

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Botanika



**Mgr. et Ing. Jakub Starosta**

**Genetická variabilita druhu *Physconia muscigena* (*Physciaceae*, *Ascomycota*) na severní polokouli**

**Genetic variability in the *Physconia muscigena* group (*Physciaceae*, *Ascomycota*) in the Northern Hemisphere**

Typ závěrečné práce:

Rigorózní práce

Vedoucí práce:

doc. Mgr. Ondřej Koukol, Ph.D.

Praha, 2020

## **Prohlášení**

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

V Praze, 8. 8. 2020

Jakub Starosta

## Genetická variabilita druhu *Physconia muscigena* (*Physciaceae*, *Ascomycota*) na severní polokouli

**Abstrakt:** Hlavním cílem studie bylo zjistit, zda je lišejník *Physconia muscigena* dobře definovaný druh nebo zda chemické a ekologické odlišnosti jednotlivých populací odhalí přítomnost více druhů. V analýzách jsme používali sekvenční data ze tří úseků DNA (ITS rDNA, mtSSU rDNA a TEF1- $\alpha$ ) pro rekonstrukci fylogenetických stromů. Sběry druhů *P. muscigena*, *P. muscigena* var. *bayeri* a *P. isidiomuscigena* probíhaly hlavně v Evropě a Kanadě. Dále jsme se snažili najít ekologické a geografické trendy mezi jednotlivými chemotypy a haplotypy. Z vyhodnocených dat vyplývá: 1) Sekvenční data úseků ITS rDNA a TEF1- $\alpha$  ukazují velikou genetickou variabilitu druhu *Physconia muscigena*, která nesouvisí s geografickým původem ani chemismem stélek. 2) Taxony *P. muscigena* var. *bayeri* a *P. isidiomuscigena* spadají ve fylogenetickém stromě do jedné linie a nelze je od sebe na základě úseků ITS rDNA, mtSSU rDNA a TEF1- $\alpha$  odlišit. 3) Synonymizovali jsme druh *P. muscigena* var. *bayeri* s druhem *P. muscigena* a vytvořili novou kombinaci pro druh *P. isidiomuscigena* jako varieta druhu *P. muscigena*.

**Abstract:** The principal goal of our study was to test whether ecologically and chemically different populations of lichens in the *Physconia muscigena* (Ach.) Poelt group belong to multiple species or one. We used sequence data from three markers (ITS rDNA, mtSSU rDNA and TEF1- $\alpha$ ) for the reconstruction of phylogenetic trees based on a sampling of mostly European and Canadian populations of *P. muscigena* (Ach.) Poelt, *P. muscigena* var. *bayeri* (Nádv.) Poelt, and *P. isidiomuscigena* Essl. Further, we sought any possible geographical or ecological trends among chemotypes and haplotypes. Results show that: 1) Sequence data of ITS rDNA and TEF1- $\alpha$  shows large genetic variation in the *Physconia muscigena* group. This genetic variability does not correlate with geographical distribution or thallus chemistry; 2) *Physconia muscigena* var. *bayeri* and *P. isidiomuscigena* appear undifferentiated in our phylogenetic trees with *P. muscigena*. These three species cannot be distinguished on the basis of ITS rDNA, mtSSU rDNA and TEF1- $\alpha$  sequences. 3) We synonymized *Physconia muscigena* var. *bayeri* with *P. muscigena* and we recombine *P. isidiomuscigena* as a variety of *P. muscigena*.

### Všeobecný úvod a cíle práce

Terčovníky rodu *Physconia* Poelt jsou nápadné lišejníky s lupenitou stélkou a převážně epifytickým růstem, které jsou v České republice zastoupeny šesti druhy (*P. detersa*, *P. distorta*, *P. enteroxantha*, *P. grisea*, *P. muscigena*, *P. perisidiosa*). Varietu *P. muscigena* var. *bayeri* (Nádv.) Poelt popsal český lichenolog Josef Nádvorník v roce 1947 z našeho území původně jako samostatný druh *Physcia bayeri* Nádv., později byla jeho taxonomická úroveň snížena na varietu (Poelt 1965). *P. muscigena* var. *bayeri* se stejně jako morfologicky podobný druh *P. muscigena* (Ach.) Poelt vyskytuje v oblasti českého termofytika na vápencových skalách. Vztah těchto dvou taxonů nebyl do dnešní doby zcela vyřešen a nebylo

jasné, zda je var. *bayeri* dobře vymezený taxon, či se jedná o lišejníky stejného druhu a tedy je pouze synonymum k druhu *P. muscigena*. K vyřešení této situace a zhodnocení postavení obou taxonů bylo nutné využít moderních taxonomických metod.

Do taxonomické studie jsme zahrnuli i nově popsáný druh *Physconia isidiomuscigena* Essl., který se svou ekologií a morfologií velice podobá již zmíněným druhům, ale byl popsán z USA. V žádné z recentních fylogenetických prací tyto druhy nebyly srovnány a jejich vzájemná pozice uvnitř rodu není známa.

### **Hlavní cíle práce:**

Zjistit vnitrodruhovou variabilitu druhu *Physconia muscigena*. Bude genetická variabilita korelovat s některou z doposud pozorovaných fenotypových odlišností (chemotyp, areál)?

Určit příbuzenské vztahy mezi ekologicky i morfologicky podobnými taxony *P. muscigena*, *P. muscigena* var. *bayeri* a *P. isidiomuscigena*. Je var. *bayeri* pouze lokální chemotyp druhu *P. muscigena*?

### **Rod *Physconia***

Rod *Physconia* (*Physciaceae*, *Lecanorales*) patří k makrolišejníkům s lupenitou stélkou. 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 diagnostickým znakům patří např. způsob rozmnožování (sorédie, izídie, askospory), charakter rhizin a zbarvení dřene. Obecně je rod *Physconia* chudý na sekundární metabolity a většina druhů neobsahuje žádné látky detekovatelné pomocí tenkovrstvé chromatografie - TLC (Moberg 2002, Smith et al. 2009). Někteří zástupci mohou příležitostně obsahovat sekalonovou kyselinu A, variolariovou nebo gyrophorovou kyselinu (např. u druhu *P. muscigena*, *P. enteroxantha* (Nyl.) Poelt, *P. isidiomuscigena* a *P. kurokawae* Kashiw.) nacházející se ve dřeni lišejníku (Esslinger 2000, Otte et al. 2002, Chen & Hu 2003).

Geografický výskyt terčovníků je – až na pár výjimek – soustředěn v mimotropických pásech severní i jižní polokoule (Otte et al. 2002). U evropských druhů převažuje epifytický způsob růstu (např. *P. perisidiosa* (Erichsen) Moberg, *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* Urbanav., *P. isidiomuscigena*).



Obr. 1: Studovaná lokalita v CHKO Pálava. Typické stanoviště druhu *P. muscigena* na vápencové skalce vystupující ze stepního trávníku, detail stélky (vpravo), měřítko 5 mm.

Druh *Physconia muscigena* (obr. 1) byla původně popsán jako *Parmelia muscigena* Ach. švédským lichenologem Erikem Achariem (Acharius 1810) i přes různé nomenklatorické přesuny je *P. muscigena* stále uznávaným druhem (Lohtander et al. 2007) 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 trávnících s řídkou vegetací ve vysokohorských a severských oblastech (Moberg 2002, Türk et Obermayer 2006). *P. muscigena* je díky své ekologii velice dobrým indikátorem primárního bezlesí (obr. 2). 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 izidií.



Obr. 2: CHKO Jeseníky – Petrovy kameny, jediná alpínská lokalita *P. muscigena* v ČR.

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 (Nádvorník 1947, Moberg 1987, Esslinger 2002, Moberg 2002). 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. Nádvorník 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 sekvenaci ITS rDNA a používala vzorky z Evropy, USA a Kanady, se druh *P. muscigena* jevil jako polyfyletický taxon (Cubero et al. 2004). To by mohlo naznačovat existenci různých ekotypových forem nebo popřípadě i kryptických druhů.

K této teorii přispívá i popsání variety *Physconia muscigena* var. *bayeri*. Tento taxon byl popsán ve čtyřicátých letech z České republiky J. Nádvorníkem jako terčovník *Physcia bayeri* vyskytující se na vápnitých skalách termofytika (tab. 1). Od druhu *Physconia muscigena* se liší přítomností sekalonové kyseliny A v dřevěné vrstvě, díky které je dřevě zbarvena žlutě a dále i tenčí stélkou (Nádvorník 1947, Otte et al. 2002). Taxon byl v minulosti dlouhou dobu akceptován. V současné době je var. *bayeri* slučována některými autory s druhem *P. muscigena*, i když toto tvrzení není podloženo žádnými molekulárními daty.

Tab. 1: Současné lokality druhu *Physconia muscigena* po revizi v roce 2015 v České republice.

lokality	výška	hornina	GPS pozice
Praha, Butovice – lom Kačnů	300 m	diabas	50°02'39.8"N 14°20'40.3"E
Praha, Butovice – Hemrovy skály	300 m	diabas	50°02'47.6"N 14°21'49.9"E
Mikulov, CHKO Pálava	450 m	vápenec	48°51'47.5"N 16°38'00.4"E
Jeseníky, Petrovy Kameny	1446 m	fylit	50°04'06.5"N 17°14'01.4"E

V nedávné době byl popsán druh *P. isidiomuscigena* (obr. 3) vyskytující se v jihozápadních státech USA (Kalifornie, Arizona, Colorado) a v Britské Kolumbii v Kanadě (Esslinger 2000; J. Holliger et C. Björk, personal communication), který se svou morfologií velice podobá předešlým dvěma druhům. *Physconia isidiomuscigena* nese na povrchu stélky soredioidní propagule (přechod mezi sorediemi a isidiemi) v nepravidelných sorálech. Druh má i stejné ekologické nároky jako *P. muscigena* – obsazuje otevřená slunná stanoviště a roste na mechorostech (Esslinger 2000). *Physconia isidiomuscigena* se neobjevuje v žádné recentní fylogenetické práci a její příbuzenský vztah k velice podobnému druhu *P. muscigena* není znám. *P. isidiomuscigena* není zastoupená žádnou sekvencí v databázi GenBank.



Obr. 3: Lokalita druhu *P. isidiomuscigena* v Britské Kolumbii (Kanada, foto David Svoboda), detail na soredio-isidiosní propagule v nepravidelných sorálech (vpravo), měřítko 5mm.

## Výsledky a Diskuze

Předkládaná studie přináší náhled na vnitrodruhovou variabilitu druhu *Physconia muscigena* a příbuzenské vztahy mezi vybranými druhy (Starosta & Svoboda 2020). Položky studovaných druhů pocházejí z našich čerstvých sběrů nebo byly zapůjčeny z mezinárodních i soukromých herbářů (B, BP, BRA, BRNM, BRNU, GZU, H, OLM, PRA, PRC, PRM, UBC, UCR, UPS). Čerstvé sběry i herbářový materiál jsme analyzovali pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na přítomnost sekundárních metabolitů. Celkem jsme analyzovali 253 vzorků, z nichž bylo 151 pozitivních na přítomnost sekundárního metabolitu (138 z 234 u *P. muscigena*, 8 z 9 u var. *bayeri* a 5 z 9 u *P. isidiomuscigena*). Zjištěný metabolit neodpovídá žádným běžně používaným standardům v lichenologii (Orange et al. 2010). Přesná chemická struktura nebyla zjištěna, podle chování látky se nejedná o mastnou kyselinu ani o terpenoid. Přítomnost sekalonové kyseliny A, udávané některými autory (Otte et al. 2002), se nám prokázat nepodařilo.

Při fylogenetické studii jsme použili tři molekulární markery: vnitřní přepisovaný mezerník ribozomální DNA, malou ribosomální podjednotku mitochondriální DNA a elongační faktor 1 $\alpha$  (ITS rDNA, mtSSU rDNA a TEF1- $\alpha$ ), z kterých dva byly dostatečně variabilní a použitelné pro konstrukci fylogenetického stromu - ITS rDNA a TEF1- $\alpha$ . Pro elongační faktor 1 $\alpha$ , jsme nově nadesignovali specifické primery pro rod *Physconia* (TEF1- $\alpha$  fph a rph), které mají mnohem vyšší úspěšnost při amplifikaci DNA než původní již publikované univerzální primery (Carbone & Kohn 1999). Gen TEF1- $\alpha$  se jeví jako velice vhodný na rozlišování jednotlivých druhů v rodu *Physconia*, na rozdíl od mtSSU, které nedokáže rozlišit jednotlivé druhy a dále jsme ho v analýzách nepoužívali. Fylogenetická rekonstrukce ukázala velkou genetickou variabilitu druhu *Physconia muscigena* na základě studovaných úseků ITS rDNA a TEF1- $\alpha$ . Zároveň je ale druh dobře podpořen jako monofyletický u obou studovaných markerů. Z obou metod fylogenetické rekonstrukce (Bayesova analýza, metoda maximální věrohodnosti) vyplývá, že studované druhy není možné na základě použitých markerů od sebe oddělit a *Physconia isidiomuscigena* a var. *bayeri* spadají do široké genetické variability druhu *P. muscigena*. Zjištěnou haplotypovou variabilitu nelze vysvětlit geografickým

původem vzorků, jelikož jednotlivé haplotypy netvoří žádné geograficky definované skupiny a jsou náhodně promíchány. Stejnou tendenci ukazují i přítomnost zjištěných sekundárních metabolitů, kterou nelze nijak definovat. Vzhledem k těmto skutečnostem jsme se rozhodli druh *P. isidiomuscigena* překombinovat jako varietu:

***Physconia muscigena* var. *isidiomuscigena*** (Essl.) Starosta & D. Svoboda comb. et stat. nov.

MycoBank No.: MB 830984

= *Physconia isidiomuscigena* Essl., Bull. Calif. Lichen Soc. 7, 5 (2000); type: USA, Arizona, Coconino Co., Grand Canyon National Park, Nash 30843 (ASU—holotype; TLE—isotype).

*Physconia muscigena* var. *bayeri* se na základě fylogenetické pozice, morfologie ani anatomie od výše studovaných druhů neodlišuje. Podle původního popisu má druh odlišovat žlutá reakce dřene s KOH, která by měla být zapříčiněna přítomností kyseliny sekalonové A (Otte et al. 2002). Nicméně žlutou reakci dřene vykazují i některé populace druhu *P. muscigena* (Esslinger 2002). Žlutou reakci se nám nepodařilo ověřit ani u dochovaných položek z herbáře J. Nádvorníka, který druh popsal. Nepovažujeme tento znak za taxonomicky relevantní a uvádíme druh pouze jako synonymum k druhu *P. muscigena* s novým neotypem:

***Physconia muscigena* (Ach.) Poelt** Nova Hedwigia 1965, 9(1–4), 30

= *Physconia muscigena* var. *muscigena* (Ach.) Poelt Nova Hedwigia 9(1–4), 30 (1965).—  
*Parmelia muscigena* Ach., Lich. Univ., 472 (1810); type: H, hb. Ach. n. 1406 (lectotype, designated by Moberg 1977).

= *Physconia muscigena* var. *bayeri* (Nádv.) Poelt, Nova Hedwigia 9(1–4), 30 (1965).

= *Physcia muscigena* var. *bayeri* (Nádv.) Poelt, Mitteleuropäische Flechten IV, 279 (1957).

= *Physcia bayeri* Nádv., Studia Botanica Československa VIII, 124 (1947).

Původní Nádvorníkovu typovou položku (Praha-Nová Ves et Motol (Bayer, Servít!)) se nepodařilo v žádném z herbářů, kde je uložen jeho studijní materiál dohledat (PRC, PRM a BRA). Z tohoto důvodu jsme vybrali novou položku z této lokality, která byla určena J. Nádvorníkem jako neotyp: PRC 4596; MB354287. Položky zařazené do Nádvorníkovy kolekce *Physciaceae* exsiccati (Dec. 2, No. 18) mohou být považovány za topotypy.

## Závěr

Studie ukázala fylogenetickou pozici druhu *P. isidiomuscigena*, která nebyla doposud známa. *P. isidiomuscigena* se od druhu *P. muscigena* na základě dvou studovaných úseků ITS rDNA a TEF1- $\alpha$  neliší. Nicméně důležitým morfologickým rozdílem zůstává schopnost tvořit nepohlavní soledio-izidiozní propagule sloužící k rozmnožování. Druh jsme taxonomicky ponížili na varietu *Physconia muscigena* var. *isidiomuscigena*. Fylogenetická pozice a absence morfologických či anatomických znaků ukazují, že druh *Physconia muscigena* var. *bayeri* je konspecifický s nominálním druhem a není opodstatněné ho jakkoli odlišovat.





## Použitá literatura

- 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 sollicitè definitas. J. F. Danckwerts, Gottingae, 696 p.
- Carbone I. & Kohn L. M. (1999):** A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553–556.
- 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: 498–505.
- 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: 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: 1–6.
- Flakus A., Etayo J., Schiefelbein U., Ahti T., Jabłońska A., Oset M., Bach K., Flakus P. & Kukwa M. (2012)** Contribution to the knowledge of the lichen biota of Bolivia 4. *Polish Botanical Journal* 57: 427–461.
- 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.
- Lohtander K., Urbanavichus G. & Ahti T. (2007)** The phylogenetic position of two new species of *Physconia* (lichenized Ascomycetes) from Russia. *Bibliotheca Lichenologica* 96: 175.
- Moberg R (2002)** Genus *Physconia*. In: Nordic Lichen Flora Vol. 2: Physciaceae. (Ahti T., Jorgensen P., Kristinsson H., Moberg R., Sochting U., Thor G): 38–41. Uddevalla: TH-tryck AB..
- 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.
- Nádvorník J. (1947)** Physciaceae Tchecoslovaques. *Studia Botanica Českoslovaca* 8: 69–124.
- Nádvorník J. (1948)** Contribution aux Physciaceae d'Europe. *Studia Botanica Českoslovaca* 9: 144–154.
- Otte V., Esslinger T. L. & Litterski B. (2002)** Biogeographical research on European species of the lichen genus *Physconia*. *Journal of Biogeography* 29: 112–1141.
- Poelt J. (1957)** Mitteleuropäische Flechten IV. Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München 2: 273–283.
- Poelt J. (1965)** Zur Systematik der Flechtenfamilie Physciaceae. *Nova Hedwigia* 9: 21–32.

- Smith C., Aptroot A., Coppins B., Fletcher A., Gilber O. & Wolseley P. (2009)** The Lichens of Great Britain and Ireland. London: British Lichen Society.
- Starosta J. & Svoboda D. (2020)** Genetic variability in the *Physconia muscigena* group (*Physciaceae*, Ascomycota) in the Northern Hemisphere. *The Lichenologist* 52(4), 305-317.
- Thomson J. W. (1963)** The lichen genus *Physcia* in North America. *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: Central European lichens – diversity and threat (A. Lackovičová, A. Guttová, E. Lisická & P. Lizoň, eds): 119–151, Ithaca: Mycotaxon Ltd.