

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Protistologie



Bc. Zuzana Vaiglová

Dynamika lišejníkové symbiózy

Dynamics of a lichen symbiosis

Diplomová práce

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

Praha, 2017

Prohlášení

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

V Praze, 14.8.2017

Podpis

Poděkování

Můj největší dík patří Pavlu Škaloudovi, jednak za vedení práce a odborné a podnětné rady, bez kterých by práce nevznikla, ale také za přátelský a pozitivní přístup, kterým mě motivuje do další vědecké práce. Dále bych chtěla velmi poděkovat Ondrovi Peksovi, který se mnou obětavě za každého počasí jezdil do terénu a poskytoval cenné informace nejen z oboru lichenologie.

Také děkuji Helče Bestové za podhalení tajů programu R, Lucce Vančurové a Ivče Jadrné za přínosné fotobiontí diskuse a poskytnutí sekvencí. Můj velký dík patří i Lence Flaškové z DNA laboratoře za dlouholetou všestrannou pomoc s molekulárními metodami. Za možnost účastnit se lichenologického *journal clubu* a za informace o rozmnožování lišejníků děkuji Jirkovi Malíčkoví.

Za pomoc se získáním informací o historii lomů v Českém krasu tímto děkuji geologovi muzea v Berouně Štěpánu Rakovi a důlnímu inženýrovi Velkolomu Čertovy schody Michalu Hejnovi.

Abstrakt

Symbiotické vztahy často nejsou jen neměnným soužitím dvou organismů, ale mohou se postupem času vyvíjet. U lišejníků bylo již publikováno mnoho prací o jejich specifitě, která se pohybuje od vysoce specifických typů, po takové, které jsou schopny kooperace s řasami nejrůznějšími. A právě u lišejníků schopných kooperace s více různými řasami si lze představit možnost změnit fotobionta během života, neboli dynamiku jejich symbiózy.

Tento fenomén byl studován pomocí srovnání fotobiontů na disturbovaných lokalitách a lokalitách bez známek disturbancí. Počtem přítomných linií fotobiontů byly obě lokality vyrovnané, avšak rodů fotobiontů bylo na disturbovaných lokalitách nalezeno více. Srovnání fylogenetické diverzity obou stanovišť také poukázalo na vyšší diverzitu disturbovaných stanovišť. Nefylogenetické analýzy naopak vyzdvihly diverzitu lokalit stálých – avšak na těchto lokalitách tvořily většinu diverzity různé linie rodu *Trebouxia*. Byly nalezeny i případy lišejníků téhož druhu, které měly na lokalitách disturbovaných jiného fotobionta, než na lokalitách stálých.

Nalezená distribuce fotobiontů naznačuje možnost změny fotobionta s vývojem společenstva. Vysvětlením by mohla být buď snížená specifita při tvorbě stélky a možnost pozdějšího nahrazení, či to, že fotobiont upřednostněný v počátečních stádiích je výhodnější v okamžiku první kolonizace stanoviště, ale v jeho pozdějších fázích je nahrazen fotobiontem naopak výhodným pro dlouhodobé přežívání.

Klíčová slova

fotobiont, lišejník, symbióza, dynamika, zelené řasy, diverzita, Chlorophyta

Abstract

The symbiotic relationships often represent not only the permanent cohabitation of two organisms, but they can evolve and change over time. Many papers published so far focused on the the specificity of lichens, characterising both highly specific species and those that can establish a symbiosis with many algal genotypes. In this second case we can imagine the possibility of a photobiont exchange during the life of lichen – the dynamics of lichen symbiosis.

In this thesis I compared the occurrence and diversity of photobionts within the thalli of lichens growing on the disturbed localities and on the the localities without the disturbance. These two types of localities were similar to species richness of photobionts, but the disturbed localities dominated by the number of photobiont genera. These localities also reached a higher value of phylogenetic diversity. Conversely, non-phylogenetic analysis revealed the higher level of photobiont diversity on non-disturbed localities, where the core of diversity was formed by different lineages of *Trebouxia*. I have also found the lichens, which cooperate with different algae on disturbed and non-disturbed localities.

The photobiont distribution presented in this paper shows the possibility of photobiont exchange during the community succession. The explanation can lie in lower mycobiont specificity during the thallus formation with the possibility of future exchange. On the other hand, the photobionts detected in the first phase of lichen life could be more suitable for the substrate colonization, whereas the algal genotypes detected in mature lichens could be suitable for a permanent persistence of lichen thalli.

Key words

photobiont, lichen, symbiosis, dynamics, green algae, diversity, Chlorophyta

Obsah

Úvod	8
Dynamika symbiůzy napříč organismy.....	9
<i>Korálová symbiůza</i>	9
<i>Mykorhizní symbiůza</i>	12
<i>Symbiůza nezmara zeleného</i>	15
<i>Symbiůza bobovitých rostlin a hlízkových bakterií</i>	17
Výzkum dynamiky lišejníkové symbiůzy.....	19
<i>Třetí lišejníkový partner</i>	21
Můžeme v dynamice symbiůz vysledovat společné trendy?.....	21
Cíle práce	22
Materiál a metody	23
Vytipování lokalit a sběr vzorků.....	23
Stanovení míry disturbance.....	24
<i>Data o ukončení těžby</i>	24
<i>Lichenometrie</i>	25
<i>Lišejníková sukcese</i>	25
Příprava a extrakce DNA.....	27
PCR.....	28
Kontrola kvality DNA, přečištění a sekvenace.....	29
Více fotobiontů ve stélce.....	29
Fotobionti z třídy Ulvophyceae.....	29
Zpracování sekvenčních dat.....	30
<i>Stromy rodů</i>	30
<i>Strom linií</i>	32
Analýzy.....	33
<i>Nefylogenetické analýzy diverzity a druhové bohatosti</i>	34
Alfa-diverzita.....	34
Beta-diversita.....	34
Výsledky	36
Míra disturbance lokalit.....	36
<i>Data o ukončení těžby</i>	36
<i>Lichenometrie</i>	36
<i>Lišejníková sukcese</i>	37
Nalezené linie fotobiontů.....	38
Analýzy fylogenetické diverzity.....	46
Nefylogenetické analýzy diverzity.....	47
<i>Alfa-diverzita</i>	47
<i>Beta-diverzita</i>	48
Diskuse	50
Nalezené linie fotobiontů.....	50
Bohatost lichenoflóry a míra disturbance.....	52
Druhová bohatost a fylogenetická diverzita fotobiontů.....	53
Je lišejníková symbiůza dynamickou interakcí?.....	54
Jaké zákonitosti ovlivňují vznik interakce?.....	55
Výměna fotobionta jako konkurenční výhoda?.....	56

Závěr.....	57
Použitá literatura.....	58
Příloha 1.....	66

Úvod

Symbióza je beze sporu jedním z nedůležitějších aspektů, doprovázející vývoj a evoluci živých organismů (Sapp, 2004). Tento fenomén hrál klíčovou roli už při samotném vzniku eukaryotické buňky (Taylor, 1974, Margulis, 1981) a dnes pozorujeme v přírodě nespočet případů organismů žijících v síti symbiotických vztahů.

Do obecného povědomí se slovo symbióza dostalo poté, co jej použil ve své práci roku 1879 Anton De Bary, profesor botaniky na universitě ve Štrasburku, kterého pozorování dvou v těsném kontaktu žijících rostlin podnítilo ke studiu kooperativních vztahů. Navrhl pro ně používat právě pojem symbióza, složený z řeckých slov *syn* = společně, a *bios* = život, jak jej vymyslel o dva roky dříve lichenolog Albert B. Frank. De Bary termínem označoval různé typy soužití, od plného parazitismu, po vztah oboustranně prospěšný. V tomto původním smyslu budu termín používat i já dále ve své práci, ačkoliv často se můžeme setkat i se zúžením jeho významu na vztah, ze kterého mají oba zúčastnění prospěch. Pro tento konkrétní případ symbiózy však lze vhodněji používat pojem mutualismus (Wilkinson, 2001). Právě u lišejníků totiž nepanuje všeobecná shoda týkající se povahy jejich symbiózy, např. Herre et al. (1999) mluví o lišejníkové symbióze jako o příkladu mutualismu, avšak Ahmadjian (1995), Ahmadjian et Jacobs (2011) či Kershaw et Millbank (1970) popisují tento vztah v rámci duálního organismu jako kontrolovaný parazitismus, ve kterém houbový partner profituje na úkor „domestikovaného“ fotobionta. Wooldrige (2010) ve stejném duchu hovoří i o korálové symbióze. I proto se omezím na označení soužití jako symbiózy, bez toho, abych již samotným termínem předesílala jeho povahu.

Za zásadní faktory ovlivňující formování společenstva byly tradičně považovány zejména negativní interakce, jako vzájemná kompetice o zdroje či predace, nicméně stále více se ukazuje, že i interakce pozitivní, mutualistické, zde hrají významnou roli (Hay et al. 2004). Zapojení se do symbiotického, potažmo mutualistického vztahu umožňuje organismům například čerpat z prostředí látky, na jejichž získání by jim vlastní biochemický aparát nestačil (jako v případě rostlin čeledi Fabaceae a symbiotických bakterií, žijících v kontaktu s jejich kořeny (Wilson et al., 1940), osídlit prostředí, ve kterém by jinak nedokázali získat dostatek živin (jak je tomu u korálů a symbiotických řas, žijících v živinami chudých tropických mořích (Muscatine a Porter 1977)), či strávit látky s náročněji narušitelnými chemickými vazbami (jako je tomu u termitů a prvoků ze skupiny Parabasalia (Martin et Martin, 1978, Slaytor, 1992)).

Symbiotickým vztahem v přírodě často není jen triviální stálé soužití právě dvou partnerů, mohou do něj zasahovat a ovlivňovat jej i další organismy, mohou se v čase měnit jak symbiotičtí

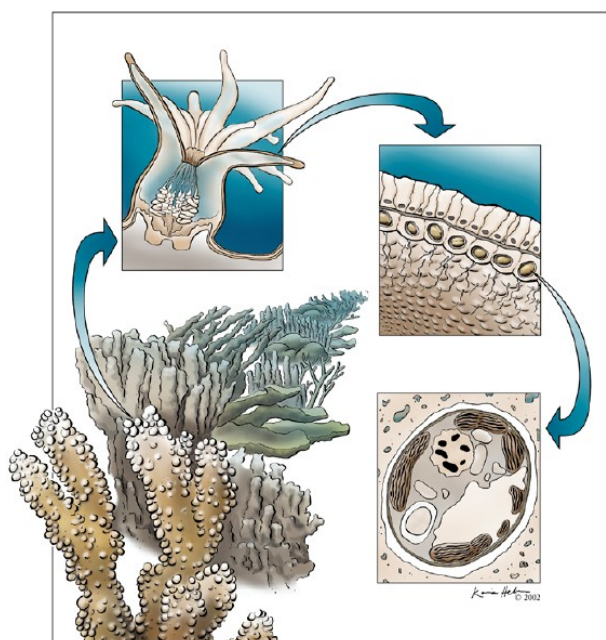
partneři, tak se může vyvíjet i co do povahy soužití, např. od parazitismu směrem k mutualismu (Canestrari et al., 2014). Za modelový příklad stálého, specifického mutualistického soužití dvou organismů bývá uváděna americká rostlina juka (*Yucca*) a její opylovači, hmyz z čeledi Prodoxidae. Hmyz je specializován pouze na tento rostlinný rod, do jejichž semen klade svá vajíčka, a současně ani zástupce jiné hmyzí čeledi nedokáže juku opylovat (Pellmyr et al. 1996).

Některým ze symbiotických vztahů, které takto trvalé nejsou, a u kterých již byla poodhalena jejich dynamika, se budu věnovat v úvodní části své práce. Pokusím se odhalit rysy, kterými jsou symbiózy napříč skupinami charakteristické, a zjistit, zda v jejich dynamice nelze nalézt společné trendy. To srovnám se symbiózou, které jsem se věnovala v mém výzkumu, tedy se symbiózou lišejníkovou. Na závěr úvodní části se ještě krátce zmíním o dosavadním výzkumu dynamiky této symbiózy.

Dynamika symbiózy napříč organismy

Korálová symbióza

Korálové útesy jsou vodní ekosystém, obývaný neobvyklým množstvím organismů od ryb, přes bezobralé, po nejrůznější skupiny makrořas i mikroorganismů. Pro svou bohatost, estetičnost a globální význam jsou v centru pozornosti nejen vědecké, ale i laické veřejnosti. Strukturní i trofický základ korálových útesů tvoří koráli (Meyer et Weis, 2012), živočichové z kmene žahavců, kteří žijí v symbióze jednak s celou řadou prokaryotických organismů (Lesser et al., 2007), ale také s řasami, zpravidla s obrněnkami rodu *Symbiodinium*. Tyto řasy nepatří mezi zelené



řasy, organismy s primárním plastidem, nýbrž do skupiny Alveolata, a díky svému žlutavému zbarvení byly nazvány zooxanthelami (Brandt, 1882). Tato symbióza je klíčovým faktorem v evolučním úspěchu útesotvorných korálů a umožnila jim dlouhodobě přežít v měřítku geologického času (Muller-Parker et al., 2015). Koráli žijí často jako koloniální organismy a v rámci kolonie mohou sdílet potravu a živiny pomocí propojeného gastrovaskulárního systému (Gladfelter, 1983).

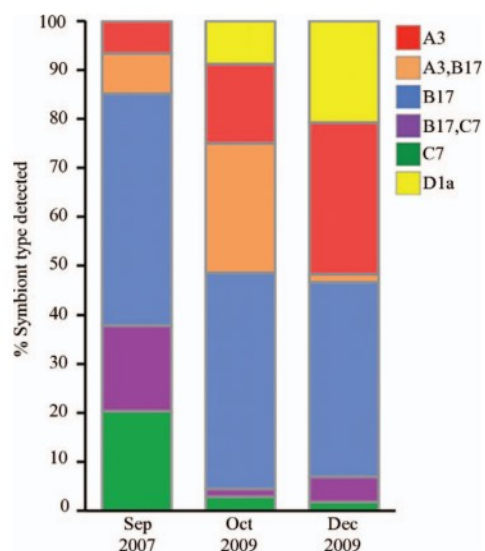
Na obrázku 1 je znázorněn jedinec polypa korálu, v pravém horním rohu je průřez povrchem

živočicha. Povrchová vrstva, epidermis, je v kontaktu s okolím, a jedna z jejích částí vylučuje vápenatou vnější kostru. Pod epidermis se nachází tenká pojivová tkáň mezoglea, jež ji odděluje od vnitřní gastrodermis, osídlené symbiotickými řasami a dotýkající se trávicí dutiny láčkovce. Symbiont neleží volně ve tkáni hostitele, ale je obklopen perivakuolární, čili symbiontoforní membránou. Jejich počet se pohybuje mezi jedním a dvěma miliony na cm² povrchu hostitele (Chappell, 1980, Muller-Parker et al., 2015).

Během života v těle láčkovce se řasa nemůže pohlavně rozmnožovat a současně je její morfologie značně uniformní a zjednodušená oproti voně žijícím obrněnkám, proto byly studie jejich diverzity velmi komplikované a omezené na ty linie, které se podařilo kultivovat i mimo tělo hostitele. Původně byly dokonce řasy považovány za jeden jediný druh, *Symbiodinium microadriaticum*. Celková bohatost symbiontů začala být odhalována až s nástupem molekulárních metod, s čímž bylo možné provádět i studie specificity symbiotických partnerů, či právě jejich změn (Rowan et Powers, 1992). Díky molekulárním studiím se ukázalo, že tato symbióza může být daleko flexibilnější a dynamičtější, než se v minulosti předpokládalo. Některé linie řas patří mezi obvyklé partnery, jiné najdeme jen u larválních stadií či v extrémních prostředích a můžeme se domnívat, že tato schopnost spolupráce s různými zooxanthelami hraje roli v odolnosti korálového ekosystému proti environmentálním změnám (Baker, 2003).

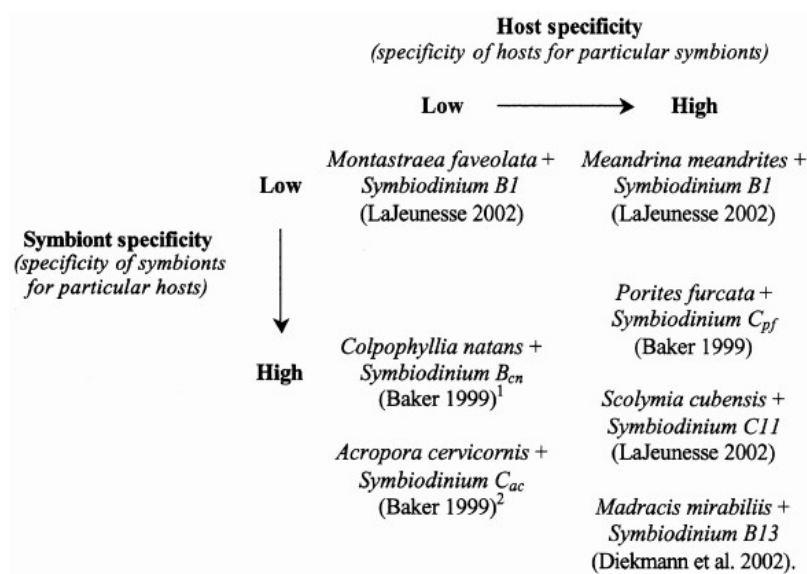
Posledních přibližně 20 let je věnována velká pozornost jevu tzv. *coral bleaching*, jenž lze přeložit jako vybělování korálů, při kterém dojde ke ztrátě řasových symbiontů, popřípadě k citelnému snížení obsahu jejich fotosyntetických pigmentů. U vybělených korálů pozorujeme zvýšenou úmrtnost, která může vést až k úhynu celé rozsáhlé masy útesu (Sheppard, 2003). Vybělování korálů je pozorováno již od druhé poloviny 19. století, jejich ojedinělé výskyty lze vysvětlit přítomností lokálních stresorů (např. znečištění, sedimentace či expozice vzduchu), avšak plošný výskyt bývá spojován s rostoucí teplotou světových moří (Glynn, 1993). V souvislosti s tímto jevem byla zaznamenána i výměna symbiotické řasy za příslušníka teplotně odolnější linie, což může dávat naději pro přežití útesu i při zvyšování se teploty vody (Hume et al., 2013).

Kemp et al. (2014) popisují dynamiku symbiotického vztahu korálu rodu *Orbicella* a různých linií řasy *Symbiodinium* před vybělením, během něj a po něm. Kromě změny hustoty symbiontů pozorovali i značný rozdíl v zastoupení jednotlivých řasových linií v



obrázek 2: Změna řasových symbiontů během vybělování korálu a po něm. Sloupce znázorňují jednotlivé odběry, prostřední odběr byl proveden během vybělování. Různé barvy označují linie rodu *Symbiodinium*. (Kemp et al. 2014)

hostiteli, jak je zobrazeno na obrázku 2 vpravo. Vybělení nastalo v říjnu 2009 (prostřední sloupec). Žlutý pruh označuje příslušníky linie D, která se vyznačuje schopností lépe tolerovat zvýšené teploty. Bylo pozorováno, že soužití s touto řasou umožňuje i jinak citlivému druhu přežít teplotní stres. Změna symbiontů v rámci jedince byla pozorována nejen během vybělování (Chen et al., 2003), ale i během sezónních změn či ontogeneze.



obrázek 3: Konkrétní příklady korálů a řas s různou mírou specificty. Směrem dolů a doprava specificta roste. (Baker, 2003)

Schopnost korálu tvořit dynamický symbiotický vztah, tedy změnit zooxanthely během života, úzce souvisí s jejich specifictou. Byly popsány případy specializovaných hostitelů, kteří byli schopni kooperovat jen s jedním či několika málo příbuznými taxony řas, ale i takových, jenž si uměli své symbiotické partnery vybírat z širokého spektra (LaJeunesse, 2002). A naopak, mnoho

druhů zooxanthel je schopno kooperovat s širokým spektrem hostitelů, jiné jsou specializované pouze na jeden taxon. Příklady různého stupně specificty hostitelů i zooxanthel jsou zobrazeny na obrázku 3, ve vodorovné ose směrem doprava roste specificta korálu, na svislé ose směrem dolů specificta řas (Baker, 2003). Přes současný značný vědecký zájem o toto téma musíme k datům o specifictě přistupovat s vědomím nedokonalého poznání organismů - ten, který se nám jeví jako specifický, může být ve skutečnosti jen dosud nepoznaný.

Little et al. (2004) uvádějí, že v počátečním stadiu utváření symbiotického vztahu vycytává korál ze svého okolí řasy velmi nespecificky a je schopen své symbionty měnit a nahrazovat je příslušníky jiných linií. V rámci výzkumu také experimentálně nakazili korály různými liniemi řas a sledovali jejich odlišnou růstovou rychlost (zde jedinci infikovaní řasou z linie C vykazovali násobně vyšší růstovou rychlost, než ti kooperující s linií D). Dále pozorovali u mladých jedinců soužití s různými liniemi *Symbiodinium* i přesto, že pro dotyčný rod korálu byla v dospělosti charakteristická pouze jedna konkrétní linie.

Nicméně, Goulet (2006), která ve své metastudii shrnuje a srovnává výzkumy týkající se výměny symbiontů, konstatuje, že schopnost změnit kooperující řasovou linii má jen menšina studovaných korálů (23 %), kdežto 77 % druhů korálů je vázaných na úzkou skupinu řas, či dokonce na jediný genotyp. Z dosavadních výsledků se zdá, že ti, kteří jsou schopni svého

symbionta vyměnit, musí obecně jako druh kooperovat s více liniemi *Symbiodinium*, ať už u různých jedinců na různých lokalitách, u různých jedinců na stejné lokalitě v různé hloubce, či v rámci jednoho jedince. S tímto poznáním vyjadřuje autorka obavu, že pozorovaná schopnost výměny fotobionta nemusí znamenat naději pro přežití korálových útesů, protože se týká jen úzké podmnožiny z bohaté palety korálových druhů.

Mykorhizní symbióza

Mykorhizní symbióza je zpravidla mutualistický vztah mezi houbami a kořeny rostlin, do kterého se zapojuje podle různých odhadů až 90 % všech vyšších rostlin a je nejhojnější houbovou symbiotickou interakcí (Smith et Read, 1997). Podle míry a způsobu kontaktu houbových hyf a kořenů rostlin rozeznáváme několik typů mykorhizní symbiózy, zejména se lišících tím, zda hyfy zasahují do buněk rostliny (endomykorhizní symbióza, např. arbuskulární mykorhizní symbióza), či se nacházejí pouze v mezibuněčných prostorech (ektomykorhiza) (Harley et al., 1983, Smith et al., 2010).

Nicméně, byly již nalezeny i případy obou typů mykorhizní symbiózy u jedné rostliny, jak popisují Ergerton-Warburton a Allen (2001) u dubu *Quercus argifolia*. Pozorovali také vývoj symbiózy – u mladších rostlin (semenáčků do 1 roku) převládala kombinace arbuskulární a ektomykorhizní symbiózy semenáčků, u starších jedinců (nad 11 let) se již ustanovila výhradně symbióza ektomykorhizní. Podobný průběh byl pozorován u z hlediska mykorhizní symbiózy často studovaného rodu *Eucalyptus*. Některé jeho druhy tvoří ektomykorhizní symbiózu, jiné vstupují do arbuskulární mykorhizní symbiózy a další jsou schopny kooperovat s oběma typy hub zároveň. U druhu *E. dumosa* bylo popsáno lepší uchycení a prospívání semenáčků v případě kooperace s arbuskulárním mykorhizním partnerem, který však byl během růstu nahrazen pro druh obvyklejším ektomykorhizním (Lapeyrie et Chilvers, 1985).

Podobně byla kombinace arbuskulární a ektomykorhizní symbiózy pozorována u semenáčků jedle (*Abies lasiocarpa*) a jedlovce (*Tsuga mertensiana*). Pokud semenáčky rostly na místech pro ně typických (na otevřených plochách), vykazovaly vysokou míru kolonizace arbuskulárními houbami, v případě růstu v lesním podrostu byla míra nižší. V dospělosti je však pro čeleď Pinaceae, do níž oba druhy patří, typická symbióza ektomykorhizní (Cázares et Trappe, 1993).

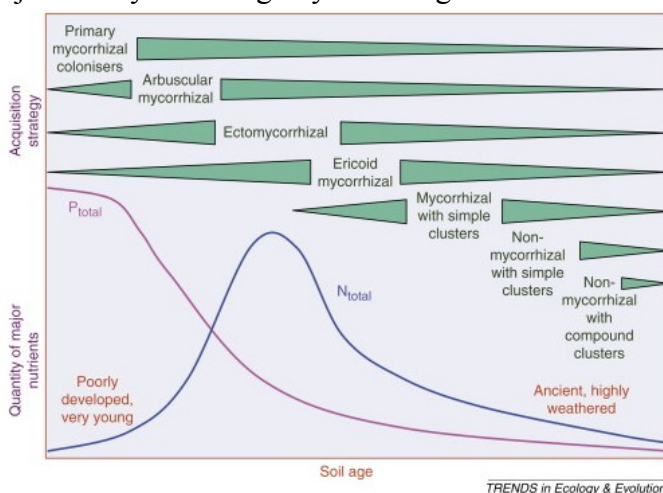
Uvedený jev, tedy preference arbuskulární mykorhizní symbiózy u semenáčků a postupné nahrazení ektomykorhizou, může souviset s odlišnou schopností z půdy čerpat a svému partnerovi

předávat živiny, zejména dusík a fosfor. Některé druhy ektomykorhizních hub jsou schopné rozrušovat vazby v dosud nerozložených organických komplexech, ve kterých jsou živiny vázány např. v chladnějších oblastech (kde je rozklad zpomalen teplotou), nebo právě v lesních ekosystémech (kde je zpomalen nižším pH). Oproti tomu arbuskulárně mykorhizní houby mohou lépe čerpat volné iontové formy dusíku a fosforu a dokud je jich dostatek, může být pro rostlinu výhodnější tento typ symbiózy (Read et Perez-Moreno, 2003).

Lambers et al. (2008) popisují utváření mykorhizní symbiózy v závislosti na stáří půdy, ve které rostlina roste. Ve starých půdách bývá často limitujícím faktorem pro růst fosfor, neboť postupem času dochází k jeho vymývání, v mladých půdách (nedávno vyvržených sopečnou činností) bývá limitující spíše dusík. Na nedostatek těchto dvou prvků se rostliny adaptují jednak tvorbou tzv. kartáčkovitých kořenů, neboli kořenových klastrů, a dále právě zapojením se do mykorhizní symbiózy, která má zpočátku povahu spíše arbuskulární, později, při snižování množství dostupného fosforu, je nahrazována ektomykorhizní symbiózou.

Obrázek 4 znázorňuje, jak je zastoupení jednotlivých ekologických strategií závislé na věku

půdy. Jako první z mykorhizovaných zástupců osidlují půdu arbuskulárně-mykorhizní rostliny, teprve po nich nastupují ti s ektomykorhizními houbami. Až po překročení maxima dusíku v půdě, ve fázi jeho vyčerpávání, přichází na řadu další mykorhizní typy, jako např. erikoidní mykorhizní symbióza (typ mykorhizní symbiózy specifický zejména pro rostlinnou čeleď *Ericaceae* a je výhodná v místech s nižším množstvím dostupných živin a vyšší mírou stresu (Cairney et Mehang, 2003). Míru zastoupení jednotlivých strategií vyjadřuje šířka trojúhelníků.



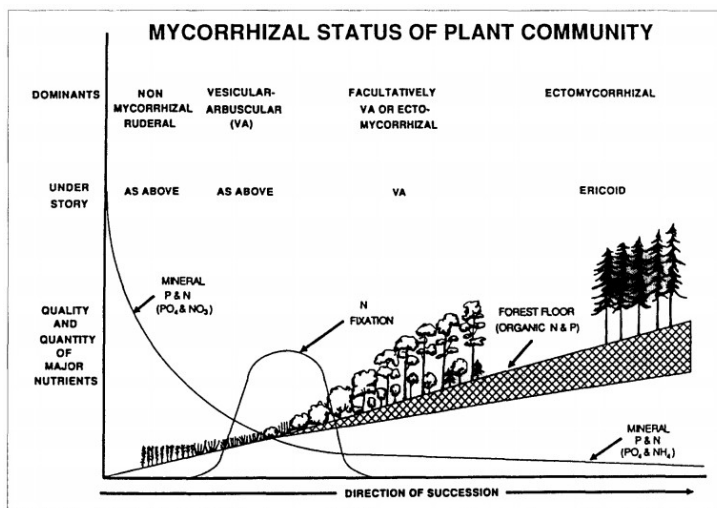
obrázek 4: Převládající typy mykorhizní symbiózy v závislosti na stáří půdy, věk roste směrem doprava po ose x. Fialová křivka znázorňuje postupné vymývání fosforu, modrá křivka přítomnost dusíku (jejich množství roste vzhůru po ose y). Šířka trojúhelníku vyjadřuje míru zastoupení daného typu mykorhizní symbiózy. (Lambers et al., 2008)

Byla sledována i míra a vývoj mykorhizní symbiózy v závislosti na disturbanci stanoviště. Read a Birch (1988) uvádějí, že pro rostliny využívající r-strategii je spolupráce s mykorhizními houbami méně důležitá, než pro K-strategy. Při brzké kolonizaci stanoviště je pro rostlinu důležitější rychle vyvinout vlastní kořenový systém. Francis a Read (1994) zdůrazňují, že zástupce čeledí, u kterých se mykorhizní symbióza vyskytuje v menší míře (*Polygonaceae* či *Chenopodiaceae*), častěji najdeme právě na disturbovaných stanovištích. Tyto rostliny dovedou rychle využít živiny uvolněné při narušení stanoviště a vykonat svůj životní cyklus ještě před

kolonizací konkurenceschopnějšími druhy, které zpravidla tvoří arbuskulární mykorhizní symbiózu.

Čerstvá, narušená stanoviště se tedy vyznačují přítomností druhů bez mykorhizního partnera, pro stabilní stanoviště je charakteristická aktivní myceliální síť tvořící arbuskulární mykorhizní symbiózu, přecházející u dřevin v ektomykorhizu. Na obrázku 5 autoři zobrazují průběh sukcese na příkladu boreálního lesa a vztah mezi změnou fyzikálních a chemických parametrů a výskytem různých mykorhizních typů.

Stejně jako v případě korálových symbiontů, i zde má případná dynamika symbiózy úzkou souvislost s její specificitou. Dříve převažoval názor, že jde o vztah převážně nespecifický, neboť jeden druh rostliny šlo v experimentálních podmínkách úspěšně naočkovat mnoha různými druhy mykorhizních partnerů. Nicméně, při pozorováních přírodních společenstev se zdá, že mycelium houby vykazuje sice poměrně nízkou, ale i tak dobře definovatelnou hostitelskou specificitu,



obrázek 5: Průběh sukcese z hlediska vývoje mykorhizní symbiózy na příkladu boreálního lesa. Směrem doprava na ose x se zvyšuje stáří lokality, křivky znázorňují množství dostupných živin. Horní řádek: dominantní typ mykorhizní symbiózy (zleva: žádná, arbuskulární, fakultativně arbuskulární či ektomykorhizní, ektomykorhizní), spodní řádek: doprovodný typ (zleva: žádný, arbuskulární, arbuskulární, erikoidní). Šrafování zobrazuje lesní půdu s obsaženým organickým dusíkem a fosforem. (Francis a Read 1994)

kteří vede spíše k preferování určitého partnera, než-li ke striktnímu vyloučení jiných. Není však zatím jasné, zda je to houba, či rostlina, která preferenci projevuje (Sanders, 2003). Vyšší specificita byla pozorována u ektomykorhizní symbiózy, oproti tomu v druhově bohatých lučních společenstvech s arbuskulární mykorhizou je specificita nízká (Francis a Read 1994).

Studium dynamiky mykorhizní symbiózy je komplikované mimo jiné z důvodu vzájemné morfologické podobnosti jednotlivých druhů mykorhizních hub a proto přinesly do této problematiky nový vhled až molekulární metody a použití specifických primerů. Vandenkoornhuysen et al. (2002) odebírali více než rok vzorky kořenů ze dvou druhů v lučním ekosystému (*Agrostis capillaris* a *Trifolium repens*) a kromě rozdílu partnerů u mezi druhy pozorovali i změnu partnerů v rámci jednotlivých druhů. To, že se složení mykorhizních partnerů mezi druhy významně lišilo, hovoří proti teorii o nízké specificitě v lučních společenstvech. Nejvýznamnější změna v mykorhizních partnerech nastala v období mezi dvěma odběry, během kterého došlo ke změně managementu lokality od pasení ke kosení. Spolu s tím se změnila i dostupnost živin a tedy zdá se, že se rostlina s tímto zásahem dokáže vyrovnat i změnou mykorhizního partnera.

Nara (2006) sledoval pionýrské druhy dřevin během primární sukcese ve vulkanické poušti

na hoře Fudži v Japonsku a srovnával jejich mykorhizní partnery. Nejčastější pionýrskou dřevinou byla vrba *Salix reinii*, kterou v některých případech doprovázela bříza *Betula ermanii* a modřín *Larix kaempferi*. Tyto dva druhy se však nikdy nevyskytovaly na místech bez vrby. Mykorhizní houby kooperující s vrbou, modřínem i břízou se navzájem podobaly a šlo o druhy známé jako generalisty, schopné tvořit symbiózu s více rostlinnými čeleděmi. Vrba by zde tedy mohla hrát roli v sukcesi tím, že poskytuje partnery pro mykorhizní symbiózu pozdějším kolonizátorům, kteří by se jinak nedokázali sami na stanovišti uchytit.

Mykorhizní symbióza je tedy vztahem, který může být dynamický a vyvíjet se během života rostliny. Byly popsány případy, kdy se rostliny pomocí změny mykorhizního symbionta vyrovnaly se změnou vnějšího prostředí a jsou známy některé zákonitosti zapojení různých typů mykorhizních hub podle stáří a typu stanoviště.

Symbióza nezmara zeleného

Oproti korálové a mykorhizní symbióze s globálními významy je soužití drobného žahavce nezmara zeleného (*Hydra viridissima*) a zelených řas rodu *Chlorella* spíše kuriozitou. Její povaha byla studována zejména v 80. letech, dnes je nezmar více využíván jako model pro testování toxicity kovů ve vodním prostředí, například kadmia, zinku či uranu (Holdway et al., 2001, Reithmuller et al., 2001, Karntanut et Paschale, 2005 a další), ale i organických látek jako bisfenol A či estradiol (Pascoe et al., 2002).

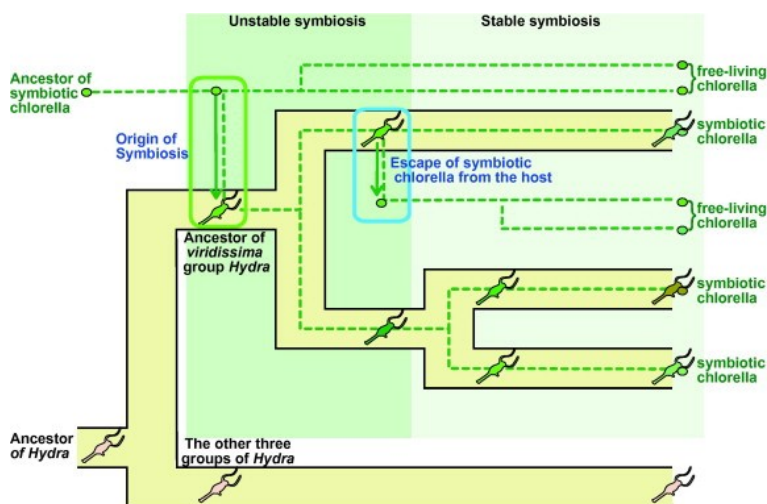
Nezmar se může rozmnožovat nepohlavně pučením, přičemž dceřinný organismus vzniká již se symbionty uvnitř těla, a dále i pohlavně, kdy dochází k přenosu symbiontů prostřednictvím oocytů. Řasy se v těle nezmara nacházejí v buňkách endodermu, odkud se uvolňují do mezolamel a dále jednotlivě do mezibuněčných prostor ektodermu, načež jsou pomocí fagocytózy uzavřeny do oocytů, které vznikají v ektodermální vrstvě (Campbell, 1990). V přírodě tedy dochází k předávání symbiontů po vertikální linii, nicméně daří se pěstovat i aposymbiotické hybridy (tedy jedince bez symbiontů). Rahat et Reich (1984) nakazili takového jedince volně žijícím kmenem řasy rodu *Chlorella* a pozorovali ustanovení symbiózy, která se však od v přírodě pozorovaných symbióz ve svých vlastnostech lišila. Řasy se uvnitř hostitele zdánlivě nekontrolovaně množily, což však bylo kompenzováno jejich strávením či vyvržením do média. Tyto vyvržené buňky hostitel opět pohlcoval, což vedlo ke kontinuální reinfekci. Tento model autoři navrhuji jako vhodný pro studium evoluce symbiózy.

Rahat (1985) využil aposymbiotických hybridů ke zkoumání kompetice mezi řasami při

nakažení hostitele více kmeny zároveň. Byl použit kmen získaný z jiného jedince *H. viridissima* a původně nesymbiotický kmen volně žijící řasy. Po infekci bylo pozorováno vytvoření chimérické symbiomy s oběma kmeny. Časem chimérické infekce vymizely a došlo k vytvoření populace, ve které různí jedinci kooperovali s různými řasovými kmeny. Autoři to vysvětlují konkurenčním bojem o intracelulární prostředí mezi řasovými kmeny, ale důvodem může být i poměrně úzké „hrdlo láhve“, kterým prochází buňky symbionta při přenosu do další generace nezmarů.

Aposymbiotičtí hybridy posloužili i při výzkumu vzájemné závislosti symbiotických partnerů – byl-li nezmarovi bez symbiontů poskytnut dostatek potravy (drobných korýšů), nebyl jeho růst oproti symbiotickým jedincům zpomalen, při nedostatku potravy však strádal. Symbiotické řasy svému hostiteli tedy poskytují živiny, díky čemuž je schopen přežít i období hladovění. Současně bylo u aposymbiotických hybridů pozorováno utlumení sexuálního rozmnožování, konkrétně tvorba samičích gonád. Lze se tedy domnívat, že v tomto procesu hraje také symbiont svou roli (Habetha et al., 2003, Bossert et al., 1986).

Někteří autoři se přiklánějí k názoru, že symbiotické řasy kooperující s nezmarem jsou symbiotické obligátně, nedokáží žít mimo hostitele a předávají se výhradně vertikálně (Rahat 1985), byla však formulována ještě kompetiční hypotéza, která popisuje, že nezmar při konzumaci své potravy (korýšů) polyká neustále i další nové řasy, které spolu s kořistí pohlcuje a tyto pak konkurují s již zavedenými symbionty (Huss et al., 1994). Teprve molekulární metody umožnily provést fylogenetickou studii dívající se na případnou koevoluci nezmarů a jejich symbiotických řas (Kawaida et al., 2012). Jedna z prvních takových studií odhalila příbuznost symbiontů s volně žijícími řasami linie *Chlorella vulgaris/sorokiniana* (Huss et al., 1994), další pak příbuznost jiným volně žijícím liniím. Fylogenetické stromy hostitele a symbionta se však v citované studii shodují, z čehož autoři usuzují, že po ustanovení symbiomy již k reinfekcím od volně žijících kmenů nedochází a evoluce nezmarů a řasy pokračuje společnou cestou. Příbuznost více různým volně žijícím kmenům vysvětlují opětovným únikem symbionta k samostatnému životu (obrázek 6) (Kawaida et al., 2012).



obrázek 6: Předpokládaná koevoluce *H. viridissima* a řasových symbiontů. Zeleně je znázorněn okamžik ustanovení symbiomy, modře únik části symbiontů zpět k nesymbiotickému životu. (Kawaida et al., 2012)

Z výsledků současných studií se

tedy zdá, že symbióza nezmarů a zelené řasy rodu *Chlorella* je spíše statická, nicméně mnohokrát

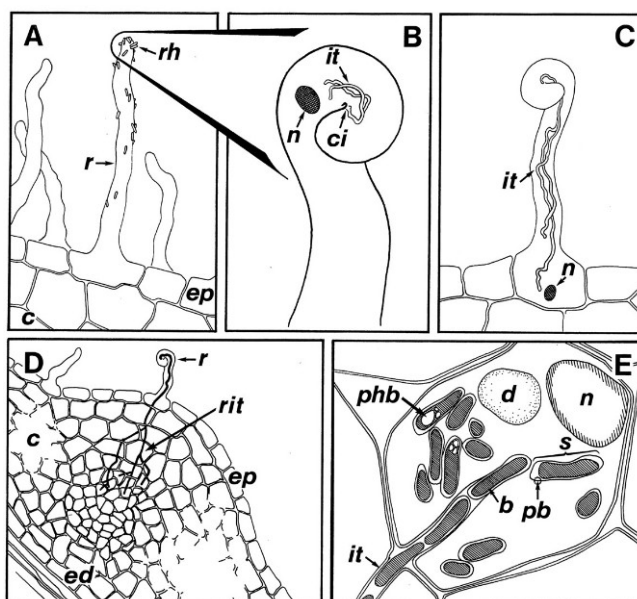
došlo k úspěšnému experimentálnímu nakažení polypa nesymbiotickým kmenem a není tedy vyloučeno, že k něčemu podobnému v přírodě může, byť vzácně, docházet. I vzhledem k tomu, že se výzkum sladkovodních zelenošasových symbióz nachází mimo centrum současného všeobecného zájmu, je skutečná povaha tohoto jevu v přírodě značně nejasná a neprozkoumaná, dosud čekající na své odhalení.

Symbióza bobovitých rostlin a hlízkových bakterií

Již v roce 1888 byly bakterie žijící v hlízkách na kořenech rostlin identifikovány jako zdroj dusíku pro své hostitele (Hirsch et al., 2001). Nejznámějšími hostiteli jsou rostliny čeledi *Fabaceae* (bobovité), ale do symbiózy se zapojují i zástupci několika dalších čeledí. Jejich partnery jsou gramnegativní bakterie, nejčastěji rodu *Rhizobium* (ale např. i *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* či *Sinorhizobium*). Bacterie indukují tvorbu tzv. nodů, hlízek, jež posléze obývají, a dusík, který jsou schopny fixovat, sdílí s rostlinným hostitelem (Long, 1996).

Vzhledem k vysokému hospodářskému významu této symbiózy je známo již mnoho aspektů týkající se její tvorby a mechanismu spojení bakterií a hostitele. Bylo potvrzeno, že ke kontaktu bakterií a hostitelské rostliny dochází přesně řízeným a koordinovaným způsobem. Důležitou roli v

komunikaci hrají flavonoidy vylučované hostitelskou rostlinou, v reakci na něž produkují bakterie tzv. *nod factors*, vyvolávající u kořenu specifické odpovědi, např. přeorientování růstu kořenových vlásků. Byla již identifikována celá řada *nod factors* i genů, které jsou za jejich syntézu zodpovědné. Schopnost syntetizovat či naopak rozeznávat konkrétní *nod factor* souvisí se specificitou této symbiózy (Perret et al., 2000, Debelle et al., 2001). Je například známo, že bakterie *Sinorhizobium meliloti* účinně kooperuje pouze s druhy rodu tolice (*Medicago*), komonice (*Melilotus*) a pískavice (*Trigonella*) (Hirsch et al., 2001). Oproti tomu byly testovány kmeny *Rhizobium*, které byly schopny kooperovat s více než dvěma sty druhy bobovitých. Pueppke a Broughton (1999) testovali dva úzce příbuzné kmeny, které se jen drobně



obrázek 7: Průběh tvorby symbiózy. A - *Rhizobium* (rh) se připojuje ke kořenovému vlásku (r), který vyrůstá z buněk epidermis (ep). B - *nod factors* způsobí zvlnění vlásku a umožňují proniknutí bakterie dovnitř v centru infekce (ci), jádro rostlinné buňky (n) je následováno rostoucím infekčním vláknem. C - prodlužující se infekční vlákno prorůstá kořenovým vláskem až k hranici epidermis. D - infekční vlákno prorůstá kořenem a indukuje dělení kortikálních buněk (c) E - z infekčního vlákna se uvolňují bakterie (pb) a tvoří tzv. symbiosomy (s) v hostitelské buňce nodu.

lišily v genu pro *nod factor*, což mělo za následek výraznou změnu schopnosti tvořit symbiózu s různými druhy rostlin.

Při pěstování bobovitých rostlin se do půdy může inokulovat požadovaný kmen bakterií, ty však kompetují o své zapojení do symbiózy s již přítomnými bakteriálními kmeny. Úspěšnost ustanovení symbiózy může ovlivnit i výskyt tzv. nenodulujících kmenů (neindukující tvorbu nodů) (Wirano et Lie, 1979).

Perret et al. (2000) popisují, že po výměně komunikačních molekul v rhizosféře (prostředí kořenů a okolní půdy) dochází ke kompetici mezi různými bakteriálními kmeny, jež mají „klíče“ k přítomným rostlinným „dveřím“ - tedy jsou schopny odpovídat na právě přítomné rostlinné signály. Průběh tvorby nodu je znázorněn na obrázku 7. Autoři vyjadřují politování nad faktem, že z historických důvodů byly studovány zejména symbiotické vztahy úzké a specifické, přičemž byly opomíjeny bakteriální kmeny, schopné kooperovat se širokým spektrem hostitelů.

Moawad et al. (1984) pozorovali kompetici mezi třemi kmeny *Rhizobium japonicum* (označenými jako 123, 110 a 138) u sóji v polních podmínkách. Všechny tři sledované kmeny se zapojily do symbiózy s hostitelskou rostlinou a během prvních několika týdnů po vysazení jejich množství uvnitř rostliny kontinuálně rostlo, zatímco v okolní půdě zůstalo beze změny. V raných fázích po vysazení dosahovaly všechny tři kmeny stejného úspěchu v kolonizaci nodů, avšak s přechodem rostliny ke kvetení začal kmen č. 123 dominovat v 60-100 % rostlinných nodů a tato převaha pokračovala i do fáze dozrávání plodů. Otázku, proč právě tento kmen dokázal v průběhu sezóny vytlačit ostatní, nechávají autoři studie otevřenou, ovšem konstatují, že nejspíše nesouvisí se schopností kolonizace kořenů, protože v počátečních fázích byly všechny tři kmeny stejně úspěšné.

Vargas et Graham (1989) se dívali na to, jak kompetici dvou kmenů *Rhizobium* o kolonizaci hostitelské rostliny fazolu (*Phaseolus vulgaris*) ovlivňuje pH. Různě pH-tolerantní kultivary fazolu pěstovali na pískovém médiu, do kterého inokulovali kmeny *Rhizobium* a zavlažovali je různě kyselými zálivkami. Pozorovali rozdíly v míře kolonizace nodů jednotlivými kmeny *Rhizobium*, některé identifikovali jako citlivější k (zejména nízkému) pH, jiné byly v této situaci úspěšnější. Poměr osídlených nodů konkrétním kmenem bakterie se měnil podle aktuálních podmínek. Míra úspěchu kolonizace nodů se lišila i u jednotlivých odrůd fazolu.

Jak je patrné i z uvedených příkladů, výzkumy dynamiky hlízkové symbiózy se většinou omezují na testování hospodářsky významných plodin, popřípadě několika málo modelových rostlin, a prakticky využitelných kmenů bakterií. Spolu s úspěchem kolonizace rostliny je sledována změna v jejím výnosu. Přesto můžeme z výsledků usuzovat, že tato symbióza není zcela statická, mezi bakteriálními kmeny dochází ke kompetici o rostlinného hostitele a zejména při změně podmínek dochází k jejich vzájemnému vytlačování.

Výzkum dynamiky lišejníkové symbiózy

Od okamžiku, kdy švýcarský botanik Simon Schwenderer rozpoznal v zelených částicích rozptýlených ve stélce lišejníků řasové symbionty, uplynulo letos 150 let. Takřka 50 let trvalo, než se jeho myšlenka dočkala všeobecného uznání, a tedy ve zbývajících více než 100 letech mohly být povaha a utváření lišejníkové symbiózy detailně prostudovány. Nicméně, například z důvodu obtížné determinace fotobiontů a donedávna i jistému nedocení jejich vlivu na celkovou povahu i ekologii duálního organismu, byl význam řasy oproti houbovému partnerovi upozadován. Teprve od poloviny 80. let minulého století, s příchodem molekulárních metod, začala být více zkoumána jejich fylogenetická pozice a příbuznost s volně žijícími řasami, i díky čemuž byla zavržena teorie přísné koevoluce obou partnerů a připuštěna možnost výběru a změny fotobiontního partnera (DePriest, 2004).

Lišejníky zdaleka nedosahují hospodářského významu bobovitých rostlin a neznáme u nich molekulární podstatu kontaktu houbové hyfy a řasy, princip jejich komunikace a utváření symbiózy. Lišejníky zřejmě nejsou jedněmi z hráčů schopných klíčového ovlivnění globálního klimatu, jako korálové útesy (ačkoliv i tato role jim někdy bývá připisována (Ahmadjian, 1995)), a tedy není věnována tak velká pozornost povaze soužití symbiotických partnerů v reakci na stres a narušení, či možnosti výměny fotosyntetického partnera během života, například při změně vnějších podmínek.

Velký krok již byl učiněn ve studiu specifity partnerů, avšak o celkové dynamice jejich vztahu není dosud známo mnoho. O některých lišejnících se soudí, že jsou velmi specifické a úzce specializované na spolupráci pouze s jedním druhem, potažmo jedním genotypem řasového fotobionta, jako např. sledované druhy dutohlávek (*Cladonia*) na Floridě (Yahr et al., 2004), ovšem u jiných byla potvrzena schopnost asociace s různými genotypy či různými druhy fotobiontů. Příkladem může být *Evernia mesomorpha*, schopná kooperovat s různými genotypy druhu *Trebouxia jamesii* (Piercey-Normore, 2006), ale i běžný *Protoparmeliopsis muralis*, u kterého bylo nalezeno hned několik druhů rodu *Trebouxia*, včetně dvou různých druhů fotobionta v jedné stélce. Autorka právě tuto schopnost spolupráce označuje za důvod širokého rozšíření a úspěchu tohoto druhu lišejníku (Guzow-Krzemińska, 2006).

Výzkumy lišejníkových fotobiontů potvrzují, že řasy mají velký vliv na ekologii lišejníku a jsou často faktorem, který limituje jejich rozšíření. Příkladem mohou být ombrofóbní lišejníky různých rodů (lišejníky, které nesnesou přítomnost kapalné vody, tj. rostou např. pod převisy a vláhu získávají z vzdušné vlhkosti), které mají sobě podobnější fotobionty, než jejich příbuzní, nežijící ombrofóbně (Peksa et Škaloud, 2011). Podobně Werth et Sork (2008) detekovali u lišejníku *Ramalina menziesii* přizpůsobení se lokálním podmínkám prostřednictvím výběru optimálního

symbionta, který sice náležel vždy do téhož druhu (*Trebouxia decolorans*), ale vykazoval zřetelnou genetickou strukturu. Stejně tak Lücking et al. (2009) pozorovali podobnost fotobiontů u lišejníků, které si byly podobné spíše ekologicky, nežli fylogeneticky, a to i symbiontů sinicových. Zda jsou však lišejníky schopné výměny symbionta při změně podmínek (např. při otevření stanoviště dešti) a tím přežít, či dojde k jejich úhynu, není známo.

Casano et al. (2011) našli u lišejníku *Ramalina farinacea* různé fotobionty v závislosti na tom, kde lišejník rostl – organismy nasbírané na Kanárských ostrovech obsahovaly jinou linii řasy *Trebouxia*, než ty, které rostly v kontinentální Evropě. Netriviální však byl fakt, že i stélka z Evropy obsahovala kanárského fotobionta, avšak v daleko menší míře. Stejně tak stélky kanárských lišejníků v sobě obsahovaly oblasti s evropským fotobiontem. Autoři tomuto jevu připisují schopnost osídlit širší areál, než by byl lišejník schopen s pouhým jedním fotobiontem. Jakou roli však ve stélce hraje minoritní fotobiont? Je možné, že v případě, že se nepohlavní částice obsahující oba fotobionty dostane na nové stanoviště, dojde k výběru mezi oběma potenciálními fotobionty a je zvolen ten vhodnější? U druhu *Ramalina farinacea* je běžné rozmnožování jak pohlavní (při kterém však k přenosu fotobiontů nedochází), tak nepohlavní pomocí sorédií – hydrofóbních částic, schopných šíření i na velké vzdálenosti. Může však touto velkou vzdáleností být i rozdíl klimatického pásma? A konečně, může být lišejník schopen při změně podmínek upozadění svého dosud majoritního fotobionta na úkor minoritního, nebo je výběr prováděn jen v okamžiku počátku růstu stélky?

U příbuzného, avšak pohlavně se rozmnožujícího lišejníku *Ramalina fraxinea*, odhalili autoři schopnost kooperace s minimálně sedmi liniemi rodu *Trebouxia* (Catalá et al., 2016). I na základě toho příkladu se můžeme domnívat, že dominance pohlavního rozmnožování může být také jedním z faktorů, jímž je mykobiont směřován ke kooperaci s více různými fotobionty.

První předpoklad dynamické symbiózy, tedy schopnost kooperace s více řasami, se tedy minimálně u některých mykobiontů potvrdil. Jak je to však s výzkumem změny symbionta? Magain et Sérusiaux (2014) popisují výměnu fotobionta během života lišejníku, nikoliv však fotobionta řasového, nýbrž sinice z rodu *Nostoc*, která kooperuje s lišejníky z čeledi Pannariaceae. Lišejníky této skupiny buď mají sinici jako jediného svého fotobionta, či kooperují jak s řasou, tak se sinicí, která se v tomto případě nachází jen ve specializovaných útvarech, tzv. cefalodiích. Autoři zde dokonce uvádějí odvážnou teorii, že by výměna fotobionta a osamostatnění cefalodia mohlo vést ke vzniku nového druhu a tedy mít vliv i na evoluci skupiny. O výměně symbionta řasového během života není známo tolik, nicméně několik příkladů uvádím níže v diskusi a konfrontuji je s mými výsledky.

Třetí lišejníkový partner

Před nedávnem byla v lišejníkové stélce odhalena ještě přítomnost třetího účastníka symbiózy, jímž je kvasinka. Podle autorů se nejedná o kontaminaci či sekundární osídlení lišejníku těmito mikroorganismy, ale o esenciální součást kůry lišejníku a rovnocenného třetího symbiotického partnera (Spirble et al., 2016). V mé práci jsem ještě s přítomností tohoto symbionta nepracovala, neboť není známo téměř nic o jeho možnostech šíření a vlivu na specificku lišejníku a výběr fotosyntetického partnera. Nicméně, tento aspekt otevírá možnosti dalšímu výzkumu, například jak přítomnost kvasinky ovlivňuje formování symbiózy a její následný vývoj. Pro příště by již jistě bylo užitečné brát tohoto symbionta v potaz a rozšířit výzkum i o tento třetí aspekt.

Můžeme v dynamice symbióz vysledovat společné trendy?

S výjimkou nezmaru zeleného můžeme u všech zmíněných symbiotických vztahů v přírodě pozorovat jejich vývoj a změny během života. U celé řady z nich již byla studována jejich specificku, která souvisí se schopností symbionty změnit. Například u korálů či rostlin kooperujících s hlízkovitými bakteriemi byla potvrzena existence jak úzce specifických organismů, tak druhů, které mohou symbiózu tvořit s celou řadou partnerů. Zdá se, že u symbiocy lišejníkové najdeme také celou paletu různě specifických druhů lichenizovaných hub.

U zmíněných symbióz můžeme často pozorovat trend, kdy se organismus v první fázi života či při kolonizaci nového stanoviště chová méně specificky a utváří symbiózu i s druhy či genotypy, které pro něj v pozdějších fázích nejsou typické. Nespecifický výběr a pozdější výměna symbiotické řasy byly popsány například u některých korálů, stejně tak rostliny zpočátku často preferují jiný typ mykorhizního symbionta. U lišejníků je tento aspekt rozšířen o možnost přenesení obou symbiontů na nové stanoviště současně díky nepohlavnímu rozmnožování. Pokud je i v tomto případě zachována schopnost fotobionta změnit, mohlo by jít o další možnost zvýšení pravděpodobnosti úspěchu kolonizace stanoviště.

U korálů či rostlin s hlízkovými bakteriemi byla popsána výměna symbiontů v reakci na stres (změna teploty vody, změna pH půdy). Výše byl popsán vliv fotosyntetického partnera na ekologii lišejníku – někteří fotobionti jsou specializovaní jen na růst v konkrétních podmínkách např. týkajících se přístupu k vodě. Avšak to, zda je během života lišejníku možná změna řasového partnera při změně těchto podmínek, není jasné.

Cíle práce

Jak bylo prokázáno ve výše zmíněných studiích, symbióza často není trvalým a neměnným vztahem dvou organismů, nýbrž vyvíjejícím se a dynamickým soužitím.

Vzhledem k problematice přímého pozorování vzniku a vývoje lišejníkové symbiózy byla zvolena cesta srovnání diverzity fotobiontů u lišejníků z lokalit, které se výrazně lišily mírou disturbance. Jednou skupinou lokalit byly přirozené skalní výchozy, osídlené bohatým lišejníkovým společenstvem, bez známek disturbancí. Druhou skupinou lokalit byla čerstvá suťová pole v lomech, vykazující častá narušení. Po narušení (např. po sesuvu svahu, otočení kamene) se začíná saxikolní společenstvo na dotčeném místě znovu formovat.

Prostřednictvím srovnání diverzity, druhové bohatosti a zastoupení jednotlivých fotobiontů na zmíněných dvou typech lokalit jsem hledala odpovědi na následující otázky:

- Vyvíjí se lišejníková symbiotická interakce, či je po svém vzniku již neměnná?
- Liší se lokality v druhové bohatosti fotobiontů? Jsou druhově bohatší čerstvější společenstva, či společenstva na nenarušených lokalitách?
- Liší se diverzita symbiontů na lokalitě v čase? Jsou diverzifikovanější lokality s čerstvě ustanovenou symbiózou, či ty s pokročilou?
- Liší se fylogenetická struktura fotobiontů na obou typech lokalit? Pokud ano, kde jsou si fotobionti příbuznější?
- Najdeme linie fotobiontů, charakteristické pro disturbované, či naopak nenarušené lokality? Známe vlastnosti těchto linií, které by mohly ovlivňovat jejich schopnost uspět na časně či stálé lokalitě?

Materiál a metody

Vytipování lokalit a sběr vzorků

Pro provedení sběrů bylo vytipováno osm lokalit. Lokality se nacházejí v okruhu přibližně pěti kilometrů v oblasti Českého krasu, v okolí obcí Srbsko a Tetín, všechny leží na vápencovém podloží a jsou bez stromového zápoje. Sobě blízké lokality byly zvoleny za účelem eliminovat vliv faktorů, které by mohly mít na výskyt fotobiontů vliv, jako je rozdílné pH, typ substrátu, zeměpisná šířka, nadmořská výška, úhrn srážek či geografická vzdálenost. Vlastnost, která naopak lokality odlišuje, je míra disturbance.

Lokality označené 1-4 jsou suťová pole v bývalých i současných lomech, podléhající časté disturbanci (pokračující sesuvy stěn lomu apod.). Lokality 5-8 jsou přirozené skalní výchozy bez známek narušení. Lokality jsou vyznačeny na mapě na obrázku 8.



obrázek 8: Lokality, na kterých byly prováděny sběry. 1-4: lomy, 5-8: přirozené sklaní výchozy (mapy.cz)

Sběry byly provedeny během let 2014-2016. Na každé lokalitě bylo vytyčeno území o rozměrech 9 metrů čtverečních, ve kterém bylo sebráno po jednom vzorku každého druhu přítomného saxikolního lišejníku (osídlujícího skálu). Druhy byly identifikovány morfologicky, v některých případech se lišejníky nepodařilo s jistotou určit až na úroveň druhu a byly proto označeny jako např. *Caloplaca* sp.

Stanovení míry disturbance

Sběry byly prováděny na lokalitách dvou typů, lišících se mírou disturbance. Prvním typem lokalit byla suťová pole ve vápencových lomech (lom Alkazar, Chlum, Kruhový lom a Modrý lom na Damilu, obrázek 9). Na těchto místech docházelo k dalším sesuvům svahů a otáčení kamenů.



obrázek 9: Suťové pole na svahu Modrého lomu na Damilu



obrázek 10: Část skalního výchozu na vyhlídce Damil nad Tetínem

Druhým typem lokalit byly přirozené skalní výchozy bez známek disturbance (Srbsko – Na Závěrce, Císařská rokle, vyhlídka Pupek nad ústím Kačáku, vyhlídka Damil nad Tetínem, obrázek 10).

Pro potvrzení rozdílu v míře disturbance lišejníkového společenstva na lokalitách přirozených a suťových bylo využito kombinace tří metod. První metoda spočívala ve zjištění data ukončení těžby v lomu, druhou metodou bylo porovnání nalezených druhů s informacemi o lišejníkové sukcesi v literatuře, třetí metodou bylo stanovení stáří přítomných lišejníků pomocí lichenometrie.

K označování lokalit budou dále používány následující zkratky: ALC (Alkazar), CH (Chlum), VV (Kruhový lom), DAM1 (Modrý lom na Damilu), SRB (Srbsko – Na Závěrce), CIS (Císařská rokle), KAC (vyhlídka Pupek nad ústím Kačáku), DAM2 (vyhlídka Damil nad Tetínem).

Data o ukončení těžby

Pro zjištění těchto dat byl kontaktován báňský inženýr Michal Hejna, specialista geologie a měřičství společnosti Velkolom Čertovy schody, a.s. Tmaň, který se dlouhodobě zabývá historií těžby v Českém krasu. Je autorem např. publikace Lomy a vápenice v srdci Českého krasu, Tetín objektivem historie a celé řady popularizačních článků, věnujících se této problematice.

Lichenometrie

Lichenometrie je metoda, při které je možné pomocí měření stélek lišejníků stanovit tzv. lichenometrický věk povrchu. Velikost lišejníku a z ní odvozené jeho stáří je použito jako proxy doby, po kterou je daný povrch odhalen např. po ústupu ledovce (Rabatel et al., 2005). Byla vyvinuta celá řada metod, kolik a jakých lišejníků je vhodné měřit pro korektní stanovení a jak posléze stáří povrchu vypočítat. Nejpokročilejší (a například podle Jomeliho et al. (2007) i nejpřesnější) způsoby vyhodnocení využívají Bayéské metody.

K přesnému určení věku povrchu je potřeba vytvořit kalibrační křivku růstu použitého lišejníku na konkrétním území – v pravidelných intervalech dochází k měření růstu stélky, z čehož je křivka sestavena. To je však velmi časově náročné, proto jsem se rozhodla využít údajů o rychlosti růstu měřených druhů z literatury. Podrobné studie byly uskutečněny zejména pomocí rodů *Rhizocarpon* či dalších kyselomilných rodů, avšak bylo již uskutečněno i měření kalcikolních (vápnobytných) lišejníků. Data o rychlosti růstu pro tuto práci byly převzaty ze studie M. Teminy (1998).

Vzhledem k účelu, pro který bylo toto měření prováděno v této práci (není mým cílem přesně stanovit věk povrchu, nýbrž srovnat stáří dvou typů společenstev navzájem), se spokojím s jednou z méně komplikovaných metod, a to měření největší přítomné stélky lišejníku. Jediným rodem, zastoupeným na všech lokalitách, byla *Verrucaria nigrescens*, proto bylo prováděno měření tohoto rodu. Na každé z lokalit byla nalezena největší stélka cirkulárního tvaru, u které šlo jasně stanovit její hranici a nebylo patrné, že by byla tvořena srůstem více stélek (např. na většině lokalit byl přítomen značný nárost různých druhů rodu *Caloplaca*, tyto však netvořily cirkulární stélky a navzájem prorůstaly, tedy nebyly vhodné pro provedení měření). Nalezená stélka byla změřena v nejširším místě pomocí posuvného měřítka s přesností na 1 mm a zaznamenána. Vždy byl prohledán celý prostor lokality, kde byly vzorky odebírány.

Lišejníková sukcese

Lišejníky bývají jedněmi z primárních kolonizátorů odhalených skal, zpravidla je na těchto místech najdeme dříve než mechorosty či cévnaté rostliny (Breen et Lévesque, 2006). Určité druhy lišejníků jsou typické pro společenstvo, které se vyvíjí teprve krátce, jiné najdeme jedině na lokalitách, které mají za sebou dlouhý, nepřerušovaný vývoj (Fritz et al., 2008).

Nascimbene et al. (2009) sledovali narůstání lišejníkové flóry na vápencové soše. První monitoring prováděli ve chvíli, kdy byla socha bohatě kolonizována lišejníkovým společenstvem.

Poté následovala důkladná restaurace sochy (odstranění lišejníků, dvojitá aplikace biocidu, odstranění mrtvých stélek štětci a skalpelem a aplikace ochranné a voduodpuzející pryskyřice), kterou lze považovat za zásadní disturbanci, jež nastartovala vývoj společenstva od začátku. Znovu byl lišejníkový porost na této soše zmapován o osm a o 12 let později. V mé práci sice pracuji s přírodním vápencovým povrchem, ale druhy na něm se vyskytující se v mnohém shodují s druhy, které byly nalezeny v této studii. Autoři pozorovali, že po 12 letech dosahuje lišejníkový porost 70 % původní plochy před restaurováním, avšak značně se liší druhová bohatost a složení lichenoflóry.

Pro účely srovnání se společenstvy z této práce jsem použila publikovanou tabulku, ve které byly uvedeny druhy vyskytující se před a po renovaci. Ty jsem srovnala s druhy, které se vyskytly na sledovaných lokalitách.

Příprava a extrakce DNA

DNA byla izolována z čerstvé stélky lišejníku. Při přípravě pro izolaci je použitý kus stélky lišejníku či kamene v případě endolitického lišejníku (vrůstajícího do kamene) oplachován pod proudem vody po dobu cca 10 s, pro snížení rizika kontaminace epifytickými řasami, osušen a umístěn do plastové izolační mikrozkušavky o objemu 2 ml.

Izolace byla provedena pomocí protokolu CTAB (cetytrimethylamoniumbromid) optimalizovaného pro extrakci DNA z hub včetně lichenizovaných (Cubero et al., 1999). Protokol byl na základě předchozích zkušeností modifikován následujícím způsobem:

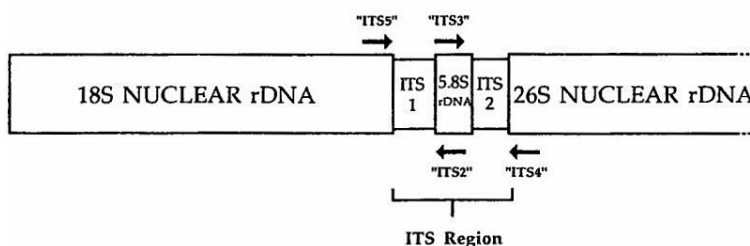
1. Stélka v mikrozkušavce byla drcena pomocí 3 ks wolfram-karbidových kuliček při frekvenci 30 000 rpm po dobu 3 minut.
2. K materiálu bylo přidáno 0,7 ml extrakčního pufru (složení podle zmíněného protokolu), spolu s minimálním množstvím polyvinylpyrrolidonu (PVP), jenž má za úkol absorbovat polyfenoly uvolňující se při extrakci. Následná doba inkubace na termobloku byla 30 min. při 13 000 rpm a 65 °C.
3. Po inkubaci bylo přidáno do zkumavek 0,5 ml roztoku chloroformu:isoamylalkoholu v poměru 24:1, zkumavky byly řádně protřepány a po 5 min. inkubaci při pokojové teplotě centrifugovány 6 minut při 13 200 ot./min. při pokojové teplotě. Došlo k oddělení horní (vodní) a spodní (nepolární) fáze. Vodní fáze (0,6 ml) byla přepipetována do nové 1,5 ml mikrozkušavky, do níž bylo následně přidáno 0,5 ml isoamylalkoholu o teplotě -20 °C. Po protřepání došlo během 20 min. k vysrážení DNA v roztoku. Během této doby byly zkumavky ponechány v -20 °C.
4. Po vysrážení byly vzorky centrifugovány při 13 200 ot./min. po dobu 3 min. při pokojové teplotě, čímž byl na dně zkumavky získán pelet DNA. Tekutá fáze byla odstraněna.
5. Pelet byl následně promyt 0,4 ml 96 % ethanolu a inkubován 15 min. při 1200 rpm a 37 °C, centrifugován při 13 200 ot./min. po dobu 3 min. při pokojové teplotě, a po odstranění tekuté fáze opět promyt 0,2 ml 70 % ethanolu. Takto byly vzorky inkubovány po dobu 5 min. při pokojové teplotě, opět zcentrifugovány při 13 200 ot./min. po dobu 3 min. při pokojové teplotě a zbaveny tekuté fáze.
6. Pelet byl ponechán při pokojové teplotě v otevřených zkumavkách, než došlo k jeho vyschnutí (cca 30 minut), a následně rozpuštěn v 0,2 ml TE pufru (složení podle zmíněného protokolu).
7. Extrahovaná DNA byla skladována krátkodobě v lednici při 4 °C, po získání sekvencí byla uložena do -20°C.

PCR

Jako molekulární marker byl zvolen jaderný úsek ITS1-5.8S-ITS2.

Postavení tohoto úseku je znázorněno na obrázku 11 (Baldwin, 1992).

Všechny tři části úseku jsou nekódující, 5.8 rDNA je součástí velké ribozomální podjednotky a ITS1 s ITS2 jsou vystříženy.



obrázek 11: pozice amplifikovaného regionu ITS (Baldwin, 1992)

K amplifikaci byl použit univerzální primer ITS4 (White et al., 1990) a specifický primer SSU1780 (Pircey-Normore et DePriest, 2001). Vzhledem k tomu, že tento primer nasedal specificky pouze na DNA rodů *Trebouxia* a *Asterochloris*, bylo nutné použít ještě méně specifický primer, pojmenovaný zelenyF2, díky němuž bylo možné namnožit kýžený úsek i u dalších řas z třídy Trebouxiophyceae. Sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 1. Specifické primery nenedaly na DNA mykobionta, díky čemuž byl získán uniformní klon amplifikovaného úseku.

Název	Sekvence	Specifická	Orientace
ITS4	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGA-3'	univerzální	reverse
SSU1780	3'-CTGCGGAAGGATCATTGATTC-5'	<i>Trebouxia</i> , <i>Asterochloris</i>	forward
zelenyF2	5'-TTCTTAGTTGGTGGGTTGCC-3'	Trebouxiophyceae	forward

tabulka 1: přehled použitých primerů

Složení jedné PCR reakce vyjadřuje tabulka 2.

	μl
voda	14,2
pufr MyTaq (Bioline)	4
primer ITS4 (25 pmol/ml)	0,3
primer zelenyF2/SSU1780 (25 pmol/ml)	0,3
polymeráza MyTaq (Bioline)	0,2
DNA (5-50 ng/μl)	1
objem reakce celkem	20

tabulka 2: složení PCR reakce

Použit byl následující cyklus: iniciační fáze 94 °C po dobu 4 minut, 35 cyklů: denaturace (94 °C, 1 min.), nasedání primerů (50 °C, 1 min.), elongace (72 °C, 3 min.). Závěrečná elongace 72 °C po dobu 10 min. Reakce probíhala v cycleru Techne TC-512 Touchgene Gradient Thermal Cycler.

Kontrola kvality DNA, přečištění a sekvenace

Kvalita a uniformita PCR produktu byla zkontrolována na vzorku 2 μ l zviditelněním na 1 % TAE agarózovém gelu pomocí značení ethidiumbromidem (viditelné pod UV zářením). PCR produkt byl poté přečištěn pomocí Agencourt AMPure XP kitu podle protokolu výrobce.

Pro sekvenaci Sangerovou metodou byly využity služby firmy Macrogen Korea Inc.

Více fotobiontů ve stélce

V ojedinělém případě (u vzorku KAC10) byla ve stélce detekována přítomnost dvou různých linií fotobiontů, u kterých se délka PCR produktů lišila. Tento fakt byl odhalen při kontrole kvality PCR produktu na elektroforéze, popsané výše. Pro účely získání obou sekvencí byl celý PCR produkt rozdělen na elektroforéze v 1,8 % TBE agarózovém gelu, zviditelněn značením ethidiumbromidem, jednotlivé proužky byly vyřezány skalpelem a extrahovány pomocí kolonkové metody QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) podle protokolu výrobce. Pro sekvenaci byly také využity služby firmy Macrogen Korea Inc.

Fotobionti z třídy Ulvophyceae

Několik zkoumaných lišejníků kooperovalo s fotobionty, kteří nenáležejí do třídy Trebouxiophyceae a nebyly na ně použitelné specifické primery SSU1780 či zelenyF2. Pro zjištění fotobionta byly tyto lišejníky kultivovány po dobu cca 1-2 měsíců na agarózovém Boldově bazálním médiu ve skleněných Petriho miskách. Okraje misek byly utěsněny pomocí parafilmu pro snížení míry vysychání.

Extrakce fotobionta pro kultivaci pobíhala následujícím způsobem: povrch lišejníku byl omyt pod proudem vody pro zmenšení rizika kontaminace epifytickými řasami, umístěn pod binolupu a sterilizovanou žiletkou byl odříznut povrch jeho plodničky. Tímto způsobem odhalení fotobionti byli přeneseni pomocí sterilizované jehly na povrch agaru, přičemž k odkrytí Petriho misky došlo jen na nezbytně dlouhou dobu. Místo vysazení fotobionta bylo označeno na vnější povrch misky permanentní fixou a během kultivace sledováno.

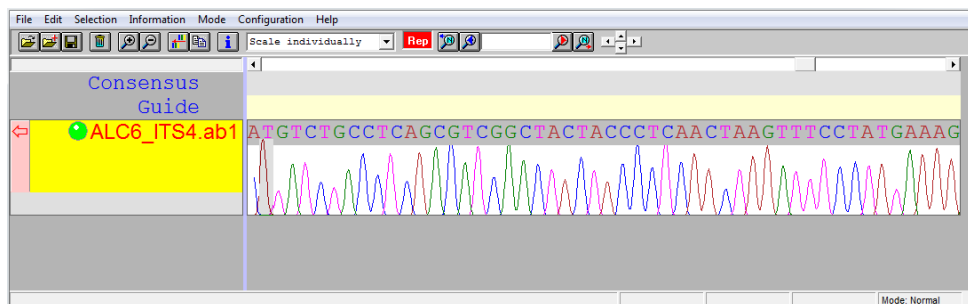
Poté, co řasy vytvořily dostatečný nárost, byly prohlédnuty pod světelným mikroskopem. Vzhledem k problematice morfologického určování jsem se omezila na determinaci na úrovni rodu.

Obdobným způsobem bylo kultivováno i několik lišejníků s fotobionty ze třídy Trebouxiophyceae pro kontrolu shody s výsledky molekulárních analýz.

Zpracování sekvenčních dat

Firma Macrogen Korea poskytla výsledky sekvenování ve formátu .ab1, který zahrnuje získaná data z elektroforetogramu, dále grafický záznam elektroforetogramu ve formátu .pdf a soubor ve formátu .phd.1, který obsahuje prostý strojový odečet sekvence se skóre kvality. Soubor ve formátu .pdf byl použit pouze pro získání jednoduchého přehledu o kvalitě sekvence a dále bylo pracováno se souborem ve formátu .ab1.

Ke kontrole kvality byl používán program SeqAssem Sequence Assembly Program (Hepperle, 2004), který umožňuje



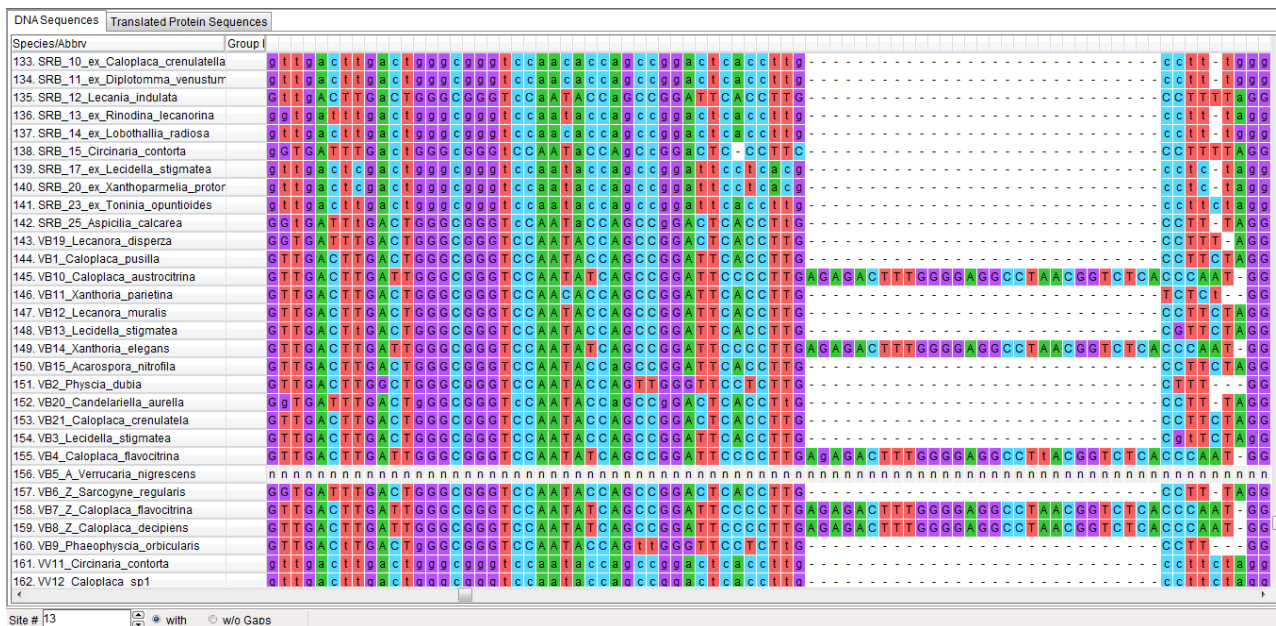
obrázek 12: grafické zobrazení dat z elektroforetogramu v programu SeqAssem

grafické zobrazení dat z elektroforetogramu (viz obrázek 12). Při hodnocení kvality byla posuzována dobrá rozlišitelnost jednotlivých píků od sebe, resp. míra jejich překryvu, konstantní vzdálenost mezi píky a síla signálu. V případě většího množství nejasností bylo provedeno ještě čtení z opačného směru (ve firmě Macrogen Korea Inc.) a z obou získaných sekvencí byla vytvořena sekvence konsenzuální.

Stromy rodů

Pro sestavení alignmentu byl použit program MEGA, verze 6 a 7 (Kumar et Tamura, 1994). Pro každý z rodů byl sestaven vlastní alignment, se kterými bylo dále pracováno zvlášť. Identifikace rodu byla provedena pomocí programu Blast (program srovnávající sekvenci se záznamy v sekvenčních databázích, dostupný on-line na adrese <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Alignment sekvencí rodu *Trebouxia* byl obohacen o 47 sekvencí zastupující dříve popsané linie tohoto rodu (Peksa et al., unpubl.). Dalšíh pět sekvencí bylo převzato z databáze GenBank (NCBI). Pro hrubé zalignování bylo využito algoritmu progresivní metody G-INS-1 v programu MAFFT (Kato et al., 2002). Získaný alignment byl následně v programu MEGA ručně zkontrolován a opraveny případné chyby. Zobrazení alignmentu na příkladu části sekvencí rodu *Trebouxia* je na obrázku 13. Alignmenty sekvencí rodů *Asterochloris* a *Myrmecia* byly vytvořeny obdobným způsobem.



obrázek 13: tvorba alignmentu sekvencí rodu *Trebouxia* v programu MEGA 7

Pro vytvoření alignmentu rodu *Diplosphaera/Stichococcus* byl využit již hotový alignment vytvořený nástrojem 4SALE v programu ClustalW podle sekundární struktury poskytnutý autorem (Hodač et al., 2016), do kterého byly přidány vlastní sekvence.

Sekvence rodu *Vulcanochloris*, které byly uniformní, byly pro identifikaci jejich příslušnosti ke konkrétní linii porovnány se sekvencemi, které mi laskavě poskytla L. Vančurová z jejich vlastních dat (Vančurová et al., 2015).

Pro sestavení fylogenetického stromu metodou maximal likelihood byl použit program GARLI. Náhled nastavení programu pro výpočet je v Příloze 1 této práce. Současně byla provedena bootstrapová analýza se 100 opakováními. Syntéza fylogenetických stromů a hodnot bootstrapu byla provedena v programu PAUP* 4.0a (Swofford et al., 1993). Konsenzuální strom byl vytvořen metodou *majority rule consensus*, tedy jsou v něm zobrazeny pouze splity, které se vyskytovaly v nadpoloviční většině stromů vybraných předchozí analýzou. Stromy byly graficky upraveny v programu TreeGraph2 (Stöver et Müller, 2010).

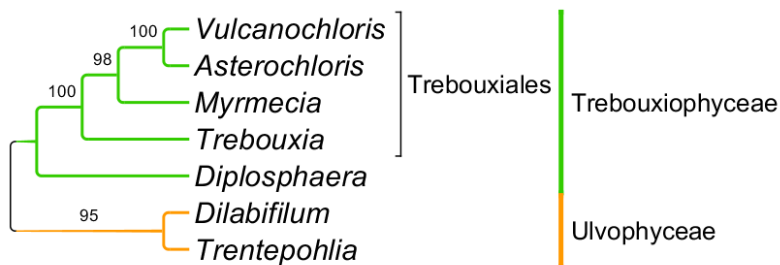
Přítomnost či nepřítomnost konkrétní linie řas na lokalitě byla zaznamenána do tabulky včetně jejich abundancí.

Strom linií

Pro následující analýzy bylo potřeba vytvořit společný fylogenetický strom všech zastoupených linií. Region ITS velmi rychle substituuje, což jej činí vhodným pro odlišení jednotlivých linií v rámci rodu, avšak vytvoření společného alignmentu zástupců vzdáleněji příbuzných je jen těžko proveditelné a je zatížené velkou mírou substituční saturace.

Proto byl nejprve sestaven strom jednotlivých zástupců rodů na základě sekvence úseku 18S (jeho pozice je taktéž znázorněna na obrázku 9). Tento úsek substituuje daleko pomaleji (Van de Peer et De Wachter, 1997) a je možné sestavit jeho alignment i u vzdálenějších taxonů. Sekvence úseku 18S byly získány z databáze GenBank (NCBI). Alignment byl sestaven v programu Mega verze 6, hrubé úpravy byly provedeny ručně, poté byla využita iterační metoda Q-INS-i nástroje MAFFT (Kato et al., 2002) a získaný alignment byl opět ručně zkontrolován proti případným chybám. Fylogenetický strom byl vytvořen v programu GARLI metodou maximum likelihood se současným provedením bootstrapové analýzy o 100 opakováních. Vložení hodnot bootstrapu do konsenzuálního stromu sestavenou metodou *majority rule consensus* a jeho grafická úprava byla provedena obdobně jako u jednotlivých rodů v programech PAUP* 4.0a (Swofford et al., 1993) a TreeGraph2 (Stöver et Müller, 2010) (obrázek 14). Dále bylo s fylogenetickým stromem rodů pracováno ve formátu NEXUS.

Dalším krokem bylo přidání linií jednotlivých rodů do tohoto stromu. Bylo vypočítáno, že úsek 18S, pomocí něhož byl sestaven strom rodů, substituuje přibližně desetkrát pomaleji, než úsek ITS (Savard et al., 1993). Tento poměr byl však stanoven na základě



sekvencí cévnatých rostlin, obrázek 14: Fylogeneze nalezených rodů fotobiontů na základě sekvence 18S rRNA konkrétně břízy a olše. U fotobiontů je známa jejich zpomalená mutační rychlost a to zejména právě v úseku ITS (Zoller et Lutzoni, 2003). S přihlédnutím k těmto faktorům byly délky větví ve stromě, sestaveném na základě úseku 18S, vynásobeny pěti. Na místo vrcholového uzlu každého rodu byl připojen strom jednotlivých linií tohoto rodu, sestavený na základě vlastních sekvencí úseku ITS. Pro vytvoření těchto dílčích stromů byl opět použit program GARLI v uvedeném nastavení.

Tímto procesem byl získán fylogenetický strom všech linií s délkami větví, který byl použit pro následující analýzy.

Analýzy

Byla porovnáována druhová a rodová bohatost obou typů lokalit, jejich druhová diverzita¹, fylogenetická diverzita (dále jen PD) a fylogenetická struktura pomocí metrik průměrné fylogenetické vzdálenosti mezi dvojicemi (*mean pairwise distance*, dále jen MPD) a průměrné vzdálenosti nejbližšího taxonu (*mean nearest taxon distance*, dále jen MNTD). MPD a MNTD jsou nejčastěji používanými metrikami PD (Swenson, 2014). Pro výpočet PD, MPD i MNTD byl použit balíček *picante* v programu R (R Core Team, 2014, Kembel et al., 2010).

Není úkolem této práce postihnout důvody, proč je pro charakteristiku společenstev využíváno výpočtů fylogenetické diverzity (PD). Jen stručně zmíním, že jde o jednu z možností, jak poodhalit interakce, ke kterým ve společenstvu dochází a je založena na myšlence, že blízké příbuzné druhy mohou mít tendenci sdílet podobné niky. Pokud by toto ve zkoumaném společenstvu platilo, mohlo by studium fylogenetické diverzity společenstva pomoci v pochopení i jeho diverzity funkční. PD nepracuje s pouhými taxonomickými poměry (poměr počtu druhů, rodů apod.), nýbrž s délkami větví na fylogenetickém stromě. PD byla spočítána jako součet délky větví, které spojují všechny druhy ve společenstvu (tento výpočet bývá také označován jako Faithův index). Tento index však v sobě nezahrnuje informaci o abundancích druhů (Faith, 1992).

Pomocí metriky MPD byla srovnána celková fylogenetická rozmanitost (*dissimilarity*) taxonů ve vzorku. Tato metrika byla vážena abundancemi druhů. Vážení abundancemi bylo použito z toho důvodu, že jednotlivé druhy nebyly na lokalitách stejně hojné a rozložení abundancí přináší důležitou ekologickou informaci (např. o dominanci jedné či několika málo linií, diskutováno níže). MPD je metrikou, počítající s průměrnou vzdáleností mezi všemi dvojicemi taxonů ve vzorku a tedy do jisté míry upozaduje informaci o terminálních větvích ve stromu. Aby mohl být posouzen i tento aspekt, byla spočítána ještě metrika MNTD, opět vážená abundancemi, která naopak na terminální větve klade důraz (Swenson, 2014).

Pro vytvoření vzdálenostní fylogenetické matice byl použit fylogenetický strom, sestavený ze zástupců každé z linií, které byly nalezeny na některé z lokalit (viz výše v kap. Strom linií).

Signifikance byla otestována pomocí Kruskal-Wallisova testu, jenž byl použit pro ověření, zda se vzorky z jednotlivých typů lokalit liší. Tento test je neparametrický a pro jeho použití není nutné normální rozdělení.

¹ Podle doporučení o používání termínů druhová bohatost (*species richness*) a druhová diverzita (*species diversity*) je pro vyjádření počtu druhů ve vzorku či v oblasti používán termín 'druhová bohatost' a pro vztah mezi počtem druhů a počtem jedinců termín 'druhová diverzita' (Spellerberg et al., 2003).

Nefylogenetické analýzy diverzity a druhové bohatosti

V následujících analýzách nebylo pracováno s fylogenetickými vztahy mezi nalezenými fotobionty, ale pouze s přítomností či nepřítomností různých linií a počtem jejich výskytů. Pro posouzení diverzity zkoumaných vzorků jsem použila terminologii vycházející z práce Roberta H. Whittakera (1960), zrevidovanou Robertem J. Whittakerem (2001) a Jurasinskim et al. (2009).

Alfa-diverzita

Druhová bohatost (*species richness*) jednotlivých vzorků je vyjádřena pomocí parametru α -diverzity. Tato hodnota byla vypočítána pro všechny lokality jako počet linií (resp. druhů), které jsou na dané lokalitě přítomny.

Samotná hodnota α -diverzity byla rozšířena o indexy, pomocí kterých je možné lépe posoudit bohatost společenstva. Vhodně interpretovatelným je Simpsonův index D (neboli Yule index), pomocí kterého jsme schopni odhalit dominanci některé z linií, neboli, jak je pravděpodobné, že dva náhodné vzorky budou patřit ke stejné linii (Hunter et Gaston 1988, Zelený 2015). Čím je diverzita vyšší, tím je hodnota tohoto indexu nižší. Simpsonův index je dán součtem čtverců relativních abundancí druhů p_i (tj. poměrů výskytů jedinců jednoho druhu a všech druhů), což vyjadřuje následující vzorec: $D = \sum (p_i)^2$. Hodnoty Simpsonova indexu byly spočítány zvlášť pro lomy a pro přirozené skalní výchozy.

Odvozeným parametrem je vyrovnanost (*evenness*), která je dána jako $E = (1/D)/S$, kde D je hodnota Simpsonova indexu a S je počet druhů. Čím vyšší je tento parametr, tím vyrovnaněji jsou jednotlivé druhy zastoupeny.

Beta-diversita

Pomocí β -diverzity je vyjádřena rozdílnost druhového složení vzorků. Odpovídáme pomocí ní na otázku, zda se nám na lokalitách pořád opakují tytéž druhy, nebo se na různých lokalitách vyskytují druhy různé. Pro výpočet β -diverzity byla použita Whittakerova β -diverzita, která je definována jako podíl celkové druhové bohatosti (jež si označím jako c) na daném typu lokality (lom- L / výchoz- V) a průměrné druhové bohatosti vzorku z tohoto typu lokality: $\beta_w = c_{L/V} / \alpha'_{L/V}$. Výsledné číslo vyjadřuje, nakolik jsou si lokality jednoho typu ve svém druhovém složení podobné.

Nicméně, Whittakerova β -diverzita nesrovnává konkrétní druhy mezi lokalitami navzájem, počítá pouze s počty druhů na lokalitu. Proto byl vypočítán ještě Jaccardův index. Pomocí tohoto indexu spočítáme podobnost jednotlivých vzorků, přičemž bereme v potaz přímo jednotlivé druhy.

Čím vyšší je hodnota tohoto indexu, tím jsou si vzorky podobnější. Pokud by $JAC=0$, nesdílely-by vzorky žádný společný druh. Jaccardův index je vhodný pro srovnání druhového složení vzorků, protože nebere v potaz negativní shodu (tj. to, že určitý druh není ve dvou vzorcích přítomen, není jejich společným znakem). Proto označujeme Jaccardův index za asymetrický. Jaccardův index se vypočítá podle následujícího vzorce: $JAC = \frac{a}{a+b+c}$, ve kterém a je počet taxonů, které jsou v obou vzorcích přítomné, b je počet taxonů, které jsou přítomné pouze v prvním ze vzorků a ve druhém nikoliv a c je počet taxonů nepřítomných v prvním vzorku, ale přítomných ve druhém. Příklad srovnání lokalit DAM1 (Modrý lom na Damilu) a CH (lom Chlum) je v tabulce 3 (Marhold, 2015).

DAM1/CH	přítomno	nepřítomno
přítomno	a = 5	b = 5
nepřítomno	c = 5	d = 7
JAC	0,333333333	

tabulka 3: Jaccardův index na příkladu lokalit DAM1 a CH

Pro lepší ilustraci výskytu shodných linií (resp. druhů) na jednotlivých lokalitách jsem použila Vennovy diagramy. Pro jejich tvorbu byl použit balíček *VennDiagram* v programu R (Chen et Bourntos, 2011).

Výsledky

Míra disturbance lokalit

Data o ukončení těžby

Pro sběr byla vybrána čtyři suťová pole ve vápencových lomech Alkazar, Na Chlumu, Modrý lom a Kruhový lom. Pouze Kruhový lom je dosud využíván pro těžbu vápence, v ostatní lomy již byly opuštěny. Zjištěné roky ukončení těžby v lomech jsou uvedeny v tabulce 4. Ukončení těžby na místě odběru v Kruhovém lomu se nepodařilo zjistit.

Lokalita	Označení vzorků	Rok ukončení těžby v lomu	Citace
Modrý lom na Damilu	DAM1	1957	Hejna, 2012
Kruhový lom	VV	v provozu	
Na Chlumu	CH	1961	Kocurková et Juříčková, 2012
Alkazar	ALC	1940	Hejna, 2013

tabulka 4: Roky ukončení těžby v jednotlivých lomech

Lichenometrie

Na všech lokalitách byla nalezena největší stélka druhu *Verrucaria nigrescens*. Rychlost růstu tohoto saxikolního lišejníku je 1,13-1,20 mm za rok, z čehož byla spočítáno přibližné stáří měřené stélky. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5. Stélky na nedisturbovaných lokalitách dosahovaly přibližného stáří 45-72 let, na disturbovaných 18-31 let.

	Průměr stélky (mm)	Věk lišejníku (let)
ALC	16	18-19
DAM1	26	29-31
CH	26	29-31
VV	23	26-28
CIS	59	68-71
DAM2	>60*	68-72
KAC	48	54-58
SRB	40	45-48

tabulka 5: Průměr největší stélky lišejníku rodu *Verrucaria nigrescens* na každé z lokalit. Disturbované lokality: modře, nedisturbované: žlutě. Na lokalitě DAM2 byla stélka místy porušená a zčásti přerostlá stélkami dalších lišejníků, s jistotou bylo naměřeno min. 60 mm.

Lišejníková sukcese

Pro srovnání s mými vzorky jsem využila studii lichenoflóry vápencové sochy Musa del Parnaso před a po jejím restaurování (Nascimbene et al., 2009). Vzhledem k tomu, že šlo stále o stejnou sochu a stejné místo, předpokládám vyloučení jiných vlivů na složení společenstva, než dobu jeho vývoje. Následující tabulka (tabulka 6) uvádí nalezené druhy před očištěním sochy (A) a po očištění (B). Lišejník je uveden vždy v té kategorii, kde měl vyšší procentuální zastoupení v porovnání s ostatními lišejníky (např. většina lišejníků z kategorie B se vyskytovala i v období před renovací, ale jejich zastoupení bylo nízké). Uvedeny jsou pouze druhy, které byly alespoň jednou nalezeny v rámci mého výzkumu. V řádcích je provedeno srovnání s lokalitami sledovanými v této práci. První čtyři jsou lokality disturbované, následující čtyři lokality bez známek disturbancí. Je-li průnik lokality a lišejníku vybarven zeleně, byl dotyčný lišejník na dané lokalitě přítomen. Červenou barvou je znázorněna jeho nepřítomnost. Poslední sloupec tabulky uvádí pro každou lokalitu poměr přítomných druhů, nalezených na nedisturbované (A) a disturbované soše (B).

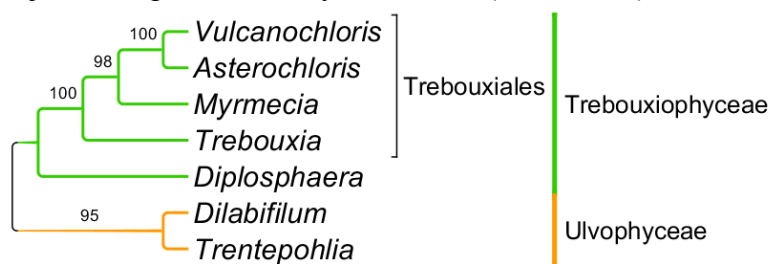
	<i>Lišejníky nalezené na soše před renovací (A)</i>							<i>Lišejníky nalezené na soše po renovaci (B)</i>				
	<i>Aspicilia calcarea</i>	<i>Aspicilia contorta</i> ssp. <i>hoffmannii</i>	<i>Caloplaca flavescens</i>	<i>Caloplaca incomixa</i>	<i>Candelariella aurella</i>	<i>Lecanora albescens</i>	<i>Lobohallia radiosa</i>	<i>Lecanora crenulata</i>	<i>Lecanora semipallida</i>	<i>Terrucaria muralis</i>	<i>Terrucaria nigrescens</i>	A:B
ALC												2:2
DAM1												0:3
CH												1:3
VV												1:3
DAM2												3:1
CIS												4:3
KAC												4:2
SRB												4:2

tabulka 6: Výskyt druhů lišejníků nalezených na soše před (A) a po renovaci (B) na studovaných lokalitách

Na disturbovaných lokalitách (ALC, DAM1, CH, VV) se nacházelo jen minimum druhů z kategorie A (před renovací sochy), typických pro rozvinutější společenstvo, oproti tomu na nedisturbovaných lokalitách (DAM2, CIS, KAC, SRB) byly přítomny druhy z obou skupin (před i po renovaci).

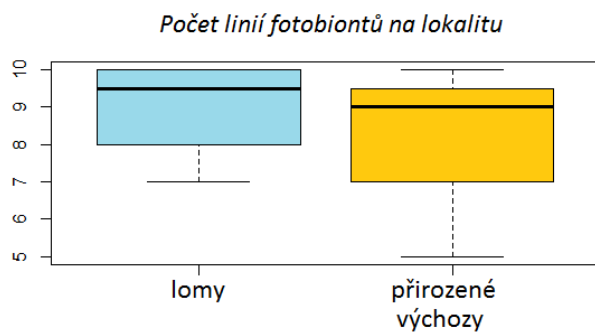
Nalezené linie fotobiontů

Na osmi lokalitách bylo odebráno celkem 126 vzorků lišejníků ze 46 druhů (morfospecíes). Jejich výčet včetně převládajícího způsobu rozmnožování a získaného fotobionta je uveden v následující tabulce (tabulka 7). Na disturbované lokalitě bylo v průměru nalezeno 11,8 druhů lišejníků, na přirozeném výchozu 19,8 (obrázek 15).

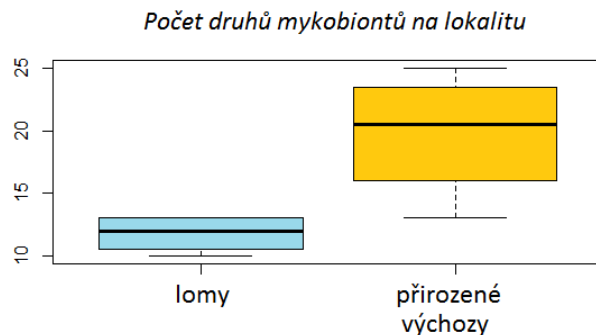


obrázek 17: Fylogeneze nalezených rodů fotobiontů na základě 18S rDNA *Trentepohlia* a *Dilabifilum*.

Na disturbovaných lokalitách bylo nalezeno průměrně 9 linií fotobiontů, na přirozených výchozech 8 linií (obrázek 18). Tito fotobionti náleželi průměrně do 5 rodů u disturbovaných lokalit a do 3,25 rodů u přirozených výchozů (obrázek 19).

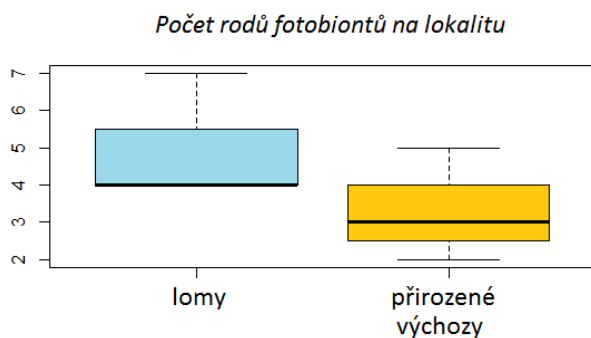


obrázek 18: Srovnání počtu nalezených linií fotobiontů na disturbovaných (modře) a nedisturbovaných lokalitách (žlutě).



obrázek 15: Srovnání počtu nalezených druhů lišejníků na disturbovaných (modře) a nedisturbovaných lokalitách (žlutě).

Fotobionti náleželi do 23 různých linií (obrázek 16 na následující straně) ze sedmi rodů (obrázek 17): *Trebouxia*, *Asterochloris*, *Vulcanochloris*, *Myrmecia*, *Diplosphaera/Stichococcus*,

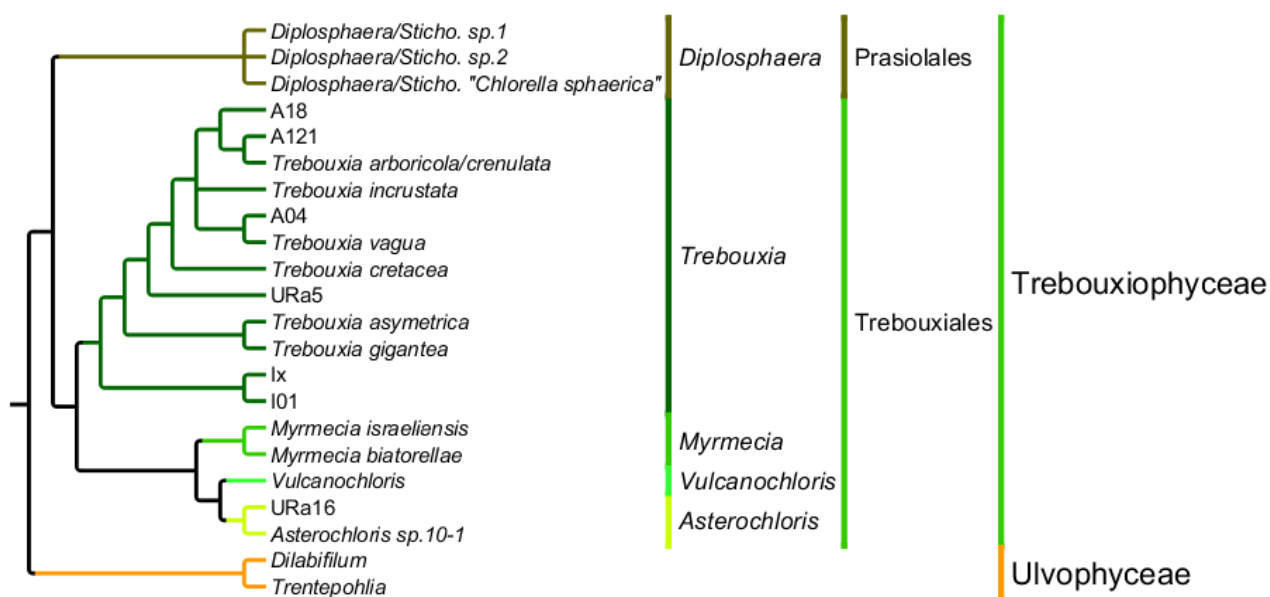


obrázek 19: Srovnání počtu nalezených rodů fotobiontů na disturbovaných (modře) a nedisturbovaných lokalitách (žlutě).

Celkem $87 \times$ byl zaznamenán fotobiont z rodu *Trebouxia* v 11 liniích (obrázek 20), třikrát z rodu *Vulcanochloris* v jediné linii (obrázek 21), $12 \times$ z rodu *Diplosphaera/Stichococcus* ve třech liniích (obrázek 22), pětkrát z rodu *Asterochloris* ve dvou liniích (obrázek 23), $16 \times$ z rodu *Myrmecia* ve dvou liniích (obrázek 24), jedenkrát z rodu *Trentepohlia* a dvakrát z rodu *Dilabifilum*.

Z rodu *Trebouxia* byli nalezeni příslušníci následujících linií: *T. incrustata*, *T. asymetrica*, URa5, *T. vaga*, A121, *T. arboricola/crenulata*, *T. gigantea*, A18, *T. cretacea*, Ix a I01. Vzorky rodu *Asterochloris* náležely do dvou linií, již dříve popsané URa16 (Ruprecht et al., 2014) a dále do linie

odpovídající publikované sekvenci označené jako *Uncultured Chlorophyta clone LIM-E79*. Pro účely této práce byla tato linie označena jako *Asterochloris* sp. 1 (v tabulce pouze Ast1).



obrázek 17: Kladogeneze všech nalezených linií fotobiontů vytvořená kombinací stromů z úseků 18S rRNA a ITS. Podpory nejsou vzhledem ke způsobu tvorby stromu uvedeny (viz kapitolu Strom lini), pro jejich zjištění viz strom všech rodů (obrázek 15) a stromy jednotlivých rodů (obrázky 20-24). Poměry délek větví nejsou pro tento obrázek zachovány.

Všechny sekvence rodu *Vulcanochloris* byly uniformní, spadající do druhu *V. canariensis*. Nalezené vzorky rodu *Myrmecia* patřily do dvou dříve popsáných druhů, *M. israeliensis* a *M. biatorellae*. U fotobiontů rodu *Diplosphaera/Stichococcus* se s výjimkou linie D2 nepodařilo najít shodu s dříve popsánými liniemi, proto tři linie byly pro účely této práce označeny jako D1, D2 a D3. Příslušníci linie D2 se shodovaly s dříve publikovanou sekvencí, která však byla označena jako polyfyletická *Chlorella sphaerica*.

tabulka 7: Odebrané vzorky lišejníků. V tabulce je uvedeno (zleva): pořadí lišejníku na lokalitě, druh mykobionta (determinace podle morfologie), rod fotobionta, linie, do které fotobiont spadá na základě sekvence ITS (či morfologie u třídy Ulvophyceae), převládající způsob rozmnožování lišejníku (P: pohlavní, N: nepohlavní).

Vzorek	Mykobiont	Fotobiont, rod	Fotobiont, linie	Rozmnožování
Lokalita: lom Alkazar				
1 ALC1	<i>Lecanora dispersa</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
2 ALC2	<i>Caloplaca interfulgens</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. gigantea</i>	P
3 ALC3	<i>Verrucaria nigrescens</i>	<i>Diplosphaera</i>	D2	P (vzácně N)
4 ALC4	<i>Sarcogyne regularis</i>	<i>Diplosphaera</i>	D2	P
5 ALC5	<i>Protoblastenia rupestris</i>	<i>Vulcanochloris</i>	<i>V. canariensis</i>	P
6 ALC6	<i>Caloplaca flavescens</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. arboricola/crenulata</i>	P
7 ALC7	<i>Aspicilia contorta</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
8 ALC8	<i>Rhinodina bischoffii</i>	<i>Trebouxia</i>	A18	P
9 ALC9	<i>Candelariella aurella</i>	<i>Myrmecia</i>	<i>M. israeliensis</i>	P
10 ALC10	<i>Caloplaca flavocitrina</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. arboricola/crenulata</i>	obě dominuje N

Vzorek	Mykobiont	Fotobiont, rod	Fotobiont, linie	Rožmnořování
Lokalita: Modrý lom na Damilu				
1	DAM1_01 <i>Verrucaria nigrescens</i>	<i>Diplosphaera</i>	D3	P (vzácně N)
2	DAM1_02 <i>Protoblastenia rupestris</i>	<i>Vulcanochloris</i>	<i>V. canariensis</i>	P
3	DAM1_03 <i>Aspicilia contorta</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
4	DAM1_04 <i>Sarcogyne regularis</i>	<i>Myrmecia</i>	<i>M. israeliensis</i>	P
5	DAM1_05 <i>Lecidella stigmatea</i>	<i>Asterochloris</i>	URa16	P
6	DAM1_06 <i>Verrucaria muralis</i>	<i>Diplosphaera</i>	D2	P
7	DAM1_07 <i>Lepraria finkii</i>	<i>Asterochloris</i>	Ast1	N
8	DAM1_09 <i>Caloplaca sp.</i>	<i>Myrmecia</i>	<i>M. israeliensis</i>	obě
9	DAM1_10 <i>Gyalecta sp.</i>	<i>Trentepohlia</i>	<i>Trentepohlia sp.</i>	P
10	DAM1_11 <i>Lecanora semipallida</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
11	DAM1_12 <i>Caloplaca dichroa</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	obě dominuje N
12	DAM1_13 <i>Caloplaca flavocitrina</i>	<i>Dilabifilum</i>	<i>Dilabifilum</i>	obě dominuje N
13	DAM1_14 <i>Rhinodina bischoffii</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. gigantea</i>	P
Lokalita: Vyhlídka Damil nad Tetínem (přirozený výchoz)				
1	DAM2_01 <i>Caloplaca decipiens</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. arboricola/crenulata</i>	N
2	DAM2_02 <i>Caloplaca variabilis</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
3	DAM2_03 <i>Lecanora muralis</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
4	DAM2_05 <i>Verrucaria nigrescens</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. cretacea</i>	P (vzácně N)
5	DAM2_06 <i>Diplotomma venustum</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. cretacea</i>	P
6	DAM2_07 <i>Caloplaca dichroa</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	obě dominuje N
7	DAM2_08 <i>Phaeophyscia orbicularis</i>	<i>Trebouxia</i>	I01	N
8	DAM2_09 <i>Aspicilia calcarea</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
9	DAM2_10 <i>Lobothallia radiosa</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
10	DAM2_11 <i>Verrucaria baldensis</i>	<i>Asterochloris</i>	Ast1	P
11	DAM2_12 <i>Aspicilia contorta ssp. hoffmanianna</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
12	DAM2_13 <i>Caloplaca interfulgens</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. cretacea</i>	P
13	DAM2_14 <i>Lecidella stigmatea</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. cretacea</i>	P
Lokalita: Císařská rokle (přirozený výchoz)				
1	CIS_V01 <i>Caloplaca oasis</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. cretacea</i>	P
2	CIS_V02 <i>Caloplaca coronata</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	obě dominuje N
3	CIS_V03 <i>Caloplaca inconnexa</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
4	CIS_V05 <i>Caloplaca variabilis</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
5	CIS_V06 <i>Candelariella aurella</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
6	CIS_V07 <i>Lecanora crenulata</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
7	CIS_V08 <i>Lecanora dispersa</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
8	CIS_V09 <i>Diplotomma alboatrum</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
9	CIS_V10 <i>Rinodina lecanorina</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
10	CIS_V11 <i>Lobothallia radiosa</i>	<i>Trebouxia</i>	A04	P
11	CIS_V12 <i>Aspicilia contorta ssp. contorta</i>	<i>Trebouxia</i>	A18	P
12	CIS_V13 <i>Aspicilia contorta ssp. hoffmanianna</i>	<i>Trebouxia</i>	A04	P
13	CIS_V14 <i>Acarospora macrospora</i>	<i>Myrmecia</i>	<i>M. biatorellae</i>	P
14	CIS_V15 <i>Lecania rabenhorstii</i>	<i>Trebouxia</i>	A18	P
15	CIS_V16 <i>Verrucaria nigrescens</i>	<i>Diplosphaera</i>	D3	P (vzácně N)
16	CIS_V17 <i>Verrucaria baldensis</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
17	CIS_V18 <i>Sarcogyne regularis</i>	<i>Myrmecia</i>	<i>M. israeliensis</i>	P

Vzorek	Mykobiont	Fotobiont, rod	Fotobiont, linie	Rožmnořování
18 CIS_V19	<i>Lecidella stigmatea</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
19 CIS_V20	<i>Phaeophyscia orbicularis</i>	<i>Trebouxia</i>	Ix	N

Lokalita: lom Chlum

1 CH1	<i>Candelariella aurella</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. cretacea</i>	P
2 CH2	<i>Lecidella stigmatea</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
3 CH5	<i>Verrucaria muralis</i>	<i>Diplosphaera</i>	D1	P
4 CH6	<i>Verrucaria nigrescens</i>	<i>Diplosphaera</i>	D3	P (vzácne N)
5 CH7	<i>Aspicilia contorta</i>	<i>Trebouxia</i>	A18	P
6 CH8	<i>Protoblastenia rupestris</i>	<i>Asterochloris</i>	URa16	P
7 CH9	<i>Acarospora moenium</i>	<i>Myrmecia</i>	<i>M. biatorellae</i>	N
8 CH10	<i>Sarcogyne regularis</i>	<i>Diplosphaera</i>	D2	P
9 CH11	<i>Lecanora semipallida</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. asymetrica</i>	P
10 CH12	<i>Caloplaca crenulatella</i> s.l.	<i>Trebouxia</i>	<i>T. gigantea</i>	P
11 CH15	<i>Baccidia</i> sp.	<i>Diplosphaera</i>	D1	P

Lokalita: vyhlídka Pupek nad ústím Kačáku (přirozený výchoz)

1 KAC1	<i>Caloplaca coronata</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. asymetrica</i>	obě dominuje N
2 KAC2	<i>Aspicilia contorta</i> ssp. <i>contorta</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. cretacea</i>	P
3 KAC3	<i>Aspicilia contorta</i> ssp. <i>hoffmanianna</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. cretacea</i>	P
4 KAC4	<i>Lecanora crenulata</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
5 KAC5	<i>Caloplaca</i> sp.	<i>Trebouxia</i>	URa5	obě
6 KAC6	<i>Sarcogyne regularis</i>	<i>Myrmecia</i>	<i>M. israeliensis</i>	P
7 KAC7	<i>Caloplaca</i> cf. <i>arnoldii</i>	<i>Trebouxia</i>	A121	P
8 KAC8	<i>Rhinodina</i> cf. <i>calcareo</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
9 KAC9	<i>Lecania inundata</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
10 KAC10A	<i>Caloplaca variabilis</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. cretacea</i>	P
10 KAC10B	<i>Caloplaca variabilis</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. gigantea</i>	P
11 KAC11	<i>Protoblastenia rupestris</i>	<i>Vulcanochloris</i>	<i>V. canariensis</i>	P
12 KAC12	<i>Dermatocarpon minutum</i>	<i>Diplosphaera</i>	D2	P
13 KAC13	<i>Caloplaca interfulgens</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. cretacea</i>	P
14 KAC14	<i>Candelariella aurella</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. cretacea</i>	P
15 KAC15	<i>Psora testacea</i>	<i>Myrmecia</i>	<i>M. biatorellae</i>	P
16 KAC16	<i>Aspicilia calcarea</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
17 KAC17	<i>Rinodina lecanorina</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
18 KAC18	<i>Caloplaca inconnexa</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
19 KAC19	<i>Diplotomma venustum</i>	<i>Myrmecia</i>	<i>M. israeliensis</i>	P
20 KAC20	<i>Verrucaria baldensis</i>	<i>Asterochloris</i>	Ast1	P
21 KAC21	<i>Lecanora muralis</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. cretacea</i>	P
22 KAC22	<i>Verrucaria nigrescens</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. cretacea</i>	P (vzácne N)

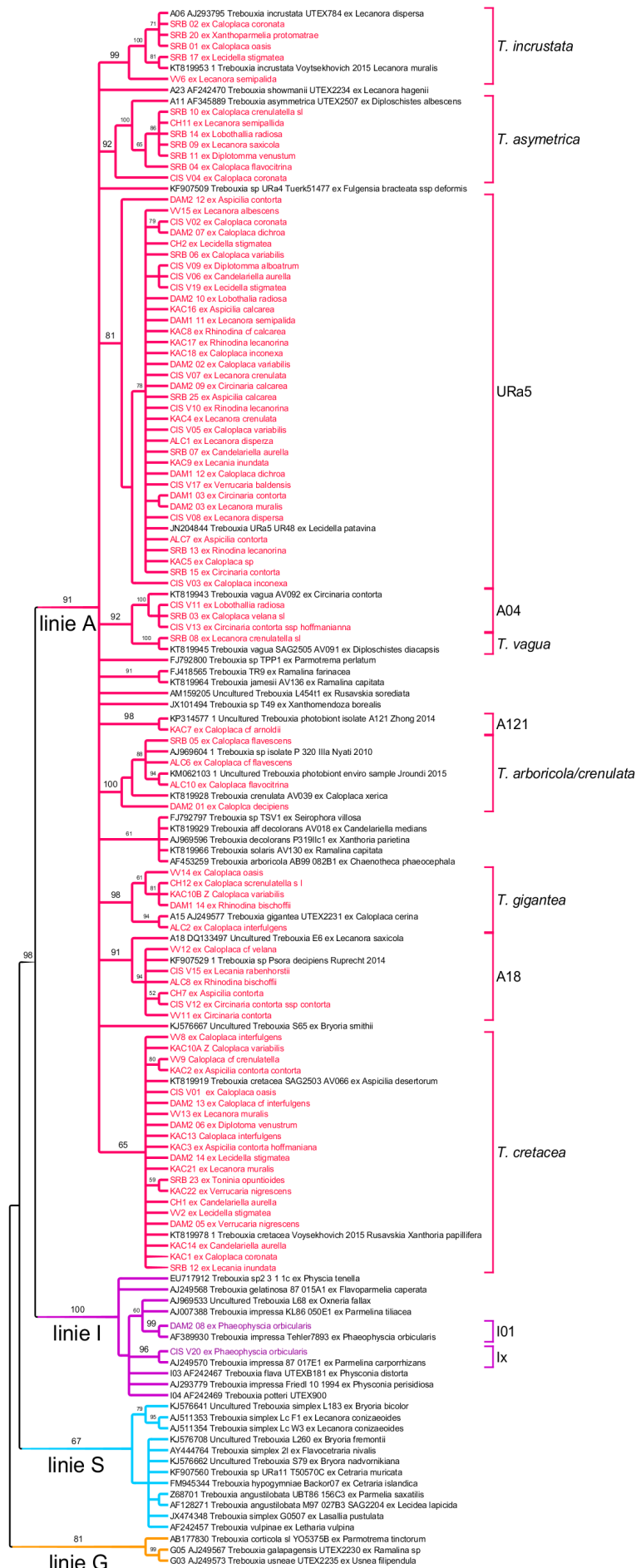
Lokalita: Srbsko, Na Závěrci (přirozený výchoz)

1 SRB01	<i>Caloplaca oasis</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. incrustata</i>	P
2 SRB02	<i>Caloplaca coronata</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. incrustata</i>	obě dominuje N
3 SRB03	<i>Caloplaca velana</i> s.l.	<i>Trebouxia</i>	A04	P
4 SRB04	<i>Caloplaca flavocitrina</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. asymetrica</i>	obě dominuje N
5 SRB05	<i>Caloplaca flavescens</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. arboricola/crenulata</i>	P
6 SRB06	<i>Caloplaca variabilis</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P

Vzorek	Mykobiont	Fotobiont, rod	Fotobiont, linie	Rozmnožování
7 SRB07	<i>Candelariella aurella</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
8 SRB08	<i>Lecanora crenulata</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. vaga</i>	P
9 SRB09	<i>Lecanora saxicola</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. asymetrica</i>	P
10 SRB10	<i>Caloplaca crenulatella</i> s.l.	<i>Trebouxia</i>	<i>T. asymetrica</i>	P
11 SRB11	<i>Diplotomma venustum</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. asymetrica</i>	P
12 SRB12	<i>Lecania inundata</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
13 SRB13	<i>Rinodina lecanorina</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
14 SRB14	<i>Lobothallia radiosa</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. asymetrica</i>	P
15 SRB15	<i>Aspicilia contorta</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
16 SRB16	<i>Protoblastenia rupestris</i>	<i>Myrmecia</i>	<i>M. biatorellae</i>	P
17 SRB17	<i>Lecidella stigmatea</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. incrustata</i>	P
18 SRB18	<i>Verrucaria nigrescens</i>	<i>Diplosphaera</i>	D3	P (vzácně N)
19 SRB19	<i>Sarcogyne regularis</i>	<i>Myrmecia</i>	<i>M. israeliensis</i>	P
20 SRB20	<i>Xanthoparmelia protomatrae</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. incrustata</i>	obě
21 SRB21	<i>Psora testacea</i>	<i>Myrmecia</i>	<i>M. biatorellae</i>	P
22 SRB22	<i>Acarospora macrospora</i>	<i>Myrmecia</i>	<i>M. biatorellae</i>	P
23 SRB23	<i>Toninia opuntioides</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. cretacea</i>	P
24 SRB24	<i>Placidium</i> sp.	<i>Myrmecia</i>	<i>M. israeliensis</i>	P
25 SRB25	<i>Aspicilia calcarea</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P

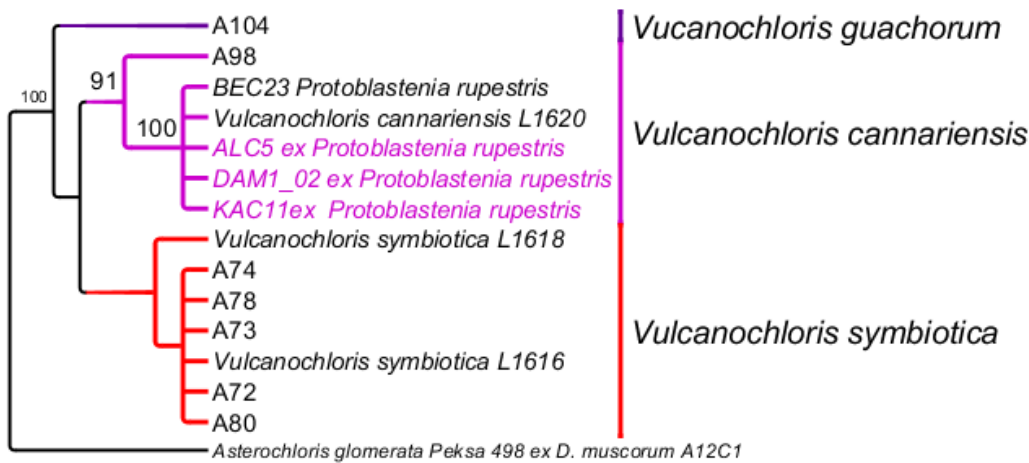
Lokalita: velký Kruhový lom

1 VV1	<i>Verrucaria nigrescens</i>	<i>Diplosphaera</i>	D2	P (vzácně N)
2 VV2	<i>Lecidella stigmatea</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. cretacea</i>	P
3 VV6	<i>Lecanora semipallida</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. incrustata</i>	P
4 VV7	<i>Sarcogyne regularis</i>	<i>Myrmecia</i>	<i>M. israeliensis</i>	P
5 VV8	<i>Caloplaca interfulgens</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. cretacea</i>	P
6 VV9	<i>Caloplaca crenulatella</i> s.l.	<i>Trebouxia</i>	<i>T. cretacea</i>	P
7 VV10	<i>Acarospora moenium</i>	<i>Myrmecia</i>	<i>M. biatorellae</i>	N
8 VV11	<i>Aspicilia contorta</i>	<i>Trebouxia</i>	A18	P
9 VV12	<i>Caloplaca velana</i> s.l.	<i>Trebouxia</i>	A18	P
10 VV13	<i>Lecanora muralis</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. cretacea</i>	P
11 VV14	<i>Caloplaca oasis</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>T. gigantea</i>	P
12 VV15	<i>Lecanora albescens</i>	<i>Trebouxia</i>	URa5	P
13 VV16	<i>Verrucaria muralis</i>	<i>Dilabifilum</i>	<i>Dilabifilum</i>	P

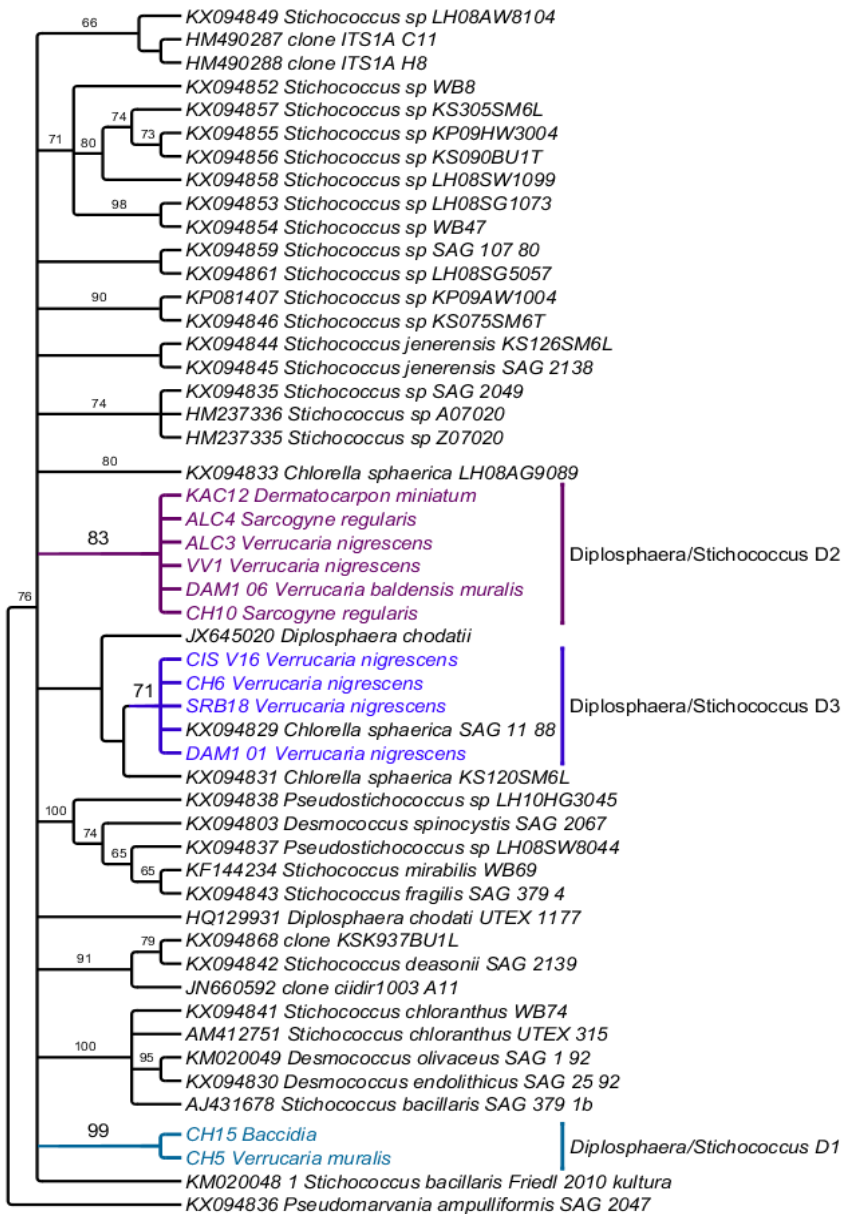


obrázek 20: fylogenetický strom rodu *Trebouxia* s důrazem na nalezené vzorky (barevně). Popsány jsou pouze linie, do kterých některý ze vzorků náleží. Uvedeny hodnoty bootstrapu >60.

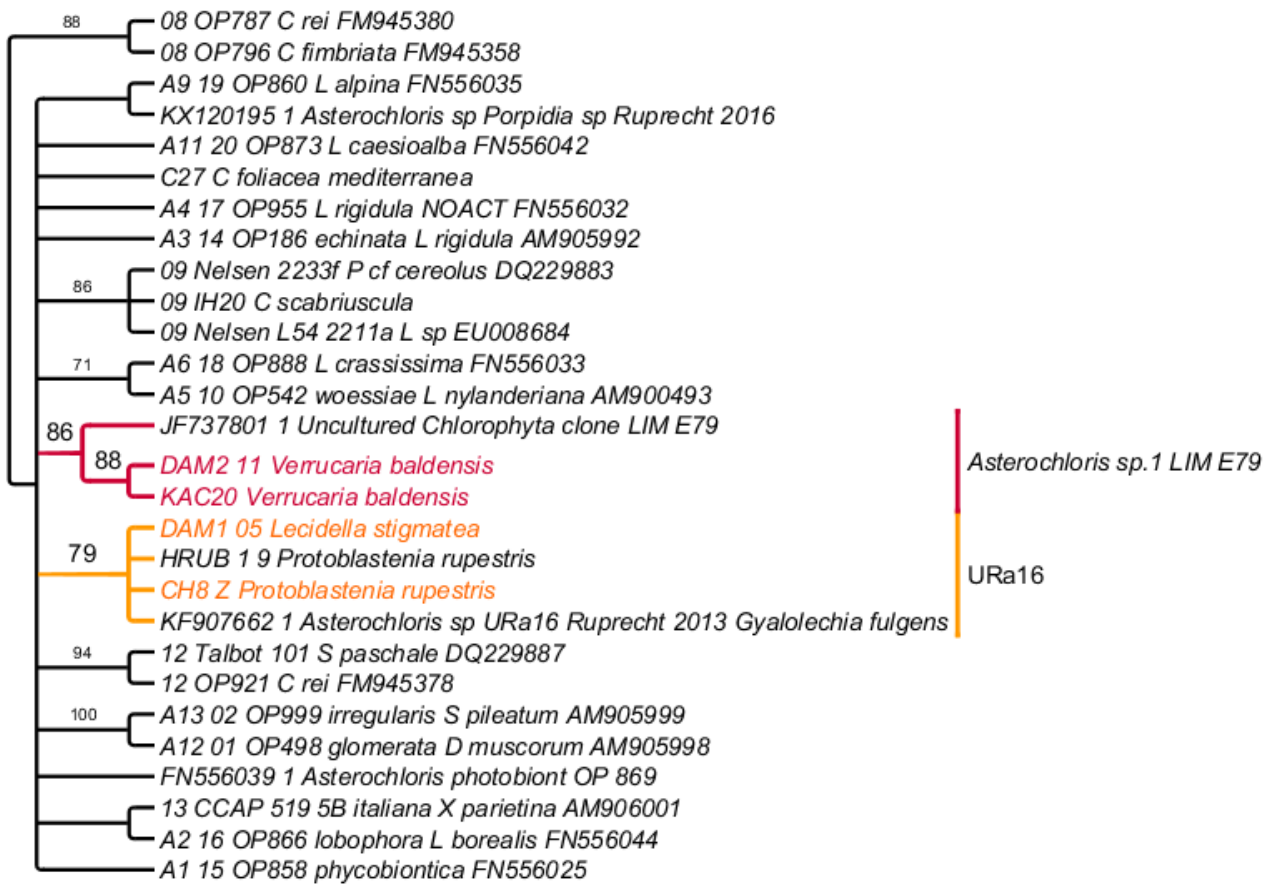
Vzorek je označen unikátním kódem, z něhož je patrné místo sběru. Dále je u něj uveden mykobiont, ze kterého byla řasa izolována. Uvedené informace obsahuje i tabulka 7.



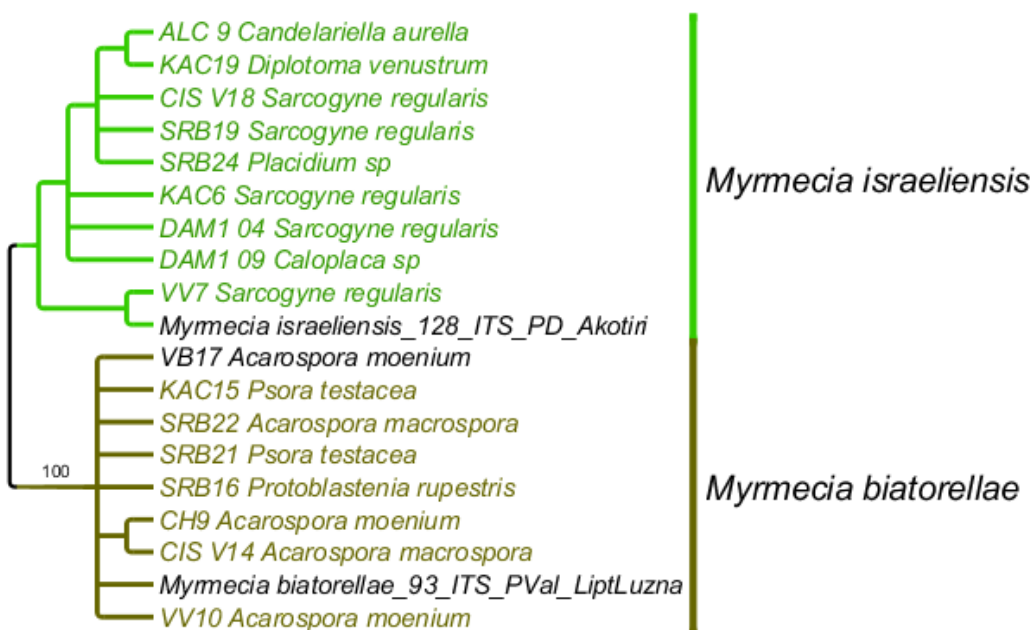
obrázek 21: fylogenetický strom rodu *Vulcanochloris* s důrazem na nalezené vzorky (barevně). Zástupce rodu *Asterochloris* byl použit jako outgroup. Uvedeny hodnoty bootstrapu >60. Nalezené vzorky jsou označeny unikátním kódem, z něhož je patrné místo sběru. Dále je u nich uveden mykobiont, ze kterého byla řasa izolována. Uvedené informace obsahuje i tabulka 7.



obrázek 22: fylogenetický strom rodu *Diplosphaera/ Stichococcus* s důrazem na nalezené vzorky (barevně). Jako outgroup je použita řasa *Pseudomarvania ampulliformis*. Uvedeny hodnoty bootstrapu >60. Nalezené vzorky jsou označeny unikátním kódem, z něhož je patrné místo sběru. Dále je u nich uveden mykobiont, ze kterého byla řasa izolována. Uvedené informace obsahuje i tabulka 7.



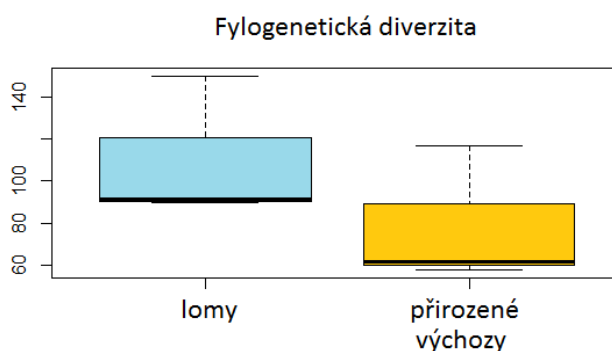
obrázek 23: fylogenetický strom rodu *Asterochloris* s důrazem na nalezené vzorky (barevně). Uvedeny hodnoty bootstrapu >60. Nalezené vzorky jsou označeny unikátním kódem, z něhož je patrné místo sběru. Dále je u nich uveden mykobiont, ze kterého byla řasa izolována. Uvedené informace obsahuje i tabulka 7.



obrázek 24: fylogenetický strom rodu *Myrmecia* s důrazem na nalezené vzorky (barevně). Strom je nezakořeněný, rozdělení na dva zmíněné rody je podpořeno hodnotou bootstrapu 100. Nalezené vzorky jsou označeny unikátním kódem, z něhož je patrné místo sběru. Dále je u nich uveden mykobiont, ze kterého byla řasa izolována. Uvedené informace obsahuje i tabulka 7.

Analýzy fylogenetické diverzity

Prvním počítaným parametrem byla fylogenetická diverzita (PD) jednotlivých typů lokalit. Průměrná fylogenetická diverzita byla v lomových lokalitách vyšší (105,643), než na přirozených skalních výchozech (74,600). Výsledek je zobrazen v tabulce 8 a v grafu na obrázku 25. Rozdíly ve fylogenetické diverzitě mezi oběma typy lokalit však nebyly signifikantní (podle Kruskal-Wallisova testu $p=0.1489$).



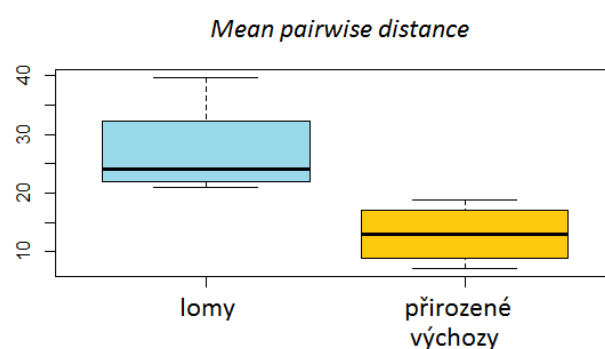
obrázek 25: srovnání PD pro lomy a přirozené výchozy, Kruskal-Wallisův test: $p=0,15$

typ lokality	průměrná PD
lomy	105,643
přirozené výchozy	74,600

tabulka 8: průměrná hodnota PD pro lomy a výchozy

Dalším počítaným parametrem vycházejícím z fylogenetických vztahů mezi pozorovanými fotobionty byla MPD (*mean pairwise distance*). Tato metrika byla vážená abundancemi jednotlivých taxonů. MPD byla na lomových lokalitách vyšší (27,155) nežli na přirozených skalních výchozech (13,0167).

Výsledek je zobrazen v tabulce 9 a v grafu na obrázku 26. Odlišení lokalit na základě MPD se ukázalo signifikantní (Kruskal-Wallisův test: $p=0,02$).

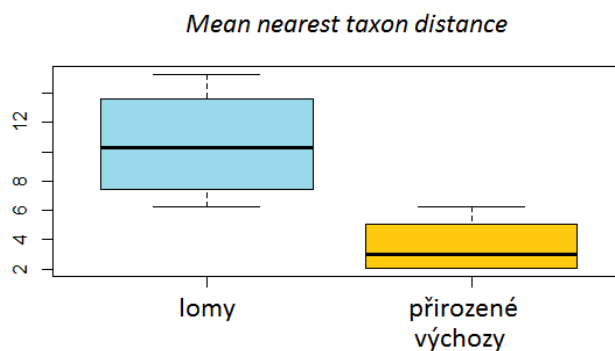


obrázek 26: srovnání MPD pro lomy a přirozené výchozy, Kruskal-Wallisův test: $p=0,02$

typ lokality	průměrná MPD
lomy	27,155
přirozené výchozy	13,0167

tabulka 9: průměrná hodnota MPD pro lomy a výchozy

Třetím počítaným parametrem byla MNTD (*mean nearest taxon distance*), počítající průměrnou fylogenetickou vzdálenost od nejbližšího příbuzného taxonu, čímž je kladen větší důraz na terminální větvení ve stromu (oproti MPD, která tuto informaci naopak upozaduje). Tato metrika byla opět vážená abundancemi. MNTD byla na lomových lokalitách opět vyšší (10,516) nežli na přirozených skalních výchozech (3,564). Výsledek je zobrazen v tabulce 10 a v grafu na obrázku 27. Odlišení lokalit na základě MNTD bylo také signifikantní (Kruskal-Wallisův test: $p=0,02$).



obrázek 27: srovnání MNTD pro lomy a přirozené výchozy, Kruskal-Wallisův test: $p=0,02$

typ lokality	průměrná MNTD
lomy	10,516
přirozené výchozy	3,546

tabulka 10: průměrná hodnota MNTD pro lomy a výchozy

Nefylogenetické analýzy diverzity

Alfa-diverzita

Hodnota α -diverzity pro jednotlivé lokality a průměrná α -diverzita pro každý z jednotlivých typů lokalit jsou uvedeny v tabulce 11. V lomech se nacházelo průměrně 9 linií (resp. druhů) fotobiontů na lokalitu, na přirozených výchozech o jednu méně.

α -diverzita			
	lomy		přirozené výchozy
ALC	7	DAM2	5
DAM1	10	CIS	8
CH	10	SRB	9
VV	9	KAC	10
průměr	9	průměr	8

tabulka 11: alfa-diverzita jednotlivých lokalit

Hodnoty Simpsonova indexu (D) pro lomy a pro přirozené skalní výchozy jsou uvedeny v tabulce 12. Přirozené výchozy mají Simpsonův index více než dvakrát vyšší než lomové lokality, což naznačuje, že ve vzorcích jedna z linií dominuje. Pravděpodobnost, že dva náhodně vybrané vzorky budou náležet do stejné linie, je u přirozených skalních výchozů 17,9 %, u lomů jen 8,4 %.

D	
lomy	0,084120983
přirozené výchozy	0,17921875

tabulka 12: Simpsonův index lomů a přirozených výchozů

Vyrovnanost (*evenness*), odvozená ze Simpsonova indexu, je uvedena v tabulce 13. Zde dosahuje vyšší hodnoty průměrná vyrovnanost lomových lokalit, jednotlivé linie jsou zde tedy zastoupeny rovnoměrněji, než je tomu v případě přirozených výchozů.

E	
lomy	0,72592836
přirozené výchozy	0,119029906

tabulka 13: vyrovnanost (*evenness*) lomů a přirozených výchozů

Beta-diverzita

Ve vzorcích byli nalezeni fotobionti z 23 různých lini. Pro účely srovnání lomových a přirozených lokalit jsem zvlášť definovala celkovou druhovou diverzitu lomů ($c_L=17$) a přirozených výchozů ($c_V=18$). S těmito hodnotami bylo pracováno při výpočtech β -diverzity.

β -diverzita vyjadřuje rozdílnost druhového složení vzorků. Zde má smysl srovnávat průměrnou β -diverzitu pro lomy a pro skalní výchozy (uvedena v tabulce 14). Z výsledku vidíme, že tato hodnota je pro přirozené skalní výchozy o něco vyšší (2,25 vs 1,889), což znamená, že mezi těmito vzorky je větší variabilita, jsou si navzájem méně podobné, než vzorky z lomů.

Beta-diverzita			
	lomy		přirozené výchozy
průměr	1,8889	průměr	2,25

tabulka 14: beta-diverzita lomů a přirozených výchozů

Jedním z počítaných indexů byl Jaccardův index podobnosti, který bere v patrnost přítomnost konkrétních linií na lokalitě, nikoliv jen jejich počet. Tabulky 15 a 16 obsahují hodnoty indexu podobnosti zvlášť pro lomové lokality a zvlášť pro přirozené skalní výchozy. Dále je v tabulkách uvedena průměrná hodnota Jaccardova indexu pro každý z typů lokalit.

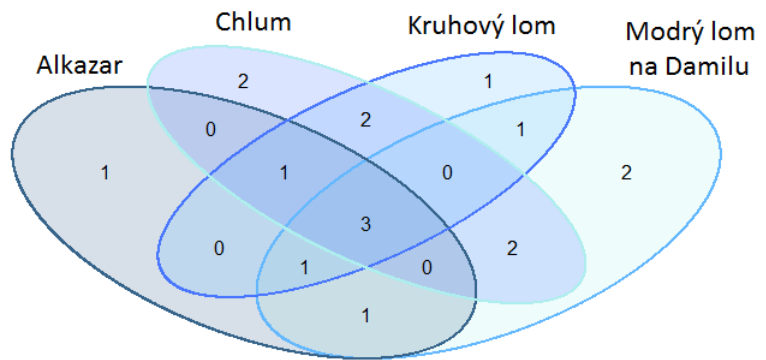
	ALC	DAM1	CH	VV
ALC	x	0,417	0,308	0,455
DAM1		x	0,333	0,357
CH			x	0,462
VV				x
průměrná hodnota				0,388

tabulka 15: Jaccardův index podobnosti pro lomy

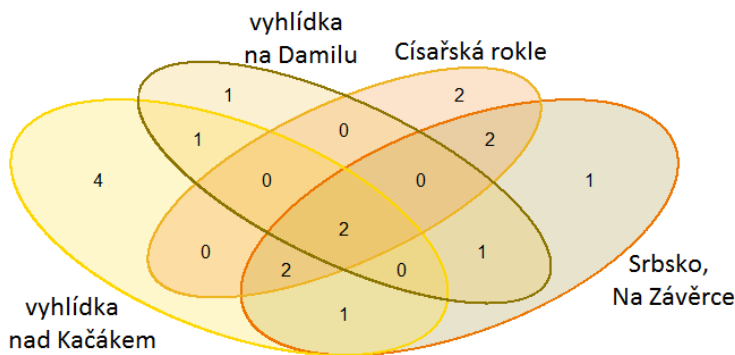
	KAC	SRB	DAM2	CIS
KAC	x	0,357	0,250	0,286
SRB		x	0,273	0,545
DAM2			x	0,182
CIS				x
průměrná hodnota				0,315

tabulka 16: Jaccardův index podobnosti pro výchozy

Průměrná hodnota *JAC* je pro přirozené výchozy nižší, což znamená, že jednotlivé lokality tohoto typu jsou si navzájem o něco méně druhově podobné, než lokality lomové. Zmíněný fakt vyjadřují i Vennovy diagramy. Na obrázku 28 je znázorněno, nakolik jednotlivé



obrázek 28: sdílené a unikátní linie fotobiontů na přirozených výchozech



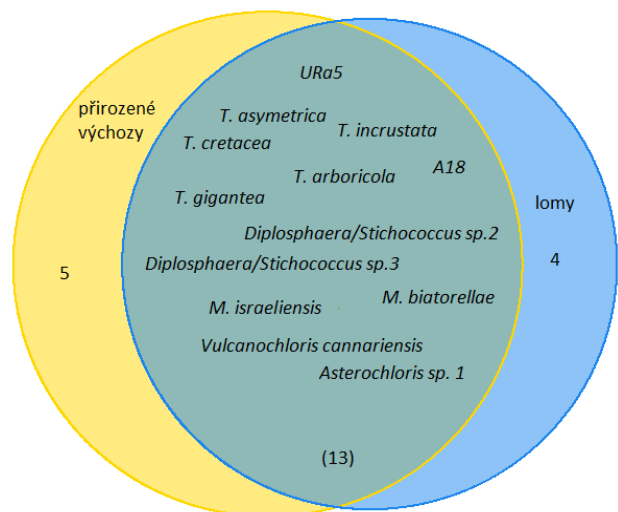
obrázek 29: Sdílené a unikátní linie fotobiontů na přirozených výchozech

ve shodě s vyšší hodnotou β -diverzity a nižší hodnotou Jaccardova indexu pro přirozené výchozy.

Poslední Vennův diagram (obrázek 30) znázorňuje, jaké linie byly nalezeny jak na lomových, tak na přirozených lokalitách. Šlo o 13 linií z rodů *Trebouxia*, *Asterochloris*, *Myrmecia*, *Diplosphaera/ Stichococcus* a *Vulcanochloris*. Pět linií bylo unikátních pro přirozené skalní výchozy (linie Ix, I01, A04, A121 a *T. vaga* z rodu *Trebouxia*) a čtyři linie pro lomy (rody *Trentepohlia* a *Dilabifilum*, linie D1 z rodu *Diplosphaera* a linie URa16 z rodu *Asterochloris*).

lomové lokality navzájem sdílí linie fotobiontů. Totéž pro přirozené skalní výchozy ilustruje obrázek 29.

Ze srovnání obou diagramů je patrné, že v lomech bylo o něco větší množství fotobiontů nalezeno na alespoň dvou lokalitách (47 %), než na přirozených výchozech (38 %). To je



obrázek 30: linie fotobiontů, které se vyskytly v obou typech lokalit

Diskuse

Nalezené linie fotobiontů

Nejčastěji nalezeným rodem byla *Trebouxia*, která je i nejhojnějším řasovým fotobiontem lišejníků vůbec (Kroken et Taylor, 2000, Ahmadjian, 2004). Tento rod se ve fylogenetických analýzách rozpadá do čtyř monofyletických linií, pro které se používá označení G či C (druhy blízké *T. corticola* a *T. galapagensis*), S (druhy blízké *T. simplex*), I (druhy blízké *T. impressa*) a A (druhy blízké *T. arboricola*) (Friedl et al., 2000, Nyati et al., 2014).

Linií, která nebyla mezi mými vzorky zastoupena, byla linie G. Nejedná se o nic překvapivého, neboť tato linie bývá zpravidla nalézána v lišejnících tropického pásma. Stejně tak nepřekvapivá je i absence zástupců linie S, pro kterou jsou typické kyselé substráty. Jediné dva nálezy linie I pocházely z lišejníku *Phaeophyscia orbicularis*, který je popisován jako vysoce selektivní pro tuto linii (Helms, 2003).

Nejzastoupenější linií mezi mými vzorky byla linie A a v ní podlinie URa5, zejména v lokalitách nenarušených (relativní abundance 36 %, oproti 15 % na sutích). I celkově asociace s rodem *Trebouxia* byly daleko častější na přirozených výchozech (80 % ze všech fotobiontů), než na disturbovaných lokalitách (54 %). Bylo by zajímavé zjistit, zda je výskyt různých linií rodu *Trebouxia* v pokročilejších společenstvech způsoben jejich fyziologickými vlastnostmi, jako je například tolerance vůči různému pH či růstová rychlost. Informace o těchto vlastnostech fotobiontů byly však dosud studovány jen sporadicky.

Nalezení fotobionti rodu *Asterochoris* náleželi do dvou linií, URa16 (Ruprecht et al., 2014) a linie odpovídající



obrázek 32: *Protoblastenia rupestris* (DAM1_02)

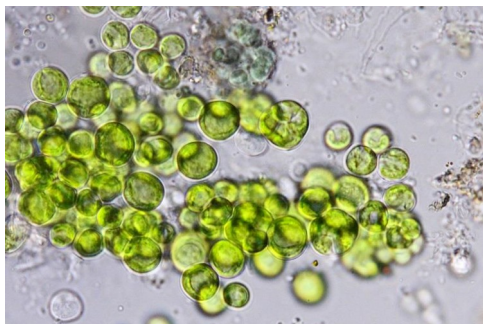
publikované sekvenci LIM E79. Celkem byly nalezeny čtyři lišejníky s tímto fotobiontem ze tří druhů – *Lecidella*



obrázek 31: *Lecidella stigmatea* (CH2)

stigmatea (obrázek 31), *Protoblastenia rupestris* (obrázek 32) a *Verrucaria baldensis*. Vyrovnaně zastoupené byly přirozené i suťové lokality. Na základě čtyř nálezů není možné vyvozovat obecný závěr, nicméně zde se zdá, že rod *Asterochloris* není svým výskytem vyhraněn pro čerstvá či stálá společenstva.

Tři nalezené sekvence rodu *Vulcanochloris* byly uniformní a spadaly do druhu *Vulcanochloris canariensis* (Vančurová et al., 2015). Hostitelem této řasy byl ve všech případech lišejník rodu *Protoblastenia rupestris*. Vzhledem k tomu, že k odlišení rodu *Vulcanochloris* došlo teprve před nedávnem a o jeho rozšíření není mnoho známo, nebylo možné v literatuře ověřit, nakolik mé zjištění odpovídá dřívějším nálezům.



obrázek 33: *Myrmecia israeliensis* z lišejníku *Diplotoma venustum* (KAC19)

Jako fotobiont šestnácti ze zkoumaných lišejníků byla rozpoznána řasa rodu *Myrmecia*. Nalezení fotobionti se rozpadali do dvou linií, *Myrmecia israeliensis* (na obrázku 33) a *Myrmecia biatorellae*. Fotobionta výhradně z tohoto rodu mají oba nalezené druhy rodu *Acarospora*, *A. moenium* (obrázek 32) a *A. macrospora* (čtyři vzorky), rod *Psora* (*P. testacea*, dva vzorky) a s výjimkou dvou vzorků z lomů i druh *Sarcogyne regularis* (nalezen na sedmi

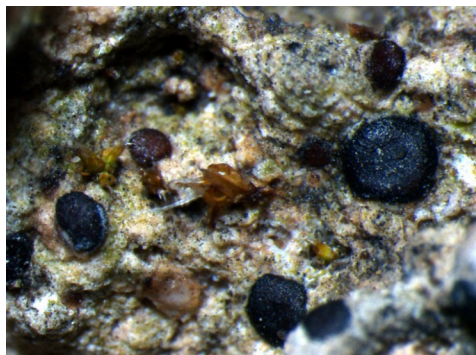
lokalitách). Třetí v literatuře zmiňovaný druh tohoto rodu tvořící lišejníkovou symbiózu, *Myrmecia astigmatica*, nebyl nalezen (Thüs et al., 2011).

Rod *Stichococcus* byl tradičně znám jako lichenizovaný rod, avšak ohledně jeho pozice ve fylogenetickém systému dlouho nebylo jasno – byl řazen i např. do Ulotrichales či do příbuznosti řasy *Klebsormidium* (Handa et al. 2003). Dnes se díky molekulárně fylogenetickým analýzám ukazuje, že se prolíná s druhým tradičně popisovaným lichenizovaným rodem, *Diplosphaera* (Thüs et al., 2011). Proto ani já jsem pro účely této práce mezi těmito rody nerozlišovala.



obrázek 34: *Diplosphaera/Stichococcus* sp. z lišejníku *Verrucaria nigrescens* (CH6)

Nalezeno bylo celkem 12 fotobiontů rodu *Diplosphaera/Stichococcus* (obrázek 34), v mé práci se například potvrdil předpokládaný výskyt tohoto rodu u lišejníku *Dermatocarpon miniatum* (Řeháková, 1968) a u



obrázek 36: *Sarcogyne regularis* (DAM1_04)

zástupců rodu *Verrucaria* (Thüs et al., 2011). Tento řasový rod byl zejména nalézán v lišejnících na



obrázek 35: *Verrucaria nigrescens* (CH6)

disturbovaných lokalitách (19 % všech fotobiontů na sutích), na přirozených skalních výchozech jen ojediněle (4 %). Lišejníky, které měly na sutích jako fotobionta řasu rodu *Diplosphaera/Stichococcus*, byly na

přirozených výchozech nalezeny i v asociaci s jiným rodem (např. *Trebouxia cretacea* u lišejníku *Verucaria nigrescens* na obrázku 35 či *Myrmecia israeliensis* u lišejníku *Sarcogyne regularis* na obrázku 36). Otázkou zůstává, čím je tento fakt způsoben – je asociace s rodem *Diplosphaera/Stichococcus* výhodná pro rychlou kolonizaci nového stanoviště? Či je tento rod konkurenčně slabý a v pozdějších fázích vývoje společenstva je vytlačen? Může mít dobré schopnosti šíření a tak být častěji dostupný na čerstvě odhaleném stanovišti? Na zmíněné aspekty by bylo zajímavé soustředit další výzkum a obecně jsou diskutovány níže.

Trentepohlia je barevně výrazná aeroterestricky rostoucí řasa, avšak hojně vstupuje i do lišejníkové symbiózy, zejména v tropech. V mírném pásmu je odhadováno, že kooperuje s asi 9 % lišejníků, celosvětově je to 23 % (Nelsen et al., 2011). I přes její vzácnost jako fotobionta lišejníků mírného pásma byla v jednom ze zkoumaných vzorků nalezena, konkrétně u druhu *Gyalecta jenensis* z disturbované lokality. Toto pozorování se shoduje i s výzkumem Honegger et al. (2011), Tschermak-Woess (1988) či Gärtner et Inholik (1998).

Po rodu *Trentepohlia* byl druhým nalezeným fotobiontem ze třídy Ulvophyceae rod *Dilabifilum*. *Dilabifilum* je z literatury popisováno jako symbiont lišejníků ze třídy Verrucariaceae. Thüs et al. (2011) ve své studii věnované fotobiontům lišejníků z této třídy dále uvádí, že lišejníky asociované s rodem *Dilabifilum* často rostou po boku různých druhů rodu *Caloplaca* či jsou jimi přerůstány.



obrázek 37: *Dilabifilum* sp. z lišejníku *Verrucaria muralis* (VV16)

V mých vzorcích byl rod *Dilabifilum* (obrázek 37) symbiontem dvou lišejníků druhů *Verrucaria muralis* a *Caloplaca flavocitrina*.

Bohatost lichenoflóry a míra disturbance

Data o ukončení těžby v místech sběrů mi poskytla možnost nejzazšího odhadu stáří společenstva, nicméně vzhledem k suťovité povaze místa předpokládám, že množství disturbancí zasahovalo do jeho charakteru ještě mnohem více do současnosti. I tak je však tato informace užitečná, neboť utváření lichenoflóry je do značné míry ovlivněno blízkým okolím, které slouží jako zdroj rozmnožovacích částic. Jinými slovy, kolonizace ojedinělého disturbovaného místa, obklopeného vyvinutou lišejníkovou flórou, probíhá podstatně rychleji, než kolonizace místa o stejné velikosti, nacházejícího se uprostřed čerstvě vytěženého lomu, kde se lichenofóra teprve formuje. Zejména nepohlavní rozmnožovací částice lišejníku, izídie, které dosahují velikosti i nad 100 μm , jsou schopny se šířit jen na poměrně krátkou vzdálenost (jiný typ vegetativních

rozmnožovacích částic, sorédie, jsou drobnější, hydrofóbní, schopné roznosu pomocí větru či zvířat, a dovedou se šířit i na delší vzdálenosti). Askospory (u basidiolišejníků basidiospory) obvykle jsou schopny šíření i na dlouhé vzdálenosti, ale zase nesou pouze houbového partnera, který si při dopadu na nové místo musí rychle najít nového fotobiontního partnera (Ott, 1987, Honnegger, 2009, Vondrák et al., 2013). I toto je jistě faktorem, který složení fotobiontů na lokalitách ovlivňuje. Spolu s daty o lišejníkové sukcesi a lichenometrie se mi podařilo potvrdit, že srovnávané dva typy společenstev se skutečně podstatně liší svým stářím.

Ve všech případech bylo na přirozených stanovištích nalezeno bohatší (v jednom případě stejně bohaté) lišejníkové společenstvo co do počtu mykobiontů, než v lokalitách v lomech. Toto nelze považovat za nic překvapivého, trend rostoucí druhové bohatosti s postupující sukcesí pozorujeme i u mnohých dalších organismů včetně cévnatých rostlin (Monk, 1967, Bazzas, 1975, Woesley et al., 2017). Například u epifytických lišejníkových společenstev v bukových lesích bylo zjištěno, že teprve přes 200 let staré stromy hostí rozvinuté a bohaté lišejníkové společenstvo. Na těchto stromech se vyskytovaly i jinak velmi vzácné specializované druhy a pro rozvinutí takového společenstva byl potřeba velmi dlouhý časový úsek (Wolseley et al., 2016).

V této souvislosti se u lišejníků často skloňuje termín kontinuita – je jím myšleno právě to, že je důležité, aby byl v okolí neustále zachován zdroj rozmnožovacích částic, díky čemuž ojediněle disturbované místo dokáže rychle svou druhovou bohatost obnovit (Woesley et al., 2017). V případě lomu jde o modelový příklad situace, kdy je taková kontinuita porušena.

Studie zabývající se sukcesí saxikolních lišejníků popisuje i pozorování fáze senescence, stárnutí společenstva, při které dochází k odumírání a naopak snižování počtu druhů (Woolhouse et al., 1985). V případě lokalit sledovaných v rámci této práce však byly nedisturbované lokality, tedy lokality s rozvinutějším společenstvem, bohatší, než lokality se společenstvem mladším.

Druhová bohatost a fylogenetická diverzita fotobiontů

V případě fotobiontů se ukazuje trend od mykobiontů zcela odlišný. Na čerstvých lokalitách bylo kvůli zvolené metodě odebráno méně vzorků a přesto byla druhová bohatost řas srovnatelná s více ovzorkovanými přirozenými lokalitami a diverzita rodová byla dokonce vyšší. Ještě větší rozdíly se ukázaly při srovnávání fylogenetické diverzity. Zatímco na stálých lokalitách fotobionti přísluší z naprosté většiny do různých linií rodu *Trebouxia*, na čerstvých stanovištích je situace mnohem pestřejší, fotobionti jsou různorodější a fylogeneticky vzdálenější, častěji zde najdeme zástupce i jiných rodů, jako je *Diplosphaera/Stichococcus* a *Myrmezia* z třídy Trebouxiophyceae, či dokonce ojediněle zástupce třídy Ulvophyceae, rody *Trentepohlia* a *Dilabifilum*.

Je lišejníková symbióza dynamickou interakcí?

Vzhledem k pomalému růstu a dlouhému životu lišejníku je obtížné, takřka nemožné, během doby vyhrazené pro výzkum k diplomové práci pozorovat vznik, vývoj a případné změny soužití u tohoto duálního organismu v jeho přirozeném prostředí v reálném čase. Zejména u vybrané skupiny saxikolních lišejníků, u kterých se rychlost růstu pohybuje v extrémních případech i kolem 0,2 mm za rok, by mohlo jít o úkol vpravdě celoživotní.

V mém výzkumu jsem se soustředila na srovnání diverzity fotobiontů mezi lokalitou, kde teprve před nedávnem došlo k jejímu osídlení lišejníky, s lokalitou, kde je již lišejníkové společenstvo ustanovené a stabilizované. Na základě pozorovaných rozdílů tvrdím, že lišejníková symbióza není neměnná a statická a dochází k jejímu vývoji. Asko- či basidiospora mykobionta, která dopadne na zem, skálu či například borku stromu, má jedinou možnost vyklíčit, rychle najít vhodného fotosyntetického partnera a zapojit se do symbiózy, jinak umírá. Mohlo by být proto výhodné spokojit se třeba i se suboptimálním partnerem, pokud žádný lepší není k dispozici, pokud by bylo možné jej později nahradit za takového, který je například lépe adaptovaný na podmínky na konkrétním stanovišti.

V případě nepohlavního rozmnožování přichází společně na nové místo houbový i řasový partner, nutnost spokojit se s první možnou přítomnou řasou v tomto případě odpadá. Je zde však jiný problém – jak se ukazuje, řasa je často ten citlivější v páru, na ní je velmi závislá ekologie lišejníku (Bačkor et al., 2010). Může se tedy snadno stát, že fotobiont není na nové stanoviště dobře adaptován, strádá a neposkytuje mykobiontu dostatek živin. I v tomto případě je pro mykobionta výhodné, může-li jej změnit za takového, kterému dané stanoviště vyhovuje. U lišejníků nalezených v rámci této práce však převládalo rozmnožování pohlavní (viz tabulka 7), proto se jich mohou týkat spíše hypotézy popsané v minulém odstavci.

Vzhledem k získaným výsledkům se domnívám, že uvedené scénáře jsou možné. Známe případy lišejníků (např. *Diploschistes muscorum*), o kterých je známo, že svůj růst začínají vždy na stélce jiného (často konkrétního) lišejníku. Důvodem, proč tomu tak je, může být právě získání fotosyntetického partnera, u kterého lze předpokládat, že bude na místní podmínky dobře adaptován (Friedl, 1987).

Stejně jako v případě korálů, je velmi pravděpodobné, že ne všechny lišejníky budou změny fotobionta schopny. I v mé práci, která se zabývala jen jedním z mnoha typů lišejníků (saxikolními bazofilními lišejníky), byly nalezeny druhy, které spolupracovaly pouze s jedním druhem fotobionta – příkladem mohou být druhy *Acarospora macrospora* a *Acarospora moenium*, jejichž partnerem byla vždy řasa *Myrmecia biatorellae*. Zajímavý je případ lišejníku *Phaeophyscia orbicularis*, jejíž

partnerem byla řasa *Trebouxia* z linie I, která u žádného jiného studovaného lišejníku nebyla nalezena. Je nutno přiznat, že tento lišejník rostl pouze na dvou lokalitách, tedy pro potvrzení faktu, že je pro něj specifická právě tato konkrétní řasová linie, by bylo potřeba jejich sběr značně rozšířit. Dalším druhem, který měl ve všech nalezených stélkách téhož fotobionta, byla *Aspicilia calcarea* s fotobiontem rodu *Trebouxia* z linie URa5.

Zmíním však druhy, u kterých se domnívám, že k vývoji dochází. Například u lišejníku *Verrucaria nigrescens*, přítomného na všech lokalitách, byla ve většině případů fotobiontem řasa *Diplosphaera/Stichococcus*, nicméně na dvou přirozených lokalitách kooperovala s řasou *Trebouxia cretacea*. *Verrucaria nigrescens* je lišejník endolitický a je představitelné, že během rozšiřování své stélky po ploše kamene může svým prothallelem (okrajovou částí stélky, ve které je přítomný pouze mykobiont) narazit na vhodnějšího partnera, například i ve formě nepohlavní rozmnožovací částice jiného lišejníku (a nyní se pouštím již na pole odvážných spekulací), čímž tato nová kombinace získá výhodu oproti zbytku stélky, dokáže rychleji růst a třeba i stélku s původním fotobiontem přerůst. Genotyp mykobionta zůstal týž, fotobiont byl nahrazen. Obdobný případ vidíme u lišejníku *Sarcogyne regularis*, taktéž přítomného na všech sledovaných lokalitách. Spolupracuje ve většině případů s druhem *Myrmecia biatorellae*, avšak ve dvou z lomů je jeho fotobiontem jedna z linií rodu *Diplosphaera*.

Jaké zákonitosti ovlivňují vznik interakce?

V minulé podkapitole jsem spekulovala o tom, že fotobiont, se kterým začíná lišejník svůj růst, může být jakési provizorium, se kterým se musí spokojit, protože dosud nenašel vhodnějšího partnera, ale jiným vysvětlením změny fotobionta během života by mohlo být to, že pro rychlou kolonizaci nové lokality a nastartování růstu jsou vhodné jiní partneři, než pro dlouhodobé vytrvání a úspěch v konkurenci rozvíjejícího se společenstva. Bohužel, u lišejníkových fotobiontů není známo mnoho o jejich ekofyziologických vlastnostech jako je například rychlost růstu či afinita k různému pH a rozhodně jde o zajímavé téma, jehož výzkum by mnohé napověděl o zákonitostech, jimiž se výběr či změna fotobiontů řídí.

V případě, že je mykobiont schopen kooperace s více genotypy řas a jeho spora kolonizuje novou lokalitu, bylo by zajímavé zjistit, z jaké nabídky fotobiontů může vybírat a co způsobí, že vznikne asociace s právě konkrétní řasou. Jde o náhodu? Utvoří symbiózu s prvním kooperaceschopným genotypem? Či i u lišejníků, které svého fotobionta během života mění, jde i v první fázi tvorby symbiózy o vysoce specifický výběr, jimž preferují partnera vhodného pro rychlé uchycení se na novém stanovišti?

Woronik et Grube (2010) srovnávají různé druhy rodu *Physconia*, které se liší svým rozmnožováním – některé dávají přednost nepohlavnímu rozmnožování, tedy dochází k přenosu obou symbiotických partnerů, jiné se rozmnožují pohlavně. Výsledky jejich výzkumu ukazují, že u druhů, u kterých se šíří partneři společně, nedochází ke striktnímu udržení tohoto partnera a velmi často dojde ke vzniku asociace jiné. Společné šíření obou partnerů tedy přináší možnost volby, nikoliv povinnou vazbu na původní řasu.

Jsou řasy, se kterými tvoří mykobionti svou symbiózu v první fázi života, lépe uzpůsobeny pro šíření a tedy jsou k dispozici i na velmi čerstvých lokalitách? I pro zodpovězení této otázky by bylo výhodné zjistit, jaké řasy se na čerstvě odhalených místech, dosud bez lišejníkové vegetace, nacházejí.

Výměna fotobionta jako konkurenční výhoda?

Výše spekuluji o tom, že spolupráce s určitým fotobiontem může lišejníku přinést konkurenční výhodu při osidlování nového biotopu, či naopak při kompetici o prostor v pozdějších fázích. Není však dodnes zcela samozřejmé uznat fakt, že mezi lišejníky ke kompetici vůbec dochází, či zda je faktorem, který má nezanedbatelný vliv na formování jejich společenstva. Mnozí autoři poukazují na to, že lišejníky jsou organismy kolonizující zejména extrémně nehostinná stanoviště (např. vystavená záření, suchu, vysokým či nízkým teplotám) a jejich odolnost vůči těmto faktorům je pro složení společenstva důležitější, než vzájemné ovlivnění (Farrar, 1973, Piggot et Grime, 1980). Druhým aspektem hovořícím proti vlivu kompetice je typ stanovišť, která lišejníky často obývají: jsou jimi nestabilní substráty (jak to ostatně bylo i v případě mého výzkumu) a místa podléhající erozi, a tedy ani zde by nebyla konkurence při formování společenstva podstatná a záleželo by spíše na neutrálních procesech (Amstrong et al., 2007).

Na základě těchto poznatků je možné formulovat hypotézu, že změna fotobionta během života není výhodou konkurenční, ale zvyšuje šance lišejníku na přežití v náročných podmínkách jeho stanoviště. Otevřenou otázkou zůstává, zda v případě změny těchto podmínek může k přežití lišejníku přispět i výměna řasového partnera, či jde o proces pomalejší, neschopný reagovat na okamžité změny.

Závěr

Ve své práci jsem zkoumala výskyt a diverzitu lišejníkových fotobiontů na dvou typech lokalit – na suťových polích v lomech, které podléhají časté disturbanci, a na přirozených skalních výchozech, bez známek disturbancí. Pomocí jejich srovnání jsem se snažila zodpovědět na otázku, zda se symbiotická interakce může vyvíjet, zda je v lišejníku možná výměna řasového partnera.

Na základě mých pozorování tvrdím, že k vývoji symbiózy dochází a existují druhy lišejníků, které preferují jiného fotobionta na čerstvě kolonizovaných stanovištích a jiného ve společenstvu pokročilém.

Součástí mé práce bylo srovnání druhové bohatosti a diverzity obou typů lokalit, kde se co do počtu mykobiontů ukázaly jako druhově bohatší přirozené skalní výchozy, ale v diverzitě fotobiontů (zejména diverzitě fylogenetické) dominovaly disturbované lokality.

Někteří fotobionti byli nalezeni pouze na přirozených výchozech (šlo vždy o různé linie rodu *Trebouxia*), jiní byli unikátní pro disturbované lokality (linie z rodů *Diplosphaera/Stichococcus*, *Asterochloris* a rody *Trentepohlia* a *Dilabifilum*). Zdá se, že s vývojem společenstva lišejníky upřednostňují partnery z rodu *Trebouxia*, avšak v časných fázích kolonizace asociují i s jinými rody, např. s rodem *Diplosphaera/Stichococcus*. Tento fakt může být způsoben např. lepší schopností šíření řas rodu *Diplosphaera/Stichococcus* či lepší schopností adaptace na místní podmínky u rodu *Trebouxia*. Avšak tyto fyziologické vlastnosti jednotlivých linií fotobiontů jsou dosud poměrně velkým bílým místem na mapě znalostí lišejníkové interakce.

S přihlédnutím ke kritickému pohledu na kompetici lišejníků je možné se domnívat, že na počátku utváření interakce hrají velkou roli neutrální procesy a méně specifický lišejník tak může zformovat symbiózu s prvním možným fotobiontem, se kterým se na novém stanovišti potká, a teprve postupem času jej může změnit za takového, který mu umožní lépe přežít v podmínkách stanoviště.

Použitá literatura

AHMADJIAN Vernon, JACOBS B. Jerome. Algal-fungal relationships in lichens: recognition, synthesis, and development. *Algal Symbiosis: A Continuum of Interaction Strategies*, 2011, 147.

AHMADJIAN, Vernon. Lichens are more important than you think. *BioScience*, 1995, 45.3: 124-124.

AHMADJIAN, Vernon. *Trebouxia*: reflections on a perplexing and controversial lichen photobiont. *Symbiosis*, 2004, 373-383.

ARMSTRONG, Richard A.; WELCH, A. R. Competition in lichen communities. *Symbiosis*, 2007, 43.1: 1-12.

BAČKOR, Martin, et al. Photobiont diversity in lichens from metal-rich substrata based on ITS rDNA sequences. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2010, 73.4: 603-612.

BAKER, Andrew C. Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis: diversity, ecology, and biogeography of *Symbiodinium*. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2003, 34.1: 661-689.

BALDWIN, Bruce G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Molecular phylogenetics and evolution*, 1992, 1.1: 3-16.

BAZZAZ, F. A. Plant species diversity in old-field successional ecosystems in southern Illinois. *Ecology*, 1975, 56.2: 485-488.

BOSSERT, PATRICIA; DUNN, KENNETH W. Regulation of intracellular algae by various strains of the symbiotic *Hydra viridissima*. *Journal of cell science*, 1986, 85.1: 187-195.

BRANDT, Karl. Über die morphologische und physiologische Bedeutung des Chlorophylls bei Thieren. 1882.

BREEN, Katie; LEVESQUE, Esther. Proglacial succession of biological soil crusts and vascular plants: biotic interactions in the High Arctic. *Botany*, 2006, 84.11: 1714-1731.

CAIRNEY, John WG; MEHARG, Andrew A. Ericoid mycorrhiza: a partnership that exploits harsh edaphic conditions. *European Journal of Soil Science*, 2003, 54.4: 735-740.

CANESTRARI, Daniela, et al. From parasitism to mutualism: unexpected interactions between a cuckoo and its host. *Science*, 2014, 343.6177: 1350-1352.

CARRILLO-GARCIA, Ángel, et al. Nurse plants, mycorrhizae, and plant establishment in a disturbed area of the Sonoran Desert. *Restoration Ecology*, 1999, 7.4: 321-335.

CASANO, Leonardo M., et al. Two *Trebouxia* algae with different physiological performances are ever-present in lichen thalli of *Ramalina farinacea*. Coexistence versus Competition?. *Environmental microbiology*, 2011, 13.3: 806-818.

CASSIE, David M.; PIERCEY-NORMORE, Michele D. Dispersal in a sterile lichen-forming fungus, *Thamnia subuliformis* (Ascomycotina: Icmadophilaceae) This paper is one of a selection of papers published in the Special Issue on Systematics Research. *Botany*, 2008, 86.7: 751-762.

CATALÁ, Santiago, et al. Coordinated ultrastructural and phylogenomic analyses shed light on the hidden phycobiont diversity of *Trebouxia* microalgae in *Ramalina fraxinea*. *Molecular phylogenetics and Evolution*, 2016, 94: 765-777.

CÁZARES, E.; TRAPPE, J. M. Vesicular endophytes in roots of the Pinaceae. *Mycorrhiza*, 1993, 2.4: 153-156.

- DE BARY, Anton. Die erscheinung der symbiose. Verlag von Karl J. Trübner, 1879.
- DEBELLÉ, Frédéric, et al. Nod genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. *Acta Biochimica Polonica*, 2001, 48.2: 359-365.
- DEPRIEST, Paula T. Early molecular investigations of lichen-forming symbionts: 1986–2001. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2004, 58: 273-301.
- EGERTON-WARBURTON, Louise; ALLEN, Michael F. Endo-and ectomycorrhizas in *Quercus agrifolia* Nee.(Fagaceae): patterns of root colonization and effects on seedling growth. *Mycorrhiza*, 2001, 11.6: 283-290.
- FAITH, Daniel P. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological conservation*, 1992, 61.1: 1-10.
- FARRAR, J. F. Lichen physiology: progress and pitfalls. *Air pollution and lichens*, 1973, 13: pp. 237-282. The Athlone Press of the University of London, London.
- FRANCIS, R.; READ, D. J. The contributions of mycorrhizal fungi to the determination of plant community structure. *Plant and soil*, 1994, 159.1: 11-25.
- FRIEDL, Th. Thallus development and phycobionts of the parasitic lichen *Diploschistes muscorum*. *The Lichenologist*, 1987, 19.2: 183-191..
- FRIEDL, Thomas, et al. The distribution of group I introns in lichen algae suggests that lichenization facilitates intron lateral transfer. *Molecular phylogenetics and evolution*, 2000, 14.3: 342-352.
- FRITZ, Örjan; GUSTAFSSON, Lena; LARSSON, Krister. Does forest continuity matter in conservation?—A study of epiphytic lichens and bryophytes in beech forests of southern Sweden. *Biological conservation*, 2008, 141.3: 655-668.
- GÄRTNER, Georg; INGOLIC, Elisabeth. Problems in the identification of lichen photobionts. na, 1998.
- GLADFELTER, Elizabeth H. Circulation of fluids in the gastrovascular system of the reef coral *Acropora cervicornis*. *The Biological Bulletin*, 1983, 165.3: 619-636.
- GLYNN, P. W. Coral reef bleaching: ecological perspectives. *Coral reefs*, 1993, 12.1: 1-17.
- GOULET, Tamar L. Most corals may not change their symbionts. *Marine Ecology Progress Series*, 2006, 321: 1-7.
- GUZOW-KRZEMIŃSKA, Beata. Photobiont flexibility in the lichen *Protoparmeliopsis muralis* as revealed by ITS rDNA analyses. *The Lichenologist*, 2006, 38.5: 469-476.
- HABETHA, Matthias, et al. The *Hydra viridis/Chlorella* symbiosis. Growth and sexual differentiation in polyps without symbionts. *Zoology*, 2003, 106.2: 101-108.
- HABETHA, Matthias; BOSCH, Thomas CG. Symbiotic *Hydra* express a plant-like peroxidase gene during oogenesis. *Journal of experimental biology*, 2005, 208.11: 2157-2165.
- HANDA, Shinji, et al. A new aerial alga, *Stichococcus ampulliformis* sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) from Japan. *Phycological Research*, 2003, 51.3: 203-210.
- HARLEY, John Laker, et al. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press Inc., 1983.
- HAY, Mark E., et al. Mutualisms and aquatic community structure: the enemy of my enemy is my friend. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 2004, 35: 175-197.
- HEJNA M. Lom Alkazar u Berouna, *Turista*, 2013, 4: 24-27
- HEJNA M. Lomy a vápenice v srdci Českého krasu, *Envidea*, 2012

- HEPPERLE, D. SeqAssem©. A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. URL: <http://www.sequentix.de>, 2004.
- HERRE, E. A., et al. The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends in Ecology & Evolution*, 1999, 14.2: 49-53.
- HIRSCH, Ann M.; LUM, Michelle R.; DOWNIE, J. Allan. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special?. *Plant physiology*, 2001, 127.4: 1484-1492.
- HOBBIE, Erik A.; JUMPPONEN, Ari; TRAPPE, Jim. Foliar and fungal 15 N: 14 N ratios reflect development of mycorrhizae and nitrogen supply during primary succession: testing analytical models. *Oecologia*, 2005, 146.2: 258-268.
- HODAČ, Ladislav, et al. Widespread green algae *Chlorella* and *Stichococcus* exhibit polar-temperate and tropical-temperate biogeography. *FEMS microbiology ecology*, 2016, 92.8: fiw122.
- HOLDWAY, Douglas A.; LOK, Katrina; SEMAAN, Michael. The acute and chronic toxicity of cadmium and zinc to two hydra species. *Environmental toxicology*, 2001, 16.6: 557-565.
- HONEGGER, Rosmarie; KUTASI, Verena; RUFFNER, Hans Peter. Polyol patterns in eleven species of aposymbiotically cultured lichen mycobionts. *Mycological Research*, 1993, 97.1: 35-39.
- HUME, Benjamin CC, et al. *Symbiodinium thermophilum* sp. nov., a thermotolerant symbiotic alga prevalent in corals of the world's hottest sea, the Persian/Arabian Gulf. *Scientific reports*, 2015, 5.
- HUNTER, Paul R.; GASTON, Michael A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of clinical microbiology*, 1988, 26.11: 2465-2466.
- HUSS, Volker AR, et al. There is an Ecological Basis for Host/Symbiont Specificity in *Chlorella Hydra* Symbioses. *Endocytobiosis and Cell Research*, 1994, 10: 35-35.
- CHAPPELL, John. Coral morphology, diversity and reef growth. *Nature*, 1980, 286.5770: 249-252.
- CHEN, C. A. et al. A stable association of the stress-tolerant zooxanthellae, *Symbiodinium* clade D, with the low-temperature-tolerant coral, *Oulastrea crispata* (Scleractinia: Faviidae) in subtropical non-reefal coral communities. *Zoological studies*, 2003, 42.4: 540-550.
- CHEN, Hanbo; BOUTROS, Paul C. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC bioinformatics*, 2011, 12.1: 35.
- CHEN, Y. L.; BRUNDRETT, M. C.; DELL, B. Effects of ectomycorrhizas and vesicular-arbuscular mycorrhizas, alone or in competition, on root colonization and growth of *Eucalyptus globulus* and *E. urophylla*. *The New Phytologist*, 2000, 146.3: 545-555.
- JOMELLI, Vincent, et al. Assessment study of lichenometric methods for dating surfaces. *Geomorphology*, 2007, 86.1: 131-143.
- JURASINSKI, Gerald; RETZER, Vroni; BEIERKUHNLEIN, Carl. Inventory, differentiation, and proportional diversity: a consistent terminology for quantifying species diversity. *Oecologia*, 2009, 159.1: 15-26.
- KALISZEWICZ, Anita. Interference of asexual and sexual reproduction in the green hydra. *Ecological Research*, 2011, 26.1: 147-152.
- KARNTANUT, W.; PASCOE, D. Effects of removing symbiotic green algae on the response of *Hydra viridissima* (Pallas 1776) to metals. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2005, 60.3: 301-305.
- KATOH, Kazutaka, et al. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research*, 2002, 30.14: 3059-3066.
- KAWAIDA, Hitomi, et al. Symbiosis between *Hydra* and *Chlorella*: molecular phylogenetic analysis and

- experimental study provide insight into its origin and evolution. *Molecular phylogenetics and evolution*, 2013, 66.3: 906-914.
- KEMBEL, Steven W., et al. Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics*, 2010, 26.11: 1463-1464.
- KEMP, Dustin W., et al. Community dynamics and physiology of *Symbiodinium* spp. before, during, and after a coral bleaching event. *Limnology and Oceanography*, 2014, 59.3: 788-797.
- KERSHAW, K. A.; MILLBANK, J. W. Nitrogen metabolism in lichens. *New phytologist*, 1970, 69.1: 75-79.
- KOCURKOVÁ, A.; JUŘIČKOVÁ, L. Měkkýši lomů v Českém krasu. *Živa*, 2012, 3: 129.
- KROKEN, Scott; TAYLOR, John W. Phylogenetic species, reproductive mode, and specificity of the green alga *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. *The Bryologist*, 2000, 103.4: 645-660.
- KUMAR, Sudhir; TAMURA, Koichiro; NEI, Masatoshi. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Bioinformatics*, 1994, 10.2: 189-191.
- LAJEUNESSE, T. Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs. *Marine Biology*, 2002, 141.2: 387-400.
- LAMBERS, Hans, et al. Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Trends in ecology & evolution*, 2008, 23.2: 95-103.
- LAPEYRIE, F. F.; CHILVERS, G. A. An endomycorrhiza-ectomycorrhiza succession associated with enhanced growth of *Eucalyptus dumosa* seedlings planted in a calcareous soil. *New Phytologist*, 1985, 100.1: 93-104.
- LEIGH, Jr, et al. The evolution of mutualism. *Journal of evolutionary biology*, 2010, 23.12: 2507-2528.
- LESSER, Michael P., et al. Nitrogen fixation by symbiotic cyanobacteria provides a source of nitrogen for the scleractinian coral *Montastraea cavernosa*. *Marine Ecology Progress Series*, 2007, 346: 143-152.
- LITTLE, Angela F.; VAN OPPEN, Madeleine JH; WILLIS, Bette L. Flexibility in algal endosymbioses shapes growth in reef corals. *Science*, 2004, 304.5676: 1492-1494.
- LONG, Sharon R. *Rhizobium* symbiosis: nod factors in perspective. *The Plant Cell*, 1996, 8.10: 1885.
- LÜCKING, Robert, et al. Do lichens domesticate photobionts like farmers domesticate crops? Evidence from a previously unrecognized lineage of filamentous cyanobacteria. *American Journal of Botany*, 2009, 96.8: 1409-1418.
- MAGAIN, Nicolas; SÉRUSIAUX, Emmanuël. Do photobiont switch and cephalodia emancipation act as evolutionary drivers in the lichen symbiosis? A case study in the Pannariaceae (Peltigerales). *PLoS One*, 2014, 9.2: e89876.
- MARGULIS, Lynn. *Symbiosis in cell evolution: Life and its environment on the early earth*. 1981.
- MARHOLD, Karol, Přednáška „Multivariační metody v taxonomii“, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, LS 2015
- MARTIN, Michael M.; MARTIN, Joan S. Cellulose digestion in the midgut of the fungus-growing termite *Macrotermes natalensis*: the role of acquired digestive enzymes. *Science*, 1978, 199.4336: 1453-1455.
- MASSICOTTE, H. B., et al. Structure and ontogeny of *Betula alleghaniensis* – *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. *Canadian Journal of Botany*, 1990, 68.3: 579-593.
- MEYER, Eli; WEIS, Virginia M. Study of cnidarian-algal symbiosis in the “omics” age. *The Biological Bulletin*, 2012, 223.1: 44-65.
- MOAWAD, H. A.; ELLIS, W. R.; SCHMIDT, E. L. Rhizosphere response as a factor in competition among

- three serogroups of indigenous *Rhizobium japonicum* for nodulation of field-grown soybeans. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 47.4: 607-612.
- MONK, Carl D. Tree species diversity in the eastern deciduous forest with particular reference to north central Florida. *The American Naturalist*, 1967, 101.918: 173-187.
- MULLER-PARKER, Gisèle; D'ELIA, Christopher F.; COOK, Clayton B. Interactions between corals and their symbiotic algae. In: *Coral Reefs in the Anthropocene*. Springer Netherlands, 2015. p. 99-116.
- MUSCATINE, L., et al. Uptake, recognition and maintenance of symbiotic *Chlorella* by *Hydra viridis*. In: *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 1974. p. 175-203.
- MUSCATINE, Leonard; PORTER, James W. Reef corals: mutualistic symbioses adapted to nutrient-poor environments. *Bioscience*, 1977, 27.7: 454-460.
- NARA, Kazuhide. Pioneer dwarf willow may facilitate tree succession by providing late colonizers with compatible ectomycorrhizal fungi in a primary successional volcanic desert. *New Phytologist*, 2006, 171.1: 187-198.
- NASCIMBENE, Juri; SALVADORI, Ornella; NIMIS, Pier Luigi. Monitoring lichen recolonization on a restored calcareous statue. *Science of the total environment*, 2009, 407.7: 2420-2426.
- NELSEN, Matthew P., et al. Phylogenetic diversity of trentepohlialean algae associated with lichen-forming fungi. *Journal of phycology*, 2011, 47.2: 282-290.
- NYATI, Shyam, et al. Green-algal photobiont diversity (*Trebouxia* spp.) in representatives of Teloschistaceae (Lecanoromycetes, lichen-forming ascomycetes). *The Lichenologist*, 2014, 46.2: 189-212.
- OTT, S., 1987. Reproductive strategies in lichens. *Bibliotheca Lichenologica*, 25: 81-93.
- PASCOE, D., et al. Toxicity of 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A to the freshwater cnidarian *Hydra vulgaris*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 2002, 43.1: 56-63.
- PEKSA, Ondřej et al.: Do rock-dwelling lichen communities represent photobiont-mediated guilds? (in prep.)
- PEKSA, Ondřej; ŠKALOUD, Pavel. Do photobionts influence the ecology of lichens? A case study of environmental preferences in symbiotic green alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae). *Molecular Ecology*, 2011, 20.18: 3936-3948.
- PELLMYR, Olle, et al. Evolution of pollination and mutualism in the yucca moth lineage. *The American Naturalist*, 1996, 148.5: 827-847.
- PERRET, Xavier; STAEHELIN, Christian; BROUGHTON, William J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64.1: 180-201.
- PIERCEY-NORMORE, Michele D.; DEPRIEST, Paula T. Algal switching among lichen symbioses. *American Journal of Botany*, 2001, 88.8: 1490-1498.
- PIERCEY-NORMORE, Michele D. The lichen-forming ascomycete *Evernia mesomorpha* associates with multiple genotypes of *Trebouxia jamesii*. *New phytologist*, 2006, 169.2: 331-344.
- PIGGOT, C. D.; GRIME, J. Plant strategies and vegetation processes. *The Journal of Ecology*, 1980, 68.2: 704.
- PUEPPKE, Steven G.; BROUGHTON, William J. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1999, 12.4: 293-318.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R, Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014 URL <http://www.R-project.org/>

- RABATEL, Antoine, et al. Dating of Little Ice Age glacier fluctuations in the tropical Andes: Charquini glaciers, Bolivia, 16 S. *Comptes Rendus Geoscience*, 2005, 337.15: 1311-1322.
- RAFF, Rudolf A.; MAHLER, Henry R. The non symbiotic origin of mitochondria. *Science*, 1972, 177.4049: 575-582.
- RAHAT, M. Competition between *Chlorellae* in chimeric infections of *Hydra viridis*: the evolution of a stable symbiosis. *Journal of cell science*, 1985, 77.1: 87-92.
- RAHAT, M.; REICH, V. Intracellular infection of aposymbiotic *Hydra viridis* by a foreign free-living *Chlorella* sp.: initiation of a stable symbiosis. *Journal of cell science*, 1984, 65.1: 265-277.
- RAMEY, John A.; RAMEY, Maintainer John A.; RCPP, Linking To. Package 'clusteval'. 2012.
- READ, D. J.; BIRCH, C. P. D. The effects and implications of disturbance of mycorrhizal mycelial systems. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B: Biological Sciences*, 1988, 94: 13-24.
- READ, D. J.; PEREZ-MORENO, J. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems—a journey towards relevance?. *New Phytologist*, 2003, 157.3: 475-492.
- RIETHMULLER, N., et al. *Effects* of water hardness and alkalinity on the toxicity of uranium to a tropical freshwater hydra (*Hydra viridissima*). *Biomarkers*, 2001, 6.1: 45-51.
- ROWAN, Rob; POWERS, Dennis A. Ribosomal RNA sequences and the diversity of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89.8: 3639-3643.
- RUPRECHT, Ulrike; BRUNAUER, Georg; TÜRK, Roman. High photobiont diversity in the common European soil crust lichen *Psora decipiens*. *Biodiversity and conservation*, 2014, 23.7: 1771-1785.
- SANDERS, Ian R. Preference, specificity and cheating in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Trends in plant science*, 2003, 8.4: 143-145.
- SAPP, Jan. The dynamics of symbiosis: an historical overview. *Canadian Journal of Botany*, 2004, 82.8: 1046-1056.
- SAVARD, Louise; MICHAUD, Martin; BOUSQUET, Jean. Genetic diversity and phylogenetic relationships between birches and alders using ITS, 18S rRNA, and rbcL gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1993, 2.2: 112-118.
- SHEPPARD, Charles RC. Predicted recurrences of mass coral mortality in the Indian Ocean. *Nature*, 2003, 425.6955: 294-297.
- SLAYTOR, Michael. Cellulose digestion in termites and cockroaches: what role do symbionts play?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1992, 103.4: 775-784.
- ŚLIWA, Lucyna, et al. Are widespread morphospecies from the *Lecanora dispersa* group (lichen-forming Ascomycota) monophyletic?. *The Bryologist*, 2012, 115.2: 265-277.
- SMITH, RI Lewis. Colonization by lichens and the development of lichen-dominated communities in the maritime Antarctic. *The Lichenologist*, 1995, 27.6: 473-483.
- SMITH, Sally E.; READ, David J. *Mycorrhizal symbiosis* 2. ed. Academic, London, 605p, 1997.
- SPELLERBERG, Ian F.; FEDOR, Peter J. A tribute to Claude Shannon (1916–2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the 'Shannon–Wiener' Index. *Global ecology and biogeography*, 2003, 12.3: 177-179.
- SPRIBILLE, Toby, et al. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science*, 2016, 353.6298: 488-492.
- STÖVER, Ben C.; MÜLLER, Kai F. TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different

- phylogenetic analyses. BMC bioinformatics, 2010, 11.1: 7.
- SWENSON, Nathan G. Functional and phylogenetic ecology in R. New York: Springer, 2014.
- SWOFFORD, David; DOUGLAS P. BEGLE. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.1, March 1993. Center for Biodiversity, Illinois Natural History Survey, 1993.
- ŠKALOUD, Pavel; PEKSA, Ondřej. Evolutionary inferences based on ITS rDNA and actin sequences reveal extensive diversity of the common lichen alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). Molecular Phylogenetics and Evolution, 2010, 54.1: 36-46.
- TAYLOR, F. J. R. Implications and extensions of the serial endosymbiosis theory of the origin of eukaryotes. Taxon, 1974, 229-258.
- THÜS, Holger, et al. Revisiting photobiont diversity in the lichen family Verrucariaceae (Ascomycota). European Journal of Phycology, 2011, 46.4: 399-415.
- TSCHERMAK-WOESS, Elisabeth. The algal partner. CRC handbook of lichenology, 1988, 1: 39.
- VAN DE PEER, Yves; DE WACHTER, Rupert. Evolutionary relationships among the eukaryotic crown taxa taking into account site-to-site rate variation in 18S rRNA. Journal of molecular evolution, 1997, 45.6: 619-630.
- VANČUROVÁ, Lucie, et al. *Vulcanochloris* (Trebouxiales, Trebouxiophyceae), a new genus of lichen photobiont from la Palma, Canary Islands, Spain. Phytotaxa, 2015, 219.2: 118-132.
- VANDENKOORNHUYSE, P., et al. Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. Molecular Ecology, 2002, 11.8: 1555-1564.
- VARGAS, Alvaro AT; GRAHAM, Peter H. Cultivar and pH effects on competition for nodule sites between isolates of *Rhizobium* in beans. Plant and Soil, 1989, 117.2: 195-200.
- WERTH, Silke; SORK, Victoria L. Identity and genetic structure of the photobiont of the epiphytic lichen *Ramalina menziesii* on three oak species in southern California. American Journal of Botany, 2010, 97.5: 821-830.
- WHITE, Thomas J., et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications, 1990, 18.1: 315-322.
- WHITTAKER, Robert Harding. Vegetation of the Siskiyou mountains, Oregon and California. Ecological monographs, 1960, 30.3: 279-338.
- WILKINSON, David M. At cross purposes. Nature, 2001, 412.6846: 485-485.
- WILSON, Perry William, et al. The biochemistry of symbiotic nitrogen fixation. The biochemistry of symbiotic nitrogen fixation., 1940.
- WINARNO, R.; LIE, T. A. Competition between *Rhizobium* strains in nodule formation: interaction between nodulating and non-nodulating strains. Plant and Soil, 1979, 51.1: 135-142.
- WOLSELEY, Pat, et al. Patterns and drivers of lichen species composition in a NW-European lowland deciduous woodland complex. Biodiversity and Conservation, 2017, 26.2: 401-419.
- WOOLDRIDGE, Scott A. Is the coral-algae symbiosis really 'mutually beneficial' for the partners?. BioEssays, 2010, 32.7: 615-625.
- WOOLHOUSE, M. E. J.; HARMSSEN, R.; FAHRIG, L. On succession in a saxicolous lichen community. The Lichenologist, 1985, 17.2: 167-172.
- WORNIK, Sabine; GRUBE, Martin. Joint dispersal does not imply maintenance of partnerships in lichen symbioses. Microbial Ecology, 2010, 59.1: 150-157.

YAHR, Rebecca; VILGALYS, Rytas; DEPRIEST, Paula T. Geographic variation in algal partners of *Cladonia subtenuis* (Cladoniaceae) highlights the dynamic nature of a lichen symbiosis. *New Phytologist*, 2006, 171.4: 847-860.

YAHR, Rebecca; VILGALYS, Rytas; DEPRIEST, Paula T. Strong fungal specificity and selectivity for algal symbionts in Florida scrub *Cladonia* lichens. *Molecular Ecology*, 2004, 13.11: 3367-3378.

YOUNG, J. P. W.; JOHNSTON, A. W. B. The evolution of specificity in the legume-Rhizobium symbiosis. *Trends in ecology & evolution*, 1989, 4.11: 341-349.

ZELENÝ, David. Přednáška „Zpracování dat v ekologii společenstev“ a „Analýza dat v ekologii společenstev v programu R“, Masarykova Universita v Brně, Přírodovědecká fakulta, ZS 2014/2015

ZOLLER, Stefan; LUTZONI, François. Slow algae, fast fungi: exceptionally high nucleotide substitution rate differences between lichenized fungi *Omphalina* and their symbiotic green algae *Coccomyxa*. *Molecular phylogenetics and evolution*, 2003, 29.3: 629-640.

Příloha 1

Nastavení programu GARLI pro tvorbu fylogenetického stromu na příkladu rodu *Trebouxia* metodou maximum likelihood se současným provedením bootstrapové analýzy o 100 opakováních.

```
[general]
datafname = Trebouxia_vse.nex
constraintfile = none
streefname = stepwise
attachmentspertaxon = 50
ofprefix = Garli
randseed = -1
availablememory = 512
logevery = 10
saveevery = 100
refinestart = 1
outputeachbettertopology = 0
outputcurrentbesttopology = 0
enforcetermconditions = 1
genthreshfortopoterm = 20000
scorethreshforterm = 0.05
significanttopochange = 0.01
outputphyliptree = 0
outputmostlyuselessfiles = 0
writecheckpoints = 0
restart = 0
outgroup = 1
resampleproportion = 1.0
inferinternalstateprobs = 0
outputsitelikelihoods = 0
optimizeinputonly = 0
collapsebranches = 1

searchreps = 3
bootstrapreps = 100

[model1]
datatype = nucleotide

ratematrix = 2rate
statefrequencies = estimate
ratehetmodel = gamma
numratecats = 4
invariantsites = none

[master]
nindivs = 4
holdover = 1
selectionintensity = 0.5
holdoverpenalty = 0
stopgen = 50000
stoptime = 50000

startoptprec = 0.5
minoptprec = 0.01
numberofprecreductions = 10
treerejectionthreshold = 50.0
topoweight = 1.0
modweight = 0.05
brlenweight = 0.2
randnniweight = 0.1
randsprweight = 0.3
limsprweight = 0.6
intervallength = 100
intervalstostore = 5
limsprrange = 6
meanbrlenmuts = 5
gammashapebrlen = 1000
gammashapemodel = 1000
uniqueswapbias = 0.1
distanceswapbias = 1.0
```