníkům s lupenitou stélkou. V roce 1965 byl vydělen z rodu *Physcia* Schreb. na základě morfologických znaků (Poelt 1965). Rod obsahuje přes třicet druhů s heteromerickou stélkou šedé až šedohnědé barvy, u většiny druhů pokrytou pruinou. Spolu se 17 dalšími rody tvoří rod *Physconia* čeleď Physciaceae Zahlbr. (Kirtk et al. 2010). Fotobiontem jsou řasy z rodu *Trebouxia* Puymali (Cubero et al. 2004). K důležitým určovacími znakům patří např. způsob rozmnožování (sorédie, izídie, askospory), charakter rhizin a zbarvení dřene.

Geografický výskyt terčovníků je – až na pár výjimek – soustředěn v mimotropickém pásu severní i jižní polokoule (Otte et al. 2002). U evropských druhů převažuje epifytický způsob růstu (např. *P. perisidiosa*, *P. enteroxantha*); tyto druhy porůstají úživnější borku opadavých listnatých dřevin. Dále se zde vyskytují terikolní a mech porůstající zástupci otevřených slunných stanovišť (*P. muscigena*, *P. rossica*, *P. isidiomuscigena*). Obecně je rod *Physconia* chudý na sekundární metabolity a většina druhů neobsahuje žádné látky detekovatelné pomocí tenkovrstvé chromatografie - TLC (Ahti et al. 2002, Smith et al. 2009). Potvrzena je přítomnost sekalonové kyseliny A např. u druhu *P. muscigena*, nacházející se ve dřeni lišejníku (Otte et al. 2002).

Physconia muscigena byla původně popsána roku 1810 jako *Parmelia muscigena* švédským lichenologem Erikem Achariem (Acharius 1810). I přes různé nomenklatorické přesuny je *P. muscigena* stále uznávaným druhem dle původního pojetí taxonu (Poelt 1965). Populace *P. muscigena* se vyskytují ve dvou dobře ekologicky definovatelných biotopech: druh roste jednak na vápnatých skálách v nižších polohách termofytika a zároveň se vyskytuje na skalách nebo v alpínských trávnicích s řídkou vegetací ve vysokohorských a severských oblastech (Türk 2006). *P. muscigena* je díky své ekologii velice dobrým indikátorem primárního bezlesí. Centrem rozšíření druhu je Evropa, některé populace se nacházejí v severní Africe, Jižní Americe, Asii, USA a Kanadě (Thompson 1963, Otte et al. 2002, Chen et Hu 2003, Cubero et al. 2004, Flakus et al. 2012). Společným rysem těchto populací je absence specializovaných útvarů sloužících k nepohlavnímu rozmnožování, které jsou u ostatních druhů lišejníků běžné, tj. sorédií či izídií.

Zároveň je i velice obtížné nalézt na stanovišti stélky nesoucí apothecia (méně než 5 % populací), která by naznačovala šíření lišejníku pohlavní cestou. Tento jev se shoduje i s poměrem počtu plodných jedinců i ve starším herbářovém materiálu, kde rovněž jedinci s apothecii zpravidla chybějí. Vzhledem k vyjmenovaným skutečnostem

se zdá, že v současné době není lišejník schopný se aktivně rozmnožovat a obsazovat nové lokality. Na svých současných stanovištích tedy pouze přežívá, případně se rozmnožuje fragmentací stélky.

V literatuře lze nalézt několik monografií zaměřených na taxonomii rodu *Physconia*. Většina jich je ale staršího data (např. Nádvořník 1948, Poelt 1957, Moberg 1977), a tato díla přirozeně nevyužívají moderní taxonomické metody (chromatografie, molekulárně-fylogenetické analýzy). Z výsledků recentních prací využívajících molekulární analýzy se zdá, že jednotlivé populace *P. muscigena* se značně odlišují. V práci zabývající se fylogenezí rodu *Physconia*, která byla založena na sekvenci ITS rDNA (vnitřní přepisovaný mezerník ribozomální DNA) a používala vzorky z Evropy, USA a Kanady, se druh *P. muscigena* jeví jako polyfyletický taxon (Cubero et al. 2004, Lohtander et al. 2007). To by mohlo naznačovat existenci různých ekotypových forem nebo popřípadě i kryptických druhů.

K této teorii přispívá i popsání druhu *Physconia bayeri* (Nádv.) Poelt. Tento druh byl popsán ve čtyřicátých letech z České republiky J. Nádvořníkem jako terčovník *Physcia bayeri* vyskytující se na vápnitých skalách termofytika (obr. 1, Nádvořník 1947). Od druhu *Physconia muscigena* se liší přítomností sekalonové kyseliny A v dřevné vrstvě, díky které je dřev zbarvena žlutě, a tenčí stélkou (Nádvořník 1947, Otte et al. 2002). Taxon byl v minulosti dlouhou dobu akceptován. V současné době je *P. bayeri* slučována s druhem *P. muscigena*, i když toto tvrzení není podloženo žádnými molekulárními daty. Postavení *P. bayeri* je doposud nevyřešený taxonomický problém.

26. *Physcia Bayeri* Nád. sp. n. — Lobes larges, serrés, rebords soulevés, denticulés-fendillés, les extrémités divisées en lobes ascendants et plutôt étroits. Face supérieure du thalle brune à pruine grisâtre au centre, extrémités des lobes brunes, nues. Ni sorédié ni isidié. Médulle jaunâtre, KOH + distinctement jaune. Stérile.

Bohême: Praha-Nová Ves et Motol. (Bayer, Servít, !).
Sur les diabases moussus. — Radotín, calcaire (Bayer). —
Moravie: D. Kounice: N. Bránice, 220 m (1943 Buček). —
Il est connu aussi de Suisse.

Hyphe de la médulle rares, face supérieure du thalle couverte de couche hyaline d'épaisseur inégale, le dessous presque pseudo-parenchymateux par places, couvert de couche hyaline mince et continue.

f. *caespitosa* Nád. f. n. — Elle diffère du type par les lobes étroits, fortement ascendants et presque dépourvu de pruine. Thalle brun-verdâtre, le dessous pâle à la périphérie, noir au centre, rhizines noires, garnies de longs cils épais.

Bohême: Praha: Nová Ves et Motol (Servít, Hilitzer, !).

Remarque: Cette espèce diffère du *Ph. muscigena* par le thalle plus mince (100–140 μ contre 150–200 μ dans le *Ph. muscigena*) et surtout par la coloration et la réaction chimique de la médulle. Son amplitude géographique serait sans doute différente.

Obr. 1 – Francouzský popis druhu *Physconia bayeri* uvedený J. Nádorníkem v *Physciaceae Tchécoslovaques* z roku 1947.

V nedávné době byly popsány další dva druhy rodu *Physconia*, které se svou morfologií velice podobají předešlým dvěma druhům. *P. rossica* Urbanav. se vyskytuje v hornatých částech středního Ruska přes Ural, střední Sibiř až po Dálný východ, hlavním odlišovacím znakem je bílá spodní část laloků, výrazná spodní kůra ve starších částech stélky a přítomnost sorálů na stélce. Z jihozápadních států USA (Kalifornie, Arizona, Colorado) je popsána *P. isidiomuscigena* Essl., která na povrchu stélky nese granulovité soredie v nepravidelných sorálech. Oba tyto druhy mají i stejné ekologické nároky jako *P. muscigena* – vyskytují se na otevřených slunných stanovištích a rostou na mechorostech (Esslinger 2000, Lohtander et al. 2007, Urbanavichus 2008). *Physconia isidiomuscigena* se neobjevuje v žádné recentní fylogenetické práci a její příbuzenský vztah k velice podobnému druhu *P. muscigena* není znám. Od *P. isidiomuscigena* dokonce není možné dohledat ani žádnou sekvenci v genové databázi.

1.3 Shrnutí základních znaků rodu *Physconia*

(dle Nádvorník 1947, Moberg 1977, Eslinger 2000, Ahti et al. 2002, Lohtander et al. 2007, Smith et al. 2009)

Základní morfologické znaky definující rod:

Stélka lupenitá, laločnatá, často nepravidelného tvaru a přerůstající se s ostatními, přitisklá nebo volně přirostlá k podkladu, šedohnědá až tmavě hnědá, **laloky** od krátkých po dlouhé, většinou do 3 mm šířky, bez cilií na koncích, šedá až tmavě hnědá, matná nebo lehce lesklá, obvykle s pruinou na koncích, spodní strana od bělavé po hnědočernou, **sorédie** u některých druhů přítomné, **horní kůra** skleroplektenchymatická nebo paraplektenchymatická, může na koncích lalůček chybět, **spodní kůra** prosoplektenchymatická, černá a zřetelná nebo bělavá a nezřetelná, vzácně může chybět, **rhiziny** štětkovité vzácně jednoduché, **fotobiont** *Trebouxia*, **apothecia** lekanorovitá na ploše stélky, často s lalůčky po okrajích, bez rhizin na spodní straně, většinou s hnědým okrajem a bílou pruinou, **stélkový okraj** přítomen, vytrvalý, často zkřivený, občas s lalůčky nebo sorédiemi, **epithecium** hnědé, **hymenium** a **hypothecium** bezbarvé, **hamathecium** tvořené parafýzami, jednoduchými nebo větvenými, kyjovitými, světle hnědé s tenkou tmavě hnědou špičkou, **vřecka** válcovitá až kyjovitá, 8sporická, lekanorovitého typu, **spory** hnědé, jemně hrbolaté s tenkou stěnou, s jednou přepážkou, septum široké, typu *Physconia*, obvykle delší než 27 μm a širší než 15 μm , **pyknidy** zanořené v lalůčkách nebo v malých hrbolcích, stěny bezbarvé, přítomné hnědé kruhovitě ústí, **konidiogenní buňky** utvářejí větvené řetízky, krátce válcovité, **konidie** jednoduché bezbarvé, dlouhé válcovité 6-8 μm , **sekundární metabolity**: většinou nepřítomné, může se vyskytovat kyselina sekalonová a neidentifikovatelné látky na TLC, bez přítomnosti atranorinu,

Ekologie: bazické nebo na živiny bohaté skály a kůra, **rozšíření**: kosmopolitní rozšíření s centrem diverzity na severní polokouli.

1.3.1 Znaky odlišující rod *Physconia* od *Physcia*

Základní morfologické rozdíly rodu *Physconia* od rodu *Physcia* jsou morfologický typ spor, větší velikost stélky, velice častá přítomnost pruinu, absence atranorinu v horní kůře (reakce K-), horní kůra je skleroplektenchymatická nebo paraplektenchymatická a štětkovité rhiziny (Poelt 1965, Moberg 1977, Ahti et al. 2002).

1.4 Ekologická a morfologická charakteristika vybraných zástupců

(dle Nádvorník 1947, Moberg 1977, Eslinger 2000, Ahti et al. 2002, Lohtander et al. 2007, Smith et al. 2009)

1.4.1 *Physconia bayeri* (Nádv.) Poelt

Morfologie:

Stélka nemá v původním popisu definovaný tvar. Laloky jsou široké a natěsnané na sebe, okraje zvednuté, zvlňené, okraje laloků dělené na dílčí, převážně úzké a zvednuté lalůčky. Svrchní strana stélky hnědé barvy s šedavou pruinou uprostřed, konce laloků holé, hnědé. Sorédie ani isidie se nevyskytují. Dřeň je žlutavé barvy. Medulární hyfy řídké, svrchní strana stélky pokrytá hyalinní vrstvou různé tloušťky, spodní kůra místy téměř pseudoparenchymatická, krytá tenkou hyalinní souvislou vrstvou. Stélka je sterilní – apothecia nejsou známa. Dřeň K + se žlutou reakcí.

Druh se liší od *P. muscigena* tenčí stélkou (100 – 140 µm oproti 150 – 200 µm u *P. muscigena*) a hlavně zbarvením a reakcí dřene.

Původní latinský popis: A Physcia muscigena preasertim medulla lutescenti discrepat. Ad muscos et saxa. Českoslovakia, Helvetia (Nádvorník 1947, str. 124).

Ekologie a rozšíření:

Druh vyhledává otevřené biotopy. Roste na mechu porůstajícím diabasové skály. Od druhu *P. muscigena* se liší rozšířením v rámci nadmořské výšky – znám pouze z nížin.

Udávané historické lokality jsou Praha: Nová Ves, Motol a Radotín; Morava: Dolní Kounice – Nové Bránice.

Physconia bayeri f. *caespitosa* Nádv.

Forma se od typického druhu liší hodně zvednutými, úzkými laloky a je prakticky bez pruiny. Stélka hnědo-zelenavá, spodek bledý na okrajích, černý ve středu stélky. Rhiziny jsou černé, sdružené v dlouhé, tlusté provazce. Podle původního popisu by se druh měl vyskytovat na lokalitách Nová Ves a Motol v Praze.

1.4.2 *Physconia detersa* (Nyl.) Poelt

Morfologie:

Stélka kruhovitě nepravidelná, až 6 cm v průměru, šedá až tmavě hnědá občas lesklá. Pruina může být přítomna, bílé až namodralé barvy. Laloky protažené až 3 mm široké, rostoucí volně nebo se překrývající. Sorály okrajové, zřídka na koncích laloků, obvykle bělavé barvy. Spodní strana stélky černá nebo tmavě hnědá. Rhiziny jsou časté a štětkovité. Horní kůra skleroplektenchymatická, dřeň je bílá, spodní kůra prosoplektenchymatická. Apothecia vzácná, spory velikosti 27-32 x (13)16-20 µm.

Ekologie a rozšíření:

Druh široce rozšířen v Eurasii a severní Americe, převážně severské a kontinentální oblasti, s centrem rozšíření v boreální zóně, vyhledává opadavé dřeviny *Acer*, *Salix*, *Populus*, *Sorbus* a *Picea* jejichž borku porůstá, občas se vyskytuje na skalách nebo mechu. (Vitikainen 1968, Ahti et al. 2002)

1.4.3 *Physconia distorta* (With.) J. R. Laundon

Morfologie:

Stélka kruhovitě nepravidelná, velmi variabilní ve velikosti, dosahující až 15 cm, uprostřed může být hrbolatá až bradavčitá, šedavě hnědá až tmavě hnědá, s bílou pruinou. Laloky široké do 4 mm, často se překrývající, spodní strana stélky černá, na koncích laloků hnědá. Rhiziny jsou časté a štětkovité. Horní kůra skleroplektenchymatická, spodní kůra prosoplektenchymatická. Apothecia se často vyskytují, do 5 mm velká, velikost spor (26)27–37(39) x (14)15-19(21) µm. Dřeň a kůra K-.

Ekologie a rozšíření:

Široce rozšířený druh – Evropa, Afrika, Asie a Austrálie. Vyhledává světlé habitaty, kde roste na bazické nebo na živiny bohaté kůře, může se vyskytovat i na místech hnízdění ptáků. V severních oblastech se může vyskytovat na mechem porostlých skalách.

1.4.4 *Physconia enteroxantha* (Nyl.) Poelt

Morfologie:

Stélka nepravidelného tvaru, do 5 cm průměru, často prorůstající jedna s druhou, šedavě hnědá až tmavě hnědá, obvykle pokryta bílou pruinou. Laloky až 3 mm široké, často překrývající se, občas se odstávajícími konečky. Okrajové sorály žlutavé barvy.

Spodní strana hnědavá až občas dočerna, na koncích laloků může být bělavá. Rhiziny četné, tmavě černé a štětkovité. Dřeň žlutá, horní kůra pseudoparenchymatická. Apothecia velmi vzácná do 3 mm šířky, okrajová občas sorédiosní. Spory velikosti (25)28-37 x 16-21 μm . Kůra K -, dřeň K + žlutá, neidentifikovaná látka na TLC.

Ekologie a rozšíření:

Druh je široce rozšířen v Evropě od Kanárských ostrovů až po Ural, v Severní Americe je nejvíce rozšířen na západním pobřeží. Záznamy o výskytu jsou i z Himálají. Druh roste na otevřených stanovištích na živiny bohaté nebo eutrofizované kůře. Upřednostňuje hlavně dřeviny *Acer*, *Populus*, *Fraxinus*, *Ulmus*, *Salix*, *Malus*, *Pyrus*, *Juglans*, *Cerasus*, *Sambucus*, *Tilia*, *Fagus*, v jižní části výskytu se nachází i na *Quercus* a *Olea*, v Himálajích je zaznamenán na *Picea* a *Pinus*.

1.4.5 *Physconia grisea* (Lam.) Poelt

Morfologie:

Stélka okrouhlého tvaru do 8 cm šířky, často prorůstající se s ostatními stélkami, šedá nebo hnědošedá, pokrytá bílou pruinou. Laloky často vystoupavé, 3 mm široké, rozšiřující se na koncích. Okrajové nebo plošné sorály občas pokrývající střed stélky. Spodní strana bělavá, ve starších částech dohněda. Rhiziny jednoduché, postupně černající, často lesklé. Horní kůra skleroplektenchymatická, dřeň bílá, spodní kůra prosoplektenchymatická nezřetelně oddělena od dřene. Apothecia přítomná do 3 mm šířky, pruinózní. Spory velikosti 27-34 x 14-17 μm . Dřeň K -, 4 neidentifikované látky na TLC.

Ekologie a rozšíření:

Výskyt druhu je omezen na Evropu, pohoří Atlas v Severní Africe a Blízký východ. Druh vyhledává temperátní a mediteránní klima. Záznamy o výskytu z ostatních zemí jako je Amerika, Grónsko, Nový Zéland a Tasmánie považují někteří autoři za nevěrohodné (Otte et al. 2002). *P. grisea* roste na živiny bohaté borce opadavých stromů *Ulmus*, *Juglans*, *Acer*, *Pyrus*, *Malus*, *Populus*, *Salix*, *Tilia*; může růst i na vápnatých skalách nebo nevápнатých eutrofizovaných skalách.

1.4.6 *Physconia isidiomuscigena* Essl.

Morfologie:

Stélka nepravidelného tvaru, šedohnědá až tmavohnědá, až 11 cm v průměru. Stélky se občas mohou mezi sebou prorůstat. Laloky nepravidelné a často se překrývající, 2-4 mm široké, obvykle na koncích zřetelně konkávní a odstávající. Sorédie/izídie se tvoří na okrajích laloků, později se tvoří plošné sorály, zpočátku vypadají propagule jako hrubé sorédie, později vypadají spíše jako izídie či blastidie. Dřeň je bílé barvy, občas může být lehce žlutá. Spodní strana světlá, postupně ke středu tmavne až černá. Rhiziny jsou černé a štětkovité. Horní kůra je paraplektenchymatická, spodní kůra nepravidelně prosoplektenchymatická. Apothecia nepřítomna. Medula obvykle K -, občas může být K + se světle žlutou reakcí. Stélka může obsahovat kys. variolarovou, často se stopami kys. sekalonové A.

Ekologie a rozšíření:

Ekologie výskytu je velmi podobná druhu *P. muscigena*, obvykle roste na mechu nebo vranečku, občas přechází na kůru, druh roste v jižní části Skalistých hor v USA (Arizona, Kalifornie, Colorado, Utah).

1.4.7 *Physconia muscigena* (Ach.) Poelt

Morfologie:

Stélka je nepravidelného tvaru, přitisklá k substrátu, šedá až šedohnědá, matná, většinou pokrytá pruinou. Většinou do velikosti 5 cm v průměru. Často špatně rozeznatelná od ostatních stélek, s kterými se přerůstá. Laloky velmi variabilní velikosti, široké do 3 mm, okrajové laloky občas širší. Konečky laloků obvykle vystoupavé. Na stélce se mohou tvořit oblasti s četnými zvednutými lalůčky. Spodní strana hnědá až černá, na konci lalůček světlejší. Rhiziny černé a štětkovité. Horní kůra je paraplektenchymatická, spodní kůra plektenchymatická. Dřeň bílá, apothecia občas přítomná, různého průměru do 5mm, obvykle s okrajovým lalokem. Spory velikosti 23-32(35) x 12-16 µm.

Popsané formy:

Physconia muscigena f. lenta (Ach.) Wain.

- historické lokality v ČR – Jeseníky: Petrovy kameny; CHKO Pálava: Pavlovské vrchy

- stélka silně pruinozní, laloky poměrně široké, konvexní či konkávní, okraje ohnuté nahoru, rhiziny na okrajích málo výrazné

***Physconia muscigena f. isidiata* Lynge**

- historické lokality v ČR – Jeseníky: Petrovy kameny
- stélka pruinozní, poměrně široké laloky, na svrchní straně pokryté krátkými izídiemi

***Physconia muscigena f. squarosa* (Ach.) Lynge**

- historické lokality v ČR – Jeseníky: Petrovy kameny; CHKO Pálava: Pavlovské vrchy; Praha: Butovice
- stélka málo pruinozní, téměř holá, užší vystoupavé laloky, okraje laloků s dlouhými výraznými, řídkými rhiziny; nejčastěji zastoupená forma v naší zemi, hlavně na Moravě a Slovensku

***Physconia muscigena f. alpina* Nádv.**

- historické lokality v ČR – Jeseníky: Petrovy kameny
- laloky velmi úzké, větvené, ploché a přitisklé k substrátu, nepřekrývající se, silná bílá pruina, vzhledem připomíná *P. distorta f. superfusa*.

Ekologie a rozšíření:

Terikolní lišejník vyhledávající otevřené a slunné habitaty (obr. 2 a 3). Centrum výskytu je arktická a boreální zóna kolem obou pólů. Dále se nachází ve stepích centrální Asie (Ahti et al. 1973, Makarova et Katenin, 1983, Chen et Hu 2003), v temperátní zóně se většinou vyskytuje ve vyšších nadmořských výškách, kde slábnou konkurence stromů a ostatních rostlin. Druh je znám i z východní Afriky z výšek 3-5 tisíc metrů nad mořem (Swinscow et Krog 1988) a Jižní Ameriky (Flakus et al. 2012). *P. muscigena* nejčastěji porůstá mech a rostlinné zbytky. Udávané historické lokality v ČR - Praha: Butovice, Chuchle, Radotín, Motolský vrch; Jeseníky: Petrovy kameny; CHKO Pálava: Pavlovské vrchy.



Obr. 2: Typický zástupce *P. muscigena* rostoucí na mechu v CHKO Pálava, vyznačené měřítko má 1 cm. (foto: D. Svoboda)



Obr. 3: Vystupující vápencová skalka uprostřed teplomilného trávníku v CHKO Pálava s hojnou populací *P. muscigena*. (foto: D. Svoboda)

1.4.8 *Physconia perisidiosa* (Erichsen) Moberg

Morfologie:

Stélka nepravidelného nebo kulatého tvaru, nejčastěji do 4 cm průměru. Obvykle srostlá s ostatními stélkami. Hnědé až tmavě hnědé barvy, obvykle lesklá, pokrytá hustou bělostnou pruinou. Dlouhé úzké laloky až 3 mm široké, v některých případech mohou být i krátké a úzké do 1 mm, vystoupavé. Sorály po okrajích mají bílou až světle šedou barvu, můžou na konci laloků přecházet v rtovitý sorál, příležitostně se ve středu stélky mohou tvořit izidiím podobné propagule. Spodní strana stélky je světlá, konečky laloků až bělavé, do středu přechází v hnědou. Dřeň je bíle barvy. Apothecia jsou přítomna pouze vzácně, po okrajích stélky. Spory velikosti $(24)28-35 \times 1-21 \mu\text{m}$. Dřeň a kůra K -.

Ekologie a rozšíření:

Druh široce rozšířen na severní polokouli, dále ve vysokých horách východní Afriky (Swinscow et Krog, 1988) a antarktické zóně Jižní Ameriky, jedná se hlavně o epifyt na živiny bohaté borce *Fraxinus*, *Populus*, *Ulmus*, *Juglans*, *Malus*, *Acer*, *Tilia*, *Salix*; v Jižní Americe porůstá *Nothofagus* a *Cryptomeria*. Občas může růst také na skalách nebo mechu.

1.4.9 *Physconia rossica* Urbanav.

Morfologie:

Stélka je oválného nebo nepravidelného tvaru, velikosti 2-4 cm v průměru, volně přitisknuta k substrátu, šedé až šedohnědé barvy, pokrytá pruinou. Laloky jsou rovné a dlouhé 0,7-1,2 mm, ploché. Sorály obvykle na koncích občas plošně po stélce. Spodní strana bílá až světle hnědá. Rhiziny jsou málo četné, jednoduché nebo lehce štětkovité. Horní kůra skleroplektenchymatická, dřeň bílá a spodní kůra prosoplektenchymatická. Apothecia vzácná 1-2 mm v průměru. Spory velikosti $26,5-30 \times 11,7-13,3 \mu\text{m}$. (Lohtander et al. 2007, Urbanavichus 2008).

Ekologie a rozšíření:

Druh se vyskytuje nejčastěji mechu rostoucím na zemi nebo skále. Preferuje otevřené habitáty s dostatkem světla. Častý výskyt ve vápencových biotopech. Široce rozšířen v horských regionech Sibiře, včetně náhorní plošiny Putorana v Krasnojarské oblasti, dále v Jakutsku, v Burjatsku, v Magadanské oblasti, v pohoří Sajany ve Střední Asii a v pohoří Ural v Baškortostánu.

1.4.10 *Physconia venusta* (Ach.) Poelt

Morfologie:

Stélka lupenitá až růžicovitá, do velikosti 10 cm. Laloky spíše úzké, 0,5-1 (1,5) mm široké, placaté, na okrajích se nepřekrývající, ve středu se mohou přerůstat, s adventivními lalůčky. Svrchní strana šedé až šedohnědé barvy, většinou pokrytá pruinou, spodní strana světlá bělavá. Dřeň bílá. Rhiziny jsou černé a štětkovité. Horní kůra je skleroplektenchymatická nebo nepravidelně prosoplektenchymatická, spodní kůra paraplektechymatická, na konci lalůček špatně vyvinuta. Apothecia velice častá 1-2,5(4) mm, hnědé barvy, pokryté pruinou nebo bez, obvykle s okrajovými lalůčky 1-1,2(2) mm. Spory velikosti 30-38(40) x (11)14-18(20) μm . (Andreev et al. 2008).

Ekologie a rozšíření:

Druh rostoucí pouze v mediteránní oblasti Evropy, Afriky a Asie. Vyhledává stanoviště s vlhčím klimatem. *P. venusta* roste nejčastěji jako epifyt na borce stromů, často vyhledává dubové lesy nebo olivové sady. Hojná je i v pralesovitých bučinách v Balkánských horách (D. Svoboda, os. sděl.).

2 Metodika

2.1 Revize herbářového materiálu a vlastní sběry

Prvním cílem bylo získat přehled o historických lokalitách i o historických sběrech *P. muscigena* našem území i v herbářových sbírkách. Z tohoto důvodu jsem navštívil všechny velké herbářové sbírky v ČR a zapůjčil si dostupné sběry. Studované herbářové položky pocházely z českých i zahraničních herbářů nebo od soukromých sběratelů – PRA, PRM, PRC, H, GZU, UPS, BRNM, BP, UBC, UCR, OLM, Jiří Malíček, Zdeněk Palice, David Svoboda, Ondřej Peksa, Jan Vondrák a Josef Halda. Revizi herbářového materiálu jsem prováděl na stereomikroskopu Leica E24. Během revize jsem pozoroval stélkovou morfologii a prováděl chemické reakce s činidlem K (10% roztok hydroxidu draselného) připraveného podle práce Smith et al. (2009). Srovnávací morfologii jsem prováděl podle klíčů Moberg (1977), Esslinger (2000), Ahti et al. (2002), Lohtander et al. (2007).

Čerstvý materiál, nezbytný pro molekulární část práce, jsem získal při ověřování historických lokalit a kontrole velikostí tamních populací v letech 2014 až 2016. Navštívil jsem udávané historické lokality v České republice a vybrané lokality na Slovensku. Na lokalitách jsem zaznamenával orientaci svahu, na kterém stélka rostla a doprovodné druhy terikolních lišejníků. Dokladový materiál je uložen v herbáři katedry

botaniky PřF UK v Praze (PRC). Další čerstvý materiál byl zapůjčen ze zahraničních herbářových sbírek. Čerstvý materiál jsem určoval stejnými postupy jako herbářový.

2.2 Tenkovrstvá chromatografie

Všechny herbářové i čerstvé položky jsem testoval na přítomnost sekundárních metabolitů obsažených ve stélce pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC). Metoda TLC umožňuje detekovat přítomnost sekundárních metabolitů, které vznikají jako produkty metabolismu mykobionta a v mnoha případech jsou druhově specifické. Během TLC jsem vzorek lišejníkové stélky vylouhoval v acetonu. Následně jsem roztok nanesl na skleněné desky pokryté tenkou vrstvou silikagelu (MERCK, TLC silicagel 60 F₂₅₄). Jako standard pro orientaci mezi metabolity jsem používal druh *Cladonia symphy carpia* (Flörke) Fr., která obsahuje atranorin a kyselinu norstiktovou. Desky s nanesenými vzorky jsem umístil do chromatografických van s připravenými roztoky rozpouštědel. Používal jsem roztok A (180 ml toluen + 45 ml 1,4-dioxan + 5 ml kyselina octová) a roztok C (170 ml toluen + 30 ml kyselina octová). V chromatografických vanách došlo k vzlínání rozpouštědla, které unášelo jednotlivé metabolity po TLC desce. Desky jsem vždy vyndal dříve, než rozpouštědlo dosáhlo úplného vrcholu desky. Po oschnutí jsem desku potřel 10% roztokem kyseliny sírové a zahříval. Během tohoto procesu jsem pozoroval barevné pigmenty jednotlivých metabolitů pod denním světlem nebo UV záření různých délek. Podrobnější metodiku a přehled určování zjištěných metabolitů je možné nalézt v práci Orange et al. (2001). Analýzy jsem prováděl v TLC laboratoři na Katedře botaniky PřF UK v Praze.

2.3 Molekulární analýzy

2.3.1 Izolace DNA

K izolaci DNA jsem používal herbářový materiál a vlastní sběry z České republiky a Slovenska. Všechny použité herbářové položky byly mladší 15-ti let. K izolaci jsem používal dva až tři koncové lalůčky stélky. DNA jsem extrahoval pomocí NaOH následovně (Werner et al. 2002):

1. vzorek byl pomocí wolframových kuliček 2 minuty drcen v drtičce (Retsch MM 400) 30 kmitů/s
2. následně byl přidán roztok 0,5M NaOH, následovalo 30 sekund drcení,
3. následně byl roztok 3 minuty centrifugován při x otáčkách
4. roztok odsán a naředěn 200 μ l TRIS (2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol)

Vzorky pro následnou amplifikaci genu kódujícího translační elongační faktor 1 α (TEF1) jsem izoloval pomocí komerčního kitu Invisorb Spin Plant Mini Kit (Stratagene molecular) při izolaci jsem se řídil pokyny výrobce uvedenými v příloženém návodu. Izolovanou DNA jsem dále používal k amplifikaci studovaných genů a následné sekvenační analýze. Kvalita získané DNA jsem kontroloval na spektrofotometru Nanodrop ND-1000.

2.3.2 Amplifikace studovaných genů

K rekonstrukci fylogenetických stromů jsem použil tři úseky - ITS rDNA, mtSSU a TEF1. Primery pro amplifikace jednotlivých úseků jsou uvedeny v tabulce 1. Reakční směs na PCR měla objem 20 μ l - obsahovala 1 μ l templátové DNA; 0,4 μ l každého z dvojice primerů (25 pmol/ μ l); 0,2 μ l MyTaq HS Red DNA polymerázy (Bioline) a 4 μ l MyTaq Red pufru (MyTaq Bioline), objem byl doplněn deionizovanou vodou (14 μ l). Amplifikaci jsem prováděl v termocykleru Mastercycler Gradient (Eppendorf).

Parametry amplifikace pro ITS rDNA a mtSSU:

1. počáteční denaturace: 60 s při 95 °C
2. Elongace (35 cyklů): 30 s při 95 °C, 30 s při 56 °C a 60 s při 72 °C
3. Finální elongace: 7 minut při 72 °C

Parametry pro TEF 1 (Rehner 2005):

1. počáteční denaturace: 60 s při 95 °C
2. Elongace: [60 s při 95 °C, 30 s při (66°C \rightarrow 56 °C při každém kroku snížena teplota o 1°C) a 90 s při 72°C] 10 cyklů, [60 s při 95 °C, 30 s při 56 °C a 90 s při 72°C] 32 cyklů
3. Finální elongace: 10 minut při 72°C

Výsledné produkty PCR jsem nanášel na elektroforetický gel (1% agarózový gel, 0,5 μ g ethidium bromidu, oboje od HiMedia), kde došlo k vizualizaci produktů a kontrole jejich délek k standardnímu markeru O'GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Přečištění produktů jsem prováděl metodou etanolového přesrážení podle následujícího postupu:

1. K 17 μ l produktu jsem přidal 2 μ l NaOAc a 50 μ l 96 % etanolu
2. Směs jsem promíchal, lehce stočil na centrifuze při 490 otáčkách za minutu (RPM) a nechal inkubovat 10 minut při laboratorní teplotě
3. Směs jsem centrifugoval 30 minut při 13 200 RPM a teplotě 22 °C

4. Supernatant jsem vylil a k precipitátu přidal 100 µl 70 % etanolu
5. Směs jsem centrifugoval 10 minut při 13 200 RPM, supernatant jsem následně vylil
6. Precipitát jsem umístil do termobloku na 5-10 minut při 65 °C, kde následně došlo k odpaření zbytkového etanolu a vysušení

Tab. 1: Primery použité k amplifikaci fragmentů studovaných genů.

oblast amplikonu	primer	pozice	sekvence (5'-3')	zdroj
ITS rDNA	ITS 1F	forward	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes et Bruns 1993
	ITS 4	revers	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. 1990
mtSSU	SSU 1	forward	AGCAGTGAGGAATATTGGTC	Zoller et al. 1999
	SSU 3	revers	ATGTGGCACGTCTAT	Zoller et al. 1999
TEF1	EF 983	forward	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT	Carbone et Kohn 1999
	EF 2218	revers	ATGACACCRACRGCACRGTGTG	Carbone et Kohn 1999

Přečištěné produkty jsem sekvenoval pomocí jednoho z primerů použitých pro amplifikaci. Sekvenační analýza byla provedena v Laboratoři sekvence DNA biologické sekce PŘF UK, na kapilárním sekvenátoru ABI 3100 Avant Genetic Analyzer.

Získané sekvence jsem kontroloval a upravoval v programech Bioedit 7.2.5 (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) a FinchTV (<http://www.geospiza.com>). Primární alignmenty jsem vytvořil v programu MEGA6 s pomocí algoritmu Muscle. Program MEGA6 následně vypočítal a doporučil nejvhodnější modely pro další fylogenetické analýzy.

K vytvoření fylogenetických stromů a doprovodných analýz jsem používal programy MEGA6 (Tamura et al. 2013), MrBayes 3.2.2 (Ronquist et al. 2012), FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) a FaBox (Villesen 2007).

3 Výsledky

3.1 Revize herbářového materiálu

Celkem jsem revidoval 245 herbářových položek *Physconia muscigena* pocházejících z 23 různých států. Z území České republiky pochází 43 herbářových dokladů (příloha 1). Během revize jsem zjistil, že *P. muscigena* se nevyskytovala na lokalitách Budkovické slepence u Moravského Krumlova, Kožichovický žleb u Třebíče a lokalitě Louka – Klášter ve Znojmě. Jednalo se o špatně určený materiál a všechny položky shodně patřily k druhu *Physconia grisea*.

3.2 Současný stav populací

Studiem herbářového materiálu a rešerší literatury jsem shromáždil informace o historických lokalitách výskytu *P. muscigena* a *P. bayeri* v České republice (tab. 2). Během roků 2014 až 2016 jsem postupně všechny udávané lokality navštívil a pokusil se ověřit stav zde rostoucích populací. Z původních 6 lokalit se 3 nacházely na současném území Prahy; 2 lokality byly na Moravě a poslední v CHKO Jeseníky ve Slezsku. Pro srovnání jsem vybral i dvě nížinné a dvě vysokohorské historické lokality na Slovensku (tab. 2).

Tab. 2: Současné a historické lokality *P. muscigena* v České republice a na Slovensku

historická lokalita	herbářové doklady	současný výskyt
<i>P. muscigena</i>		
CHKO Jeseník, Petrovy kameny	Suza 1928, Buček 1944,	ano
CHKO Pálava, Pavlovské vrchy	Suza 1920, Kovář 1906	ano
Praha, Butovice	Černoorský 1921, 1943	ano
Praha, Motol	Bayer 1918	ne
Praha, Radotín	Bayer 1892, 1902	ne
<i>P. bayeri</i>		
Dolní Kounice - Nové Bránice	Buček 1943*	ne
Praha, Butovice	Černoorský 1931	ano
Praha, Motol	Servít*	ne
Praha, Radotín	Bayer*	ne
lokality Slovensko		
<i>P. muscigena</i>		
Belianské Tatry - Muráň, Havran	Suza 1923, 1929	ano
Demänovská dolina, Siná	Suza 1934	ano
Spišské Podhradie, NPR Dreveník	Suza 1939	ano
Spišské Podhradie, Spišská kapitula	Suza 1938	ne

* zdroj Nádvorník 1947

V současné době se *P. muscigena* vyskytuje pouze na třech lokalitách v ČR. Jedná se to tyto lokality:

3.2.1 Praha – Butovice (300 m n. m.)

Lokalita je situována na západním okraji Prahy v přírodní rezervaci Prokopském údolí. Jedná se o diabasové skalky se stepní vegetací. *P. muscigena* se zde nachází na dvou mikrolokalitách – Hemrovy skály a lom Kačnů. Hemrovy skály (50°02'39.8"N 14°20'40.3"E) jsou nejbohatší pražská lokalita na studovaný druh, našel jsem zde 7 stélek. Stélky rostly na jihozápadně orientované kamenné skalce na mechu. Druhá mikrolokalita se nachází v lomu Kačnů (50°02'47.6"N 14°21'49.9"E), kde jsem po dlouhém hledání našel pouze jednu stélku. Lom tvoří diabasy, břidlice a vápence a je dlouhou dobu opuštěný. *P. muscigena* rostla na svahu se severozápadní orientací. Vzhledem k velkému zarůstání lomu náletovými dřevinami a okolními stromy se lokalita stává pro růst lišejníku nevhodnou. *P. muscigena* má vysoké požadavky na osvětlenost svého habitatu a není schopná konkurovat zapojené vegetaci.

3.2.2 CHKO Jeseníky – Petrovy kameny (1446 m n. m.)

Petrovy kameny jsou až 7 metrů vysoké skály složené z fylitů obohacených vápencem, nacházejí se uprostřed alpské louky a představují třetí nejvyšší vrchol v pohoří Hrubý Jeseník (50°04'06.5"N, 17°14'01.4"E). Na této velice botanicky významné lokalitě přežívá velké množství vzácných lišejníků a mechorostů. Na lokalitě jsem našel pouze jednu stélku. Stélka rostla na mechu asi 2 metry nad zemí s orientací k jihozápadu. Během mapování lichenoflóry Petrových kamenů bylo na lokalitě přítomno dalších 5 lichenologů a je tak velice pravděpodobné, že více stélek se zde nenachází. Výskyt byl potvrzen 69 let od posledního herbářového dokladu Šmardy z roku 1947. Petrovy kameny jsou naše jediná lokalita, kde se *P. muscigena* vyskytuje nad hranicí lesa.

3.2.3 CHKO Pálava – Pavlovské vrchy (450 m n. m.)

Pavlovské vrchy jsou vápencové pohoří nacházející se na jižní Moravě. i přes svou malou výšku tvoří dominantu místní krajiny. Pohoří je tvořeno druhohorními vápenci, které byly vyzvednuty při alpínské vrásnění. Celá oblast spadá do Panonského termofytika. Vyskytuje se zde mnoho unikátních druhů rostlin i živočichů pro ČR, které jsou vázané na biotopy skalních stepí a teplomilných trávníků. *P. muscigena* se zde vyskytuje v NPR Děvín – Kotel – Soutěska na skalkách vystupujících z trávníků (48°51'47.5"N 16°38'00.4"E). Jedná se o naši nejbohatší lokalitu, stélek je zde velké množství a oproti ostatním lokalitám jsou zde vitální a velcí jedinci.

3.2.4 Zaniklé lokality

Ověřování výskytu *P. muscigena* na lokalitách Motol a Radotín v Praze ani na lokalitě Dolní Kounice – Nové Bránice poblíž Brna nebylo úspěšné.

Podle herbářových dokladů na lokalitách Motol a Radotín opravdu Edvin Bayer sbíral. Z roku 1918 pochází od Bayera dvě položky *P. muscigena* z Motolského vrchu (PRM 851305, PRM 851331), na schedě uvádí popis „Motolský vrch, jižní stráně nahore, 22. 8. 1918“. V popisu je také uvedeno, že v Motole sbíral Servít, ale jeho herbářové položky se mi nepodařilo nikde dohledat. V roce 1918 byl Motol malá vesnička u Prahy. V dnešní době je téměř celé území zastavěno a z původních biotopů a lokalit mnoho nezbylo, vzhledem k nehostinným a zemědělsky nevhodným suchým výchozům se jednalo převážně o pastviny, vyjma hlavních výchozů, dnešních PP Kalvárie v Motole na obou stranách Plzeňské silnice (dnes ul. Plzeňská). Žádné pozdější herbářové nálezy z této lokality jsem už nenalezl.

Herbářové doklady z Radotína pochází také pouze od Bayera. Ten zde sbíral dvakrát v letech 1892 a 1902 (PRM 851304, PRM 851307). Na obou položkách je shodně uvedeno „na vápenitých nejvyšších hřbetech na mechu někde za Radotínem“. Podle popisu není možné přesněji určit místo sběru. Jisté ale je, že kolem roku 1900 mohlo být v okolí Radotína dostatek vhodných stanovišť pro růst *P. muscigena*. Z historických fotografií a záznamů vyplývá, že okolí bylo plné skalek a výchozů, kde by lišejník mohl růst. Vápnité podloží a přítomnost pastvin umožňovalo růst teplomilných trávníků bez zarůstání křovinami a následně lesní vegetací. Zejména v poválečném období se ale pásť přestává a místní lokality zarůstají vegetací. Zároveň zde nabírá intenzitu těžba vápence a sliveneckého mramoru, s tím souvisí znečištění okolí prachem z místních lomů a emisemi z Radotínské cementárny a přidružených provozů. Se změnou využívání tohoto území přišel i zánik Radotínských lokalit.

Lokalitu Dolní Kounice – Nové Bránice jihozápadně od Brna uvádí Nádvorník v popisu *P. bayeri* s dokladem od Bučka z roku 1943. Herbářový doklad této položky se mi nepodařilo dohledat v českých ani moravských herbářích. Jednalo-li se skutečně o *P. muscigena* není možné ověřit ani blíže specifikovat, kde by se měla lokalita nacházet. V okolí Dolních Kounic se nacházejí silikátové (PP Červené stráně) a granodioritové skály, které jsem v roce 2015 navštívil. Terčovník se mi nalézt nepodařilo, ani se zde nevyskytují společenstva, ve kterých se *P. muscigena* obvykle vyskytuje.

3.3 Stanovištní charakteristiky a doprovodné druhy

Při ověřování výskytu na historických lokalitách jsem zaznamenával expozici svahu, geologii podloží a nadmořskou výšku lokalit, kde se vyskytovala *P. muscigena* (tab. 3). Zároveň jsem zaznamenával i druhy doprovodných terikolních lišejníků nacházejících se v nejbližším okolí (tab. 4).

Tab. 3: Stanovištní charakteristiky jednotlivých navštívených lokalit

lokality	nadmořská výška	podloží	expozice svahu	GPS souřadnice
Česká republika				
Butovice, Hemrovy skály	300	diabas	JZ	50°02'39.8"N 14°20'40.3"E
Butovice, lom Kačnů	300	diabas	Z	50°02'47.6"N 14°21'49.9"E
Pavlovské vrchy	450	vápenec	J, JZ, JV, Z	48°51'47.5"N 16°38'00.4"E
Petrovy kameny	1446	fylit	JZ	50°04'06.5"N 17°14'01.4"E
Slovensko				
Belianské Tatry - Muráň, Havran	1800-2100	vápenec	JZ, Z, V	49°14'56.0"N 20°11'22.3"E
Demänovská dolina, Siná	1550	vápenec	JZ, JV	49°00'01.9"N 19°33'16.8"E
Spišské Podhradie, NPR Dreveník	600	travertin	JZ, Z	48°58'56.4"N 20°46'41.1"E

Z nasbíraných dat je patrné, že *P. muscigena* se vyskytuje na dobře osluněných svazích nebo ploškách skal. Na většině studovaných míst preferovala převážně jihozápadní expozici, ale lze ji najít i na rovných plochách osluněných ze všech stran. Nejméně jedinců se vyskytovalo na místech s orientací k západní straně. Na severně orientovaných stanovištích se lišejník nevyskytoval vůbec. i když *P. muscigena* neroste přímo na podkladu, ale porůstá mechorosty, preferuje substráty s vysokým zastoupením vápnitých složek. Složení podložního substrátu se projevuje i na druhovém složení terikolních lišejníků rostoucích v nejbližším okolí. Ty často náležejí do společenstev vápencových skal a teplých stepních trávníků, či do arкто-alpinských vysokohorských druhů (např. *Dactylina arctica*).

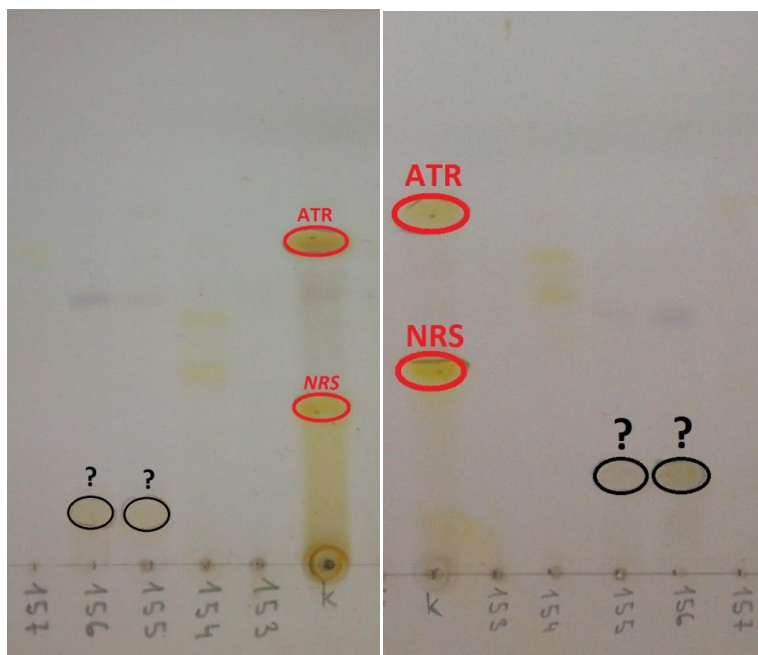
Tab. 4: Doprovodné druhy terikolních lišejníků rostoucích v blízkém okolí

Doprovodné druhy
<i>Agonimia tristicula</i> (Nyl.) Zahlbr.
<i>Bacidia bagliettoana</i> (A.Massal. & De Not.) Jatta
<i>Caloplaca ammiospila</i> (Wahlenb.) H. Olivier
<i>Caloplaca stillicidiorum</i> (Vahl) Lynge
<i>Cladonia foliacea</i> (Huds.) Willd.
<i>Cladonia pocillum</i> (Ach.) Grognot

Cladonia symphy carpia (Florke) Fr.
Collema crispum (Hudson) Weber ex F. H. Wigg.
Collema tenax (Sw.) Ach.
Dactylina arctica (Richardson) Nyl.
Diploschistes muscorum (Scop.) R. Sant.
Lecanora epibryon (Ach.) Ach.
Lecanora saxicola (Schreber) Rabenh
Leptogium pulvinatum (Hoffm.) Otálora
Mycobilimbia lobulata (Sommerf.) Hafellner
Peltigera rufescens (Weiss) Humb.
Placidium squamulosum (Ach.) Breuss
Placynthiella icmalea (Ach.) Coppins & P. James
Squamarina cartilaginea (With.) P. James
Toninia sedifolia (Scop.) Tindal

3.1 Tenkovrstvá chromatografie - TLC

Metodou TLC jsem analyzoval 240 herbářových položek *P. muscigena* sbíraných od roku 1902 do současnosti. U 138 položek se mi podařilo objevit nový metabolit, který se zatím nepodařilo určit (obr. 4). Předpokládám, že se jedná o zcela novou látku, jelikož se neshoduje s žádným z běžně užívaných standardů. Podle chování látky v průběhu TLC se nejedná o mastnou kyselinu ani o terpenoid. V literatuře někdy uváděnou sekalonovou kyselinu A (Otte et al. 2002) se mi na TLC prokázat nepodařilo.



Obr. 4: Nově objevený metabolit při TLC. Vlevo použit solvent C a vpravo solvent A. (ATR – atranorin, NRS – kyselina norstiktová)

3.2 Molekulární analýzy

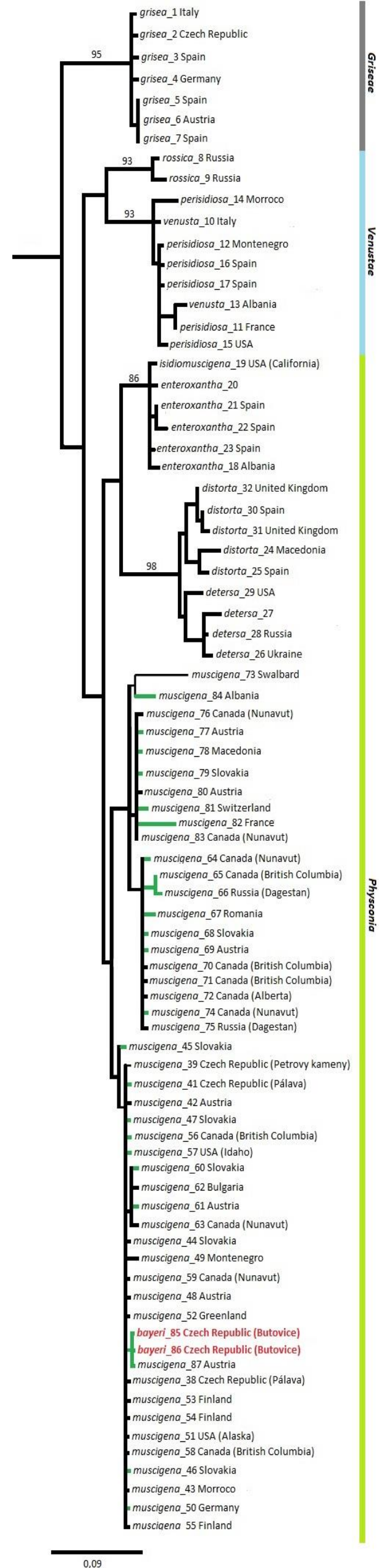
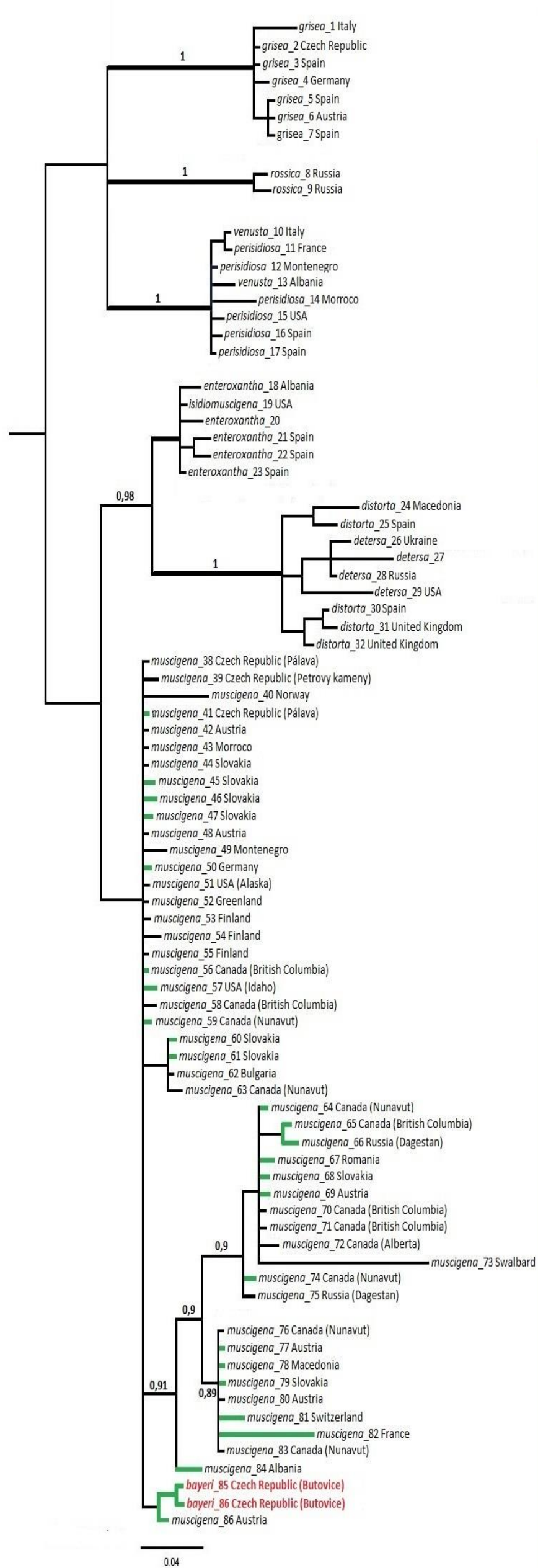
Podářilo se mi získat sekvence ze tří úseků – ITS rDNA, mtSSU a TEF1. Jedná se o sekvence z 87 položek rodu *Physconia* (tab. 5) z toho 123 sekvencí patří *P. muscigena* a 5 sekvencí *P. bayeri*. Pro konstrukci fylogenetických stromů jsem použil i sekvence dostupné z databáze GenBank. V případě genu pro elongační faktor (TEF1) se povedlo poprvé nasekvenovat zástupce z rodu *Physconia*. Jako outgroup byl u všech modelů použit blíže příbuzný rod *Anaptychia*.

3.2.1 ITS rDNA

K rekonstrukci fylogenetického stromu pro ITS rDNA jsem použil celkem 84 sekvencí, z toho bylo 48 od druhu *P. muscigena* a dvě od *P. bayeri*. Využito bylo 467 pozic. Bayesovskou analýzu dat jsem provedl v programu MrBayes v. 3.2 (Ronquist et al 2012) pomocí evolučního modelu SYM G + I (symmetrical model, Zharkikh 1994; s využitím gamma rozdělení a invariabilními pozicemi). Analýza běžela 10 milionu generací, zaznamenáván byl každý tisíc strom. Výsledná konvergence dosáhla 0,004. Jako „burnin“ bylo odstraněno prvních 25 % stromů. Výsledný strom jsem editoval v programu FigTree (obr. 5). Pro srovnání jsem použil i program Mega6, kde byl stejný dataset analyzován metodou Maximum Likelihood (Tamura et al. 2011) s 5000 bootstrapy, model jsem použil Kimurův dvou parametrový model (K2P) s využitím gamma rozdělení a invariabilními pozicemi (obr. 5).

Z výsledných dat je patrná vysoká vnitrodruhová variabilita druhu *P. muscigena*. Mezi 50 vzorky se nachází 34 různých haplotypů (Villesen 2007). Zároveň je druh velice dobře vymezen. Dovnitř málo podpořené linie s druhem *P. muscigena* spadá i druh *P. bayeri*, který se na základě ITS rDNA nedá odlišit. Po vyznačení přítomnosti sekundárního metabolitu a geografické příslušnosti jednotlivých vzorků nelze ve vnitřní architektuře linie *P. muscigena* nalézt žádnou zákonitost, která by tuto topologii vysvětlovala.

Další výsledky ukázaly, že *P. venusta* a *P. perisidiosa* tvoří společně jednu vysoce podpořenou monofyletickou skupinu. Tyto druhy nemají na základě ITS rDNA žádnou podporu jako samostatné druhy. Tento jev se objevuje i v jiných fylogenetických studiích (Cubero et al. 2004, Lohtander 2007, 2008; Divakar et al. 2007), ale nikde není diskutován ani objasněn.



Obr. 5: Fylogenetické stromy úseku ITS rDNA vytvořené Bayesovskou metodou (vlevo) a metodou Maximul Likelihood (vpravo). Zobrazeny pouze posteriorní pravděpodobnosti a bootstrapové podpory vyšší než 85 %. Číselné označení položek viz tabulku 5. Jako outgroup je použit rod *Anaptychia*. Členění na sekce podle práce Lohtander et al. 2007. Zeleně označené větve obsahují nově nalezený metabolit.

Tabulka 5: Seznam použitých položek pro molekulární studii, informace o lokalitě sběru a herbářových položkách. Přiřazená čísla odpovídají položkám ve výsledných fylogenetických stromech (herb. – zkratka herbáře, kde je položka uložena).

no.	Physconia	herb.	sběratel	GenBank	lokalita
1	<i>grisea</i>	JM	Malíček 7419		Italy, Sicily, Cesaro
2	<i>grisea</i>	PRC	Starosta		Czech Rep., Moravský Krumlov
3	<i>grisea</i>			KC559094	Spain
4	<i>grisea</i>			AF540524	Germany
5	<i>grisea</i>			AY368128	Spain
6	<i>grisea</i>			AY368127	Austria
7	<i>grisea</i>			AY368126	Spain
8	<i>rossica</i>	PRA	Vondrák 14139		Russia, Dagestan, Gergebil, Gunib
9	<i>rossica</i>		Urbanavichus 019	EF594741	Russia
10	<i>venusta</i>	JM	Malíček 7593		Italy, Sicily, Nebrodi National park
11	<i>perisidiosa</i>	DS	Svoboda 2590		France, Corsica, Haute Corse
12	<i>perisidiosa</i>	DS	Svoboda 1654		Montenegro, NP Bielašica
13	<i>venusta</i>	DS	Svoboda 1657		Albania, prov. Shkoder, Theth Valley
14	<i>perisidiosa</i>	PRC	Starosta		Morroco, High Atlas, Imlil
15	<i>perisidiosa</i>		Esslinger 15399	AY368142	USA, North Dakota
16	<i>perisidiosa</i>		Cubero (MAF 9801)	AY368141	Spain, Avila
17	<i>perisidiosa</i>		Cubero (MAF 9801)	AY368140	Spain, Madrid
18	<i>enteroxantha</i>	DS	Svoboda 1666		Albania, prov. Permet, Pagri
19	<i>isidiomusicigena</i>	UCR	Knudsen 1014KK12		USA, California, Peninsular Range
20	<i>enteroxantha</i>	GOET	Espinosa 1000717	AF540523	
21	<i>enteroxantha</i>		Jones (MAF 6385)	AY368124	Spain, Madrid
22	<i>enteroxantha</i>		Crespo, Blanco	AY368123	Spain, Zamora
23	<i>enteroxantha</i>		BCN-Lich 15482	GU247158	Spain
24	<i>distorta</i>	JM	Malíček 7935		Macedonia, Galichica NP
25	<i>distorta</i>		MAF-Lich 14114	DQ862486	Spain
26	<i>detersa</i>	PRA	Palice 19716		Ukraine, Khust, Velyka Uhol'ka
27	<i>detersa</i>		Lohtander, Jalonen	AF224372	
28	<i>detersa</i>		Ahti, Timofeev	EF582761	Russia
29	<i>detersa</i>		Esslinger 14682	AY368115	USA
30	<i>distorta</i>		MAF-Lich 17761	KC559093	Spain
31	<i>distorta</i>			FR799275	United Kingdom
32	<i>distorta</i>			FR799274	United Kingdom
33	<i>grisea</i>	PRC	Starosta		Czech Rep., Kamenice nad Lipou
34	<i>grisea</i>	DS	Svoboda 1465		Czech Rep., Praha, Pikovice
36	<i>perisidiosa</i>	JM	Malíček 8097		Ukraine, Western Ukraine, Khust
37	<i>rossica</i>	PRA	Vondrák 14139		Russia, Dagestan, Gergebil, Gunib
38	<i>muscigena</i>	PRC	Svoboda 927		Czech Rep., CHKO Pálava
39	<i>muscigena</i>	PRC	Starosta		Czech Rep., Hrubý Jeseník, Petrovy kameny
41	<i>muscigena</i>	JM	Malíček 6940		Czech Rep., Pálava CHKO
42	<i>muscigena</i>	PRC	Svoboda		Austria, Innsbruck
43	<i>muscigena</i>	PRC	Starosta		Morroco, High Atlas, Imlil

44	<i>muscigena</i>	PRC	Starosta	Slovakia, Belianské Tatry
45	<i>muscigena</i>	PRC	Starosta	Slovakia, Belianské Tatry
46	<i>muscigena</i>	PRC	Starosta	Slovakia, Spišské Podhradie
47	<i>muscigena</i>	PRC	Starosta	Slovakia, Demänovská dolina
48	<i>muscigena</i>	GZU	Hafellner 67703	Austria, Oberösterreich
49	<i>muscigena</i>	GZU	Myerhofer 492	Kosova, Prokletije, Hajla
50	<i>muscigena</i>	GZU	Hafellner 79410	Deutschland, Bayern
51	<i>muscigena</i>	GZU	Hafellner 79946	USA, Alaska, Brooks Range
52	<i>muscigena</i>	H	ex. Groenlandici 1027	Greenland, Kap Morris Jesup
53	<i>muscigena</i>	H	Haikonen 27979	Finland, Kil. Muonio
54	<i>muscigena</i>	H	Pykälä 39242	Finland, Ks. Kuusamo, Juuma
55	<i>muscigena</i>	H	Pykälä 35611	Finland, Ks. Kuusamo, Piljakkka
56	<i>muscigena</i>	UBC	Goward 08-04a	Canada, B.C., Mission Flats
57	<i>muscigena</i>	UBC	Björk 21320	USA, Idaho, Big Dry Gulch trail
58	<i>muscigena</i>	UBC	Björk 22686	Canada, B.C., Columbia Mts.
59	<i>muscigena</i>	UBC	Björk 36039	Canada, Nunavut, Hope Bay area
60	<i>muscigena</i>	JM	Malíček 3248	Slovakia, Belianské Tatry
61	<i>muscigena</i>	GZU	ex. Graecensia 930	Austria, Steiermark
62	<i>muscigena</i>	GZU	Atanassova 150803	Bulgaria, Rila mountain
63	<i>muscigena</i>	UBC	Björk 38216	Canada, Nunavut, Hope Bay area
64	<i>muscigena</i>	UBC	Björk 38167	Canada, Nunavut, Hope Bay area
65	<i>muscigena</i>	UBC	Björk 34371	Canada, British Col., Rocky Mts.
66	<i>muscigena</i>	PRA	Vondrák 14137	Russia, Dagestan, Gergebil, Gunib
67	<i>muscigena</i>	JM	Maliček 5750	Romania, Transylvania, Hasmas Mts.
68	<i>muscigena</i>	PRC	Starosta	Slovakia, Belianské Tatry
69	<i>muscigena</i>	GZU	Hafellner 72915	Austria, Vorarlberg
70	<i>muscigena</i>	UBC	Björk 32022	Canada, B.C., Hart Range
71	<i>muscigena</i>	UBC	Björk 31996	Canada, B.C., Hart Range
72	<i>muscigena</i>	UBC	Goward 12-143	Canada, Alberta, Mt. Hammel
73	<i>muscigena</i>	SOKO	Uhlík P.	Swalbard, Pyramidalen
74	<i>muscigena</i>	UBC	Björk 28389	Canada, Nunavut, Hope Bay area
75	<i>muscigena</i>	PRA	Vondrák 14138	Russia, Dagestan, Gergebil, Gunib
76	<i>muscigena</i>	UBC	Björk 28855	Canada, Nunavut, Bathurst Inlet
77	<i>muscigena</i>	JM	Malíček 2335	Austria, Tirol, Hohe Tauern
78	<i>muscigena</i>	JM	Malíček 4133	Macedonia, Tetovo, Šar Planina
79	<i>muscigena</i>	PRA	Palice 18071	Slovakia, Poprad
80	<i>muscigena</i>	GZU	Hafellner 76894	Austria, Kärnten, Karnischen Alpen
81	<i>muscigena</i>	GZU	Muggia	Switzerland, Canto Ticino
81	<i>muscigena</i>	UBC	Björk 29329	Canada, Nunavut, Bathurst Inlet
82	<i>muscigena</i>	BP	Lökös	France, Mercantour NP
84	<i>muscigena</i>	GZU	Hafellner 75363	Albania, Nemuna Mts.
85	<i>bayeri</i>	PRA	Palice 14851	Czech Rep., Praha, Butovice
86	<i>bayeri</i>	PRC	Starosta	Czech Rep., Praha, Butovice
87	<i>muscigena</i>	GZU	Hafellner 78906	Austria, Vorarlberg

3.2.2 mtSSU

Pro rekonstrukci fylogenetického stromu na základě mtSSU jsem využil 88 sekvencí o délce 356 pozic. Ve stromu se nachází 56 sekvencí druhu *P. muscigena* a čtyři sekvence druhu *P. bayeri*. K vytvoření jsem použil Hasegawa-Kishino-Yano model v programu Mega6 (5000 bootstrap, metoda Maximum Likelihood) Bayesovskou analýzu dat jsem provedl v programu MrBayes (5 miliony generací, model HKY, výsledná konvergence X). Jako „burnin“ bylo odstraněno prvních 25 % stromů.

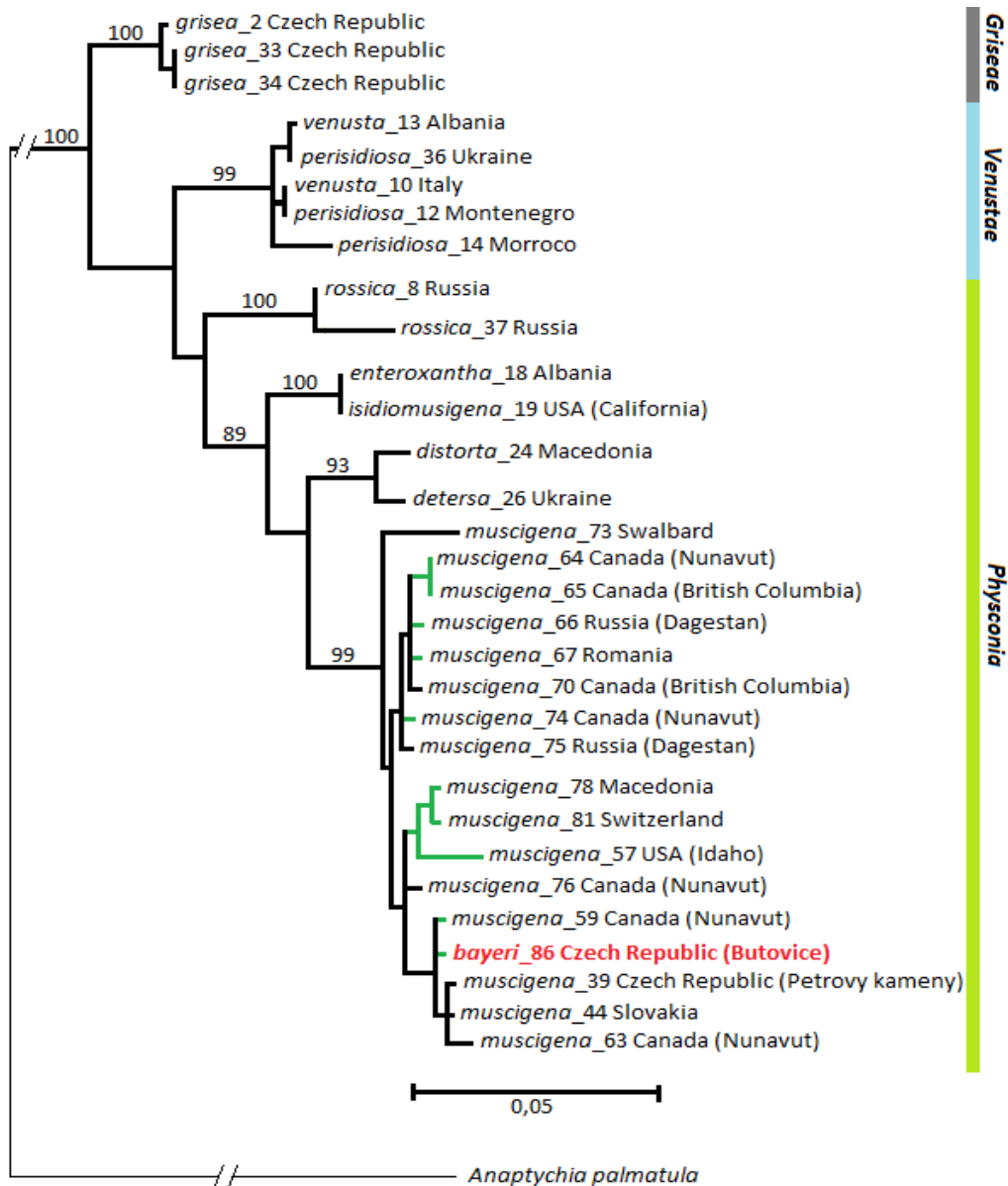
V sekvenovaném úseku je velice nízká variabilita jak mezi jedinci *P. muscigena*, tak napříč celým rodem *Physconia*. Přibližně se jedná o jednu substituci na 100 bází. Tato skutečnost je dobře vidět i na přiloženém stromu, kde nejsou podpořeny žádné druhy a dokonce jsou náhodně promíchány mezi sebou. Tato topologie se vyskytovala ve výsledcích při použití obou metod a ukazuje, že tento úsek je velice konzervativní. K lepší rekonstrukci fylogenetického stromu by bylo vhodné zvolit jinou kombinaci primerů a osekvenovat delší úseky mtSSU. Vzhledem k nízké variabilitě sledovaného úseku a náhodnému promíchání jednotlivých druhů se nedá o postavení *P. bayeri* podle mtSSU spolehlivě nic usuzovat, proto jsem od další amplifikace tohoto genu upustil. Výsledek Bayesovské analýzy uvádím pouze jako ilustrativní v příloze 2.

3.2.3 TEF1

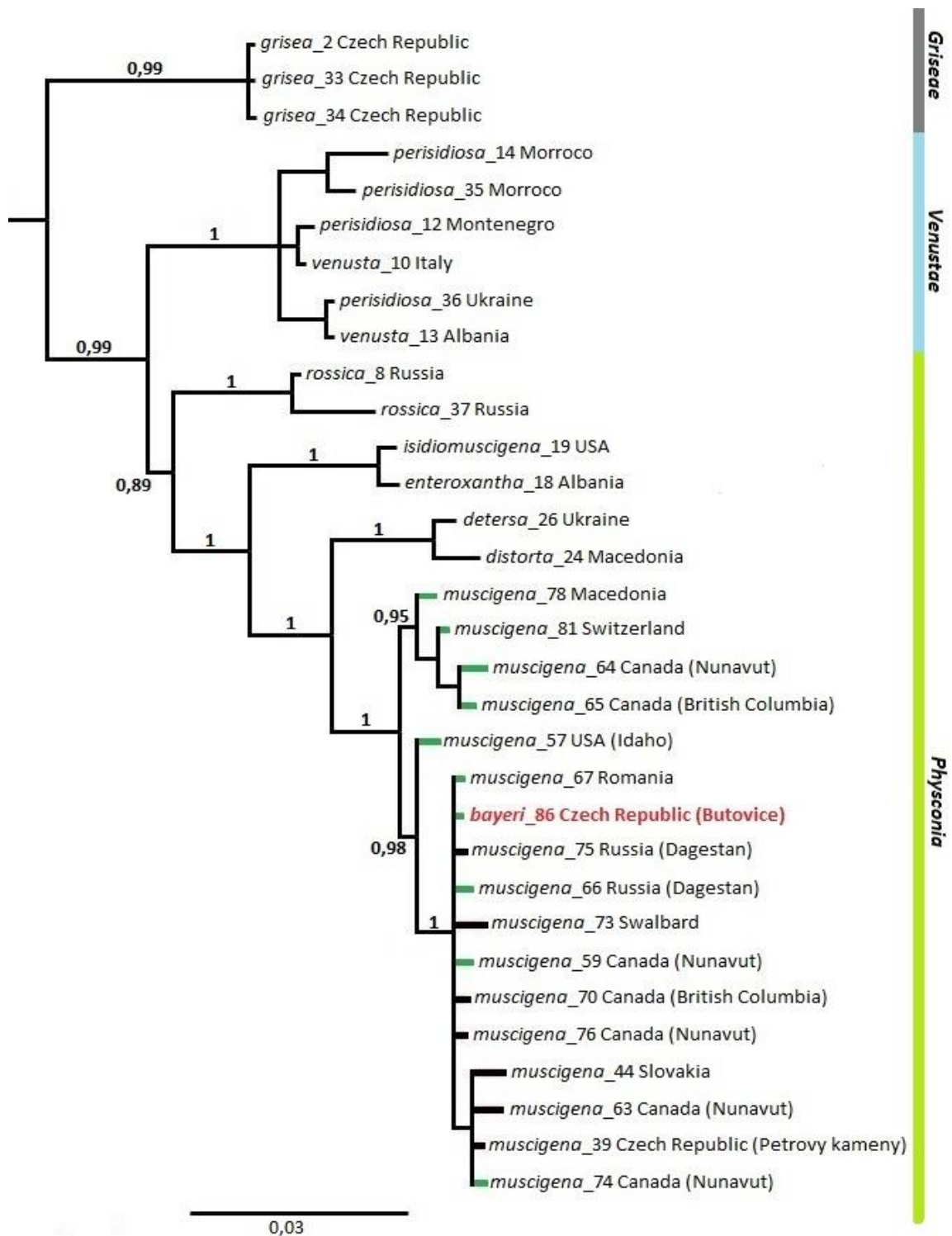
Gen pro TEF1 byl u rodu *Physconia* amplifikován a osekvenován poprvé v této studii. TEF1 se podle dosavadních výsledků jeví jako vhodný marker na rozlišování zástupců na druhové úrovni. Jedinou nevýhodu představuje nutnost použití relativně čerstvého materiálu k izolaci. Nepodařilo se mi amplifikovat a osekvenovat žádnou položku starší 5 let a nejlepší výsledky jsem měl u položek do 1 roku stáří. Protokol pro sekvenační reakci musel být optimalizován s Laboratoří sekvenace DNA, biologické sekce PŘF UK a všechny vzorky byly sekvenovány za vyšší teploty. I přes všechny optimalizace se mi povedlo osekvenovat pouze jednu položku *P. distorta* a sekvenace druhu *P. enteroxantha* byla také velmi problematická.

Pro fylogenetickou studii jsem použil 33 sekvencí z rodu *Physconia*. Bayesovskou analýzu dat jsem provedl v programu MrBayes pomocí dvou parametrického Kimurova modelu (K2P) s využitím gamma rozdělení s invariabilními pozicemi (G+I), k analýze jsem použil 5 milionů generací a výsledná konvergence dosáhla hodnoty 0,006. Jako „burnin“ bylo odstraněno prvních 25 % stromů. Výsledný strom jsem editoval v programu FigTree. Pro srovnání jsem dataset analyzoval i metodou Maximum Likelihood (Tamura et al. 2011) s 5000 bootstrapy, model jsem použil stejný (obr. 6 a 7).

Ve výsledném stromě je zřetelná vysoká variabilita druhu *P. muscigena* a pozice *P. bayeri*, stejně jako v případě ITS rDNA (obr. 5). Ani zde geografie ani chemie stélky nevysvětluje vnitřní topologii linie *P. muscigena*. Zachována zůstala i skupina druhů *P. perisidiosa* a *P. venusta*.



Obr. 6: Fylogenetický strom na základě úseku TEF1 získaný metodou Maximum Likelihood. Zobrazeny pouze bootstrapové podpory vyšší než 85 %. Číselné označení položek viz tabulku 5. Členění na sekce podle práce Lohtander et al. 2007. Zeleně označené větve obsahují nově nalezený metabolit.



Obr. 7: Fylogenetický strom na základě úseku TEF1 vytvořený Bayesovskou metodou. Čísla na větvích značí posteriorní pravděpodobnosti, zobrazeny pouze vyšší než 85 %. Číselné označení položek viz tabulku 5. Jako outgroup je použit rod *Anaptychia*. Členění na sekce podle práce Lohtander et al. 2007. Zeleně označené větve obsahují nově nalezený metabolit.

3.2.4 Spojený soubor ITS rDNA – TEF1

Fylogenetické stromy jednotlivých genů si byly topologií podobné. Jedinou odlišnost představovalo postavení *P. rossica*, která podle ITS rDNA patřila do sekce *Venustae* a podle TEF1 náležela k sekci *Physconia*. Předpokládal jsem, že spojením dvou úseků se povede výsledné postavení vyřešit. Osekvované úseky obou genů jsem měl k dispozici od 32 jedinců rodu *Physconia*. Oběma úsekům vyhovoval model K2P G+I, takže jsem nemusel při analýze v programu MrBayes nastavovat různé modely pro každý gen zvlášť (K2P G+I, 5 milionů generací, výsledná konvergence 0,006). Stejným způsobem jsem přistupoval při analýze Maximum Likelihood s 5000 bootstrapy (Mega6).

Výsledné stromy nepřinesly shodu. Podle analýzy Maximum Likelihood náleží *P. rossica* do sekce *Physconia* (obr. 8), oproti tomu Bayesianá analýza ji zařadila do sekce *Venustae* (obr. 9). Viz i text v odst. 3.2.6.

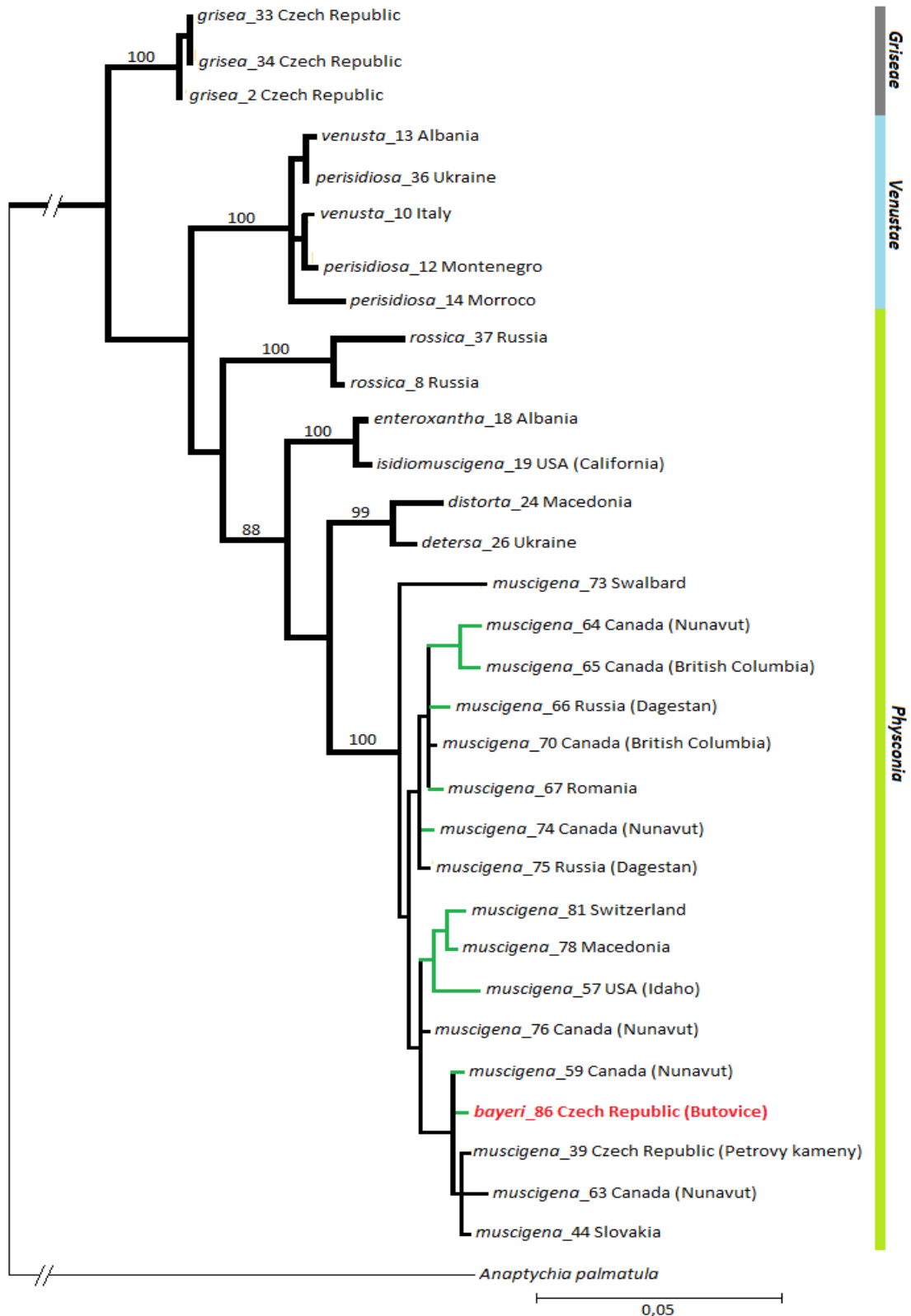
3.2.5 Postavení *Physconia bayeri*

Podle dosavadních výsledků ze sekvenování tří úseků je pozice druhu *P. bayeri* uvnitř druhu *P. muscigena*. Druh *P. bayeri* se prokazatelně neliší morfologií stélky ani jejím chemismem. Výskyt na lokalitě s nízkou nadmořskou výškou není v rámci druhu *P. muscigena* úplně běžný, ale i takové habitaty se vyskytují (CHKO Pálava, NPR Dreveník). Vzhledem k těmto skutečnostem se nedá uvažovat ani o nižším taxonomickém statutu jako je varieta nebo forma. Z mého pohledu je tak rozlišování *P. bayeri* jako druhu neoprávněné a jedná se pouze o synonymum k *P. muscigena*.

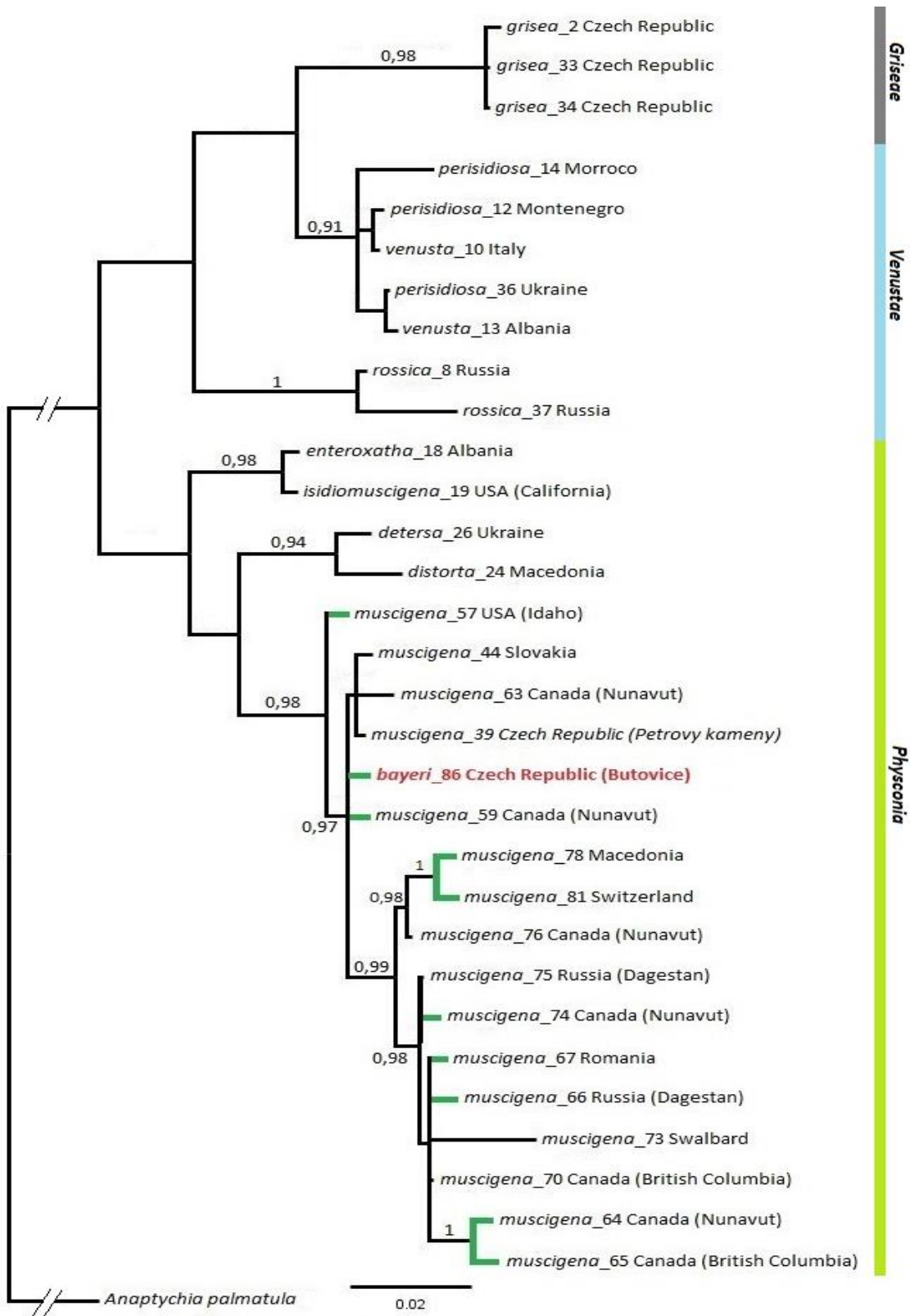
3.2.6 Pozice ekologicky podobných druhů

Physconia rossica patří podle studie autorů popisu Lohtander et al. (2007) do sekce *Venustae* a je tak blízce příbuzná druhům *P. venusta* a *P. perisidiosa*. Mé výsledky toto zařazení v případě ITS rDNA potvrzují, ale zároveň ukazují bližší příbuzenské vztahy se sekci *Physconia* podle genu TEF1. Vyřešit tento rozpor nepomohla ani analýza po spojení těchto souborů, kde obě metody přinesly rozdílné výsledky.

Pozici druhu *P. isidiomuscigena* se mi zjistit nepodařilo. Zapůjčená položka od Kerryho Knudseny z USA je pravděpodobně *P. enteroxantha*. O čerstvý a správně určený materiál jsem žádal autora popisu profesora T. Esslingera. Ten potvrdil, že čerstvý materiál se v herbářích téměř nevyskytuje a jeho položky jsou 25 let staré. Na jaře 2016 měl jet T. Esslinger na studijní cestu do Arizony a slíbil mi zaslání čerstvě nasbíraných položek. Bohužel od té doby na korespondenci neodpovídá a nepodařilo se mi jej zastihnout ani telefonem na jeho pracovišti celé jaro.



Obr. 8: Fylogenetický strom na základě spojení úseků TEF1 a ITS rDNA získaný metodou Maximum Likelihood. Zobrazeny pouze bootstrapové podpory vyšší než 85 %. Číselné označení položek viz tabulku 5. Členění na sekce podle práce Lohtander et al. 2007. Zeleně označené větve obsahují nově nalezený metabolit.



Obr. 9: Fylogenetický strom na základě spojení úseků TEF1 a ITS rDNA vytvořený Bayesovskou metodou. Čísla na větvích značí posteriorní pravděpodobnosti, zobrazeny pouze vyšší než 85 %. Číselné označení položek viz tabulku 5. Členění na sekce podle práce Lohtander et al. 2007. Zeleně označené větve obsahují nově nalezený metabolit.

4 Diskuse

4.1 Výskyt druhu *Physconia muscigena* na území ČR

Jedním z cílů práce bylo zmapovat současný výskyt druhů *P. muscigena* a *P. bayeri* na území České republiky a porovnat ho s historickými údaji z herbářových sbírek a literatury.

Systematickým mapováním druhu *P. muscigena* (\equiv *P. bayeri*) na území ČR se doposud nikdo nezabýval. Údaje o lokalitách se nacházejí u podrobnějších popisů obou druhů ve spise *Physciaceae Tchécoslovaques* (Nádvorník 1947) a také v různých pracích mapujících lichenofloru určitého území (Kocourková 1999, Svoboda 2007, Svoboda et al. 2014). V okolních státech je situace podobná. Zmapovaný výskyt druhu je jen v Rakousku (Türk et Obermayer 2006) a v severských státech Evropy (Ahti et al. 2002).

V České republice se v současné době *P. muscigena* (\equiv *P. bayeri*) nachází pouze na třech lokalitách. Jediná vitální populace s dostatečným množstvím jedinců se nachází na Pálavě. Na zbylých dvou lokalitách – Petrovy kameny a Butovice lišejník pouze přežívá a není vidět žádné nové stélky. Vzhledem k této skutečnosti by podle mého názoru měla být *P. muscigena* zařazena v Červeném seznamu lišejníků České republiky do kategorie CE (kriticky ohrožený), současný status EN (ohrožený) podle Liška et Palice (2010) hrubě neodpovídá současnému rozšíření druhu. V okolních zemích je druh hojnější a nachází se na více lokalitách – Rakousko (Türk et Obermayer 2002), Slovensko (osobní pozorování) nebo je zde poměrně běžný jako např.: v Itálii (Nimis et Martellos 2008), Norsku, Švédsku a Finsku (Ahti et al. 2002). Větší četnost výskytu ve výše uvedených zemích je dána zcela jistě větším počtem vhodných stanovišť ve vysokých horách, které v České republice chybějí.

Na nejhojnější lokalitě v ČR na Pálavě se nachází i přes deset stélek na čtvereční metr. Zajímavé je, že mikrolokality, které se zde nacházejí a vypadají na první pohled úplně stejně, nejsou vždy lišejníky obsazeny. Přitom se jedná o pár metrů vzdálené habitaty, kde jeden je porostlý vysokým množstvím stélek a na vedlejší skalce nenalezneme ani jednoho jedince. Tento jev může mít za následek nějaký nepostřehnutý ekologický faktor nebo omezenou schopnost šíření pouze fragmentací stélky. U žádné stélky nebyla zaznamenána apothecia. Ekologické nároky druhu nejsou v praxích obvykle zmíněny, pouze v praxích Türk et Obermayer (2002) a Ahti et al. (2002) autoři uvádějí, že „*P. muscigena* se vyskytuje na silikátových nebo vápnatých skalkách porostlých mechem“; američtí autoři (Brodo et al. 2001) uvádějí, že

„Druh roste na zemi, na meších, na skalách, zejména často navštěvovaných ptáky, obvykle v na báze bohatých tundrových habitatech.“

4.2 Kyselina sekalonová A

Physconia muscigena podle dostupných monografií neobsahuje žádné sekundární metabolity detekovatelné pomocí tenkovrstvé chromatografie (Ahti et al. 2002, Andreev et al. 2008, Brodo et al. 2001). U popisu *P. bayeri* se Nádvorník (1947) zmiňuje o reakci K⁺ do světla žlutého zbarvení, ale žádnou specifickou látku také neuvádí. V rozporu s těmito pracemi je Otte et al. (2002), který odůvodňuje žluté zbarvení dřene po reakci přítomností kyseliny sekalonové A. Tato kyselina se podle autora nachází i u jiných zástupců rodu. Jak na to ale autor přišel, se v článku nedozvíme, nejsou přiloženy žádné protokoly TLC či zmíněny metody detekce. TLC jsem provedl na 240 položkách z 22 zemí, ale kyselinu sekalonovou A se mi prokázat nepodařilo. Podle výsledku shodného s ostatními pracemi, které ji neuvádějí (Moberg 1987, Ahti et al. 2002, Andreev et al. 2008), považuji tvrzení Otte et al. (2002) za nesprávné.

4.3 Pozice druhů *P. rossica* a *P. isidiomuscigena*

Potvrdit ani vyvrátit zařazení druhu *Physconia rossica* do sekce *Venustae* (Lohtander et al. 2007) se mi nepodařilo. Lohtander et al. (2007) toto zařazení provedl na základě studia 3 položek a spojených úseků ITS a mtSSU. U mtSSU použili upravené primery SSU1KL a SSU2 KL, tento sekvenovaný úsek je delší než mnou použitý pár SSU1 a SSU3, jak je úsek variabilní autoři bohužel nepíší.

Já mohu zařazení do sekce *Venustae* potvrdit pouze pro studii samostatného úseku ITS. Úsek TEF1 řadí *P. rossica* do sekce *Physconia*. Stejně tak konkatenovaný dataset přinesl výsledky, které jsou v rozporu, a nedá se podle nich příslušnost do jednotlivé sekce určit. Druhu *P. rossica* se další práce nevěnují a ani v pozdějších pracích zaměřených na fylogenezi rodu *Physconia* se neobjevuje (cf. Lohtander et al. 2008). To může souviset s nedostupností čerstvého materiálu i herbářových položek v evropských herbářích (i vzhledem k obtížnosti získání výpůjček či materiálu z Ruska). Pro vyřešení tohoto problému bude třeba více čerstvých položek na sekvenaci a zejména amplifikace TEF1 či jiného variabilního úseku vzhledem ke zjištěné variabilitě/konzervativnosti mtSSU.

Jak už jsem uvedl ve výsledcích, zařadit druh *Physconia isidiomuscigena* do fylogenetického stromu se mi nepodařilo. Hlavním problémem je nedostupnost čerstvého materiálu pro izolaci DNA a obecná nedostupnost herbářového materiálu tohoto druhu. I přes popis starý 16 let a nápadné vzezření se druh v žádných taxonomických pracích využívající molekulární metody zatím neobjevil.

4.4 Vnitrodruhová variabilita *Physconia muscigena*

Studii zaměřující se na vnitrodruhovou variabilitu a fylogeografii široce rozšířených druhů lišejníků moc není, ale s dostupností a snižujícími se náklady při použití molekulárních metod se i takto úzce specializované práce začínají objevovat (Crespo et al. 2002, Printzen et al. 2003, Sork et Werth 2014, Otálora et al. 2015). Většina prací se snaží potvrdit nebo vyvrátit existenci dvou morfologicky velice podobných druhů a během studie zjistí, že se jedná o jeden široce rozšířený a morfologicky i geneticky variabilní druh (Myllys et al. 2001, Articus et al. 2002, Velmala et al 2009, Messuti et al. 2015).

Vysoká vnitrodruhová variabilita *P. muscigena* se nedá vysvětlit různými geneticky izolovanými liniemi, které by odpovídaly geografickému rozmístění jako v případě studií jiných druhů – např. *Biatora helvola* (Printzen et al 1999), *Bryoria fremontii* (Velmala et al 2009), *Ramalina menziesii* (Sork et Werth 2014) nebo *Parmelina tiliacea* (Núñez-Zapata et al. 2015). Srovnáme-li mé výsledky z výše uvedenými pracemi, je zde zřetelný rozdíl. Autoři našli molekulárně odlišené linie, které byly podpořeny i geografii výskytu. U *P. muscigena* je jasně patrné, že vzorky z jednotlivých zemí nebo geografických regionů netvoří holotypové skupiny ani žádné definovatelné linie. Ani přítomnost nově objeveného metabolitu ve stélce nevnáší do architektury linie žádné jednoznačné vysvětlení, které by souviselo s ekologií nebo geografii.

Uvnitř linie *P. muscigena* se nachází 34 haplotypů, některé haplotypové skupiny jsou zastoupeny jak v Evropě, tak v Severní Americe. Tento skutečnost by mohla naznačovat velice dobrou schopnost šířit se nebo dřívější široké rozšíření druhu po severní polokouli. Jak už bylo popsáno v úvodu, schopnost šířit se na velké vzdálenosti je u druhu *P. muscigena* velice omezená, druh tvoří apothecia jen velmi vzácně a vegetativní propagule u něj nebyly pozorovány (Moberg 1977, Ahti et al. 2002). To ale neznamená, že někdy v minulosti při optimálních podmínkách nemohl tvořit plodné populace a šířit se na veliké vzdálenosti pomocí pohlavních spor. Během posledního glaciálu mohl mít druh zřejmě dostatek vhodných stanovišť (absence lesa, půdy bohatší na vápník) aby byl široce rozšířen. S postupným oteplováním klimatu

mizí vhodná stanoviště, snižuje se zastoupení pohlavního rozmnožování a druh přežívá pouze v refugích, kde tvoří izolované populace, které spolu nekomunikují. Těmito vlastnostmi se *P. muscigena* velice podobá druhu *Cavernularia hultenii*, jehož fylogeografii studovali Printzen et al. (2003). *C. hultenii* byla podle autorů během holocénu a pleistocénu široce rozšířena na severu severní polokoule. Během pleistocénu docházelo k zaledňování velké části území a *C. hultenii* se tak stáhla z velkého areálu pouze do vhodných refugií. Při molekulární studii byly nalezeny haplotypy, které se vyskytují v populacích ze Severní Ameriky i severní Evropy. K objasnění tohoto jevu navrhli teorii pomalého genetického driftu. Vzhledem k této situaci je možné, že dříve široce rozšířené haplotypy rostoucí na severní polokouli je možné nalézt v malých populacích přežívajících v Evropě i Severní Americe. Zároveň některé haplotypy působením genetického driftu zanikly a jiné se zase rozšířily. Podle mého názoru může mít genetický drift nebo změna klimatických podmínek za následek změnu frekvence pohlavního a nepohlavního rozmnožování, která je u *P. muscigena* značně vychýlena k nepohlavnímu způsobu. Bohužel jsem neměl možnost osekvenovat ani pozorovat položky z jižní polokoule. Zařazení jižních haplotypů by mohlo přinést zajímavé výsledky a objasnit nebo vyvrátit některé skutečnosti, které z omezeného datasetu nejsou zjevné.

K lepšímu pochopení populační struktury, genového toku mezi populacemi a nalezení případných refugií by bylo vhodné využít analýzu více genů nebo využít mikrosatelitové markery. V současné době díky technologickému pokroku a klesajícím finančním nákladům dochází k velkému nárůstu využití nových výkonných sekvenačních metod (next generation sequencing, Shendure et al., 2008; Metzker, 2010; Lemmon et al., 2013). Těmito metodami lze získat velké množství genetické informace napříč celými genomy v množství, které nebylo dříve dostupné.

Jednou z takových metod je i RAD sekvenování (restriction-site-associated DNA sequencing) (Peterson et al., 2012). Využití této metody v lichenologii zatím brání úzké soužití obou lišejníkových partnerů, které neumí metoda rozlišit. Je pravděpodobné, že se tento metodický problém povede vyřešit a RAD sekvenování i u lišejníků pomůže hlouběji nahlédnout do fylogeografie široce rozšířených druhů.

4.5 Linie *Physconia venusta*/*Physconia perisidiosa*

P. venusta a *P. perisidiosa* tvoří vysoce podpořenou monofyletickou linii. Tyto druhy se na základě úseků ITS rDNA a TEF1 nedají od sebe odlišit. Stejně výsledky zaznamenali při použití úseku ITS rDNA i Cubero et al. (2004) a Divakar et al. (2007).

Lohtander et al. (2007, 2008) použil spojené úseky ITS rDNA a mtSSU a také mu vyšla vysoce podpořená jedna linie. Má i výše citované studie jsou založeny na jednom nebo dvou studovaných úsecích a malém počtu vzorků. Pro podrobnější a robustnější analýzu by bylo vhodné využít data z více úseků/genů od jedinců pokrývajících areál rozšíření a sestavit fylogenetické stromy na jejich základě. Multigenová studie by pak mohla přesvědčivě nastínit vztahy uvnitř linie. V případě nerozlišitelnosti obou druhů se nabízí otázka, zda se nejedná pouze o jeden druh s různými morfotypy nebo ekotypy vyznačujícími se rozdílnou schopností tvořit apothecia. Podobná situace nastala při molekulárních studiích druhů *Usnea florida* / *U. subfloridana* (Articus et al. 2002), *Bryoria fremontii* / *B. tortuosa* (Velmala et al 2009) či *Physcia aipolia* / *P. caesia* (Myllys et al. 2001).

5 Závěr

Na základě studia herbářových dokladů a zmapování výskytu *Physconia muscigena* na historických i současných lokalitách by měla být *P. muscigena* zařazena v Červeném seznamu lišejníků České republiky do kategorie CE (kriticky ohrožený), současný status EN (ohrožený) neodpovídá současnému rozšíření druhu. Druh se vyskytuje pouze na třech lokalitách – CHKO Pálava, Petrovy kameny (CHKO Jeseníky) a Praha - Butovice. Jediná vitální populace s dostatečným množstvím jedinců se nachází na Pálavě.

V některých položkách *P. muscigena* se povedlo pomocí TLC nalézt nový metabolit, který se zatím nepodařilo určit. Naopak se nepodařilo prokázat přítomnost sekalonové kyseliny A, která se ve stélkách nevyskytuje, a tvrzení o její přítomnosti považuji za mylné.

Pomocí morfologických, chemických a hlavně molekulárních znaků jsem prokázal, že *Physconia bayeri* se ničím neliší od druhu *P. muscigena*. Z mého pohledu je tak rozlišování *P. bayeri* jako druhu neoprávněné a jedná se pouze o synonymum k *P. muscigena*.

Vysokou vnitrodruhovou variabilitu *P. muscigena* nelze vysvětlit geografickým rozmístěním populací ani přítomností sekundárního metabolitu. Druh byl pravděpodobně v minulosti široce rozšířený. Po změně klimatických podmínek a vymizení vhodných stanovišť přežívá pouze v refugiích. To by vysvětlovalo přítomnost stejných haplotypů na území Severní Ameriky i Evropy. Tento jev by mohla vysvětlovat teorie pomalého genetického driftu podle autorů Printzen et al. (2003).

P. venusta a *P. perisidiosa* tvoří vysoce podpořenou monofyletickou linii. Tyto druhy se na základě úseků ITS rDNA, mtSSU a TEF1 nedají od sebe odlišit. Pokud by druhy neodlišila ani rozsáhlejší multigenová analýza, mohlo by se jednat pouze o jeden druh s více morfotypy/ekotypy s rozdílnou schopností tvořit apothecia.

6 Seznam použité literatury

- Ahti T., Jorgensen P., Kristinsson H., Moberg R., Sochting U., Thor G. (2002):** Nordic Lichen Flora Vol. 2 Physciaceae. TH-tryck AB, Uddevalla, 116 p.
- Ahti T., Scotter G. W., Vanska, H. (1973):** Lichens of the Reindeer Preserve, Northwest Territories, Canada. *The Bryologist* 76: 48–76.
- Acharius E. (1810):** Lichenographia universalis in qua lichenes omnes detectos, adjectis observationibus et figuris horum vegetabilium naturam et organorum carpomorphorum structuram illustrantibus, ad genera, species, varietates differentiis et observationibus sollicite definitas. J. F. Danckwerts, Gottingae, 696 p.
- Andreev M. P., Dobrysh A. A., Golubkova N. S., Himebrant D. E., Kataeva O. A., Kotlov Yu. V., Makarova I. I., Titov A. N., Tolpysheva T. Yu., Urbanavichene I. N. & Urbanavichus G. P. (2008):** Opredelitel' lišajnikov Rossii, Tom 10. Nauka Sankt-Petersburg, 515 p.
- Articus K., Mattsson J. E., Tibell L., Grube M., Wedin M. (2002):** Ribosomal DNA and β -tubulin data do not support the separation of the lichens *Usnea florida* and *U. subfloridana* as distinct species. *Mycological research* 106: 412–418.
- Brodo I., Sharnoff S. D., Sharnoff S. (2001):** Lichens of North America. Yale University Press, New Haven and London, 795 p.
- Carbone I., Kohn L. M. (1999):** A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553–556.
- Crespo, A., Molina, M. C., Blanco, O., Schroeter, B., Sancho, L. G., Hawksworth, D. L. (2002):** rDNA ITS and β -tubulin gene sequence analyses reveal two monophyletic groups within the cosmopolitan lichen *Parmelia saxatilis*. *Mycological Research* 106: 788–795.
- Cubero O. F., Crespo A., Esslinger T. L. & Lumbsch H. T. (2004):** Molecular phylogeny of the genus *Physconia* (Ascomycota, Lecanorales) inferred from a Bayesian analysis of nuclear ITS rDNA sequences. *Mycological Research*, 108(5): 498–505.
- Esslinger L. T. (2000):** A Key for the Lichen Genus *Physconia* in California, with descriptions for three new species occurring within the state. *Bulletin of the California Lichen Society* 7(1): 5.
- Flakus A., Etayo J., Schiefelbein U., Ahti T., Jabłońska A., Oset M., Bach K., Rodriguez Flakus P., Kukwa M. (2012):** Contribution to the knowledge of the lichen biota of Bolivia 4. *Polish Botanical Journal* 57(2): 427–461.

- Hasegawa M, Kishino H, Yano T. (1985):** Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22: 160–174.
- Chen J. B., Hu G. R. (2003):** The lichen family Physciaceae (Ascomycota) in China V. The genus *Physconia*. *Mycotaxon* 86: 185–194.
- Kirk P., Cannon F., Stalpers J., Minter W. (2010):** *Dictionary of the Fungi* 10th ed., CABI UK, 784 p.
- Kocourková J. (1999):** Lichenologická studie Prokopského údolí za rok 1999. – 32 p. Praha [ms.].
- Lemmon E. M., Lemmon A. R. (2013):** High-Throughput Genomic Data in Systematics and Phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 44: 99–121.
- Lohtander K., Urbanavichus G., Ahti T. (2007):** The phylogenetic position of two new species of *Physconia* (lichenized Ascomycetes) from Russia. *Bibliotheca Lichenologica*, 96, 175.
- Makarova I. I., Katenin A. E. (1983):** Lishayniki v gorakh yugovostoka Chukotskogo Poluostrova. *BPH* 68: 1477–1486.
- Messuti M., Passo A., Scervino J., Vidal-Russell, R. (2016):** The species pair *Pseudocyphellaria pilosella-piloselloides* (lichenized Ascomycota: Lobariaceae) is a single species. *The Lichenologist* 48(2). 141–146.
- Metzker M. L. (2010):** Sequencing technologies – the next generation. *Nature reviews genetics* 11: 31–46.
- Moberg R. (1977):** The lichen genus *Physcia* and allied genera in Fennoscandia. - *Symbolae Botanicae Upsalienses* 22/1: 1–108.
- Moberg R. (1987):** The genera *Hyperphyscia* and *Physconia* in East Africa. *Nordic Journal of Botany* 7: 719-728.
- Myllys L., Lohtander K., Tehler A. (2001):** β -tubulin, ITS and group I intron sequences challenge the species pair concept in *Physcia aipolia* and *P. caesia*. *Mycologia* 335–343.
- Nádvorník J. (1947):** Physciaceae Tchécoslovaques. *Studia Botanica Českoslovaca* 8: 69–124.
- Nádvorník J. (1948):** Contribution aux Physciaceae d'Europe. *Studia Botanica Českoslovaca* 9: 144–154.
- Nimis P., Martellos S. (2008):** *ITALIC* - The Information System on Italian Lichens. Version 4.0. University of Trieste, Dept. of Biology, IN4.0/1 (<http://dbiodbs.univ.trieste.it/>).

- Núñez-Zapata J., Cubas P., Hawksworth D. L., Crespo A. (2015):** Biogeography and Genetic Structure in Populations of a Widespread Lichen (*Parmelina tiliacea*, Parmeliaceae, Ascomycota). *PloS one* 10(5), e0126981.
- Orange A., James P. W., White F. J. (2001):** Microchemical methods for the identification of lichens. British Lichen Society (London), 101 p.
- Otálora M. A., Belinchón R., Prieto M., Aragón G., Izquierdo P., Martínez I. (2015):** The threatened epiphytic lichen *Lobaria pulmonaria* in the Iberian Peninsula: Genetic diversity and structure across a latitudinal gradient. *Fungal biology* 119(9): 802–811.
- Otte V., Esslinger T. L., Litterski B. (2002):** Biogeographical research on European species of the lichen genus *Physconia*. *Journal of Biogeography* 29: 112–1141.
- Peterson B. K., Weber J. N., Kay E. H., Fisher H. S., Hoekstra H. E. (2012):** Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PloS one*, 7(5), e37135.
- Poelt J. (1965):** Zur Systematik der Flechtenfamilie Physciaceae. *Nova Hedwigia*, 9(1-4): 21–32.
- Printzen C., Ekman S., Tønsberg T. (2003):** Phylogeography of *Cavernularia hulthenii*: evidence of slow genetic drift in a widely disjunct lichen. *Molecular Ecology* 12: 1473–1486.
- Printzen C., Lumbsch H. T., Schmitt I., Feige, G. B. (1999):** A study on the genetic variability of *Biatora helvola* using RAPD markers. *Lichenologist* 31: 491–499.
- Rehner S. A., Buckley E. (2005):** A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97:84–98.
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D., Darling A. (2012):** MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology* 61: 539-42.
- Shendure J., Ji H. (2008):** Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology* 26(10): 1135–1145.
- Smith C, Aptroot, A., Coppins B, Fletcher A., Gilber, O., Wolseley P. (2009):** The Lichens of Great Britain and Ireland. The British Lichen Society, London, 1046 p.
- Sork V., Werth A. (2014):** Phylogeography of *Ramalina menziesii*, a widely distributed lichen-forming fungus in western North America. *Molecular Ecology* 23 : 2326–2339.

- Svoboda D. (2007):** Lichens of the central part of the Bohemian Karst. - *Novitates botanicae Universitatis Carolinae* 18: 15–52.
- Svoboda D., Halda J. P., Malíček J., Palice Z., Šoun J., Vondrák J. (2014):** Lišejníky Českého krasu: shrnutí výzkumů a soupis druhů. *Bohemia centralis* 32: 213–265.
- Swinscow, T. D. V., Krog, H. (1988):** *Macrolichens of East Africa*. British Museum (Natural History), London, 390 p.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013):** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- Thomson J. W. (1963):** The lichen genus *Physcia* in North America. *Beihefte zur Nova Hedwigia*, 7: 1–172.
- Türk R., Obermayer W. (2006):** The distribution of the species of the genera *Physcia* and *Physconia* (Physciaceae) in Austria. - In: Lackovičová A., Guttová A., Lisická E. & Lizoň P. (eds.), *Central European lichens – diversity and threat*, p. 119–151, Mycotaxon Ltd., Ithaca.
- Urbanavichus G. P. (2008):** *Physconia rossica* (Physciaceae), a new lichen species from Russia. *Botanicheskiy Zhurnal* 93(2): 317–321.
- Velmala S., Myllys L., Halonen P., Goward T., Ahti T. (2009):** Molecular data show that *Bryoria fremontii* and *B. tortuosa* (Parmeliaceae) are conspecific. *The Lichenologist* 41(03), 231–242.
- Villesen P. (2007):** *FaBox: an online fasta sequence toolbox*, <http://www.birc.au.dk/software/fabox>
- Vitikainen O. (1968):** On the sorediate species of the lichen genus *Physconia* Poelt in Eastern Fennoscandia. *Annales Botanici Fennici*. 5: 1–9.
- Werner O., Ros R. M., Guerra J. (2002):** Direct amplification and NaOH extraction: two rapid and simple methods for preparing bryophyte DNA for polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Bryology* 24: 127–131.
- Zharkikh A. (1994):** Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 39(3): 315– 29.

7 Přílohy

Příloha 1: Herbářové položky druhu *Physconia muscigena* sbírané na území České republiky a herbáře, kde jsou uloženy.

rok sběru	Herb.	evid. č.	sběratel	lokalita
1892	PRM	851304	Bayer	Czech Rep., na vápenitých nejvyšších hřbetech na mechu někde za Radotínem
1902	PRM	851307	Bayer	Czech Rep., na vápenitých nejvyšších hřbetech na mechu někde za Radotínem
1906	OLM	8991	Kovář	Czech Rep., Pavlovské vrchy, Turola
1906	BRNM	2894/32	Kovář	Czech Rep., Pavlovské kopce, Turola
1918	PRM	851305	Bayer	Czech Rep., Motolský vrch
1918	PRM	851331	Bayer	Czech Rep., Motolský vrch II., jižní straně nahoře
1920	PRM	640433	Suza	Czech Rep., Moravia, Pavlovské vrchy, 450-500 m
1921	PRM	640434	Suza	Czech Rep., Moravia, Kotelná, Pavlovské kopce, 450 m
1921	PRC		Černohorský	Czech Rep., Praha, Butovice
1922	PRM	851314	Suza	Czech Rep., Morava, Pavlovické kopce, 350-450 m
1922	PRM	640455	Suza	Czech Rep., Moravia, Pavlovské kopce, 450 m
1922	BRNU	102696	Suza	Czech Rep., Pavlovské kopce, 450 m
1922	BRNM	3406/39	Kovář	Czech Rep., Pavlovské kopce, 300 m
1928	PRM	640473	Suza	Czech Rep., Jeseníky, Petrštýn, 1440 m
1931	PRC	Černohorský 576		Czech Rep., Praha, Butovice, diabas, 300 m
1931	PRC		Černohorský	Czech Rep., Praha, Butovice, diabas, 300 m
1940	BRA		Nádvořík	Czech Rep., Praha, Nová Ves, Butovice, 280 m
1943	PRC		Černohorský	Czech Rep., Praha, Butovice
1944	BRNM	63293	Buček	Czech Rep., Pavlovské kopce, Kotelná
1944	BRNM	63202	Buček	Czech Rep., Vysoký Jeseník, Petrovy kameny, 1440 m
1944	BRNM	63290	Buček	Czech Rep., Pavlovské kopce, Kotelná
1944	BRNM	63294	Buček	Czech Rep., Vysoký Jeseník, Petrovy kameny, 1440 m
nedat.	BRNM	63291	Buček	Czech Rep., Pavlovské kopce

1944	BRNM	63288	Buček	Czech Rep., Pavlovské kopce, Kotelná
1944	BRNM	63287	Buček	Czech Rep., CHKO Pálava, Kotel/Obora, 483 m
1944	BRNM	84253	Šmarda	Czech Rep., Praha, Butovice, diabazové skály
1944	BRNM	3961	Nádvorník	Czech Rep., Praha, Nová Ves, severní svah vápenců nad pramenem, 300 m
1947	BRNM	3846	Buček	Czech Rep., Hrubý Jeseník, Petrův kámen, 1446 m
1948	PRM	756193	Nádvorník	Czech Rep., Praha, Nová Ves, 260m,Physciaceae exsiccatae 18.
1948	PRC	2557	Nádvorník	Czech Rep., Praha, Nová Ves, 260m,Physciaceae exsiccatae 18.
1948	BRA		Nádvorník	Czech Rep., Praha, Nová Ves, 260m,Physciaceae exsiccatae 18.
1948	BRA		Nádvorník	Czech Rep., Praha, Nová Ves
1949	BRA		Nádvorník	Czech Rep., Praha, Butovice
1956	BRA		Pišůt	Czech Rep., Praha, Jinonice, 280 m
1956	BRA		Pišůt	Czech Rep., Beroun, Sv. Jan pod Skalou
1988	PRM	887555	Horáková	Czech Rep., Praha 5 - Butovice, Hemrovy skály, 300 m
1990	PRM	887558	Horáková	Czech Rep., Praha 5 - Nová Ves, 240 m
1999	PRM	908172	Kocourková	Czech Rep., Praha, Jinonice, lom Kačnů, 300 m
2002	PRA	6482	Palice	Czech Rep., Central Bohemia, Praha, Butovice, 300 m
2004	PRC	Svoboda 913	Svoboda	Czech Rep., CHKO Pálava, Děvín, na hřebeni kopce u vysílače, hojně, ca 400 m
2004	PRC	Svoboda 927	Svoboda	Czech Rep., CHKO Pálava, Děvín, na hřebeni kopce u vysílače, hojně, ca 400 m
2009	JM	1668	Malíček	Czech Rep., Praha, Hlubočany, Prokopské údolí
2011	PRA	Palice 14851	Palice	Czech Rep., Praha, Butovice, Hemrovy skály, 290 m
2014	JM	6940	Malíček	Czech Rep., Moravia, Břeclav, Pálava CHKO, Horní Věstonice, Obora, 390 m
2015	PRC		Starosta	Czech Rep., Praha, Nové Butovice, PR Prokopské údolí, Hemrovy skály
2015	PRC		Starosta	Czech Rep., Praha, Nové Butovice, PR Prokopské údolí, Hemrovy skály
2015	PRC		Starosta	Czech Rep., Praha, Nové Butovice, PR Prokopské údolí, lom Kačnů
2015	PRC		Starosta	Czech Rep., Hrubý Jeseník, Petrovy kameny, 1446 m
2016	PRC		Starosta	Czech Rep., CHKO Pálava, Obora, u opuštěného lomu nedaleko útvaru Trůn

Příloha 2: Fylogenetický strom na základě úseku mtSSU vytvořený Bayesovskou metodou. Číselné označení položek viz tabulka 5. Jako outgroup byl použit rod *Anaptychia*.

