

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Botanika

Studijní obor: N-BOTABR



Bc. Heda Ghlimová

Vliv hadcových substrátů na druhové složení fotobiontů lišejníků
Influence of serpentinite substrates on species composition of lichen photobionts

Diplomová práce

Školitelka: Mgr. Jana Steinová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Ondřej Peksa, Ph.D.

Praha, 2024

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, 8. 8. 2024

Heda Ghlimová

Ráda bych poděkovala:

- ✿ **Janě Steinové**, že mě přivedla k tak zajímavému tématu na pomezí lichenologie a geochemie, ve kterém jsem se našla. Že mě zasvětila do práce v DNA laboratoři i do následného zpracování dat. Také ale, že mě vždycky podpořila, starala se o mě jako o vlastní a stala se tak mou lichenologickou maminkou.
- ✿ **Martině Vítkové**, že se se mnou do této studie pustila, uvedla mě do problematiky geochemických analýz a vždy mi ochotně vysvětlila vše, co mě ohledně nich zajímalo.
- ✿ **Ondrovi Peksovi** za diskuse nad některými metodami a výsledky této práce, za poznámky k jejímu textu. Také ale, že se mnou jezdil do terénu a neúnavně mi opakoval všechny druhy lišejníků včetně těch, které jsem už stokrát viděla. Děkuji také za skepsi, se kterou přistupoval ke všem mým výsledkům, čímž mě nutil nad nimi ještě více přemýšlet.
- ✿ **Fandovi Boudovi** za společnost v terénu, kde se ze mě společnými silami s Ondrou snaží udělat lichenologa. Také ale, že je mi nejlepším šéfem, jakého jsem si mohla přát, a že se mnou prodiskutoval ne jeden výsledek mých bádání. Neskonale díky však Fandovi patří především za to, že mě podržel a podpořil ve všech těžkých chvílích, které mě za poslední rok potkaly, a že mi nedovolil klesat na mysli, když jsem k tomu měla blízko.
- ✿ **Matěji Manovi** za zpracování a poskytnutí klimatických dat, na jejichž základě jsem mohla vybrat nejvhodnější amfibolitové lokality pro sběr lišejníků, a za konzultace statistického zpracování dat.
- ✿ **Ivce Černajové** za přípravu knihovny pro metabarcoding.
- ✿ **Pavlovi Škaloudovi** za zpracování metabarcodových dat a poskytnutí skriptu pro statistické zpracování dat.
- ✿ **Lukáši Janošíkovi** za pomoc při focení na mikroskopu.
- ✿ **Lence Flaškové** za vstřícnost a ochotu mi pomoci při práci v DNA laboratoři.
- ✿ **Zdeňkovi Palicemu** za poskytnutí některých starých nedohledatelných článků.
- ✿ **Kryštofu Vernerovi** za konzultace týkající se výběru kontrolní horniny.
- ✿ **Luce Fatkové a Filipu Křivohlavému** za zprostředkování přístupu do LECHAP, díky čemuž jsem si mohla namlít horniny pro měření pH.
- ✿ **Martinu Váňovi**, že mě doprovázel na několik lokalit, kde jsem sbírala lišejníky pro tuto práci, a že vždycky rád a se zájmem poslouchá, co mu o lišejnících vyprávím.
- ✿ **Věrce Vtípilové**, se kterou jsme se po celé studium (a obzvlášť v hořkém finále) vzájemně podporovaly a sdílely nejrůznější životní radosti i strasti.
- ✿ svým dalším spolužákům, jmenovitě **Vendy Sedlákové, Kamče Dědkové a Štěpánu Jerhotovi**, bez kterých by bylo mé studium rozhodně méně zábavné a se kterými jsem mohla prožít krásné chvíle nejen v rámci exkurzí.
- ✿ všem z myko-bryo-lichenologického oddělení, se kterými byla radost trávit čas na katedře i exkurzích.
- ✿ mámě **Pavle** a sestře **Ester Ghlimovym**, které mě během celé doby studia podporovaly a snažily se alespoň trošku pochopit, čím jsou lišejníky tak neskutečně zajímavé. Ester pak také děkuji za poskytnutí grafického programu pro zpracování fylogenetických stromů.
- ✿ **Národnímu muzeu** (a Petrovi Zehnálkovi a Fandovi Boudovi) za poskytnutí notebooku, na kterém jsem mohla svou diplomovou práci dopsat, když se mi můj notebook rozbil.
- ✿ **Grantové agentuře UK** za finanční podporu, díky které mohla tato práce vzniknout (projekt č. 134823).

Musím také poděkovat lišejníkům za všechno, co mi do života přinesly.

Abstrakt

Výběr fotobiontů lišejníků je obvykle ovlivněn podmínkami prostředí, ve kterém daný lišejník roste (např. klimatické podmínky, typ a pH substrátu). V prostředí, které je pro lišejníky nějakým způsobem stresující, se může v jedné stélce lišejníku vyskytovat více druhů (i rodů) fotobiontů zároveň. V nepříznivém prostředí může také mykobiont vyměnit svého obvyklého fotobionta za fotobionta, který je na podmínky daného prostředí lépe adaptovaný. Ukazuje se, že oba tyto fenomény se vyskytují u lišejníků rostoucích na recentně vzniklých antropogenních stanovištích s vysokým obsahem těžkých kovů (výsypky, haldy, odkaliště).

V rámci své práce si kladu za cíl zjistit druhové složení fotobiontů lišejníků rostoucích na hadcích, které lze považovat za přírodní analogy antropogenně vzniklých (postindustriálních) stanovišť s vysokým obsahem těžkých kovů, a porovnat jej s druhovou skladbou fotobiontů lišejníků rostoucích na kontrolní hornině amfibolitu, který představuje přirozeně vzniklý substrát s odlišnou hladinou těžkých kovů. Fotobionti hadcových lišejníků jsou dosud známí pouze z 13 stélek lišejníků z jedné hadcové lokality.

Stélky deseti euryekních druhů lišejníků a jednoho hadcového specialisty jsem sbírala na pěti hadcových a pěti klimaticky srovnatelných amfibolitových lokalitách v rámci České republiky. Identitu mykobiontů i fotobiontů jsem potvrdila na základě úseku ITS rDNA. Stélky lišejníků obsahovaly 17 linií řas rodu *Trebouxia* a 11 linií řas rodu *Asterochloris*. Tyto linie se však mezi hadci a amfibolity lišily jen minimálně. V jediné stélce lišejníku *Lecanora rupicola* jsem pomocí Illumina metabarcodingu odhalila pluralitu fotobiontů. Přítomnost rodů *Trebouxia* a *Coccomyxa* jsem následně potvrdila i pomocí světelné mikroskopie.

Na všech lokalitách jsem měřila obsah těžkých kovů pomocí přenosného rentgenfluorescenčního analyzátoru (XRF), pH a konduktivitu. K ověření přítomnosti částic bohatých na kovy ve stélkách lišejníků a jejich vizualizaci jsem použila skenovací elektronovou mikroskopii s energiově disperzním spektrometrem (SEM/EDS). Podařilo se mi tak potvrdit, že korovité lišejníky přijímají do svých stélek velké množství úlomků horniny, kterou porůstají.

Mykobionti hadcových lišejníků, které jsem zkoumala, vykazují nízkou míru specifity i selektivity vůči fotobiontům, se kterými jsou v symbiotickém vztahu. Je pravděpodobné, že těžké kovy z hadců nejsou pro lišejníky dostupné, proto nejspíš hadce nepředstavují pro lišejníky ani volně žijící fotobionty toxický substrát. Z tohoto důvodu se ve stélkách lišejníků z hadcových lokalit vyskytují fotobionti, které známe i z jiných netoxických substrátů.

Klíčová slova: hadec, amfibolit, fotobionti, *Trebouxia*, *Asterochloris*, těžké kovy, pH, XRF, SEM-EDS

Abstract

The choice of lichen photobionts is usually influenced by the environmental conditions in which the lichen grows (e.g. climatic conditions, substrate type and pH). In environments that are stressful to lichens in some way, multiple species (and genera) of photobionts may occur in a single lichen thallus at the same time. In a hostile environment, a mycobiont may also replace its usual photobiont with a photobiont that is better adapted to the environmental conditions. Both of these phenomena appear to occur in lichens growing in recently formed anthropogenic habitats with high levels of heavy metals (dumps, heaps, tailings).

The aim of my work is to determine the species composition of photobionts of lichens growing on serpentinites, which can be considered as natural analogues of anthropogenically formed (post-industrial) habitats with high content of heavy metals, and to compare it with the species composition of photobionts of lichens growing on the control rock amphibolite, which represents a naturally formed substrate with different heavy metal levels. Photobionts of serpentinite lichens are so far only known from only 13 lichen thalli from one serpentinite locality.

I collected thalli of ten euryoecious lichen species and one serpentinite specialist from five serpentinite and five climatically comparable amphibolite localities within the Czech Republic. I confirmed the identity of mycobionts and photobionts based on ITS rDNA. The lichen thalli contained 17 lineages of algae of the genus *Trebouxia* and 11 lineages of algae of the genus *Asterochloris*. These lineages, however, differed only minimally between serpentinites and amphibolites. I detected a plurality of photobionts in a single thallus of the lichen *Lecanora rupicola* using Illumina metabarcoding. I subsequently confirmed the presence of the genera *Trebouxia* and *Coccomyxa* by light microscopy.

At all sites, I measured heavy metal content using a portable X-ray fluorescence analyzer (XRF), pH and conductivity. I used scanning electron microscopy with energy dispersive spectrometer (SEM-EDS) to verify the presence of metal-rich particles in the lichen thalli and to visualize them. I was thus able to confirm that the crustose lichens take up large amounts of fragments of the rock they grow in their thalli.

The mycobionts of the serpentinite lichens that I examined exhibit a low level of specificity and selectivity towards the photobionts with which they are in a symbiotic relationship. It is likely that heavy metals from the serpentinites are not available to the lichens and therefore serpentinites probably do not represent a toxic substrate for the lichens or free-living photobionts. For this reason, photobionts known from other non-toxic substrates are found in the thalli of lichens from serpentinite sites.

Key words: serpentinite, amphibolite, *Trebouxia*, *Asterochloris*, heavy metals, pH, XRF, SEM-EDS

Obsah

1	Úvod	8
1.1	Osud těžkých kovů ve stélce lišejníku	8
1.2	Fotobionti lišejníků narušených stanovišť	10
1.2.1	Pluralita fotobiontů ve stélce	11
1.3	Hadce	13
2	Cíle práce	15
3	Materiál a metody	16
3.1	Výběr druhů lišejníků	16
3.2	Výběr lokalit a sběr lišejníků	16
3.2.1	Klimatická data	18
3.3	Izolace DNA	19
3.4	PCR a sekvenace	20
3.5	Illumina metabarcoding	21
3.6	Tvorba alignmentu	23
3.7	Fylogenetické analýzy	24
3.8	Morfologické potvrzení plurality fotobiontů	25
3.9	Měření pH a konduktivity	26
3.10	Měření obsahu těžkých kovů	28
3.11	SEM-EDS	29
3.12	Statistické zpracování dat	30
4	Výsledky	32
4.1	pH a konduktivita	32
4.2	XRF	34
4.3	SEM-EDS	41
4.4	Mykobionti	46
4.5	Fotobionti	50
4.5.1	Fotobionti rodu <i>Trebouxia</i>	52
4.5.2	Fotobionti rodu <i>Asterochloris</i>	59
4.5.3	Pluralita fotobiontů ve stélce	62
4.5.3.1	Morfologické potvrzení plurality fotobiontů	63
5	Diskuse	64
5.1	Výhody a nevýhody použitých metod	64
5.1.1	Molekulární metody	64
5.1.2	Měření pH	64
5.1.3	XRF	65
5.1.4	SEM-EDS	65
5.2	Příjem částic horniny do stélky lišejníku	66
5.3	Diverzita fotobiontů na hadci a amfibolitu	68
5.3.1	Toxicita hadcových substrátů	68
5.3.2	Co ovlivňuje druhovou skladbu fotobiontů?	70
5.3.2.1	Selektivita & specifická	70

5.3.2.2	Podmínky prostředí.....	72
5.4	Diverzita mykobiontů na hadci	73
5.5	Fotobionti hadců a postindustriálních stanovišť.....	74
5.6	Hadcový specialista a jeho preference	75
5.7	Pluralita fotobiontů ve stélce.....	76
5.8	Lišejníky vs. cévnaté rostliny – 1:0.....	79
6	Další směr výzkumu.....	81
7	Závěr	83
8	Seznam literatury.....	85
9	Příloha	96

Abecední seznam zkratk

BSE	backscattered electrons	zpětně odražené elektrony
BI	Bayesian inference	Bayesova inference
ITS	internal transcribed spacer	
ML	maximum likelihood	metoda maximální věrohodnosti
mtSSU	mitochondrial small subunit	malá podjednotka ribozomu mitochondrie
MCMC	Markov Chain Monte Carlo method	Markov Chain Monte Carlo metoda
NMDS	nonmetric multidimensional scaling	nemetrické mnohorozměrné škálování
OTU	operational taxonomic unit	operační taxonomická jednotka
PD	phylogenetic diversity	fylogenetická diverzita
PCA	principal component analysis	analýza hlavních komponent
PCoA	principal coordinates analysis	analýza hlavních koordinát
PCR	polymerase chain reaction	řetězová polymerázová reakce
SDSF	standard deviation of split frequencies	
SE	secondary electrons	sekundární elektrony
SEM-EDS	scanning electron microscopy with energy-dispersive spectrometer	
	skenovací elektronová mikroskopie s energiově disperzním spektrometrem	
ses PD	standardized effect size (ses) of phylogenetic diversity (PD)	
TLC	thin-layer chromatography	tenkovrstevná chromatografie
XRF	X-ray fluorescence	rentgenová fluorescence

1 Úvod

Všechny živé organismy potřebují ke svému růstu a správnému fungování alespoň stopové množství kovů. Nejinak je tomu u hub, které se díky své schopnosti akumulovat a přeměňovat prvky z prostředí staly nejvýznamnějšími hráči na poli biogeochemických procesů (Gadd, 1993). Některé houby dokážou určité prvky přijímat a následně ukládat ve stélkách ve vysokých koncentracích, a to i v případě, že se jedná o prvky, které jsou pro ostatní organismy toxické. Takové houby jsou nazývány hyperakumulátory (Sesli & Tüzen, 1999; Alonso *et al.*, 2003; García *et al.*, 2009). K akumulaci prvků ve stélce dochází především v prostředí, které se vyznačuje vysokým obsahem daného prvku. Houby disponují funkčními detoxikačními mechanismy, pomocí kterých zvládají toxické prvky vyloučit ze stélky či imobilizovat (Khullar & Reddy, 2018) (Khullar & Reddy, 2018). Rostliny mají také mechanismy, kterými se s vysokými koncentracemi toxických prvků vyrovnávají, např. syntézu fytochelatinů (Grill *et al.*, 1985; Cobbett, 2001). I přesto však zůstávají vůči stresu (např. z vysokého obsahu těžkých kovů v prostředí) citlivější. Pro rostliny je tedy výhodné spojení s houbou, která je před přímým působením toxických prvků alespoň částečně ochrání. Děje se tak především prostřednictvím ektomykorhizy, při které jsou kořeny rostlin obaleny houbovými vlákny. S toxickými prvky je tak v kontaktu primárně houba, která působí jako „narázník“ – těžké kovy z prostředí vyváže, detoxikuje a k rostlině je pustí v mnohem menší míře, případně vůbec. Tento druh symbiózy pak rostlinám umožňuje osídlit i prostředí, ve kterém by jinak samy nepřežily (Hartley *et al.*, 1997; Smith & Read, 2010). V lišejníku poskytují obdobné služby mykobionti fotobiontům.

1.1 Osud těžkých kovů ve stélce lišejníku

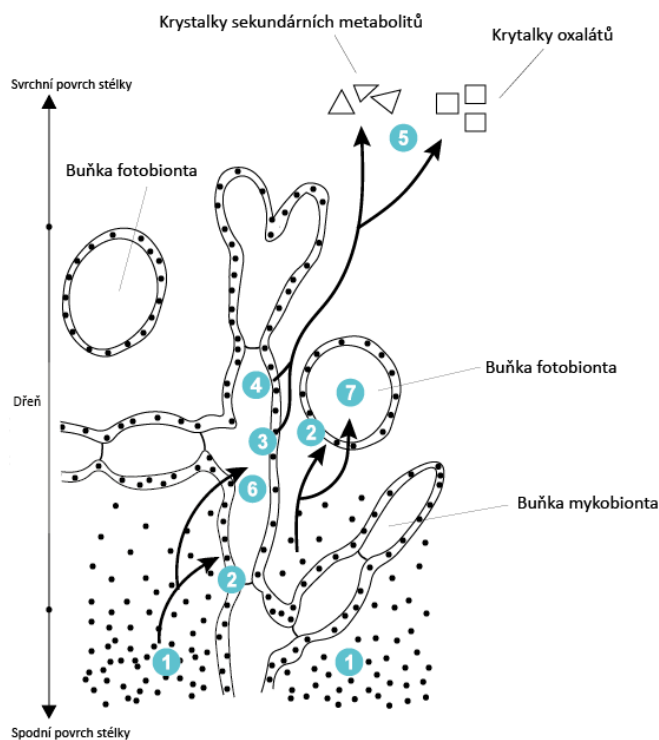
Lišejníky jsou vybaveny řadou mechanismů, pomocí kterých se s nadbytkem těžkých kovů vyrovnávají. Většinu těchto mechanismů zajišťuje právě mykobiont – dalo by se tak říct, že si chrání svého fotobionta, který je obecně považován za citlivějšího z obou partnerů, a to nejen vůči působení těžkých kovů, ale vůči všem abiotickým faktorům jako je desikace, přílišné ozáření slunečními paprsky a vysoké nebo nízké teploty (Ahmadjian, 1993; Pawlik-Skowrońska, 2000; Bačkor & Fahselt, 2008). Stélka lišejníku je navíc až z 90 % tvořena právě houbovým partnerem (Ahmadjian, 1993), který je tím pádem schopen na povrch buněčných stěn navázat více kovových iontů než buněčné stěny fotobionta, který je v lišejníku v menšině (Goyal & Seaward, 1981).

Ve chvíli, kdy začnou ionty kovů pronikat do vnitřních prostor stélky, dochází k aktivaci extracelulárních mechanismů, jejichž úkolem je udržet kationty mimo buňku a dovnitř buňky je vpouštět jen postupně a v malém množství. Na povrchu buněk obou symbiontů se proto nacházejí vazebná místa nazývaná ligandy, na které se kationty kovů navážou výměnou za iont vodíku nebo jiného kovu, který je vázán jen slabou vazbou (Puckett *et al.*, 1973; Nieboer *et al.*, 1976). Takto znehybněný kationt těžkého kovu je považován za netoxický (Tyler, 1989). Dalším extracelulárním mechanismem je vylučování kovů. Děje se tak díky syntéze speciálních látek – sekundárních metabolitů a/nebo oxalátů. Tvorbu obou látek zajišťuje výhradně mykobiont (Fahselt *et al.*, 1973). Syntéza

oxalátů je považována za nejvýznamnější a také velmi častý mechanismus detoxikace těžkých kovů v lišejníku (Purvis, 1984; Purvis & Pawlik-Skowrońska, 2008). Sekundárních metabolitů je dosud z lišejníků známých přes 1000 (Goga *et al.*, 2020), přičemž většina z nich je typická pouze pro lišejníky. V lišejníku mohou mít mnoho funkcí – od ochrany před UV zářením (Rundel, 1978), přes alelopatické (Cardarelli *et al.*, 1997) či antiherbivorní účinky (Lawrey, 1986), po ochranu před těžkými kovy (Purvis, 1984; Bačkor & Fahselt, 2004a, 2004b). Oba typy těchto látek fungují na stejném principu – vytvoří spolu s těžkými kovy komplexy, ty pak zůstanou ve formě krystalků na povrchu houbových hyf nebo jsou vyloučeny na povrch stélky (Purvis, 1984; Purvis *et al.*, 1987; Purvis & Pawlik-Skowrońska, 2008).

Intracelulární příjem kovů spočívá v produkci látek, které na sebe těžké kovy navážou a dopraví je do vakuol, kde dojde k jejich detoxikaci (Grill *et al.*, 1985; Khullar & Reddy, 2018). Buňky mykobionta produkují metalotioneiny a/nebo glutationy (Khullar & Reddy, 2018), zelené řasy tvoří fytochelatiny (Gekeler *et al.*, 1988; Pawlik-Skowrońska *et al.*, 2002), což jsou látky, které k detoxikaci těžkých kovů využívají i cévnaté rostliny (Grill *et al.*, 1985; Cobbett, 2001). Sinice nejsou schopné tvořit žádnou ze zmíněných látek (Pawlik-Skowrońska *et al.*, 1995 v Pawlik-Skowrońska *et al.*, 2002). Všechny tyto látky lze nazvat pomyslnou „krabičkou poslední záchrany“. K jejich syntéze totiž dochází ve chvíli, kdy se kovy ve stélce nahromadí ve velkém množství, extracelulární mechanismy pak nedokážou všechny kovy detoxikovat a jejich ionty tak proniknou dovnitř buněk jednoho nebo obou symbiontů (Bačkor & Fahselt, 2008). Schéma všech těchto mechanismů je zobrazeno na **Obr. 1.**

Fotobionti jsou považováni za citlivější vůči stresu způsobenému těžkými kovy než mykobionti (Bačkor & Fahselt, 2008), tudíž lze předpokládat, že rozšíření lišejníku ovlivňuje především schopnost fotobionta v takovém prostředí přežít (Osyczka *et al.*, 2021).



Obr. 1 Schéma detoxikačních mechanismů lišejníků

- 1 – vnik těžkých kovů do mezibuněčných prostor lišejníku
- 2 – navázání na ligandy buněčných stěn mykobionta i fotobionta
- 3 – tvorba komplexů těžkých kovů a sekundárních metabolitů
- 4 – tvorba komplexů těžkých kovů a oxalátů
- 5 – některé sekundární metabolity (např. kys. usnová) a oxaláty se nevylučují pouze na povrchu hyf, ale také na povrchu stélky lišejníku
- 6 – těžké kovy pronikají dovnitř buňky mykobionta, který spouští syntézu metalothioneinů a glutathionů
- 7 – těžké kovy pronikají dovnitř buňky fotobionta, který spouští syntézu fytochelatinů

(Ghlimová, 2021)

1.2 Fotobionti lišejníků narušených stanovišť

Ve stélkách lišejníků bylo dosud zaznamenáno přibližně 200 druhů řas a sinic (Muggia *et al.*, 2020) – nejčastějšími rody zelených řas zapojenými do lišejníkové symbiomy jsou: *Trebouxia*, *Trentepohlia*, *Coccomyxa* a *Myrmecia*, u sinic se pak nejčastěji jedná o následující rody: *Nostoc*, *Scytonema*, *Stigonema*, *Gleocapsa* a *Calothrix* (Ahmadjian, 1993).

Citlivým monitorem fyziologického poškození je fotosyntéza, kterou zajišťují právě fotobionti (Brown & Beckett, 1983, 1984). Jak zmiňují výše, fotobionti jsou obecně vůči abiotickému stresu citlivější než mykobionti (Ahmadjian, 1993; Bačkor & Fahselt, 2008), proto se předpokládá, že ve srovnání s houbovými partnery mohou hrát významnější roli v rozšíření lišejníků – na substrátech s vyšším obsahem těžkých kovů mohou růst takové lišejníky, které obsahují fotobionty tolerantnější vůči fyziologickému stresu (Bačkor *et al.*, 2010; Álvarez *et al.*, 2012; Osyczka *et al.*, 2020). Je také možné, že mykobiont minimalizuje stres, který na fotobionta dopadá, čímž rozšiřuje svou (i jeho) ekologickou niku.

Fotobiontům na substrátech s vysokým obsahem kovů se podrobně věnovali Osyczka a kol. (Osyczka *et al.*, 2020), kteří ve své studii uvádějí následující: Typickým příkladem toxi-tolerantního fotobionta jsou řasy rodu *Trebouxia*, které vykazují ve stélkách lišejníků tím vyšší genetickou diverzitu, čím více těžkých kovů se vyskytuje v prostředí, kde lišejníky rostou. Zároveň se jedná o řasy, které jsou úzce vázané na substráty vytvořené člověkem – počet lišejníků obsahujících řasu rodu *Trebouxia* závisí spíše na množství těžkých kovů v substrátu než na druhu lišejníku. Trebouxioidní řasy tak mohou být i alternativními fotosyntetickými partnery pro určité lišejníky rostoucí v oblastech s vysokým obsahem těžkých kovů – např. lišejníky rodu *Cladonia* jsou obvykle asociovány

pouze s řasami rodu *Asterochloris*, při specifických podmínkách daných stanovišť jsou však schopné začít relichenizační proces s řasami rodu *Trebouxia* a vytvořit s nimi stabilní spojení. Fotobionti ale mohou být ve stélkách nahrazováni i v průběhu životního cyklu lišejníku (Piercey-Normore & De-Priest, 2001; Ertz *et al.*, 2018).

Mykobionti se vzájemně liší v počtu řasových partnerů, se kterými mohou tvořit symbiózu – tento vztah je označován termínem specifická. Zároveň mohou být mykobionti vůči fotobiontům různě selektivní. Mohou upřednostňovat pouze jeden druh (případně skupinu druhů) fotobiontů, tyto mykobionty pak označujeme za specialisty, nebo jsou naopak ve výběru pružnější, takové označujeme za generalisty (Yahr *et al.*, 2004). Většina mykobiontů preferuje spojení pouze s jedním rodem, např. mykobionti lišejníků rodu *Cladonia*, *Diploschistes* nebo *Lepraria* dávají přednost řasám rodu *Asterochloris* (Peksa, 2011a). Jiné lišejníky ale vytvářejí symbiózu dokonce s různými rody řas – lišejníky rodu *Stereocaulon* mohou obsahovat řasy rodů *Asterochloris*, *Vulcanochloris* a *Chloroidium* (Vančurová *et al.*, 2018). Rozdíly ve specifitě mezi různými mykobionty mají i ekologické implikace: čím nižší míru specifity vůči fotobiontovi mykobiont vykazuje, tím více různých stanovišť zvládne osídlit (Osyczka *et al.*, 2021). Předpokládá se tedy, že široce rozšířené lišejníky obsahují mykobionta-generalistu (Vančurová *et al.*, 2018) a fotobionta, který se v prostředí běžně nachází (Peksa & Škaloud, 2011; Grube & Spribille, 2012; Osyczka *et al.*, 2020).

Některé studie ze substrátů bohatých na kovy ukazují, že mykobionti si vybírají fotobionty i podle jejich schopnosti tolerovat těžké kovy (Vančurová *et al.*, 2018; Rola *et al.*, 2021), jiné toto však nepotvrzují (Beck, 2002; Hauck *et al.*, 2007; Bačkor *et al.*, 2010).

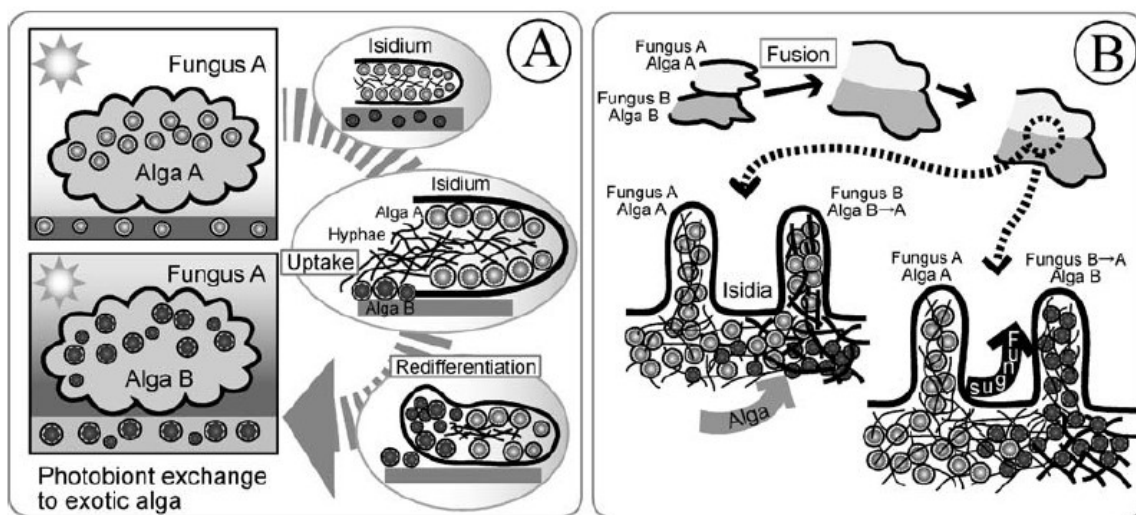
1.2.1 Pluralita fotobiontů ve stélce

Lišejníky jsou, s výjimkou tripartitních druhů, stále obecně vnímány jako soužití jednoho druhu houby a jednoho druhu řasy, případně sinice. Otázka *Co je to lišejník?* zůstává stále nedostatečně zodpovězená. V posledním desetiletí se stále více začíná diskutovat o dalších organismech, které mohou být součástí lišejníku, a jejich funkci v něm. Jedná se o bakterie, kvasinky nebo další druhy/rody fotobiontů (Uphof, 1925; Muggia *et al.*, 2014; Spribille *et al.*, 2016; Wedin *et al.*, 2016; Vančurová *et al.*, 2018). Ve výběru vhodných fotobiontů hrají významnou roli podmínky prostředí. Jak bylo zmíněno v kapitole 1.1, mykobiont pravděpodobněji vytvoří konečnou symbiózu s fotobiontem, který je pro dané stanoviště nejlépe adaptovaný (Muggia *et al.*, 2014). V prostředí, které se často mění, je pak výhodné umět si ve stélce udržet více různých fotobiontů a pro růst si vybrat toho, který je na dané podmínky nejlépe přizpůsobený (Dal Grande *et al.*, 2012; Muggia *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2015; Osyczka *et al.*, 2020). Výskyt více fotobiontů v jedné stélce lišejníku je nejspíš častějším jevem, než se předpokládalo (Bačkor *et al.*, 2010; Muggia *et al.*, 2011, 2014; Park *et al.*, 2015; Voytskhovich & Beck, 2016; Onuț-Brännström *et al.*, 2018), avšak není pravidlem, jelikož v jiných pracích obsahovaly lišejníky výhradně jediného fotobionta (Beck & Koop, 2001; Škaloud *et al.*, 2018), či byl výskyt různých druhů fotobiontů v jedné stélce zaznamenán jen výjimečně (Bačkor *et al.*,

2010; Muggia *et al.*, 2013; Vančurová *et al.*, 2018; Molins *et al.*, 2020). V nestabilních podmínkách prostředí však může být výskyt více fotobiontů ve stélce zásadní pro přežití lišejníku (Casano *et al.*, 2011).

Vznik plurality fotobiontů ve stélce zatím není stoprocentně objasněn, ale existuje několik teorií, jak k výskytu více fotobiontů v jedné stélce může dojít. Lišejníky rozmnožující se pohlavně pomocí spor jsou při vzniku nové stélky odkázány na výskyt potenciálních fotobiontů v místě dopadu spory (Ahmadjian, 1993). Je tedy možné, že se spora asociuje s více různými fotobionty najednou a pro tvorbu stélky si nakonec vybere toho nejlépe adaptovaného (Bhattacharya *et al.*, 1996; Werth & Sork, 2010; Dal Grande *et al.*, 2014; Muggia *et al.*, 2014).

U vegetativně rozmnožujících se lišejníků, které se rozšiřují pomocí speciálních propagulí (soredií, izidií) nebo pomocí fragmentace stélky, se v propaguli/úlomku stélky nachází fotobiont pocházející z mateřského lišejníku. Předpokládá se tedy, že další fotobiont se do stélky dostane z okolí v průběhu jejího rozrůstání nebo může dojít k blízkému kontaktu dvou stélek a výměny fotobiontů mezi nimi, jak ukazuje **Obr. 2** (Beck *et al.*, 1998; Ohmura *et al.*, 2006, 2019). Pokud se tento fotobiont ukáže jako lépe adaptovaný pro dané podmínky prostředí, může dokonce nahradit původního fotobionta (Ohmura *et al.*, 2006). Další způsob, jak se do stélky mohou dostat noví fotobionti, představuje porušení svrchní kůry způsobené např. herbivorií (Dal Grande *et al.*, 2014, 2018). V případě pohlavního rozmnožování hovoříme o přenosu horizontálním (Dal Grande *et al.*, 2012), v případě vegetativního rozmnožování mluvíme o tzv. vertikálním přenosu fotobiontů (Werth & Sork, 2010).



Obr. 2 Možnosti diverzifikace genetických kombinací mezi fotobiontem a mykobiontem *Parmotrema perlatum*.
A Výměna původního fotobionta za kompatibilního fotobionta z prostředí nebo za fotobionta z jiné stélky lišejníku.
B Výměna fotobionta nebo mykobionta jako důsledek spojení dvou geneticky odlišných jedinců.
 (Ohmura *et al.*, 2006)

1.3 Hadce

Hadec (serpentinit) řadíme mezi ultramafické a ultrabazické horniny (Krist & Křivý, 1985). Jedná se o horninu pokrývající asi 1 % zemského povrchu, avšak její výskyt je omezen na menší ostrůvky uvnitř masy jiné horniny (Kolář & Vít, 2008). Serpentinity se vyznačují vysokým obsahem některých těžkých kovů, především niklu (Ni), chromu (Cr) a kobaltu (Co), dále vysokým obsahem hořčíku (Mg) a železa (Fe) (Faust *et al.*, 1956; Faust & Fahey, 1962). Pro některé hadce je typický i nízký obsah základních biogenních živin, kterými jsou dusík (N), fosfor (P), draslík (K), a vápníku (Ca) (Krause, 1958 v Proctor & Woodell, 1975). V hadcových substrátech se snoubí také hned několik zvláštních fyzikálních vlastností: Hadce samotné i půdy, které na nich vznikají, jsou špatně tepelně vodivé, kvůli čemuž zde dochází ke značnému kolísání teplot mezi dnem a nocí (Hrudička, 1937). S touto skutečností souvisí i fakt, že se často jedná o otevřené výchozy, které nejsou nijak chráněné před větrem, a navíc zde roste málo cévnatých rostlin, které by dané stanoviště zastínily. Sucho je tak další vlastností, kterou hadce i půdy na nich oplývají (Proctor & Woodell, 1975). Je však nutné zdůraznit, že i přes určitou vzájemnou podobnost mohou mít různé hadcové horniny výrazně odlišné chemické vlastnosti – na některých lokalitách lze naměřit normální hladinu živin (N, P, K), zatímco některé půdy vznikající na hadci se neliší od půd vznikajících na jiné, netoxické podložní hornině (Proctor, 1971). Hadcová půda je však obecně považována za neúrodnou (Proctor & Woodell, 1975).

V České republice se nachází osm významnějších hadcových těles, která se vzájemně liší abiotickými (rozdílná nadmořská výška, geomorfologie i rozdílný úhrn srážek) a biotickými (odlišné vegetační a fytogeografické vazby) faktory (Kolář & Vít, 2008).

Organismy, které na hadcových substrátech dokážou růst, musí tolerovat jak jeho fyzikální vlastnosti (především sucho), tak specifický chemismus daných půd (Walker, 1954). Reakce na hadcový substrát byly nejprve zaznamenána u cévnatých rostlin, a to jak morfologické – např. nanismus, redukce velikosti listů, tak i anatomické – např. vyšší obsah cytosolu v buňkách (Messori, 1936; Ritter-Studnička, 1972). Pro všechny tyto adaptace zavedl Novák (1928) souhrnný termín serpentinomorfózy. Je však nutné dodat, že podobné adaptace nalezneme i u organismů z jiných extrémních habitatů, které se vyznačují vysokou ozářeností, nízkou vlhkostí nebo nedostatkem živin a nejedná se tedy o adaptace specifické výlučně pro hadcové substráty.

První studie zabývající se výhradně lišejníky rostoucími na hadcích vznikla na půdě bývalého Československa, konkrétně se jedná o studii Jindřicha Suzy (1928), která se věnuje západočeským serpentinitům. Diverzita lišejníků na hadcových substrátech je velmi proměnlivá, liší se v závislosti na konkrétním typu hadce (míře serpentinizace), ale i na dalších podmínkách, kterými může být nadmořská výška, klimatické podmínky nebo třeba zastínění. Obecně však hadce zahrnují mnoho mikrostanovišť a hostí i druhy, které jinak preferují jiné typy hornin, např. žulu, čedič, gabro nebo i vápencové horniny (Paukov, 2009). Díky tomu považují někteří autoři druhovou diverzitu lišejníků

na hadcích za vyšší než na ostatních horninách (Favero-Longo *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 2007). Většina lišejníků, které na hadcích rostou, tedy vykazuje nízkou specifitu pro hadcový substrát (Paukov, 2009), existují ale i druhy, které se na hadcový substrát specializují (Suza, 1928; Ritter-Studnička & Klement, 1968; Sánchez-Biezma & López de Silanes, 1999). Jelikož hadce obsahují vysoké koncentrace kovů, lze na nich často nalézt druhy metalofytní (Purvis & James, 1985), xerothermofytní – především na exponovaných stanovištích, kterými jsou například svislé výslunné svahy (Suza, 1928; Sánchez-Biezma Serrano & Álvarez Andrés, 2001). Zatímco hadce oplývají endemity, co se cévnatých rostlin týče, nevyskytuje se zde příliš mnoho lišejníkových endemitů – některé druhy, které byly dříve považovány za endemické, byly později objeveny i na jiných typech hornin, například čediči nebo vápenci (Wirth, 1972; Hafellner, 1991; Favero-Longo *et al.*, 2004). Za hadcové specialisty lze považovat druhy *Cladonia praeterrmissa* var. *modesta*, *Pertusaria chiodectonoides* nebo *Porpidia nadvornikiana* (Kantvilas, 1991; Wirth & Hertel, 2009), poslední zmíněný druh byl dlouho považován za endemita českého, avšak posléze byl objeven i na hadcích ve Španělsku, Skotsku a v sousedním Německu (Vězda, 1972; Sánchez-Biezma & López de Silanes, 1999; Smith *et al.*, 2009; Wirth & Hertel, 2009).

Druhovou skladbu fotobiontů lišejníků rostoucích na hadcových substrátech studoval Peksa *et al.* (2022), ale pouze na jediné lokalitě ve Slavkovském lese. Více prozkoumaná je diverzita fotobiontů lišejníků vyskytujících se na antropogenních substrátech bohatých na kovy, např. na výsypkách, tedy substrátech analogních k hadcovým substrátům z hlediska vysokých koncentrací těžkých kovů (např. Osyczka *et al.*, 2020; Rola *et al.*, 2021). V těchto pracích bylo zjištěno, že lišejníky obsahují jiné fotobionty než lišejníky z lokalit, které nejsou obohaceny o kovy, ale také, že lišejníky z těchto substrátů mohou ve svých stélkách obsahovat více fotobiontů. Nabízí se tedy otázka, jaká je druhová skladba fotobiontů lišejníků rostoucích na přirozeně vzniklých substrátech s vysokým obsahem těžkých kovů, kterými jsou právě hadce.

Ve své práci jsem se rozhodla zkoumat nejen druhové složení fotobiontů z hadcových substrátů, ale i z nehadcové horniny, za kterou jsem zvolila amfibolit. Lichenofloru hadců a amfibolitů porovnával z čistě floristického pohledu již Suza (1928). Důvodem, proč jsem si za kontrolní horninu vybrala právě amfibolit, je jednak z části se překrývající druhová skladba lišejníků na obou typech horniny a jednak jeho charakter. Obě horniny můžeme zařadit do skupiny bazických silikátových hornin – v případě hadce se jedná o ultrabazickou horninu obsahující < 45 % SiO₂, v případě amfibolitu o horninu bazickou s obsahem SiO₂ mezi 45 a 52 % (Krist & Křivý, 1985). Zároveň jde o horniny, které mají stejný původ, řadíme je mezi horniny metamorfované. Rozdíly mezi těmito typy hornin jsou v obsahu hořčíku a těžkých kovů (Ni, Cr, Co), který by měl být v amfibolitech výrazně nižší (René, 2007). Díky této kontrolní hornině je možné porovnat druhové složení fotobiontů nejen s výsledky studií z antropogenně vzniklých substrátů obohacených o těžké kovy, ale i s druhovou identitou fotobiontů přirozeně vzniklé horniny, která se však v obsahu těžkých kovů liší.

2 Cíle práce

Hlavním cílem mé diplomové práce je zjistit, zda se ve stélkách lišejníků rostoucích na hadcových substrátech vyskytují jiní fotobionti než na substrátech amfibolitových.

Konkrétně si kladu následující otázky týkající se druhového složení fotobiontů:

- a) Jaká je druhová skladba fotobiontů lišejníků rostoucích na hadcích? Vyskytují se zde v lišejnících specifické linie řas?
- b) Liší se druhové složení fotobiontů mezi hadcovými a amfibolitovými substráty?
- c) Bude si druhové složení fotobiontů z jednotlivých hadcových lokalit vzájemně podobné, nebo se bude lišit?
- d) Dochází k příjmu částic horniny do stélky lišejníku?

Zajímá mě ale také, do jaké míry působí přítomnost těžkých kovů na druhové složení fotobiontů.

3 Materiál a metody

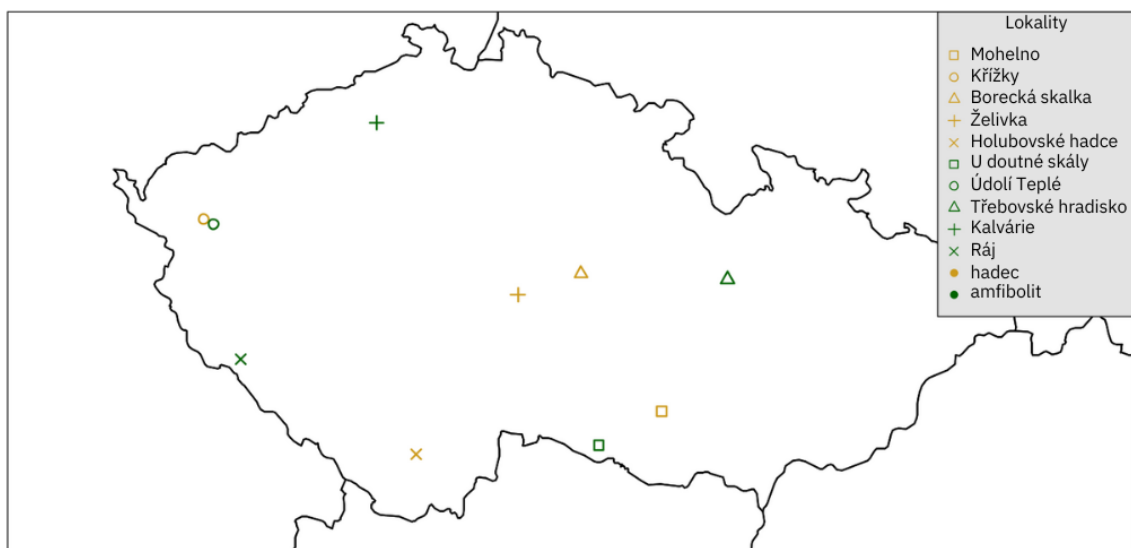
3.1 Výběr druhů lišejníků

Pro svou diplomovou práci jsem vybrala deset běžně rostoucích euryekních druhů lišejníků, které právě díky své ekologické nevyhraněnosti dokážou růst na různých typech substrátu. Konkrétně se jedná o následující druhy: *Acarospora fuscata*, *Candelariella coralliza*, *Candelariella vitellina*, *Cladonia pyxidata*, *Lecanora polytropa*, *Lecanora rupicola*, *Lecidea fuscoatra*, *Lecidella carpathica*, *Protoparmeliopsis muralis* a *Rhizocarpon geographicum*. Devět z těchto druhů je saxikolních s korovitým typem stélky. Korovité lišejníky jsou v bezprostředním kontaktu s podložní horninou a může je proto značně ovlivnit přítomnost těžkých kovů v ní (Beck, 1999). Zbývající druh, *Cladonia pyxidata*, je druhem terikolním s dimorfickou stélkou. Tři z mnou vybraných druhů (*Lecanora polytropa*, *Lecidea fuscoatra*, *Protoparmeliopsis muralis*) jsou považovány za hyperakumulátory těžkých kovů (Purvis *et al.*, 2008; Rola *et al.*, 2016). Zároveň jsem se rozhodla zjistit, které fotobionty obsahuje lišejník *Pertusaria chiodectionoides*, který se v ČR vyskytuje výhradně na hadcích a je tak jedním z mála hadcových specialistů.

3.2 Výběr lokalit a sběr lišejníků

Lišejníky jsem sbírala na pěti hadcových lokalitách v rámci České republiky: PP Borecká skalka (BS), NPP Hadce u Želivky (Želivka, ZE), PR Holubovské hadce (HH), NPP Křížky (KR), NPR Mohelenská hadcová step (Mohelno, MO). Ke každé z hadcových lokalit jsem vybrala jednu amfibolitovou lokalitu s podobným úhrnem srážek (**Tab. 1**). Sbírala jsem tedy na následujících amfibolitových lokalitách: PR Kalvárie (KA), Ráj (RA), Třebovské Hradisko (TH), PR U doutné skály (Bítov, DS), PR Údolí Teplé (Teplá, TE). Geografické rozmístění lokalit je patrné z **Obr. 3**, fotografie jsou uvedené v příloze (**Příloha 1**). Mapu jsem vytvořila v programu R. v. 4.4.0 s využitím balíčku *rworldmap* (South, 2011).

Výběr kontrolní horniny jsem konzultovala s geologem doc. RNDr. Kryštofem Vernerem, Ph.D.



Obr. 3 Mapa navštívených lokalit, stejné symboly označují klimatické páry.

Sběr lišejníků probíhal od listopadu roku 2021 do září roku 2023. Jelikož se jedná výhradně o saxikolní druhy, odsekávala jsem je pomocí majzlíku a kladiva i s kusem podkladové horniny. Od každého druhu lišejníku jsem sesbírala tři stélky z různých míst v rámci dané lokality, v případě nedostatečného množství stélek jsem sebrala maximální počet přítomných stélek. Sběr materiálu ztěžoval fakt, že jsem sebrané položky lišejníků dále používala i pro měření těžkých kovů pomocí XRF analyzátoru – měření je důležité provádět na co nejrovnější ploše, aby docházelo k minimálnímu zkreslení výsledků (viz kapitulu 3.10). Zároveň některé lišejníky porůstaly mikrostanoviště, která pro sběr nebyla vhodná (např. skalní spáry) a při odsekávání by došlo ke znehodnocení celé položky, případně by takto rostoucí lišejník nebylo možné vůbec odebrat. I z tohoto důvodu nebylo možné na některých lokalitách odebrat tři různé stélky. Všechny položky jsem následně uchovávala v papírových obálkách v pokojové teplotě. Položky budou uloženy v herbáři Univerzity Karlovy v Praze (PRC).

Tab. 1 Přehled nadmořské výšky, průměrných srážek, teploty v 15. nejchladnější a nejteplejší den a průměrné teploty mezi lety 2014–2019, **žlutá** = hadec, **zelená** = amfibolit, dvě po sobě následující lokality představují klimatický pár.

	nadm. výška m n. m.	srážky mm	t zima °C	t léto °C	t °C
Křížky	812	620,6	-8,9	28,9	7,6
Teplá	622	596,3	-9	30,7	8,1
Mohelno	339	484	-8,6	31,8	9,4
Bitov	360	513,4	-9,2	32,0	9,2
Holubovské hadce	470	619,5	-9,5	31,4	8,8
Ráj	614	673,1	-8,3	29,1	7,5
Želivka	395	579,1	-8,7	32,3	9,5
Kalvárie	222	542,9	-7,9	30,7	8,8
Borecká skalka	418	622,4	-9	31,9	9,3
Třebovské hradisko	350	600,3	-9	31,4	9,1

3.2.1 Klimatická data

Klimatická data, na základě kterých jsem provedla konečný výběr amfibolitových lokalit, mi zprostředkoval Matěj Man.

Klimatická data byla extrahována proložením souřadnic výzkumných ploch s rastry charakterizujícími střednědobý trend klimatu mezi lety 2014 a 2019 na základě měření stanic Českého hydrometeorologického institutu (ČHMÚ). Bodová měření ČHMÚ byla prostorově interpolována pro území celé ČR v rozlišení 30 x 30 m pro potřeby hrubé charakteristiky klimatu (Man et. al. 2022, nepublikovaná data).

Podkladem pro vytvoření klimatických rastrů byly denní údaje o průměrné, minimální a maximální teplotě z cca 200 stanic a souhrnných denních srážkách z cca 500 stanic ČHMÚ. Tato denní data jsou volně dostupná na portálu ČHMÚ <https://www.chmi.cz/historicka-data/pocasi/denni-data/Denni-data-dle-z.-123-1998-Sb> pro období od roku 1961 do současnosti. Pro potřeby klimatických rastrů bylo zvoleno období od 1. 1. 2014 do 31. 12. 2019, kdy měřilo naráz nejvíce stanic. Denní data byla agregována na roční kromě těch, kde průměrná roční teplota byla vypočítána jako průměr denních hodnot, minimální teplota jako pátý a maximální teplota jako 95. percentil denních hodnot. Tyto roční hodnoty posoužily jako trénovací data pro kalibraci interpolačních modelů.

Pro interpolace teplot bylo testováno několik statistických metod v kombinaci s různými prediktory. Mezi testovanými interpolačními modely byly: lineární model, generalizovaný lineární model, Krigging (Hengl *et al.*, 2004), Lasso (Nussbaum *et al.*, 2018) a model strojového učení Random forest (Breiman, 2001). Modely byly posouzeny na základě prostorové, desetinásobné, blokové kros validace (Roberts *et al.*, 2017) s pomocí RMSE (root mean square error, tj. odmocnina střední kvadratické chyby). Jako prediktory byly testovány topografické proměnné (Man et. al. 2022, nepublikovaná data) odvozené z digitálního modelu terénu páté generace ČR (DMR 5G), poskytovaného Českým úřadem zeměměřickým a katastrálním (ČUZK) <https://ags.cuzk.cz/geoprohlizec/?atom=dmr5g>.

Na základě prostorové kros validace a nejnižšího RMSE byl pro predikce teplot použit model Random forest a pro srážky model Krigging.

3.3 Izolace DNA

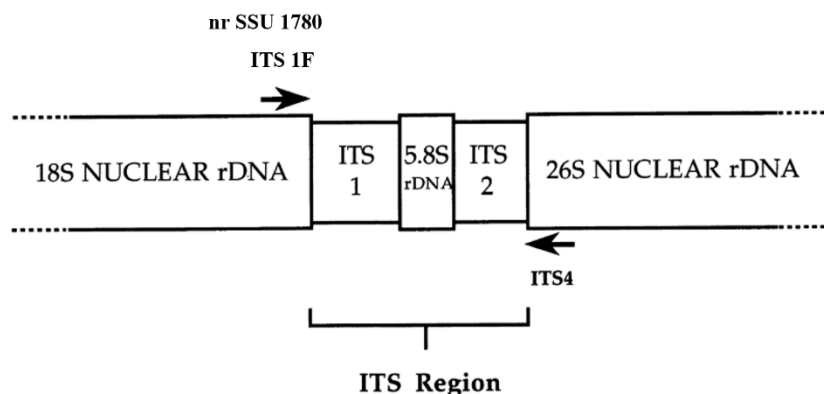
Před samotnou izolací DNA jsem každou stélku omývala po několik minut pod tekoucí vodou a zároveň jemně očišťovala její povrch zubním kartáčkem, aby se snížila možnost získání DNA z epilichenicky rostoucích řas a řas, které se na stélce pouze zachytily, ale nijak se nepodílejí na fotosyntéze a látkové výměně s mykobiontem. Takto omyté lišejníky jsem nechala jeden až dva dny vysychat, až poté jsem přistoupila k vlastní přípravě na izolaci. Pomocí sterilních nástrojů (žiletka, pinzeta) jsem dostatečné množství materiálu z různých částí stélek přenesla do 2ml zkumavek. Izolace DNA proběhla podle modifikovaného CTAB (cetyltrimethylamoniumbromid) protokolu (Cubero *et al.*, 1999):

1. K suchému materiálu jsem do zkumavek přidala 2 wolframkarbidové kuličky, pomocí kterých byl materiál v mlýnku (Retsch MM200) drcen při 30 000 otáčkách za minutu (rpm) po dobu 5 minut.
2. K takto nadrcenému materiálu jsem přidala 700 µl extrakčního pufru CTAB a na špičku špachličky prášku PVP (polyvinylpyrrolidon), který absorbuje sekundární metabolity, které by jinak mohly inhibovat PCR reakci. Uzavřené zkumavky jsem několikrát ručně protřepala a poté vložila do termobloku (Eppendorf Thermomixer R), kde jsem je nechala 30 minut inkubovat při 60 °C a 1 200 rpm.
3. Po inkubaci jsem do zkumavek přidala 500 µl roztoku chloroform:izoamylalkohol (24:1). Uzavřené zkumavky jsem opět několikrát ručně protřepala a po 5 minutách, kdy jsem je nechala stát v klidu v pokojové teplotě, jsem je stáčela v centrifuze (Eppendorf 5415D) při 13 200 rpm po dobu 6 minut.
4. Supernatant (500–600 µl) jsem přepipetovala do čistých 1,5ml zkumavek, do kterých jsem předem přidala 500 µl isoamylalkoholu vychlazeného na -20 °C. Zkumavky jsem ručně protřepala a následně uložila na 30 minut do -20 °C. Během této doby došlo k vysrážení DNA.
5. Zkumavky s vysráženou DNA jsem stáčela v centrifuze při 13 200 rpm po dobu 3 minut. Po vyndání z centrifugy jsem na dně zkumavky pozorovala bílou peletku DNA. Zbylý obsah zkumavky jsem opatrně vylila do odpadu.
6. Do zkumavek jsem přidala 400 µl 96% ethanolu vychlazeného na teplotu -20 °C. Poté jsem vzorky 15 minut inkubovala na termobloku při teplotě 37 °C a 350 rpm. Po uplynutí této doby jsem je opět centrifugovala při 13 200 rpm po dobu 3 minut.
7. Následně jsem 96% ethanol opatrně vylila (pelet DNA drží na stěně zkumavky). Do zkumavek jsem přidala 200 µl 70% ethanolu a poté je ponechala po dobu 5 minut v klidu. Po uplynutí této doby jsem 70% ethanol vylila a zkumavky nechala na papírovém kapesníku dnem vzhůru po dobu několika minut. Aby došlo k úplnému odpaření ethanolu, umístila jsem otevřené zkumavky do termobloku, kde jsem je ponechala při 60 °C po dobu 5–10 minut.

8. Vysušený pelet jsem rozpouštěla ve 150 µl TE pufru na termobloku při 40 °C a 600 rpm po dobu 30 minut. Na závěr jsem vzorky důkladně promíchala na vortexu (Genie 2), aby došlo k úplnému rozpuštění peletky DNA.
9. Koncentrace DNA jsem bezprostředně po každé izolaci změřila na nanodropu (NanoDrop 1000).
10. Vyzolovanou DNA jsem uchovávala v lednici při 4 °C.

3.4 PCR a sekvenace

Identifikace mykobiontů i fotobiontů na úrovni druhů proběhla na základě úseku ITS (Internal Transcribed Spacer, **Obr. 4**).



Obr. 4 Pozice amplifikovaných úseků ITS upraveno podle Baldwin et al. (1995)

Tento úsek jsem u mykobiontů amplifikovala pomocí kombinace univerzálního primeru ITS4 a primeru ITS1F specifického pro houby z oddělení Ascomycota. K amplifikaci úseku ITS u fotobiontů došlo s použitím primerů ITS4 a SSU1780, který je specifický pro zelené řasy (odd. Chlorophyta). Sekvence všech primerů a jejich orientace jsou uvedeny v **Tab. 2**.

Tab. 2 Přehled primerů použitých pro PCR

Název	Sekvence	Orientace	Specifická	Zdroj
ITS4	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGA-3'	reverse	univerzální	White <i>et al.</i> , 1990
ITS1F	3'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-5'	forward	Ascomycota	Gardes & Bruns, 1993
mrSSU1	5'-AGCAGTGAGGAATATTGGTC-3'	forward	Ascomycota	Zoller <i>et al.</i> , 1999
mrSSU3R	5'-ATGTGGCACGTCTATAGCCC-3'	reverse	Ascomycota	Zoller <i>et al.</i> , 1999
SSU1780	3'-CTGCGGAAGGATCATTGATTC-5'	forward	Chlorophyta	Piercey-Normore & DePriest, 2001

V případě několika vzorků lišejníku *Lecidella carpathica* (HH11–14, KR17, KR36, KR41) jsem pro ověření druhu mykobionta použila i úsek malé ribosomální podjednotky (mtSSU), jelikož úsek ITS nebyl průkazný.

PCR amplifikace vybraných úseků se odehrávala v celkovém objemu 20 µl reakční směsi, jejíž složení bylo následující:

- 14,4 µl voda (ddH₂O)
- 4 µl pufr MyTaq™ Reaction Buffer Red (Bioline)
- 0,2 µl forward primer (ITS1F/SSU1780) v koncentraci 25 pM/µl
- 0,2 µl reverse primer (ITS4) v koncentraci 25 pM/µl
- 0,2 µl polymerázy MyTaq™ HS DNA (Bioline)
- 1 µl DNA

PCR reakce probíhala v termocykleru Eppendorff Mastercycler pro, průběh cyklu byl stejný pro oblast ITS mykobionta i fotobionta:

- iniciální denaturace (95 °C, 1 minuta)
- 35 cyklů: denaturace (95 °C, 30 vteřin), annealing (54 °C, 30 vteřin), elongace (72 °C, 30 vteřin)
- finální elongace (72 °C, 3 minuty)

Průběh PCR reakce pro oblast mitochondriální SSU mykobionta byl následující:

- iniciální denaturace (95 °C, 1 minuta)
- 35 cyklů: denaturace (95 °C, 30 vteřin), annealing (60 °C, 30 vteřin), elongace (72 °C, 30 vteřin)
- finální elongace (72 °C, 3 minuty)

Přítomnost PCR produktů a jejich kvalitu jsem ověřila elektroforézou – 2 µl PCR produktu jsem nanasla na 1% agarózový gel s ethidium bromidem nebo později s barvičkou MIDORI Green Advance. PCR produkty byly následně vizualizovány pomocí UV záření. Délku fragmentů jsem porovnávala s žebříčkem Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp DNA Ladder. PCR produkty jsem přečišťovala pomocí paramagnetických kuliček SPRI AMPure XP (Beckman Coulter) podle protokolu výrobce. Koncentraci přečištěných PCR produktů jsem měřila na nanodropu (NanoDrop 1000). Sangerovo sekvenování univerzálním primerem ITS4 a primerem mtSSU1 probíhalo ve společnosti Macrogen Europe (Amsterdam, Nizozemsko).

3.5 Illumina metabarcoding

Pro Illumina metabarcoding jsem vybrala jeden ze vzorků, u kterých se mi opakovaně nepodařilo získat kvalitní sekvenci fotobionta Sangerovým sekvenováním. Konkrétně šlo o vzorek KR7, tedy lišejník *Lecanora rupicola* z Křížků. Knihovnu s tímto vzorkem připravila Ivana Černajová,

následné zpracování dat provedl Pavel Škaloud. Pro metabarcoding byla využita mnou vyizolovaná DNA postupem, který popisují výše v kapitole 3.3. Nejprve proběhla nested PCR, při níž došlo k amplifikaci úseku ITS2 za použití primerů 1378j02 (navržený P. Škaloudem, nepublikováno) a ITS4 (White *et al.*, 1990), poté následovala druhá PCR s použitím značeného primeru specifického pro chlorofytů řasy 5.8F-Chlorophyta (Vančurová *et al.*, 2020) a ITS4 (White *et al.*, 1990). Přehled použitých primerů zobrazuje **Tab. 3**.

Tab. 3 Přehled primerů použitých pro metabarcoding

Název	Sekvence	Orientace	Specifita	Zdroj
ITS4	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGA-3'	reverse	univerzální	White <i>et al.</i> , 1990
1378j02	5'-TTGCCTTGTCAGGTTGATTCC-3'	forward	univerzální	Škaloud, nepubl.
5.8F-Chlorophyta	5'-GAATTCCGTGAACCATCGAAT CTTT-3'	forward	Chlorophyta	Vančurová <i>et al.</i> , 2020

Nested PCR proběhla v následující reakční směsi o celkovém objemu 20 µl:

- 10 µl Q5® High-Fidelity DNA polymerázy (BioLabs Inc.)
- 1,5 µl forward primeru
- 1,5 µl reverse primeru
- 1 µl DNA
- 6 µl vody (Milli-Q ddH₂O)

Takto připravené vzorky byly vloženy do termocykleru Eppendorff Mastercycler pro a PCR proběhla při tomto nastavení:

- iniciální denaturace (98 °C, 30 vteřin)
- 22 cyklů: denaturace (98 °C, 10 vteřin), annealing (52 °C, 45 vteřin), elongace (72 °C, 1 minuta)
- finální elongace (72 °C, 2 minuty)

Kvalita a přítomnost PCR produktu byla ověřena pomocí elektroforézy, kdy byly 2 µl DNA smíchány s 1 µl modré barvičky a následně naneseny na 1% agarózový gel s ethidium bromidem. PCR produkt byl přečištěn paramagnetickými kuličkami SPRI AMPure XP (Beckman Coulter) dle návodu výrobce. Tento PCR produkt byl následně použit pro druhou PCR. Ta probíhala taktéž v objemu 20 µl reakční směsi se složením:

- 10 µl Q5® High-Fidelity DNA polymerázy (BioLabs Inc.)
- 1,5 µl forward primeru
- 1,5 µl reverse primeru
- 3 µl DNA
- 4 µl vody (Milli-Q ddH₂O)

Průběh PCR byl pak následovný:

- iniciální denaturace (98 °C, 30 vteřin)
- 24 cyklů: denaturace (98 °C, 10 vteřin), annealing (52 °C, 45 vteřin), elongace (72 °C, 1 minuta)
- finální elongace (72 °C, 2 minuty)

Poté byla opět ověřena přítomnost a kvalita PCR produktu pomocí elektroforézy a DNA byla přečištěna, jak jsem popsala výše. Koncentrace DNA byla změřena na qubitu Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific). Vzorek byl připraven v duplikátu. Oba vzorky byly následně zaslány k osekvenování na platformě MiSeq Illumina do společnosti Fasteris (Plan-lesOuates, Švýcarsko).

Kvalita kontroly readů byla provedena za použití programu FastQC v. 0.11.8 (Andrews 2010). Surová data byla zpracována podle (Bálint *et al.*, 2014), zpracování zahrnovalo filtrování dle kvality, složení paired-end readů, odstranění primerových artefaktů, extrakci readů dle barkódů, orientaci všech readů do směru 5'→3', demultiplexizaci, dereplikaci a clusterování do OTU. V posledním zmíněném kroku byl použit program Swarm v. 2 (Mahé *et al.*, 2015) s denoisem nastaveným na $d = 3$ a odfiltrováním chimér. Jednotlivé OTU byly identifikovány algoritmem BLASTN (Zhang *et al.*, 2000) v programu SEED2 (Větrovský *et al.*, 2018).

3.6 Tvorba alignmentu

Kvalitu získaných sekvencí jsem kontrolovala v programu SeqAssem v. 09/2004 (Hepperle, 2004). Alignment mykobiontů i fotobiontů jsem vytvořila v programu MAFFT v. 7 (Katoh *et al.*, 2019) a následně jej upravila v programu MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021). Sekvence jsem dále identifikovala pomocí online algoritmu BLASTN (Zhang *et al.*, 2000) který porovnává vloženou sekvenci s dalšími sekvencemi v databázi GenBank. Pro každý druh mykobionta jsem vytvořila speciální alignment, pouze pro druhy *Candeliariella coralliza* a *Candeliariella vitellina* jsem vytvořila alignment společný, u fotobiontů jsem vytvořila dva alignmenty – jeden pro řasy rodu *Trebouxia* (obsahující sekvence získané Sangerovým sekvenováním i Illumina metabarcodingem), druhý pro řasy rodu *Asterochloris*. Pro fylogenetickou analýzu a odhalení cladů a linií, do kterých řasy rodu *Trebouxia* spadají, jsem alignment doplnila o 228 sekvencí ze studie Peksy a kol. (Peksa *et al.* 2022), která byla zaměřena na fotobionty rodu *Trebouxia*, a pět sekvencí získaných metabarcodingem. Do alignmentu řas rodu *Asterochloris* jsem přidala 78 sekvencí ze studie Vančurové a kol. (Vančurová *et al.*, 2021). V obou případech byly v alignmentu ponechány pouze unikátní sekvence, čehož jsem docílila použitím balíčku Biostrings (Pagès *et al.*, 2024) v programu R v. 4.4.0. Dále jsem pomocí balíčku ape (Paradis *et al.*, 2004) odstranila z alignmentů pozice, které obsahovaly více než 95 % mezer. Ruční zastřížení alignmentů jsem provedla v programu MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021).

Do alignmentů mykobiontů jsem přidala sekvence, které měly podle algoritmu BLASTN nejvyšší shodou s vloženými sekvencemi, a sekvence, které slouží jako outgroup. V alignmentech byly

ponechány všechny získané sekvence. Zbývající zpracování alignmentů bylo shodné se zpracováním alignmentů fotobiontů.

3.7 Fylogenetické analýzy

Fylogenetické analýzy jsem provedla pro každý zastoupený rod fotobiontů a pro každý druh mykobiontů s výjimkou rodu *Candelariella*, kde jsem zpracovala dohromady druhy *Candelariella coralliza* a *Candelariella vitellina*.

Úsek ITS fotobiontů jsem rozdělila na části ITS1, 5,8S a ITS2. Následně jsem pro každou část získala substituční model na základě Bayesovského informačního kritéria (BIC) v programu jModelTest2 v. 2.1.6 (Darriba *et al.*, 2012) na portálu CIPRES (Miller *et al.*, 2010). Fylogenetické stromy jsem našla metodou Bayesovy inference (BI) v programu Mr. Bayes v. 3.2.7a (Ronquist *et al.*, 2012) pomocí Markov Chain Monte Carlo (MCMC) metody. Použila jsem dva paralelní MCMC chody, každý se třemi horkými a jedním studeným řetězcem. Každých 100 generací došlo k zaznamenání parametrů a stromů. Hodnota SDSF (standard deviation of split frequencies) sloužila k vyhodnocení konvergence běhů. Prvních 25 % stromů bylo vyřazeno jako burn-in. Použité substituční modely pro jednotlivé části úseku ITS, jak byly zadány do programu MrBayes (který nedisponuje všemi výslednými substitučními modely z programu jModelTest), celkový počet generací a konečnou hodnotu SDSF shrnuje **Tab. 4**.

Podpory větví byly spočítány také pomocí ultrafast bootstrapu s 1000 opakováními v programu RAxML v. 8.2.10 (Stamatakis, 2014). Tato analýza proběhla podle modelu GTR+G pro všechny části úseku ITS.

Tab. 4 Použité substituční modely (SM) pro jednotlivé části úseku ITS fotobiontů, jak byly zadány do programu MrBayes (SM MrBayes), počet generací a výsledná hodnota SDSF

Rod	Úsek	SM	SM MrBayes	Počet generací	SDSF
<i>Asterochloris</i>	ITS1	TrNef+G	SYM+G	15 000 000	0,0046
	5,8S	JC	JC		
	ITS2	TPM1+G	GTR+G		
<i>Trebouxia</i>	ITS1	TIM2+G	GTR+G	50 000 000	0,0046
	5,8S	TrNef+G	SYM+G		
	ITS2	TPM2+G	GTR+G		

U mykobiontů jsem pracovala s celým úsekem ITS. Substituční model jsem získala pomocí BIC v programu jModelTest2 v. 2.1.6 na portálu CIPRES. Fylogenetické stromy jsem našla metodou ML v programu RAxML v. 8.2.10, podpory větví byly spočítány ultrafast bootstrapem s 1000 opakováními. Substituční modely uvádím v **Tab. 5**.

Fylogenetické stromy jsem graficky zpracovala v programech FigTree v. 1.4.4 (Rambaut & Drummond, 2020) a Affinity Photo (Serif).

Tab. 5 Použité substituční modely (SM) pro úsek ITS mykobiontů

Druh/rod	Úsek	SM jModelTest	SM RAxML
<i>Acarospora fuscata</i>	ITS	K80	GTRCAT
<i>Candelariella coralliza a vitellina</i>	ITS	TPM2+G	GTRGAMMA
<i>Cladonia pyxidata</i>	ITS	TrNef+G	GTRGAMMA
<i>Lecanora polytropia</i>	ITS	TrNef+G	GTRGAMMA
<i>Lecanora rupicola</i>	ITS	HKY+G	GTRGAMMA
<i>Lecidea fuscoatra</i>	ITS	TrNef+G	GTRGAMMA
<i>Lecidella carpathica</i>	ITS	TrNef+G	GTRGAMMA
<i>Pertusaria chiodectonoides</i>	ITS	TrNef	GTRCAT
<i>Protoparmeliopsis muralis</i>	ITS	TrNef+G	GTRGAMMA
<i>Rhizocarpon geographicum</i>	ITS	TrNef+G	GTRGAMMA

3.8 Morfologické potvrzení plurality fotobiontů

Vzhledem k výsledkům metabarcodingu jsem provedla příčné řezy různými částmi stélky lišejníku *Lecanora rupicola* (KR7), abych morfologicky potvrdila přítomnost obou rodů řas v nich. Řezy jsem pozorovala ve světelném mikroskopu a některé řezy následně přenesla do mikroskopu Olympus BX51 a vyfotografovala je.

3.9 Měření pH a konduktivity

V rámci každé lokality jsem vybrala tři položky, ze kterých jsem pomocí majzlíku a kladiva odsekla cca 10 g horniny. Na jedné z položek vždy rostl acidofilní druh *Rhizocarpon geographicum*, toto neplatí pro lokalitu na Třebovském hradisku, kde tento druh nebyl přítomný. Těchto 10 g horniny jsem nejdříve kladivem nadrtila na frakci < 5 mm a posléze umlela na analytickou jemnost na mlýnku Retsch MM400 v Laboratoři environmentální chemie a analýzy půd (LECHAP), v Ústavu pro životní prostředí na Univerzitě Karlově. Mletí probíhalo následovně:

- 5 g horniny bylo vloženo do 35ml nádoby a mleto pomocí kuličky při 30 000 otáčkách za minutu po dobu 30 vteřin.
- Mezi drcením jednotlivých položek byla nádoba vždy vymyta a vytřena ethanolem.

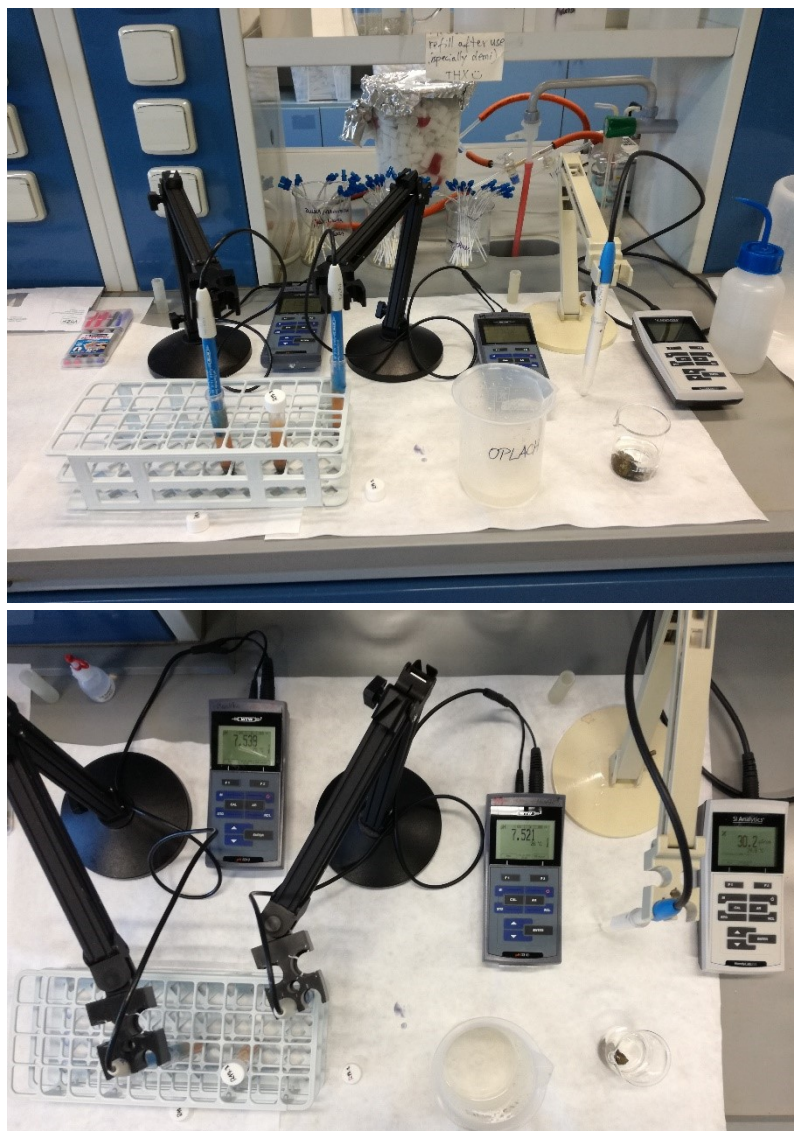
Pro stanovení pH hornin není zavedena žádná obecně platná metodika, proto jsem následovala metodiku pro měření pH půdních vzorků (ISO 10390:2005). Na přesné váze Mettler Toledo, New Classic MF, ML104/01 jsem odvážíla 2 g namleté horniny (**Obr. 5**). Vážení proběhlo rovnou v 15ml zkumavce, do které jsem následně přidala 10 ml demineralizované (demi) vody (v poměru 1:5). Z každé 10g položky jsem vytvořila tři replikáty. Výsledné pH v rámci jedné lokality je aritmetickým průměrem všech těchto měření. Po přidání demi vody jsem zkumavky vložila do třepačky GFL 3018, kde jsem je nechala třepat po dobu 1 hodiny při frekvenci 100 kmitů za minutu. Poté jsem nechala zkumavky stát 1 hod. ve svislé poloze ve stojánku. pH jsem měřila přenosným pH metrem WTW 3310 dokud nedošlo k ustálení hodnoty pH, což trvalo cca 2 min. Podobnou metodiku zvolili ve své studii i Paukov a kol. (Paukov *et al.*, 2019), ti sice použili jiný poměr namleté horniny a demi vody (1:10), ale následné louhování probíhalo po delší dobu – 48 hodin. Mohli proto dosáhnout podobných výsledků jako já při louhování v menším objemu po kratší čas.



Obr. 5 Odvažování 2 g namleté horniny

Příprava vzorků pro měření konduktivity je totožná s přípravou pro měření pH, tudíž jsem mohla použít stejné vzorky pro obě metody. Konduktivitu jsem měřila přenosným konduktometrem HandyLab 200, dokud se její hodnota neustálila, tedy po dobu cca 1 min. Výsledná hodnota je opět aritmetickým průměrem daných měření.

Konduktivitu i pH jsem měřila v Laboratoři environmentální geochemie I na Fakultě životního prostředí, Katedře geoenvironmentálních věd na České zemědělské univerzitě (**Obr. 6**).



Obr. 6 Měření pH a konduktivity

Lišejníky jsou v kontaktu se svrchní vrstvou horniny, která je více zvětralá. Provedla jsem proto i měření pH povrchu horniny. Metodu měření povrchového pH s rozdílným substrátem (borka stromů) použil např. Pelant (2020). Na povrch zvětralé i nezvětralé (zdravé) části horniny, na které nerostl lišejník nebo mech, jsem nanesla kapku destilované vody a jednu minutu počkala. Poté jsem měřila pH přenosným pH metrem WTW pH/Cond 340i, dokud se naměřená hodnota neustálila, tedy cca 2 min. Provedla jsem vždy jen jedno měření v rámci dané položky. Během jednotlivých měření docházelo ke kolísání hodnot, kdy hodnota nejprve začala stoupat a až posléze klesat, případně chvíli stoupala a chvíli klesala. Jelikož jsem musela sondu ručně držet přitisknutou přímo na měřeném objektu, nevyhnula jsem se ani lehkým pohybům během měření, což opět způsobilo jeho výkyvy.

3.10 Měření obsahu těžkých kovů

Obsah těžkých kovů jsem měřila ručním rentgenfluorescenčním analyzátozem (XRF) Delta Professional. Rentgenfluorescenční analýza je nedestruktivní analýza, při níž lze změřit obsah prvků těžších než Mg. Princip této metody je následující – rentgenové záření o vysoké energii vyrazí elektrony z vnitřních orbitalů atomu, čímž způsobí jeho nestabilitu. Na uvolněná místa poté přeskakují elektrony z vyšších energetických hladin, čímž dojde k uvolnění energie, která se rovná energetickému rozdílu zúčastněných orbitalů. Díky tomu je záření charakteristické pro každý typ atomu a tím i pro každý chemický prvek. Ve spektrometru poté dochází k analýze tohoto záření a tvorbě výsledného energetického spektra, ze kterého lze získat informace o chemickém složení materiálu v místě měření (Karathanasis & Hajek, 2018). Jelikož k měření pomocí ručního XRF analyzátoru nedochází ve vakuu, je nutné použití vyšší energie budícího zdroje a paprsek tak proniká do větších hloubek materiálu. Hloubku, do které paprsek pronikne, však nelze jednoznačně určit, jelikož závisí na typu materiálu, který je měřen. Měření pomocí přenosného XRF spektrometru nemusí předcházet žádná příprava měřeného objektu, navíc je tato metoda velmi efektivní, rychlá a levná.

Měření jsem prováděla vždy přes stélku lišejníku, kvůli kterému jsem danou položku sbírala. Jedno měření probíhalo pomocí dvou rentgenových paprsků, každý z nich měřil obsah prvků po dobu 30 vteřin. Na každé položce jsem provedla vždy dvě měření na jedné ploše (asi $0,5 \text{ cm}^2$), výsledný obsah prvků je tedy aritmetickým průměrem těchto měření. Analyzátor je vybaven kamerou, na obrazu je zakroužkováno



Obr. 7 Měření pomocí ručního XRF analyzátoru v NPR Křížky, 16. 11. 2021

místo, kde bude měření probíhat, díky čemuž lze před začátkem měření zkontrolovat, zda „mířím“ opravdu na místo, které chci měřit. To bylo výhodné především u malých položek ($< 3 \text{ cm}$). Měření položek v NPR Křížky probíhalo v terénu (**Obr. 7**) ještě před odseknutím dané položky, všechna ostatní měření probíhala v laboratoři.

Výsledky měření jsou však spíše orientační, jelikož nevíme, do jaké hloubky rentgenové paprsky proniknou. V mém případě navíc záleží i na tloušťce stélky, skrze kterou je měření prováděno. Měření je nejpřesnější na rovném a hladkém povrchu, ačkoliv jsem se snažila vybírat co nejrovnější části hornin, jistě nejsou úplně hladké a může tak docházet k odrazení energie mimo detektor. Pro měření skrze stélku jsem se rozhodla z několika důvodů: (i) zajímá mě obsah kovů přímo v hornině pod danou stélkou (ii) najít v bezprostředním okolí lišejníku místo bez jakéhokoliv jiného lišejníku, mechorostu či řas je často velmi obtížné a ke zkreslení výsledků by tak došlo téměř vždy. Tato metoda

tak slouží především ke zjištění, zda se daný prvek v hornině opravdu nachází a zda je ho více, či méně než na hornině z jiné lokality.

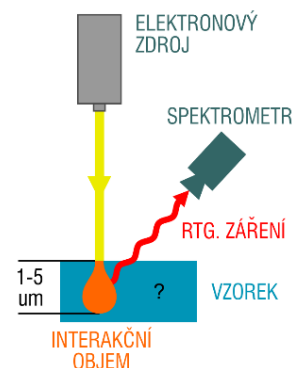
3.11 SEM-EDS

Pro skenovací elektronovou mikroskopii (SEM) s energiově disperzním spektrometrem (EDS) jsem vybrala takové položky, ve kterých jsem naměřila největší množství těžkých kovů XRF analyzátozem. Celkem jsem vybrala pět položek z obou typů substrátu (**Tab. 6**). Z těchto položek jsem bez použití kovových nástrojů, tedy pomocí keramického nože a plastové pinzety, připravila příčné řezy stélkou, případně jsem na nosiče vzorku jen přenesla kousky lišejníku s i bez podložní horniny. Takto připravené vzorky byly následně v laboratoři Geologického ústavu AV ČR pokoveny uhlíkem a vloženy do skenovacího elektronového mikroskopu TESCAN VEGA 3XMU propojeného s energiově disperzním spektrometrem Bruker QUANTAX 200.

Tab. 6 Vybrané druhy lišejníků pro analýzu SEM-EDS; H = hadec, A = amfibolit

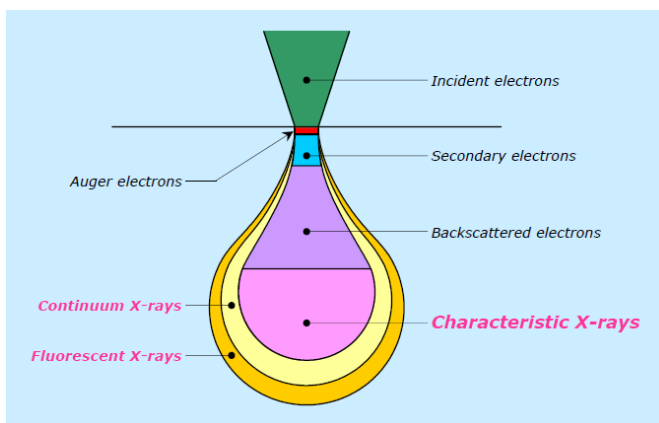
MO75	<i>Lecanora rupicola</i>	NPR Mohelenská hadcová step	H
DS20	<i>Lecidea fuscoatra</i>	PP U doutné skály	A
RA10	<i>Protoparmeliopsis muralis</i>	Ráj	A
RA24	<i>Acarospora fuscata</i>	Ráj	A
ZE5	<i>Lecidella carpathica</i>	NPP Hadce u Želivky	H

Touto metodou lze vizualizovat jednotlivé částičky horniny obsahující kovy a sledovat jejich přesnou lokalizaci ve stélce lišejníku. Díky propojení s EDS je také možné změřit obsah prvků zastoupených jak ve stélce lišejníku, tak v hornině samotné. Detekce prvkového složení probíhá jedním paprskem elektronů urychlených napětím 20 kV, což umožňuje provést měření na ploše o průměru 1 μm , takže lze změřit obsahy i u opravdu malých částic hornin. Provedena byla denormalizovaná analýza, v rámci které není navyšováno množství naměřených prvků do celkového objemu 100 hmotnostních procent. Tento typ analýzy jsme zvolily, abychom dostaly co nejreálnější obraz o prvkovém složení v místě měření, protože v případě normalizované analýzy by došlo ke zkreslení výsledků.



Obr. 8 Schéma SEM-EDS (MATCA, 2024)

Zároveň i zde, stejně jako při měření XRF, nelze říct, do jaké hloubky elektronový paprsek přesně dosáhne (**Obr. 8, Obr. 9**). Obzvláště u organického materiálu může při měření obsahu prvků ve stélce dojít k měření částičky, která je ukrytá pod houbovými hyfami a na obrazu tak není vidět. Při zobrazení povrchu pomocí zpětně odražených elektronů (BSE) také není možné rozlišit, zda jsou částice opravdu začleněné dovnitř stélky, či se



Obr. 9 Schéma hloubky, které jednotlivé typy elektronů dosáhnou. (Chatterjee, N.)

nacházejí pouze na povrchu vzorku, kam mohly být naneseny při přípravě či manipulaci se vzorkem. To je způsobené tím, že BSE pocházejí z větších hloubek interakčního objemu materiálu. Potvrzení přítomnosti částic horniny přímo ve stélce jsem proto provedla pomocí snímání sekundárních elektronů (SE), díky kterým lze sledovat topografii sledovaného povrchu. Pořídila jsem fotografie vybraných vzorků zahrnujících měřené částice.

Následné zpracování získaných dat (vykreslení prvkového spektra) jsem provedla v programu MS Excel 365.

Všechny geochemické analýzy (měření pH a konduktivity z výluhu z horniny, XRF, SEM-EDS) jsem prováděla po konzultaci a pod dohledem geochemičky doc. Mgr. Martiny Vítkové, Ph.D. z České zemědělské univerzity, Katedry geoenvironmentálních věd.

3.12 Statistické zpracování dat

Všechna získaná data (výsledky měření obsahu těžkých kovů XRF analyzátozem, měření pH a sekvence myko- i fotobiontů získané Sangerovým sekvenováním) jsem statisticky vyhodnotila v programu R v. 4.4.0. Pro zjištění korelace mezi parametry vstupujícími do analýzy (průměrný obsah jednotlivých prvků v rámci lokality) jsem použila Pearsonův korelační koeficient (**Příloha 2**). Z prvků, které spolu korelovaly (Fe a Mn, Ni a Cr) jsem ponechala pouze jeden (Fe a Ni). Hodnoty naměřených prvků byly následně standardizovány. Odlišnost lokalit na základě prvkového složení (Ni, Mg, Fe, Si, Ti) a odlišnost jednotlivých společenstev fotobiontů z daných lokalit byla vizualizována metodou neparametrického mnohorozměrného škálování (NMDS), matice vzdáleností byla v obou případech vypočtena na základě Euklidovy metriky. Pro další analýzy jsem vytvořila unimetrické fylogenetické stromy v programu BEAST v. 2.5 (Bouckaert *et al.*, 2019) zvláště pro všechny fotobionty rodu *Trebouxia* a všechny mykobionty. Fotobionty rodu *Asterochloris* jsem z těchto analýz vyloučila, jelikož měření prvků pod stélkami, ve kterých se vyskytují, bylo z většiny neúspěšné (více viz kapitolu 4.2) a jejich zapojení by také významně zvyšovalo fylogenetickou diverzitu (PD). Pomocí unimetrických fylogenetických stromů jsem následně vypočítala PD obou symbiontů, tzv.

standardized effect size (ses) of PD, fylogenetickou strukturu a jejich rozdíly mezi oběma typy substrátu. Díky těmto analýzám jsem zjistila míru příbuznosti mykobiontů a fotobiontů na studovaných substrátech, z čehož bylo možné odvodit vliv vnějších vlivů (podmínek prostředí nebo vzájemné kompetice). Následně jsem výpočtem sesPD testovala, zda přítomnost fotobiontů na lokalitě není filtrována obsahem nebo absencí těžkých kovů v hornině. Klima jsem charakterizovala pomocí průměrné teploty mezi lety 2014 a 2019, pátého percentilu nejnižší naměřené teploty, 95. percentilu nejvyšší naměřené teploty (tedy 15. nejchladnější a nejteplejší den) a průměrným úhrnem srážek ve stejném období. Chemismus horniny byl vyjádřen pomocí pH zkoumaných lokalit a naměřených hodnot prvků Mg, Si, Ti, Fe, Mn, Cr, Ni pod každou stélkou. Efekt těchto proměnných na druhové složení fotobiontů jsem hodnotila rozkladem variability. Fylogenetické vzdálenosti mykobiontů i fotobiontů byly spočítány na základě unimetrických fylogenetických stromů a převedeny na hlavní osy pomocí analýzy hlavních koordinát (PCoA). V případě klimatu a chemismu jsem použila analýzu hlavních komponent (PCA). Pro rozklad variability jsem následně použila 30 hlavních os genetické vzdálenosti symbiontů, všechny komponenty klimatu (čtyři) i chemismu (osm).

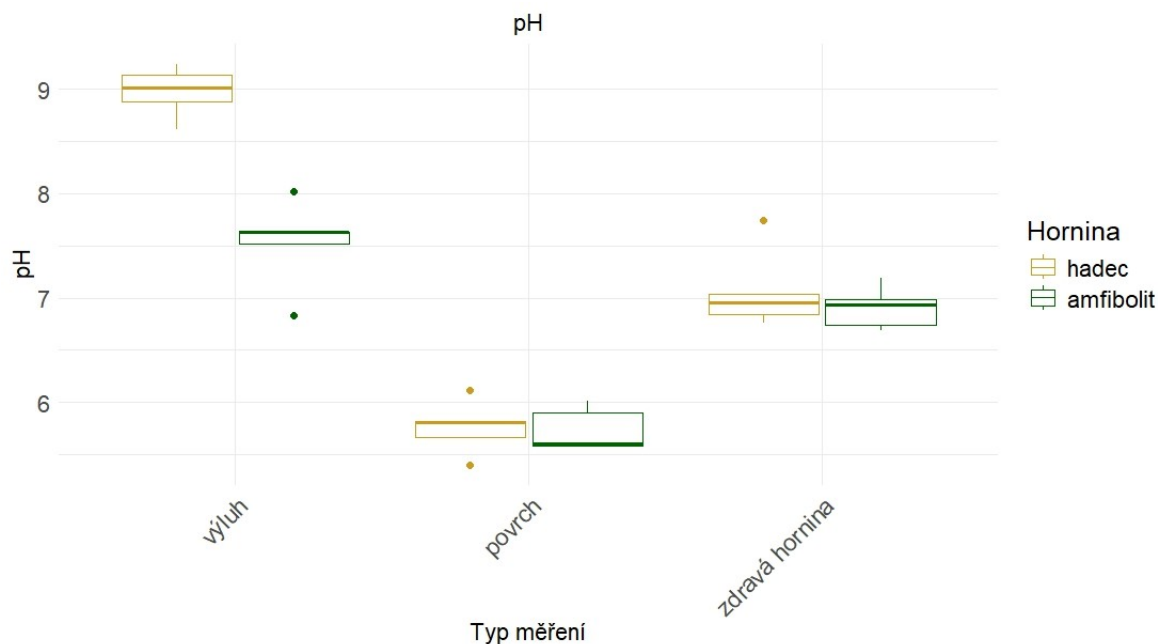
Balíčky využité pro tyto analýzy byly následující: dplyr (Wickham *et al.*, 2014), vegan (Oksanen *et al.*, 2001), corrplot (Wei *et al.*, 2021), caret (Kuhn *et al.*, 2023), phytools (Revell, 2024), geiger (Harmon *et al.*, 2023), ape (Paradis *et al.*, 2004), picante (Kembel *et al.*, 2020), ade4 (Dray *et al.*, 2023), rJava (Urbanek, 2024), venneuler (Wilkinson, 2024).

Skript pro statistické vyhodnocení získaných dat mi poskytl Pavel Škaloud.

4 Výsledky

4.1 pH a konduktivita

Vzhledem k tomu, že neexistuje standardizovaná metodika pro měření pH hornin, měřila jsem pH dvěma metodami, které jsem se rozhodla porovnat. Ukázalo se, že mezi výsledky obou měření je velký rozdíl. Nejvyšší hodnoty pH jsem naměřila ve výluhu z horniny namleté na analytickou jemnost (**Obr. 10**). Při této metodě dojde k namletí všech minerálů, které hornina obsahuje, čímž se zvětší povrch, který může reagovat s destilovanou vodou během louhování. Zároveň reakce povrchu namleté horniny s vodou probíhala po dobu dvou hodin, zatímco při použití druhé (povrchové) metody byl povrch kamene pokryt kapkou vody pouze po dobu jedné minuty. Aby byly obě metody porovnatelné, měřila jsem pH povrchovou metodou i na zdravé straně horniny, protože výluh z namleté horniny obsahoval převážně tu část horniny, která zvětrávacím procesem neprošla. Toto měření jsem však doplnila i o měření zvětralého povrchu, protože lišejníky jsou v kontaktu právě s touto vrstvou horniny. Mohla bych tak tímto typem měření získat hodnotu nejpodobnější tomu, s čím se lišejník na daném stanovišti setkává.



Obr. 10 Výsledky měření pH

Tab. 7 Výsledky t-testů pro hadec a amfibolit a různé metody měření

t-test	výluh		povrch		zdravá hornina	
	DF	p-hodnota	DF	p-hodnota	DF	p-hodnota
pH	6,2945	< 0,001	7,6355	0,8565	5,961	0,4404

Zatímco měření pH ve výluhu přineslo vysoké hodnoty (> 7) u hadce i amfibolitu, z měření zdravé horniny povrchovou metodou vyplynulo, že obě horniny vykazovaly subneutrální až neutrální pH. Rozdíl mezi hadcem a amfibolitem představuje v případě měření výluhu i více než jeden stupeň, zatímco při použití druhé metody se horniny téměř neliší. Při měření zvětřalého povrchu jsem naopak získala hodnoty spíše kyselé (< 7) a rozdíly mezi oběma horninami jsou výraznější (nikoliv signifikantní) než v případě měření zdravé horniny. Výsledky t-testů rozdílů naměřených hodnot na hadci a amfibolitu pro použité metody měření jsou uvedeny v **Tab. 7**.

Pro další analýzy jsem se rozhodla pracovat s hodnotami naměřenými z výluhu horniny, a to především z důvodu průběhu měření. Zatímco při stanovování pH z výluhu byl průběh měření vždy stejný (sonda byla vždy ponořena a umístěna v držáku, hodnota na pH metru vždy klesala/stoupala v průběhu měření, dokud nedošlo k jejímu ustálení), měření na povrchu položek se ukázalo jako problematictější. Po nanesení kapky vody na položku došlo v několika případech během oné jedné minuty „louhování“ k jejímu vsáknutí. Musela jsem ji proto nanášet opakovaně, protože sonda pH metru musí být pro správné měření v kontaktu s tekutinou (destilovaná voda, KCl). Celkový čas, po kterou mohl povrch s vodou reagovat se tak snížil. Zároveň docházelo během měření k výkyvům, jak jsem popsala v kapitole **3.9**.

Jednou ze tří měřených položek byla vždy položka, na které roste *Rhizocarpon geographicum* (pokud se na dané lokalitě vyskytoval). Tento lišejník sice není ekologicky příliš vyhraněný, ale preferuje spíše kyselé substráty (Wirth, 1995). Na hadci je pH vyšší než na amfibolitu, proto jsem se snažila ověřit, zda bude na hadcové hornině růst preferenčně na místech s nižším pH, než jaké panuje na zbytku lokality. Tento předpoklad se mi potvrdit nepodařilo, a to ani jednou z použitých metod.

Konduktivita naměřená ve výluhu z obou typů substrátu je velmi nízká, což znamená málo rozpuštěných iontů ve výluhu. Pro představu – pitná voda v ČR může mít podle vyhlášky č. 252/2004 Sb. konduktivitu max. $125 \mu\text{S}/\text{cm}$, doporučená konduktivita je pak $25\text{--}50 \mu\text{S}/\text{cm}$. Na hadcích jsem naměřila ve většině případů vyšší konduktivitu než na amfibolitech (**Tab. 8**). Výjimku tvoří amfibolitová lokalita Ráj, kde jsem naměřila konduktivitu srovnatelnou s hadcovými lokalitami. To je nejspíš způsobeno vysokým obsahem Fe na této lokalitě (**Obr. 12**). Vyšší konduktivitu na hadcích přikládám především vysokému obsahu Mg, Ca, Ni a Cr, ze kterých se mohou ionty uvolňovat.

Tab. 8 Průměrné hodnoty pH a konduktivity naměřené na jednotlivých lokalitách, jejich směrodatné odchylky (sd) a jejich průměry pro oba typy substrátu – **žlutá** = hadec, **zelená** = amfibolit, dvě po sobě následující lokality představují klimatický pár.

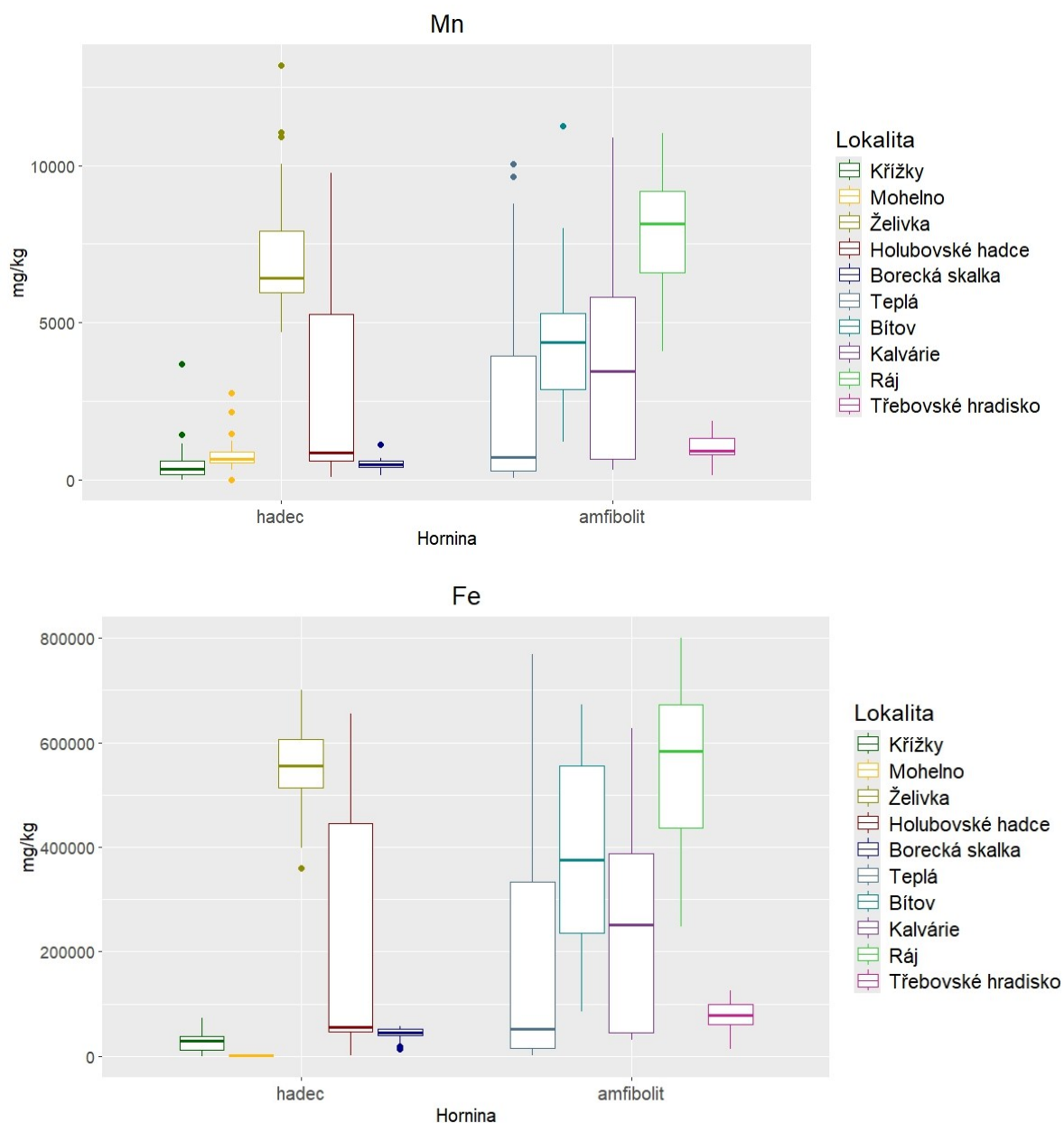
lokalita	pH výluh	sd	pH povrch	pH zdravá hornina	konduktivita (μS/cm)	sd (μS/cm)
Křížky	9,14	0,05	5,80	7,74	69,19	8,56
Teplá	7,52	0,07	5,58	7,19	31,65	6,62
Mohelno	8,89	0,07	5,39	6,96	60,61	6,35
Bítov	6,83	0,07	5,60	6,74	41,38	3,10
Borecká skalka	8,62	0,17	5,82	6,76	64,26	5,68
Třebovské hradisko	7,63	0,17	6,01	6,69	20,17	1,91
Želivka	9,01	0,17	6,11	6,84	74,06	3,40
Kalvárie	8,02	0,18	5,90	6,98	42,04	2,91
Holubov	9,24	0,18	5,67	7,04	53,81	3,80
Ráj	7,63	0,18	5,57	6,94	64,92	5,90
hadec	8,98	0,13	5,76	7,07	64,38	5,56
amfibolit	7,52	0,14	5,73	6,91	40,03	4,09

4.2 XRF

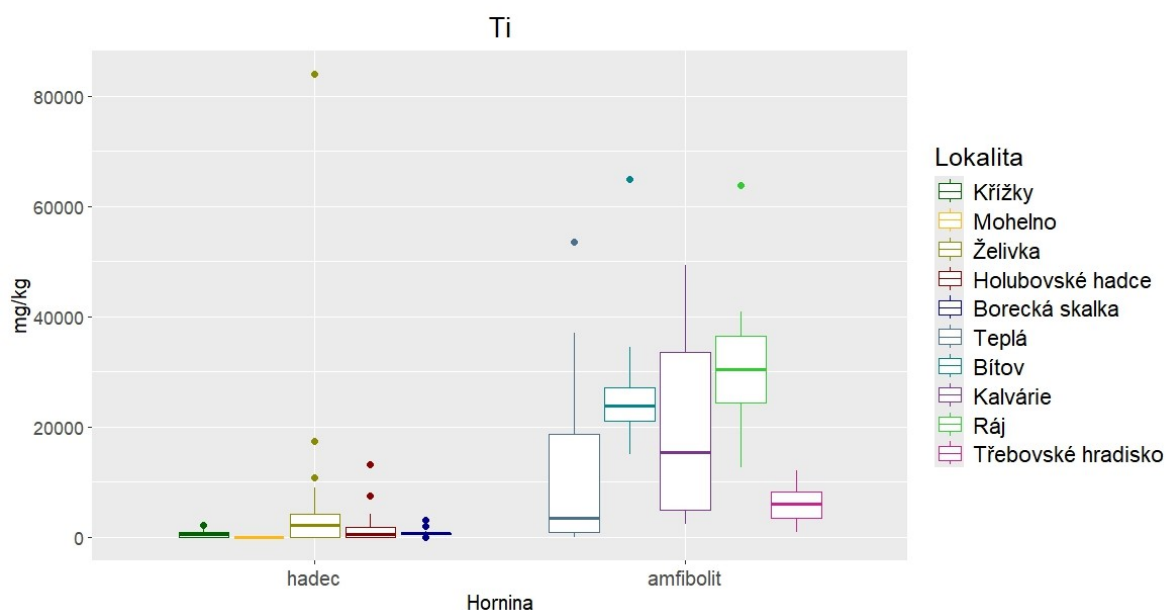
Celkem jsem na hadcích a amfibolitech provedla 337 měření obsahu těžkých kovů přenosným XRF analyzátozem. Počet měření se v rámci všech lokalit různil, neboť jsem měřila vždy přes stélku sbíraného lišejníku a počet sbíraných lišejníků se na každé lokalitě lišil. Abych získala co nejvěrohodnější obraz o prvkovém složení horniny na dané lokalitě, využila jsem všechna měření včetně těch, která byla provedena přes stélku, ze které se mi nepodařilo získat sekvenci mykobionta (nebo jsem molekulárně potvrdila jiný druh mykobionta či lichenikolní houbu). Celkem jsem tak provedla 191 měření hadcové horniny a 146 měření horniny amfibolitové.

Ačkoliv se v literatuře uvádí, že hadce obsahují velké množství Ni, Cr a Co (Faust *et al.*, 1956; Faust & Fahey, 1962), má měření potvrdila pouze vysoký obsah Ni a Cr (**Obr. 11**). Oba tyto prvky se v největší míře vyskytují na třech hadcových lokalitách – Mohelenské hadcové stepi, Želivce a Holubovských hadcích. Na amfibolitech se tyto kovy vyskytují minimálně. Jak ukazuje krabicový graf obsahu Co (**Obr. 11**), jediná lokalita, na které byl naměřen vysoký obsah tohoto prvku, je Mohelenská hadcová step. Na ostatních lokalitách nebyl ve většině měření vůbec detekován, případně se zde vyskytuje ve větších koncentracích (i více než 5000 mg/kg), ale pouze ojediněle, a to i na amfibolitových lokalitách.

Výsledky měření prokázaly, že i amfibolity jsou bohaté na některé těžké kovy, konkrétně mangan (Mn), železo (Fe) a titan (Ti). Mangan a železo se na amfibolitových lokalitách vyskytuje ve většině případů ve větším množství než na hadcových lokalitách. Jedinou výjimku tvoří Želivka – na této lokalitě se vyskytuje v hadci více obou prvků než na většině amfibolitových lokalit (**Obr. 12**). V případě Ti je jeho množství v amfibolitech výrazně vyšší než v hadci napříč všemi lokalitami (**Obr. 13**).



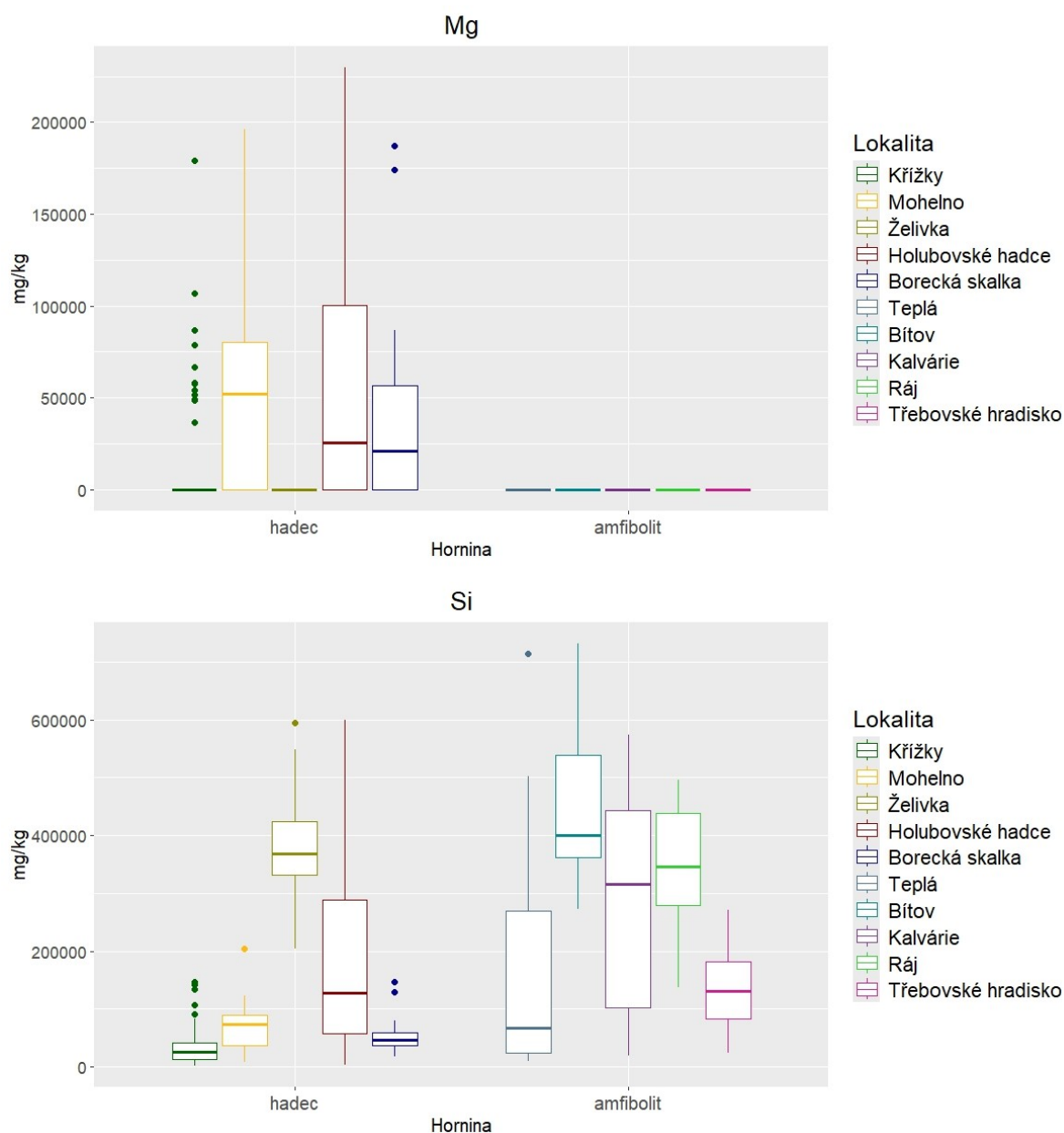
Obr. 12 Krabicový graf obsahu Mn a Fe měřeného pomocí XRF analyzátoru



Obr. 13 Krabicový graf obsahu Ti naměřeného pomocí XRF analyzátoru

Posledními dvěma prvky, kterými jsem se zabývala, jsou hořčík (Mg) a křemík (Si). V případě těchto prvků se nejedná o těžké kovy, ale jsou to prvky, které jsou ve zkoumaných horninách významně zastoupené a přispívají tak k charakteristice daného typu horniny. Je obecně známo, že hadce jsou bohaté na Mg, což se mým měřením potvrdilo. Jak ale popisuji v kapitole 3.10 věnující se metodice měření XRF analyzátozem, Mg je sice nejlehčím prvkem, jehož obsah v hornině je možné XRF analyzátozem změřit, ale přesto je jeho měření nepřesné. V mnoha případech bylo jeho množství pod limitem detekce, ačkoliv jiná měření z dané lokality potvrdila vysoký obsah Mg. Měření tohoto prvku je proto nutné brát s rezervou a uvádím jej spíš pro zajímavost a demonstraci limitů této metody. Jedinou lokalitou, kde se Mg nepodařilo detekovat vůbec, byly Hadce u Želivky (**Obr. 14**). Chemický vzorec hadce je $M_3T_2O_5(OH)_4$, kde M může být nahrazeno Mg, Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al, Ni, Mn^{2+} , Zn, zatímco místo T může být obsazeno Si, Al, Fe^{3+} . Zároveň je hadec tvořen především minerály serpentinu, kterými jsou antigorit, lizarit a chrysolit, které mají stejné složení – $Mg_3Si_2O_5(OH)_4$, a vznikly hydrotermální alterací z železito-hořečnatých silikátů jako olivín a pyroxen (Rakovan, 2011). Přítomnost Mg na všech hadcových lokalitách je vzhledem k jejich původu nutná. Hořčík byl navíc v položce z Želivky naměřen metodou SEM-EDS v podobném množství jako v položce z Mohelenské hadcové stepi.

Křemík se vyskytuje v obou horninách. V případě většiny klimatických párů převažuje jeho množství v amfibolitech (**Obr. 14**).



Obr. 14 Krabicový graf obsahu Mg a Si naměřeného pomocí XRF analyzátoru

Rozdíly v prvkovém složení se ukázaly ve většině případů jako signifikantní (Tab. 10). Minimální, maximální a průměrné hodnoty naměřených prvků a směrodatné odchylky daných měření uvádím v Tab. 11.

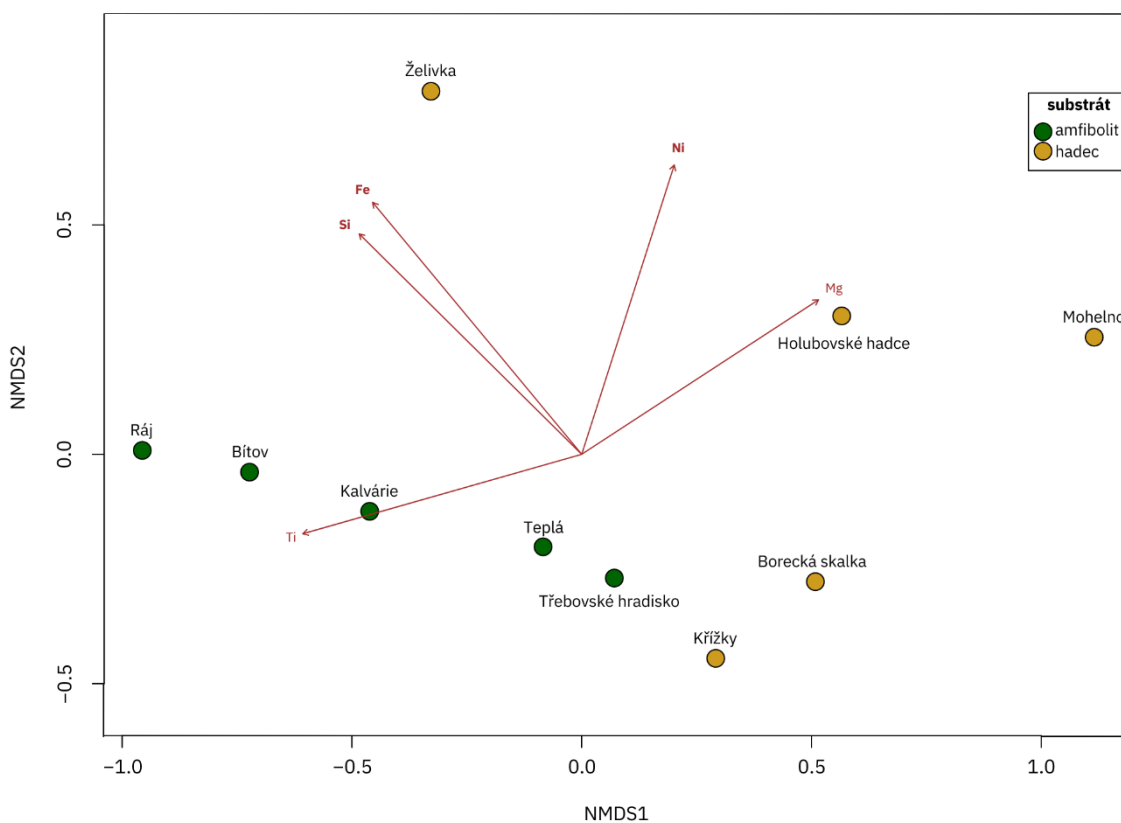
Jelikož jsem chtěla mít představu o obsahu prvků v hornině/stélce všech sbíraných lišejníků, snažila jsem se změřit prvkové složení i v lišejnících druhu *Cladonia pyxidata*. Ukázalo se ale, že tato měření jsou mnohdy nemožná, nejspíš kvůli nerovnosti povrchu (přízemní šupiny) nebo malé šířce podcecia. Docházelo pak k měření volného vzduchu a tato měření byla často zrušená předčasně. Nedokončená měření jsem z analýz vyloučila.

Na některých lokalitách (Křížky, Mohelno) jsem provedla i měření nezvětralé části horniny. Na Křížkách byl obsah prvků měřený pod převisem ve všech případech vyšší, než je průměr měření přes stélku lišejníku v rámci celé lokality. Na Mohelně bylo totéž prokázáno ve všech případech kromě Cr (**Tab. 9**).

Tab. 9 Výsledky měření obsahu prvků ve zdravé hornině, žlutě zvýrazněné jsou vyšší z naměřených hodnot, všechny hodnoty jsou uvedeny v mg/kg.

	Mg	Si	Cr	Ni	Fe
Mohelno průměr	50386,8	66067,6	10023,45	46529,3	1121,36
Mohelno zdravá hornina	128250,0	159950	3224	61500	1545
Křížky průměr	941,0	30740,0	625,1	669,9	27773,3
Křížky převis	115150,0	104600	879	1957,5	66950

Rozdíly obou substrátů na základě prvkového složení jsem ověřila pomocí NMDS (**Obr. 15**) – lokality sice vytvářejí dvě skupiny, ovšem nejedná se o dva oddělené clustery. Ze vzdálenosti mezi jednotlivými lokalitami lze navíc odvodit, že mají horniny různé chemické složení, a to i v rámci stejného typu horniny.



Obr. 15 NMDS diagram zobrazující rozdílnost lokalit na základě jejich chemismu (průměrný obsah Mg, Si, Ti, Fe a Ni), tučně jsou vyznačeny signifikantní proměnné, Euklidovská metrika, stres = 0,027

Tab. 10 Výsledky t-testů naměřených prvků pro hadce a amfibolity

t test	Mg		Si		Ti		Cr		Mn		Fe		Ni	
	DF	p-hodnota	DF	p-hodnota	DF	p-hodnota	DF	p-hodnota	DF	p-hodnota	DF	p-hodnota	DF	p-hodnota
Křížky + Teplá	38	0,1661	35,2	<0,001	34	<0,001	46	<0,001	36,8	<0,001	35,2	<0,001	49,5	<0,001
Mohelno + Bítov	51	<0,001	28,9	<0,001	26	<0,001	47	<0,001	26,4	<0,001	27	<0,001	51,3	<0,001
Želivka + Kalvárie	x	x	37,8	0,029	29	<0,001	29,3	<0,001	37,3	<0,001	34,3	<0,001	32	<0,001
Holubovské hadce + Ráj	24	<0,001	45,5	<0,001	24	<0,001	24	<0,001	44,9	<0,001	45	<0,001	25	>0,0035
Borecká skalka + Třebovské hradisko	21	<0,001	24,9	<0,001	22	<0,001	23,3	<0,001	27,2	<0,001	26,6	<0,001	21,6	<0,001
hadec + amfibolit	170	<0,001	259	<0,001	139	<0,001	173	<0,001	269	<0,001	287	<0,001	182	<0,001

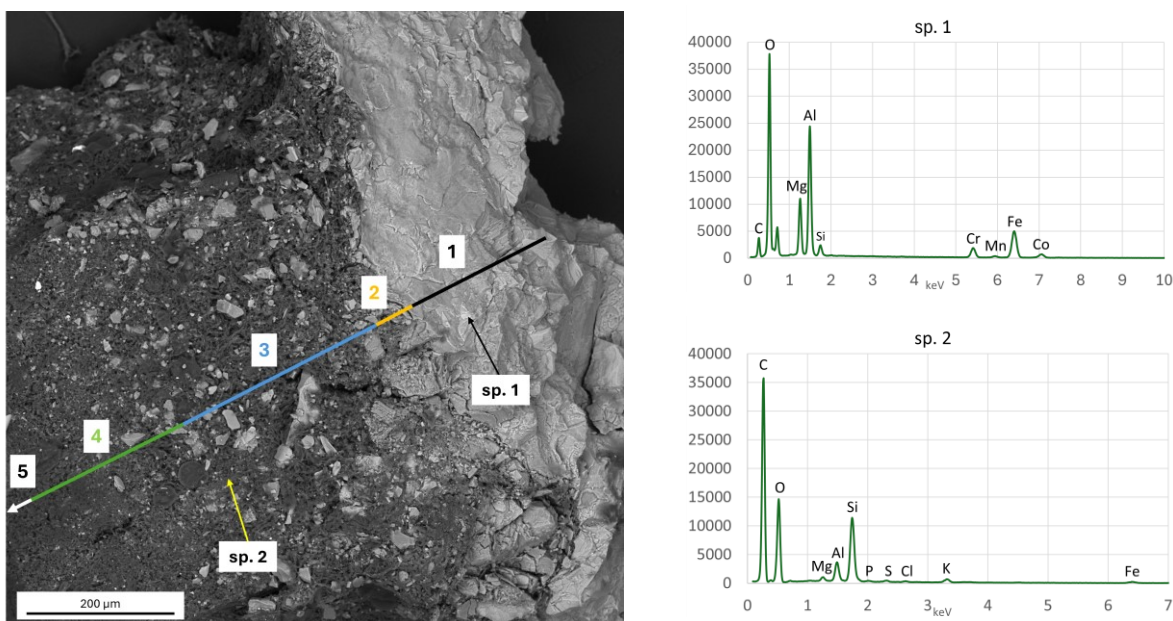
Tab. 11 Minimální (min) a maximální (max) naměřené hodnoty XRF analyzátozem, jejich průměry a směrodatné odchylky jednotlivých měření. Odlehle hodnoty jsou vyloučeny. Všechny hodnoty jsou uvedeny v mg/kg, nd = nedetekováno, pod limitem detekce. Žluté jsou označeny hadce, zelené amfibolity, dvě po sobě následující lokality představují klimatický pár.

		Mg	Si	Ti	Cr	Mn	Fe	Ni	Co
Křížky	min–max průměr ± SD	nd–36700 941 ± 187493,6	2405,5–91900 30740 ± 540,1	nd–1930,5 nd ± 1930,5	nd–1862 625,1 ± 55	nd–1155,5 382,9 ± 2353,5	418,5–72750 27773,3 ± 306,3	nd–1970 669,9 ± 20	nd nd ± 687,2
Teplá	min–max průměr ± SD	nd nd	9617–268950 147528,6 ± 1175,1	nd–11681,5 10322,2 ± 399,3	nd nd	48–953,5 2263,2 ± 112,9	1241–112550 196679,9 ± 866,4	nd–105,5 12,9 ± 2,2	nd nd
Mohelno	min–max průměr ± SD	nd–196100 50386,8 ± 53648,1	8383–123450 66067,6 ± 999,6	nd nd ± 22606,6	1331,5–31436,5 10023,4 ± 136	304–1241 704,3 ± 734,6	121–2495,5 1121,4 ± 40,5	16129–72850 46529,3 ± 566,4	197–880,5 580,9 ± 30,1
Bítov	min–max průměr ± SD	nd nd	272250–732250 445389,7 ± 2424,1	14950–34450 24339,3 ± 1125	nd–777 145,2 ± 36	1209,5–8000 4304,3 ± 320,7	85900–673000 386467,2 ± 1982,8	nd–2000,5 551,5 ± 107,7	nd nd
Želivka	min–max průměr ± SD	nd nd	203600–548250 366750 ± 1851,5	nd–8850 2348,5 ± 409,6	2501–22182 10957,7 ± 363,1	4677,5–10046,5 6741,3 ± 362,3	398500–700200 563153,1 ± 1828,1	16800–58600 39512 ± 726,6	nd nd
Kalvárie	min–max průměr ± SD	nd nd	19642–574000 296108,4 ± 1568,6	2408–49400 22036,3 ± 530,3	nd–1809,5 140,1 ± 24,6	296,5–10881,5 3603,5 ± 140,9	30300–627350 256820,9 ± 1113,4	nd–865 167,4 ± 30,5	nd nd
Holubovské hadce	min–max průměr ± SD	nd–208400 51132,7 ± 45725	3414,5–599800 185026,7 ± 1400,8	nd–4200 982,26 ± 5828,1	nd–17600 4707 ± 160,5	84,5–9749,5 2780,1 ± 128,8	1821–654550 211659,5 ± 921,3	39,5–50500 12442,3 ± 218,2	nd nd ± 386,3
Ráj	min–max průměr ± SD	nd nd	103000–496600 332609,6 ± 1967,3	12550–40900 29564 ± 854	nd nd	4088–12828,5 7934,3 ± 321,6	247750–837150 560473,1 ± 1886,5	nd–2100 557,2 ± 110,8	nd nd
Borecká skalka	min–max průměr ± SD	nd–86650 25526,1±5191,3	17328,5–79200 44803 ± 711,4	383–950,5 605,8 ± 125,5	252–2026 998,6 ± 34,8	124–676 468,4 ± 27,2	21878–56550 45488,7 ± 493,4	436–1712,5 1121,6 ± 23,4	nd nd
Třebovské hradisko	min–max průměr ± SD	nd nd	25003–271000 128271,9 ± 1240,6	869,5–12035,5 6189,3 ± 255,3	nd–189,5 55,1 ± 10,9	131–1875 998,5 ± 39,6	12927,5–149000 81343,6 ± 679,1	nd–146,5 66,5 ± 9,6	nd nd

4.3 SEM-EDS

Pomocí SEM se mi podařilo vizualizovat průřez stélkou lišejníku a její svrchní i spodní povrch. Zatímco tmavé struktury představují organickou hmotu (tedy stélku lišejníku), světlá místa představují horninu, případně její částice (**Obr. 16**). Právě tyto částice mě nejvíce zajímaly vzhledem k tomu, že jsou v přímém kontaktu se stélkou lišejníku. Rozdíly ve světlosti pozorovaných struktur jsou způsobené rozdílnými atomovými čísly prvků, které jsou v nich obsažené. Svítivější (světlejší) místa tedy obsahují prvky s vyšším atomovým číslem. Taková místa jsme s M. Vítkovou vytipovaly a nechaly změřit jejich obsah prvků pomocí EDS. Celkem jsme provedly 120 měření obsahu prvků ve stélkách lišejníků a částicích horniny v 15 vzorcích pocházejících z pěti položek ze čtyř lokalit a obou typů substrátu (viz **Tab. 6.**, kapitolu 3.11). Uvádím zde pouze výsledky nejzajímavějších měření.

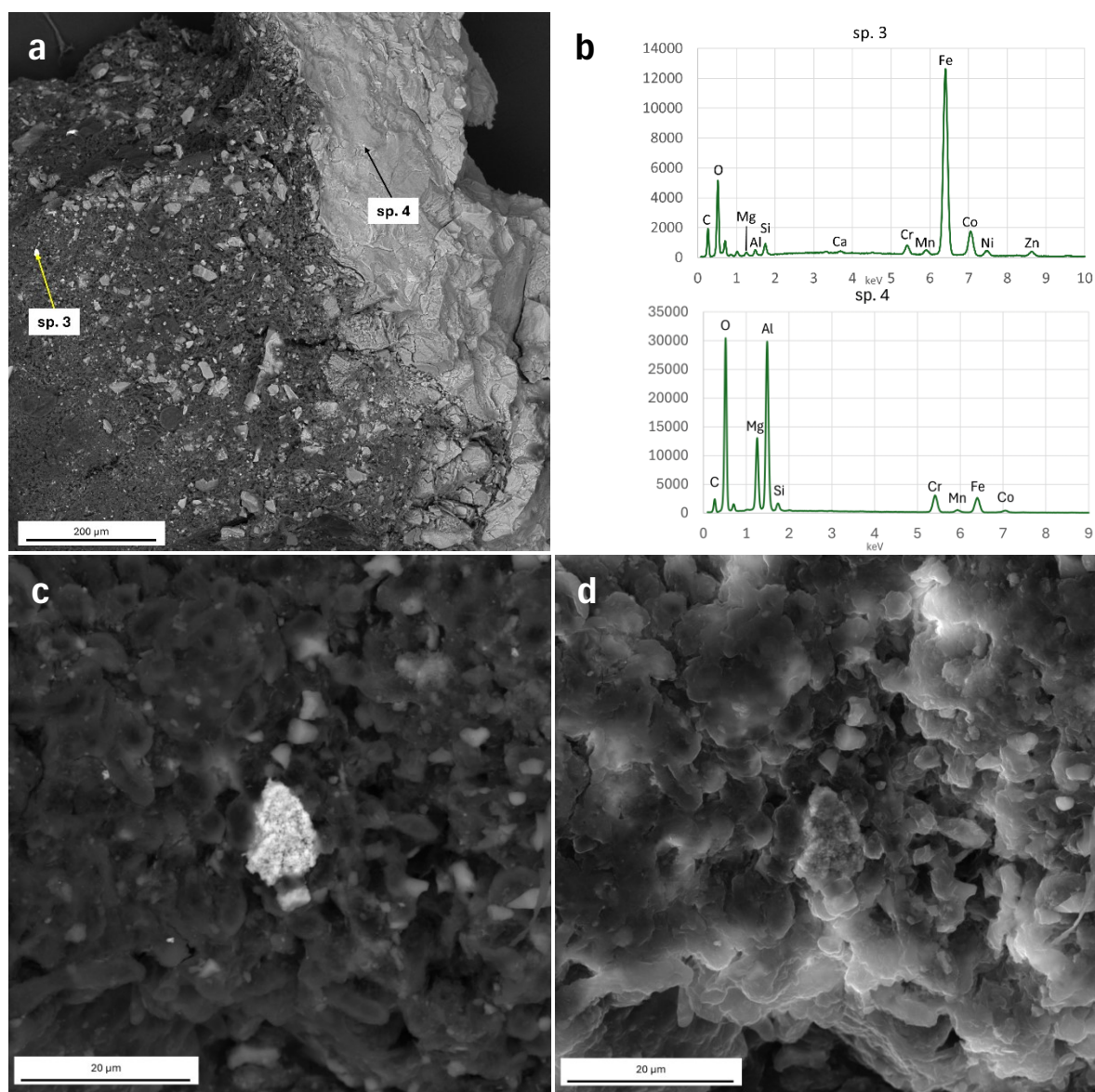
Po vykreslení spektra má každý prvek na ose x jedinečnou pozici určenou množstvím odražené energie – díky tomu lze jednotlivé vrcholy spektra identifikovat. Výška jednotlivých vrcholů pak odpovídá počtu countů za vteřinu a je možné z ní vyčíst koncentrace daného prvku ve vzorku. Ovšem nejedná se o přesné hodnoty jako spíš o orientační informaci o prvkovém složení vzorku – prvky, které se ve vzorku vyskytují v největší míře (>10 hm.%) budou mít vrcholy nejvyšší, minoritní prvky (1–10 hm. %) mají vrcholy nízké a stopové prvky mají vrcholy ještě nižší, případně vůbec nejsou detekovatelné (Rasch *et al.*, 2024).



Obr. 16 Vlevo: Příčný řez stélkou lišejníku *Lecanora rupicola* z Mohelenské hadcové stezi ze SEM (BSE), barevně jsou zaznačené jednotlivé části stélky a horniny: 1 – hornina, 2 – přechodová vrstva mezi horninou a stélkou lišejníku, 3 – dřeň, 4 – vrstva fotobionta, 5 – korová vrstva a svrchní povrch stélky, šipky s označením sp. 1 a 2 označují body měření EDS. Vpravo: Spektra zobrazující prvkové složení v bodech měření.

Ve většině případů patřily svítivé částičky oxidům železa, ale prokázala se i přítomnost jiných těžkých kovů – především Ni a Cr v případě hadce, Ti v případě amfibolitu. Hlavním parametrem potvrzujícím rozdíl mezi anorganickou a organickou hmotou je (ne)přítomnost C, který je v organické hmotě více zastoupen než v hmotě anorganické. To je zřejmé z **Obr. 16**, ze kterého je

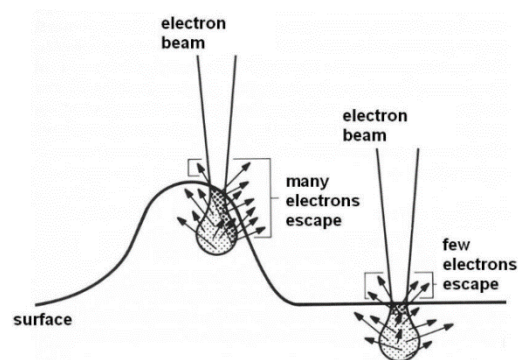
ale patrný i rozdíl v prvkovém složení horniny a stélky lišejníku. Je na něm fotografie příčného řezu stélkou lišejníku *Lecanora rupicola* z Mohelenské hadcové stepi. Je zřejmé, že zatímco hornina (v tomto případě hadec) obsahuje značné množství Mg, O a Al a menší množství Fe, C, Cr, Co, Mn a Si, stélka lišejníku obsahuje především velké množství C, O a Si. Hliníku a Mg zde nalezneme oproti hornině málo a některé prvky (Cr, Mn, Co) zde nenalezneme vůbec. Chlor sice v hornině také nebyl naměřen, ale jeho výskyt ve stélce lišejníku nepovažuji za relevantní vzhledem k jeho nízkému obsahu a možnosti, že byl na vzorek nanesen při manipulaci s ním jako kontaminace – např. ve formě potu (NaCl) z rukou.



Obr. 17 **a** – příčný řez stélkou lišejníku *Lecanora rupicola* z Mohelenské hadcové stepi, šipky označují body měření (BSE), **b** – spektra prvků naměřených v bodech měření, **c** – detail měřené částičky horniny (sp. 3) ve stélce (BSE), **d** – stejná částička horniny zobrazená snímáním SE

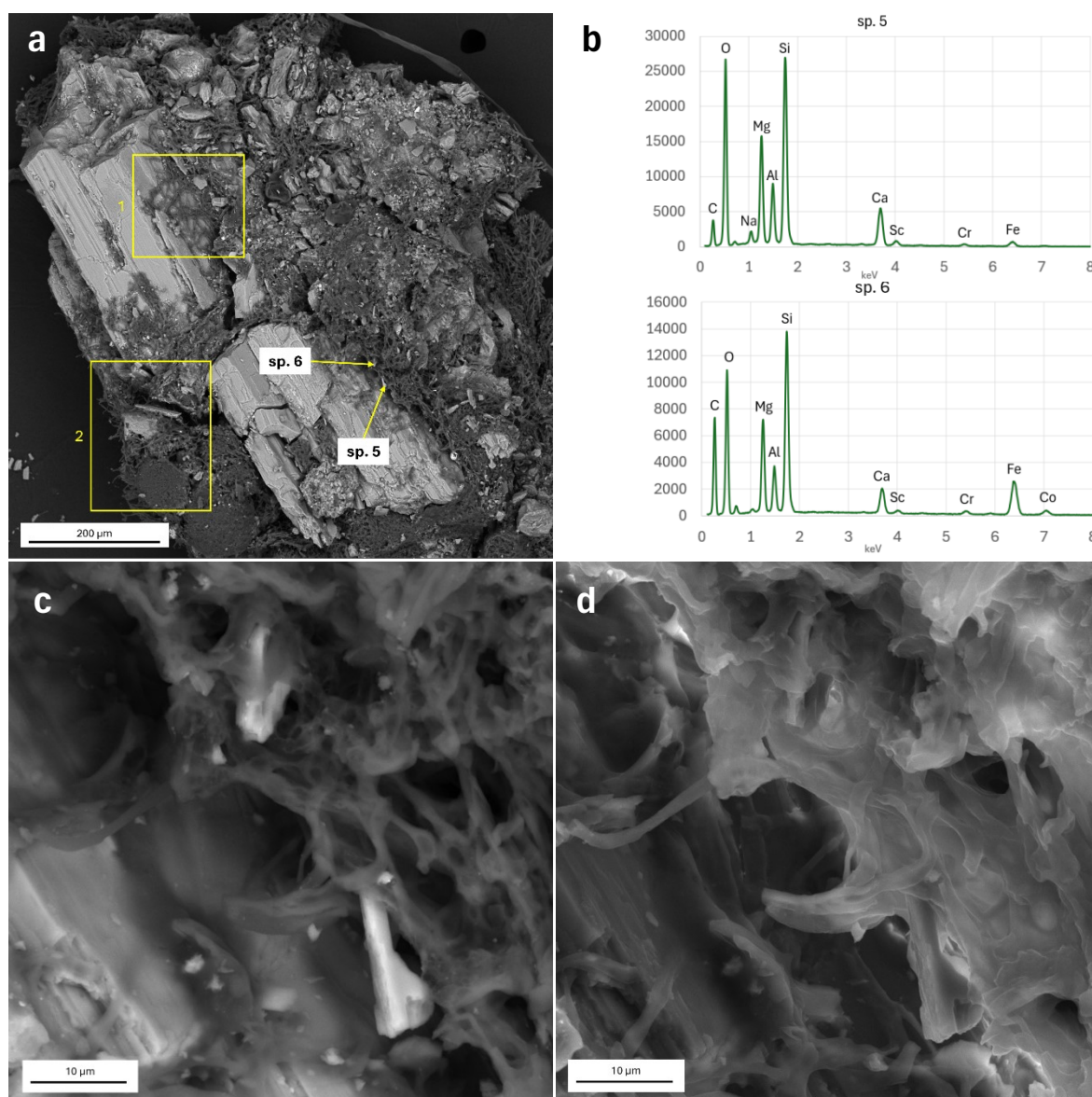
Ze stejného průřezu stélkou jsem získala další dva zajímavé výsledky z měření podložní horniny a částice ve stélce lišejníku (**Obr. 17**). V tomto případě je však nutné si všimnout odlišného množství countů zachycených za vteřinu na ose y – v tomto případě nelze pouze porovnat výšku vrcholů jednotlivých prvků a vyvozovat z ní závěry o množstevním zastoupení jednotlivých prvků. Zatímco obsah prvků v místě měření ve svrchní části horniny je lehce nadhodnocený (celkem změřeno 117 hm. %), měření částice, která se nachází ve stélce lišejníku, nedosáhlo 100 hm. %, ale pouze 69 hm. %. Je však zřejmé, že se částice i pevná hornina v obsahu prvků částečně překrývají a v obou tak nalezneme následující prvky: C, O, Mg, Al, Si, Cr, Mn a Co. V částici ve stélce se vyskytuje navíc Zn.

Potvrzení o včlenění měřené částičky do stélky lišejníku jsem získala pomocí snímání SE, tedy zobrazení topografie povrchu vzorku (**Obr. 17d**). Ze snímku je patrné, že je částice překrytá houbovými hyfami. Na tomto obrázku je také možné si povšimnout hranového efektu, což je jev, ke kterému dochází při snímání SE a použití vysokého urychlovacího napětí elektronů. Jak už název tohoto jevu napovídá, hranový efekt se projevuje na hranách nebo jiných ostrých výčnělcích vzorku. Na rovné ploše je část elektronů vzorkem absorbována, zatímco na hraně, kde je větší část reakčního objemu u povrchu, nedojde k absorbování těchto elektronů (**Obr. 18**). To se projeví jako světlejší, přesvícená oblast (Juříková, 2021; Krumeich, 2023).



Obr. 18 Schéma vzniku hranového efektu (Krumeich, 2023)

Inkorporaci částic do prothallu lišejníku *Lecidella carpathica* ze Želivky zobrazuje **Obr. 19**. V tomto případě jsem nesnímala příčný řez stélkou, ale samotný povrch stélky i horniny, na které tento lišejník roste. Kromě prothallu, stélky a apothecií je možné vidět i sinice, které jsem podle jejich morfologie zařadila do rodu *Stigonema*. Prvkové zastoupení měřených částic odpovídá hadcové hornině – obsahuje Mg a stopové množství Cr a v případě jedné z částic i Co. Zajímavá je stopová přítomnost stroncia (Sc), které se v jiných měřeních nevyskytuje. Z téměř shodného prvkového složení lze také usuzovat, že se jedná o částičky stejného původu.

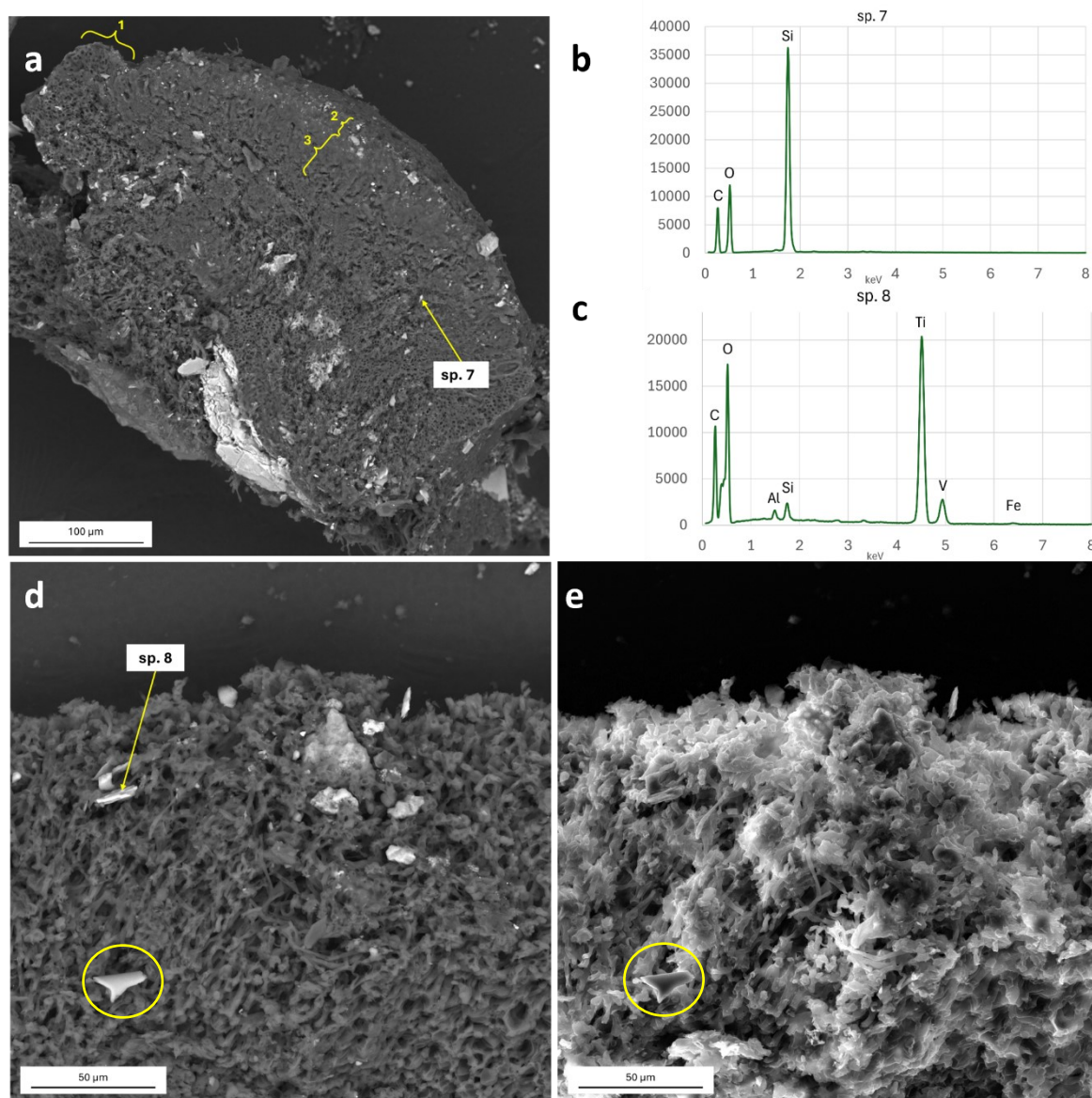


Obr. 19 **a** – svrchní povrch lišejníku *Lecidella carpathica* ze Želivky, šipky označují body měření (BSE), **1** = prothallus, **2** = volně žijící sinice **b** – spektra prvků naměřených v bodech měření, **c** – detail obou měřených částic (BSE), **d** – detail obou měřených částic (SE)

Na řezu apotheciem lišejníku *Lecidea fuscoatra* z PR U doutné skály (**Obr. 20 a** – příčný řez apotheciem lišejníku *Lecidea fuscoatra* z PR U doutné skály (BSE), šipka označuje místo měření, **1** = okraj apothecia, **2** = epithecium, **3** = thecium (hymenium), **b + c** – spektrum prvků naměřených v místech měření, **d** – detail spodního povrchu stélky lišejníku *Acarospora fuscata* (BSE), šipka označuje místo měření, kroužek zvýrazňuje částici na povrchu vzorku, **e** – detail spodního povrchu stélky lišejníku *Acarospora fuscata* (SE)) je možné pozorovat lokalizaci částic horniny uvnitř apothecia. Částice se ve větší míře vyskytují pouze ve svrchní vrstvě apothecia (epithecium) a pod výtrusorodou vrstvou (hymenium), zatímco v hymeniu je jejich výskyt značně omezen. Měřená částice byla méně svítivá, čemuž odpovídá i její prvkové složení. Nenacházejí se v ní žádné těžké kovy – obsahuje pouze C, O

a Si. Ačkoliv není možné určit přesný chemický vzorec dané sloučeniny, lze předpokládat, že se jedná o zrníčko křemene (s chemickým vzorcem SiO_2). Část C může být také falešným signálem pocházejícím z pokovení vzorku, které se provádí právě uhlíkem.

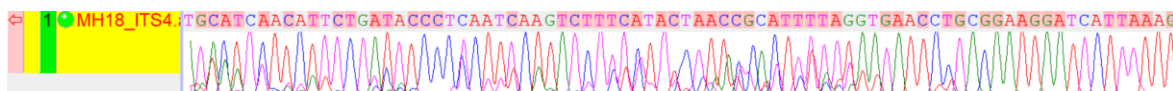
Zbývající dvě fotografie zobrazují spodní povrch stélky lišejníku *Acarospora fuscata* z Ráje. Měřená částice obsahuje přibližně 25 hm. % Ti, což je těžký kov, který byl ve vysoké míře naměřen i XRF analyzátozem na všech amfibolitových lokalitách (viz kapitolu 4.2). Tato částice je začleněná do stélky lišejníku, jak ukazuje **Obr. 20**. Na těchto dvou fotografiích lze spatřit rozdíl v tom, jak vypadá při snímání topografie povrchu částice, která je zarostlá ve stélce a která je pouze na povrchu vzorku (v kroužku). Zajímavá je častá přítomnost zirkonů v poloze RA10 z Ráje, které zde byly hojně přítomné na povrchu stélky lišejníku *Protoparmeliopsis muralis*. V této poloze byly přítomné i částice čistého Fe bez přítomnosti O.



Obr. 20 a – příčný řez apotheciem lišejníku *Lecidea fuscoatra* z PR U doutné skály (BSE), šipka označuje místo měření, 1 = okraj apothecia, 2 = epithecium, 3 = thecium (hymenium), b + c – spektrum prvků naměřených v místech měření, d – detail spodního povrchu stélky lišejníku *Acarospora fuscata* (BSE), šipka označuje místo měření, kroužek zvýrazňuje částici na povrchu vzorku, e – detail spodního povrchu stélky lišejníku *Acarospora fuscata* (SE)

4.4 Mykobionti

Získání sekvencí mykobiontů se u některých položek ukázalo jako náročné z důvodu častého napadení sbíraných lišejníků lichenikolními houbami (**Obr. 21**). Pro extrakci DNA jsem se snažila vybírat pouze části stélek, které nevykazovaly viditelnou přítomnost lichenikolních hub – tedy ve většině případů nejmladší části stélek (okraje laloků, areol). V mnoha případech však získaná sekvence nebyla kvalitní a musela jsem proto opakovat PCR. Pokud nedošlo ke zlepšení kvality sekvence, přistoupila jsem k opětovné izolaci DNA. Ani to ale nebylo v některých případech zárukou úspěchu a sekvenci se mi z 49 stélek lišejníků opakovaně nepodařilo získat.

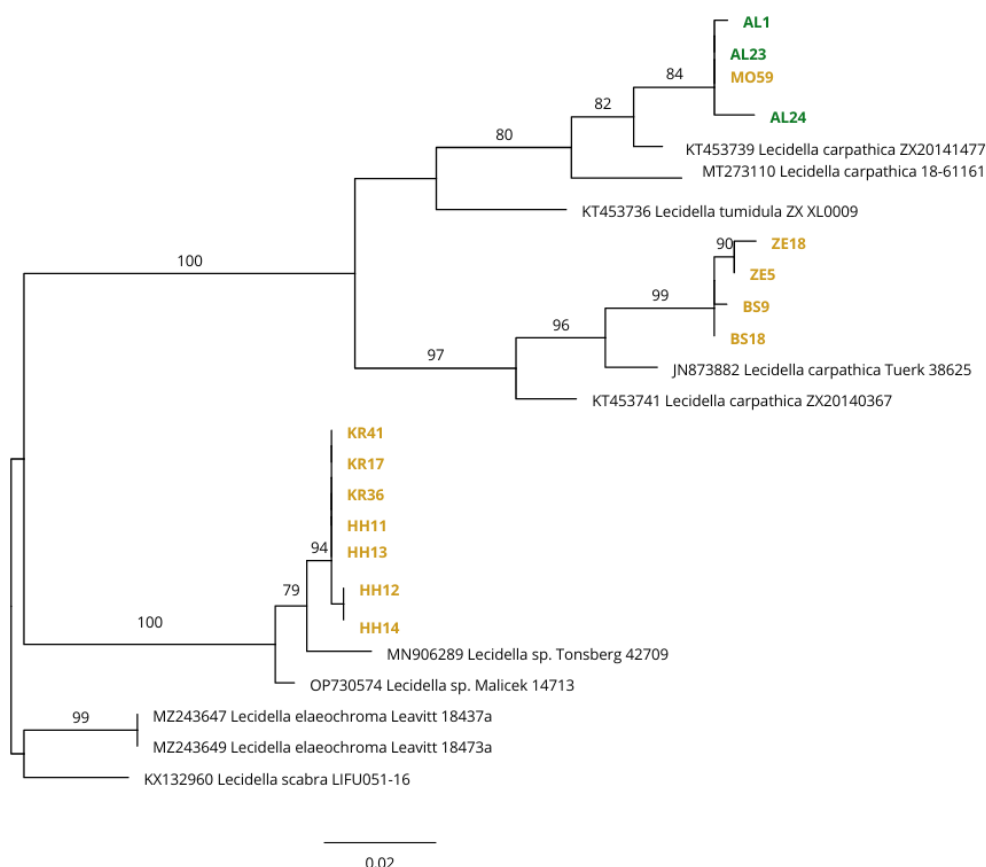


Obr. 21 Sekvence lišejníku *Lecanora polytropa* z Křížků obsahující mykobionta a lichenikolní houbu

Z celkového počtu 278 sebraných stélek lišejníků jsem získala sekвени a molekulárně potvrdila identitu 203 mykobiontů. Ve 26 případech byla sice sekvence kvalitní, ale prokázala příslušnost k jinému druhu lišejníku, než jak jsem jej morfologicky určila. Pokud se jednalo o druh lišejníku, který nepatřil mezi 11 mnou sbíraných druhů, tak jsem sekвени vyřadila. Pro další zpracování jsem použila pouze vzorky, u kterých se mi podařilo získat sekвени DNA obou symbiontů, celkem jsem tedy pracovala se 157 vzorky. **Tab. 12** zobrazuje, z kolika položek z dané lokality se mi povedlo získat kvalitní sekвени obou symbiontů. Vzhledem k tomu, že se počet sebraných druhů lišejníků na spárovovaných lokalitách různí, jsem se rozhodla upustit od porovnávání fotobiontů v rámci klimatických párů a přistoupit k porovnání fotobiontů lišejníků celkově z obou typů horniny. Osmdesát položek pochází z hadce a 77 z amfibolitu.

Tab. 12 Počet položek s potvrzeným mykobiontem i fotobiontem na každé z lokalit, prázdná buňka = 0, **žlutá** = hadec, **zelená** = amfibolit

druh	Křížky	Teplá	Holubovské hadce	Ráj	Mohelno	Bítov	Želivka	Kalvárie	Borecká skalka	Třebovské hradisko
<i>Acarospora fuscata</i>		1	1	2			1		1	3
<i>Candelariella coralliza</i>	1	1		3		1				
<i>Candelariella vitellina</i>	1		2		2	1	3	2	4	3
<i>Cladonia pyxidata</i>	3	2	3		2	4	1	4	2	3
<i>Lecanora polytropa</i>	2	3		2		2		1		3
<i>Lecanora rupicola</i>	2		3		3	2		3	2	
<i>Lecidea fuscoatra</i>	2	3		3		1	1	1	2	5
<i>Lecidella carpathica</i>	3		4		1		2	3	2	
<i>Protoparmeliopsis muralis</i>	1			1			3	4	1	3
<i>Rhizocarpon geographicum</i>	3	5	3	1	4	1	3	1		
<i>Pertusaria chiodectionoides</i>	1						3		1	

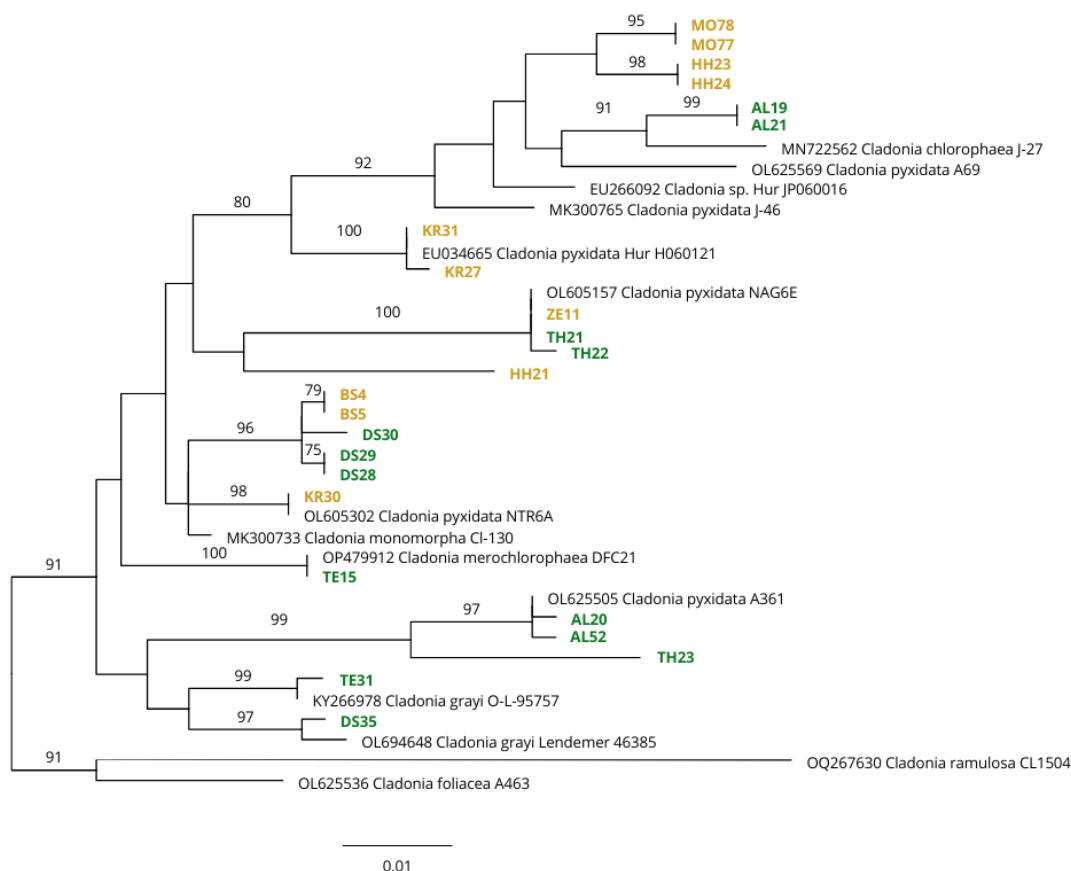


Obr. 22 Nezakořeněný fylogenetický strom mykobiontů náležících do druhu *Lecidella carpathica* vytvořený metodou ML na základě úseku ITS rDNA. Čísla nad větvemi zobrazují ML bootstrap, zobrazeny jsou hodnoty >75. Tučně vyznačené vzorky pocházejí z této práce, barva určuje typ substrátu – žlutá = hadec, zelená = amfibolit.

U některých položek druhu *Lecidella carpathica* (HH11–14, KR36, KR41) jsem zaznamenala pouze nízkou shodu se sekvencemi úseku ITS v rámci databáze GenBank. Tyto položky vykazují shodu 93–95 % s lišejníkem *Lecidella scabra*, avšak žádná z položek netvoří soredie, jsou naopak bohatě plodné. Nejvyšší shoda (> 98 %) byla nalezena se sekvencemi MN906289 a OP730574. První zmíněná sekvence pochází z Aljašky z několika sorediosních i nesorediosních bohatě plodných položek určených pouze do rodu *Lecidella*. Tyto položky obsahovaly xanthony a atranorin (McCune *et al.*, 2020). Druhá sekvence pochází z lišejníku *Lecidella* sp., který byl nalezen J. Malíčkem v PR Ptačí stěna v Blanském lese (Malíček, 2022). Mé položky pocházejí jednak z PR Holubovské hadce (všechny s kódem HHxx), která je od výše zmíněné lokality vzdálená 11,7 km vzdušenou čarou a nachází se také v pohoří Blanský les, a jednak z NPR Křížky (kód KRxx). Zatímco v NPR Křížky i PR Holubovské hadce byly lišejníky tohoto druhu nalezeny rostoucí na hadcovém substrátu, PR Ptačí stěna leží celou svou rozlohou na granulitové podložní hornině. Stejně jako položky J. Malíčka vykazovaly všechny mé položky K+ žlutou reakci, naopak C+ oranžovou reakci jsem však zaznamenala jen u dvou položek z Holubovských hadců – HH12 a HH13. Metodou ML jsem vytvořila fylogenetický strom úseku ITS zahrnující všechny sekvence druhu *L. carpathica* (**Obr. 22**). Ze stromu lze vyčíst, že mnou sebrané lišejníky druhu *L. carpathica* utvářejí tři clady, přičemž jeden tvoří právě vzorky z Křížky a Holubovských hadců. U těchto vzorků jsem se proto rozhodla amplifikovat i úsek mtSSU. Ten již vykazoval vyšší shodu s druhem *L. carpathica* – 97,3–97,7 %. Pro účely této

diplomové práce jsem se rozhodla tyto nejednoznačné položky zahrnout do druhu *L. carpathica*, ale tento druh by si v budoucnu jistě zasloužil více pozornosti.

Dalším druhem, u kterého se ukázalo nejednoznačné rozlišení na základě úseku ITS, je druh *Lecidea fuscoatra*. Před dvěma lety byl v ČR zaznamenán výskyt druhu *Lecidea fuscoatrina* (Vondrák *et al.*, 2022). Tyto druhy je v terénu nemožné rozeznat a jejich odlišení je možné především na základě chemismu – zatímco *L. fuscoatra* obsahuje gyrofovou kyselinu, *L. fuscoatrina* ji neobsahuje, ale vyznačuje se přítomností kyseliny konfluentové (Malíček *et al.*, 2024). K ověření (ne)přítomnosti kyseliny gyrofové v kůře a dřeni je možné provést bodový test roztokem chlornanu sodného (běžně se používá neředěné Savo). Ověření přítomnosti kyseliny konfluentové je nutné provést pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC). U položek, které vykazovaly shodu úseku ITS s oběma výše zmíněnými druhy, jsem provedla příčný řez stélkou, ke kterému jsem následně pod mikroskopem přidala pár kapek Sava. Ve většině případů došlo k reakci (růžové až červené zbarvení kůry a dřene), jen u tří položek (DS20, DS22, DS31) k žádné reakci nedošlo. Tyto lišejníky, které jsem přiřadila druhu *L. fuscoatrina*, rostly na lokalitě PR U doutné skály společně s lišejníky druhu *L. fuscoatra*, které červenou reakci vykazovaly. Vzorky druhu *L. fuscoatrina* jsem vyřadila.



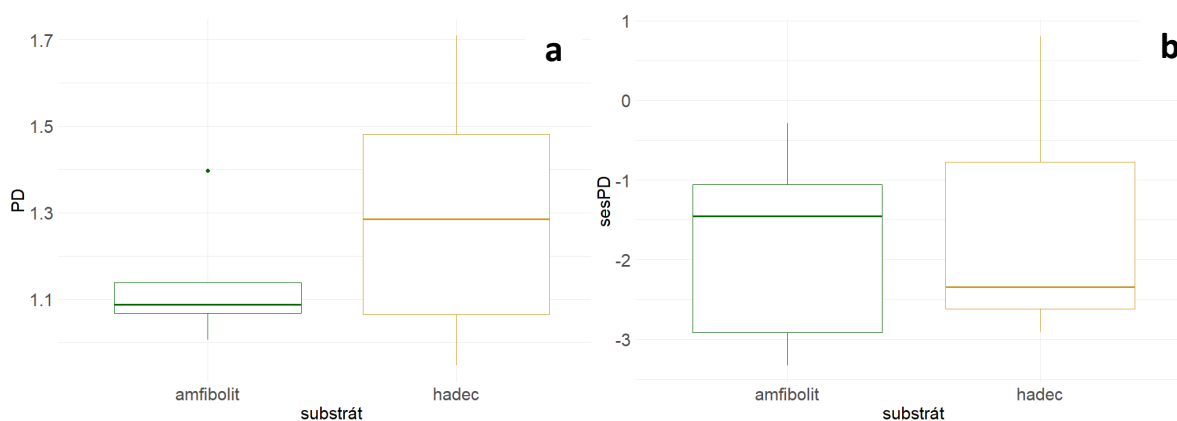
Obr. 23 Nezakořeněný fylogenetický strom mykobiontů rodu *Cladonia* vytvořený metodou ML na základě úseku ITS rDNA. Čísla nad větvemi zobrazují ML bootstrap, zobrazeny jsou hodnoty >75. Tučně vyznačené vzorky pocházejí z této práce, barva určuje typ substrátu – žlutá = hadec, zelená = amfibolit.

Dva vzorky rodu *Cladonia* (DS35 a TE31) vykazovaly nejvyšší shodu (> 99 %) s druhem *Cladonia grayi*, jeden (TE15) s druhem *Cladonia merochlorophaea* (> 99 %, **Obr. 23**). Morfologicky a chemicky však všechny položky odpovídaly druhu *Cladonia pyxidata* – na podeciu se vyskytovaly granulky až destičky a v UV světle nedošlo k žádné reakci. Je také pozoruhodné, že mnoho sekvencí nevykazuje vysokou shodu (> 98 %) s žádnou sekvencí v databázi GenBank. Úsek ITS však nemusí být spolehlivý pro odlišení některých druhů dutohlávek (Kelly *et al.*, 2011; Kanz *et al.*, 2015). Vymezení druhů v této skupině dutohlávek navíc zatím nebylo komplexně studováno. Z těchto důvodů jsem tyto vzorky zařadila do dalších analýz jako druh *C. pyxidata*.

Fylogenetické stromy všech zbývajících mykobiontů jsou uvedené v příloze (**Příloha 6**).

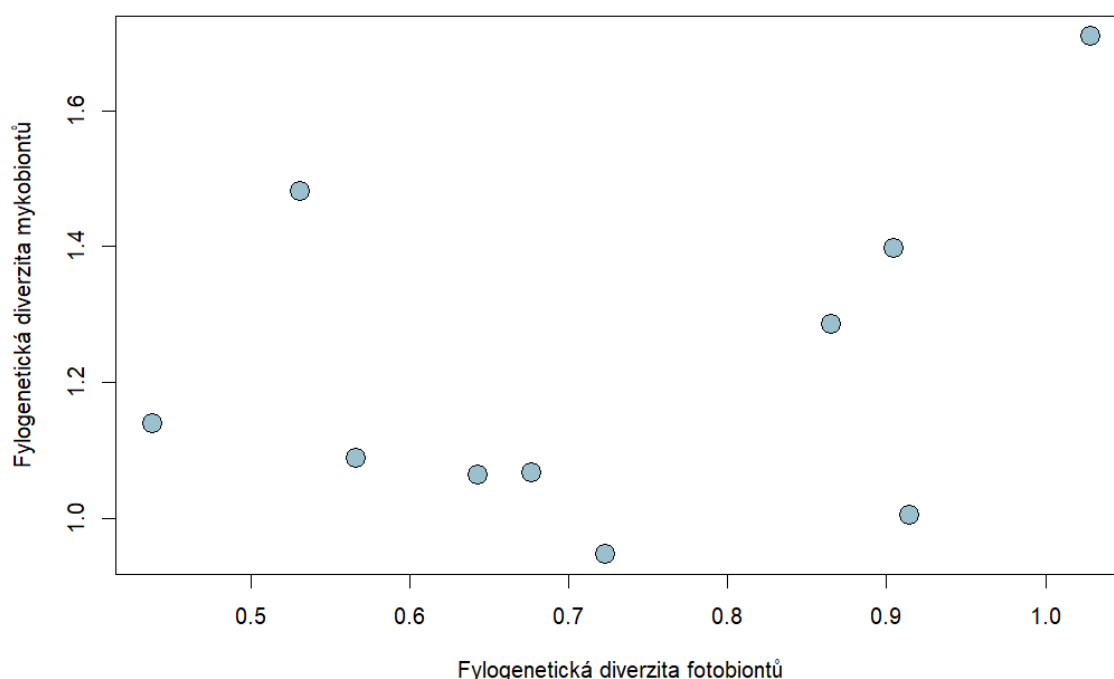
Ačkoliv je *Lecanora rupicola* běžně se vyskytujícím lišejníkem, který je i v terénu dobře rozpoznatelný, kvalitní sekvenci se mi podařilo získat pouze ve 12 případech z celkových 21 sebraných stélek. Většina stélek, ze kterých se mi nepodařilo získat sekvenci, nevykazovala žádné viditelné napadení lichenizujícími houbami (což ovšem nevylučuje jejich přítomnost). V případě tohoto lišejníku nepomohl ani pečlivý výběr kousků stélky, ze kterých jsem izolovala DNA, ani opakování PCR.

Z fylogenetických stromů (**Obr. 22, Obr. 23, Příloha 6**) je patrné, že se v některých druzích vyskytují linie mykobiontů vykazující afinitu k jednomu ze substrátů. Takové linie se nacházejí ve druzích *Cladonia pyxidata*, *Lecanora rupicola*, *Lecanora polytropa*, *Lecidea fuscoatra*, *Lecidella carpathica*, *Protoparmeliopsis muralis*. Nelze s jistotou tvrdit, že do těchto linií nebudou spadat i mykobionti z jiných substrátů, jelikož počet stélek, které jsem na jednotlivých lokalitách sbírala, byl nízký. Z tohoto důvodu by si problematika mykobiontů rostoucích na hadcových substrátech zasloužila hlubší zkoumání.



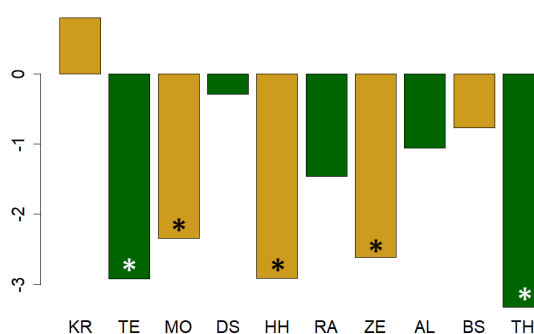
Obr. 24 a – porovnání fylogenetické diverzity mykobiontů asociovaných s fotobionty rodu *Trebouxia*, **b** – porovnání fylogenetické struktury mykobiontů asociovaných s fotobionty rodu *Trebouxia*

Fylogenetická diverzita mykobiontů tvořících symbiózu s řasou rodu *Trebouxia* je nižší na amfibolitech než na hadcích (**Obr. 24a**), z toho lze odvodit, že mykobionti z amfibolitových lokalit jsou vzájemně příbuznější než z lokalit hadcových. Více diverzní mykobionti však neobsahují více diverzní fotobionty (**Obr. 26**). Fylogenetická struktura se u těchto mykobiontů neliší v závislosti na typu horniny, kterou porůstají (**Obr. 24b**).



Obr. 26 Závislost PD mykobiontů na PD fotobiontů

Hodnoty sesPD v případě mykobiontů dosahují ve všech případech kromě Křížků záporných hodnot, v pěti případech jde o signifikantní výsledky (**Obr. 25**). Znamená to tedy, že společenstvo mykobiontů je spíše filtrováno typem substrátu než např. kompeticí.



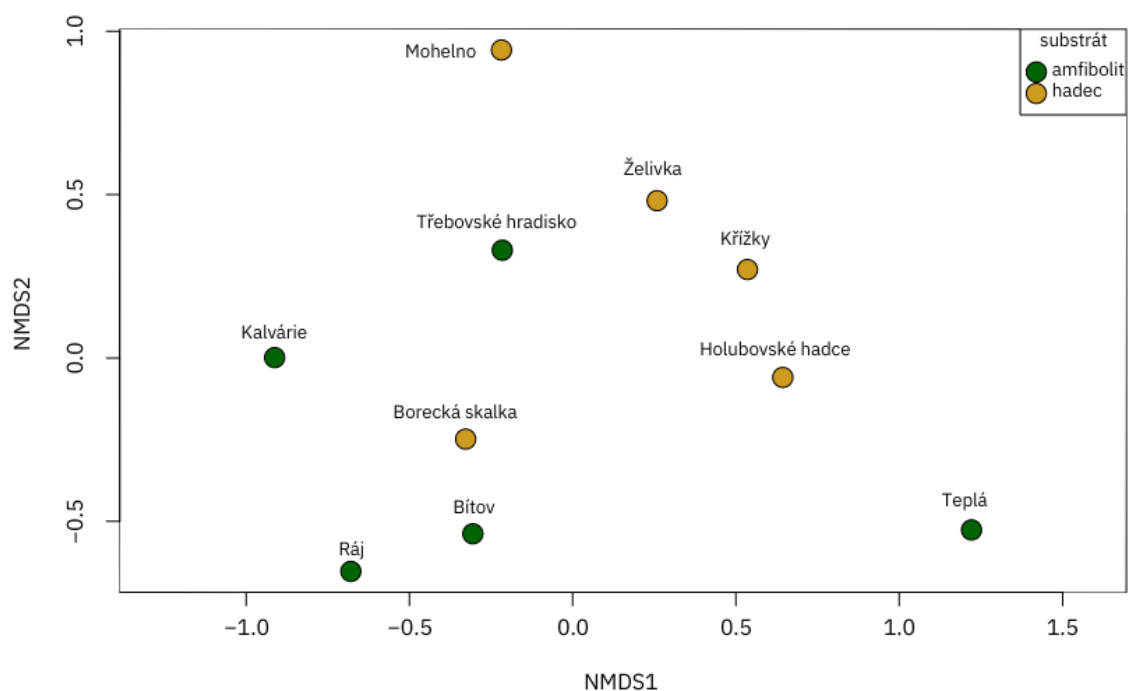
Obr. 25 Fylogenetická struktura společenstva mykobiontů, žlutě hadec, zeleně amfibolit, hvězdička označuje signifikantní výsledek s $p < 0,01$.

4.5 Fotobionti

Z celkového počtu 278 sebraných stélek se mi podařilo získat 174 kvalitních sekvencí fotobiontů. Nejprve jsem vzorky zpracovávala postupně – až po potvrzení druhu mykobionta jsem přistoupila ke zpracování DNA fotobionta. Později jsem však musela přistoupit k souběžnému zpracovávání vzorků. Z tohoto důvodu jsem získala 14 kvalitních sekvencí fotobiontů, u kterých jsem ale molekulárně neprokázala identitu mykobionta. Tyto vzorky jsem vyřadila a dál pracovala pouze se 157, u kterých jsem získala kvalitní sekvenční obou symbiontů. V 60 případech byla sekvenční i po opakování PCR nekvalitní. Ve 21 případech jsem při vizualizaci PCR produktů zaznamenala dva proužky na gelu, což může svědčit o přítomnosti druhého fotobionta ve stélce nebo kontaminaci volně žijící řasou. Ze 157 analyzovaných sekvencí patří 133 sekvencí řasám rodu *Trebouxia* a 24 řasám rodu *Asterochloris*.

Řasy rodu *Trebouxia* pocházejí z deseti druhů lišejníků, zatímco řasy rodu *Asterochloris* ze stélek lišejníků morfologicky odpovídajících druhu *Cladonia pyxidata*.

Vliv typu substrátu na druhové složení fotobiontů jsem vizualizovala pomocí NMDS diagramu (Obr. 27). Je z něj patrné, že druhové složení je na obou lokalitách podobné a vliv substrátu je tím pádem minimální.



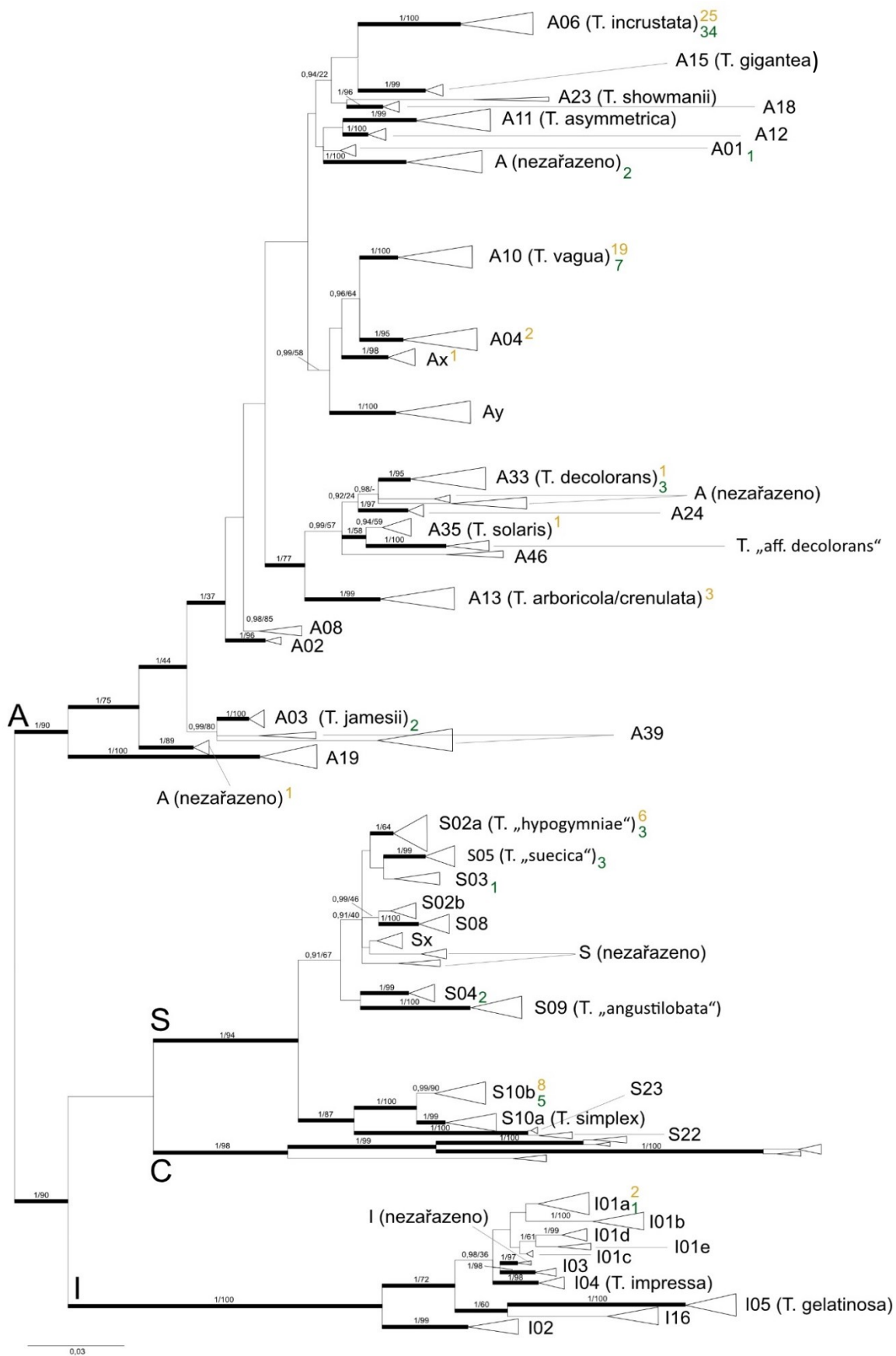
Obr. 27 NMDS diagram vlivu typu substrátu na druhové složení fotobiontů, Bray-Curtisův index, stres = 0,11

4.5.1 Fotobionti rodu *Trebouxia*

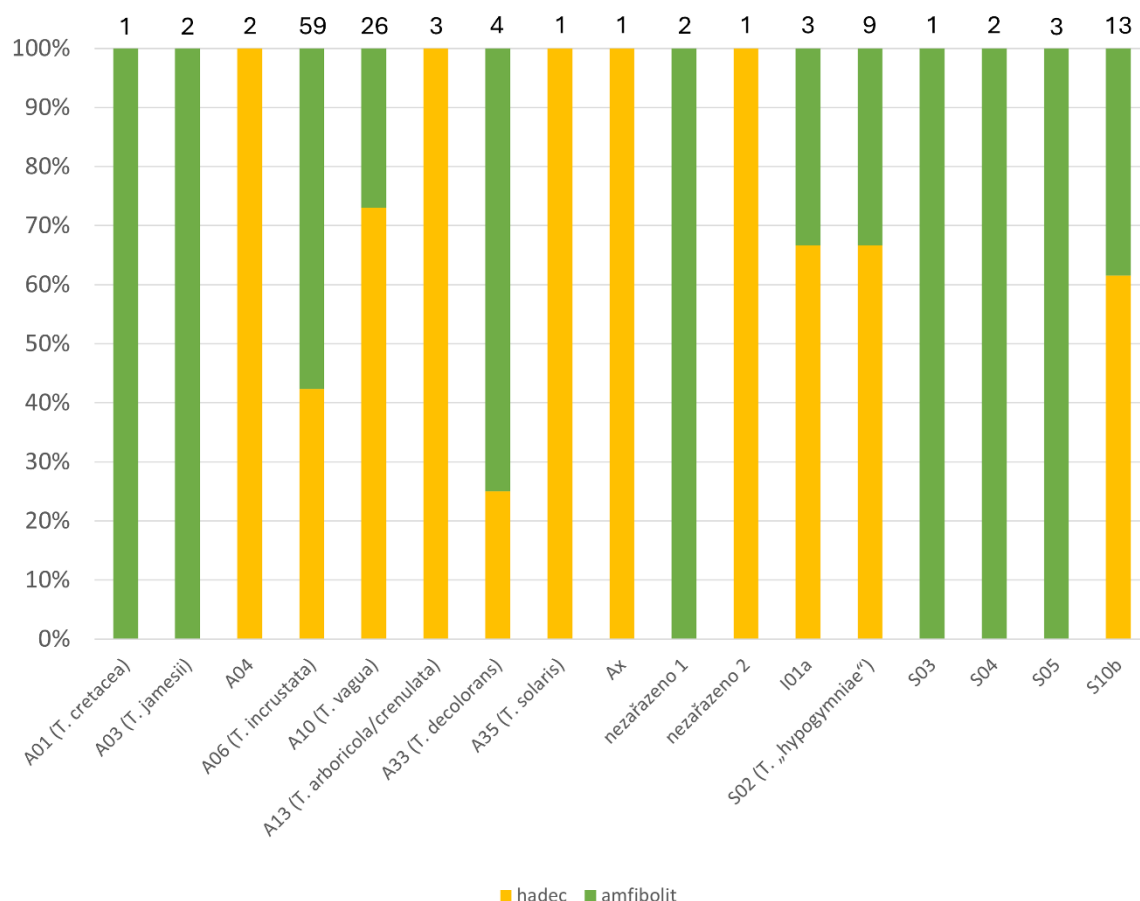
Fylogenetický strom řas rodu *Trebouxia* obsahuje celkem 341 unikátních sekvencí. Původní alignment ze studie Peksy a kol. (Peksa *et al.*, 2022) obsahoval 213 unikátních sekvencí, přidala jsem k němu 117 nově získaných unikátních sekvencí. Zbylých 16 duplicitních sekvencí jsem spárovala s unikátními sekvencemi v alignmentu a následně je do fylogenetického stromu ručně doplnila. Do původního alignmentu jsem přidala i sekvence získané metodou Illumina metabarcodingu. Spolu s nově získanými sekvencemi jsem přidala i referenční sekvence z databáze GenBank, které vykazovaly nejvyšší shodu při použití algoritmu BLASTN. Výsledný fylogenetický strom (**Příloha 5**) tedy zobrazuje příbuzenské vztahy mezi 358 vzorky řas rodu *Trebouxia*. Zjednodušený fylogenetický strom (**Obr. 28**) obsahuje názvy všech linií, čísla označují počty stélek, ve kterých jsem danou linii identifikovala. Jednotlivé clady a linie uvnitř nich jsem identifikovala podle studie Peksy a kol. (Peksa *et al.*, 2022).

Nejvíce fotobiontů z mé práce (celkem 102) patří do cladu A, 28 fotobiontů do cladu S a tři do cladu I. V rámci cladu A náleží fotobionti devíti liniím – A01 (*T. cretacea*), A03 (*T. jamesii*), A04, A06 (*T. incrustata*), A10 (*T. vaga*), A13 (*T. arboricola/crenulata*), A33 (*T. decolorans*), A35 (*T. solaris*) a Ax. *Trebouxia* z lišejníku *Lecidella carpathica* z Holubovských hadců (HH11) patří do již známé, avšak nepojmenované linie, fotobionti ze dvou stélek lišejníku *Protoparmeliopsis muralis* z Třebovského hradiska pak vytvářejí zcela novou linii, nebo minimálně nezaznamenanou ve výše zmíněné studii Peksy a kol., která ale patří do cladu A. V rámci cladu S patří řasy do pěti linií – S02 (*T. „hypogymniae“*), S03, S04, S05 (*T. „suecica“*) a S10b. Zástupci cladu I se sdružují v jediné linii – I01a.

Hadce a amfibolity se příliš neliší v počtu linií, které jsem ve stélkách identifikovala. V 69 hadcových stélkách se vyskytovalo 11 linií, zatímco v 64 stélkách z amfibolitů patřili fotobionti do 12 linií.



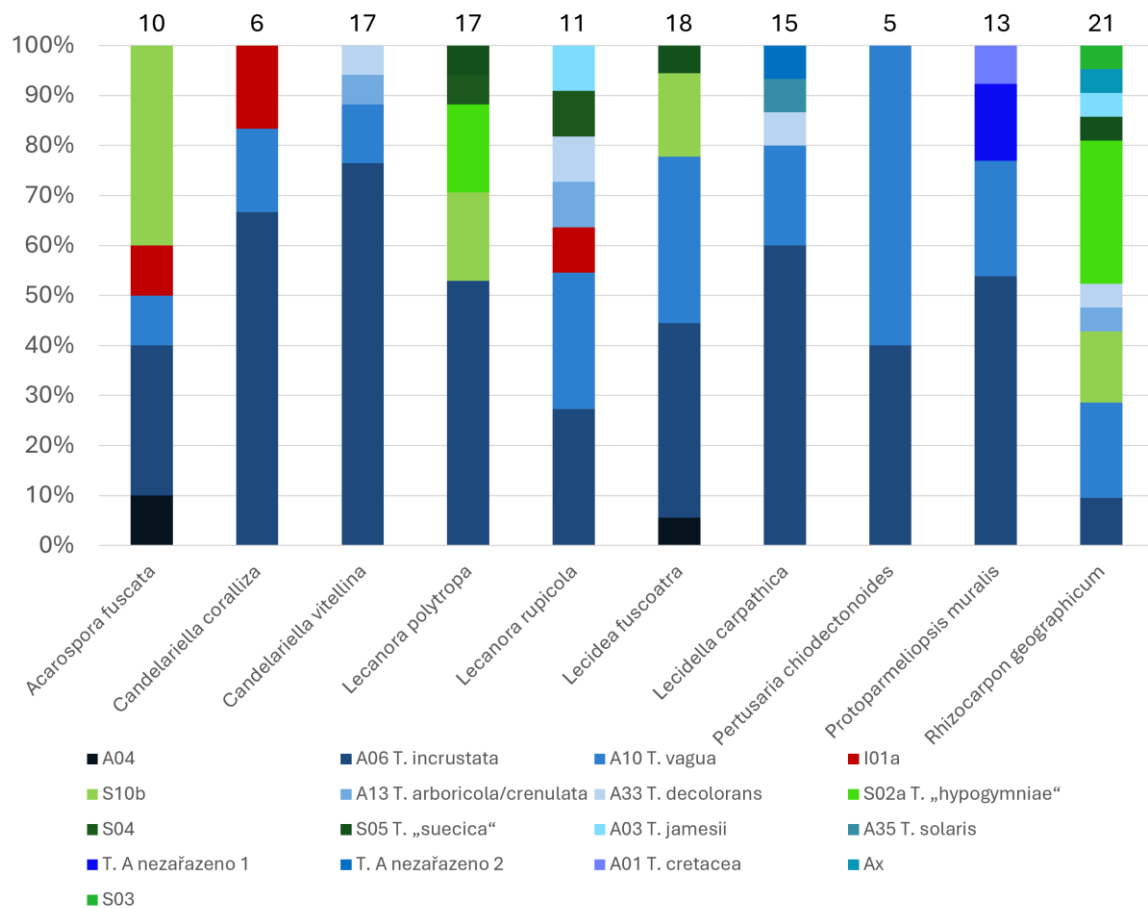
Obr. 28 Zjednodušený nezakořeněný BI strom linií fotobiontů rodu *Trebouxia* vytvořený na základě úseku ITS. Čísla nad větvemi zobrazují statistickou podporu určenou dvěma metodami – BI posteriorní pravděpodobnost / ML bootstrap. Zobrazeny jsou hodnoty > 89 pro BI a jim odpovídající hodnoty ML. Tučně jsou vyznačeny linie s BI = 1. Čísla za jmény linií udávají počet stélek, ze kterých jsem získala sekvenci daného fotobionta, barva odpovídá substrátu, na kterém stélka rostla – **žlutá** = hadec, **zelená** = amfibolit, písmena A, S, C, I označují jednotlivé clady.



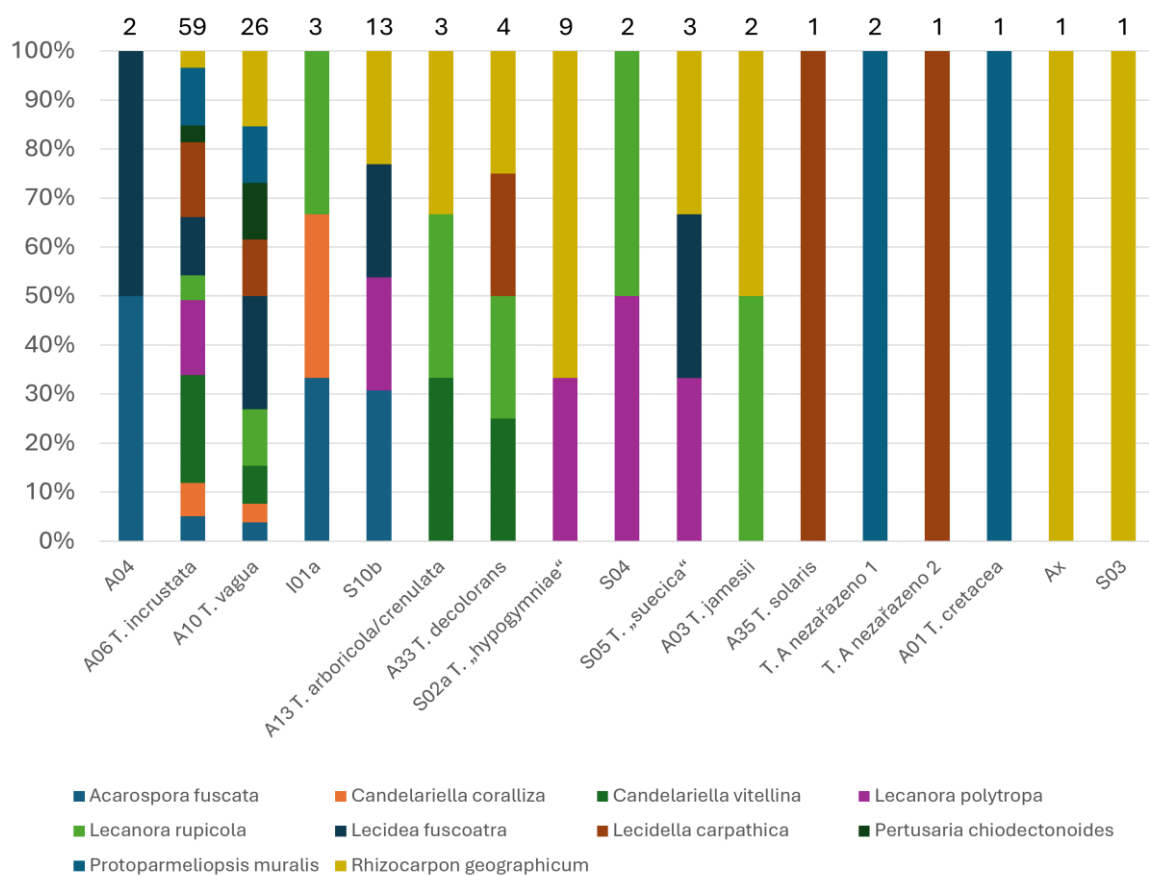
Obr. 29 Zastoupení jednotlivých linií rodu *Trebouxia* na hadci a amfibolitu, čísla nad sloupci udávají počet stélek, ve kterých se daná linie nacházela.

Šest linií z celkového počtu 17 linií jsem našla na obou typech substrátu, 11 linií pak vykazovalo preferenci pro jeden z typů substrátu: hadec (pět) nebo amfibolit (šest, **Obr. 29**). Počty stélek, ze kterých tyto linie pocházejí, je však velmi nízký (v průměru 1,7 stélky). Tabulka shrnující přesné počty jednotlivých linií na hadci a amfibolitu se nachází v příloze (**Příloha 4**). Řasy z cladu A se vyskytovaly na všech lokalitách. Počet stélek, ve kterých se vyskytovali fotobionti z cladu S, je na obou typech horniny stejný – 14 stélek. Clade I se vyskytoval ve dvou stélkách z hadce a jedné z amfibolitu

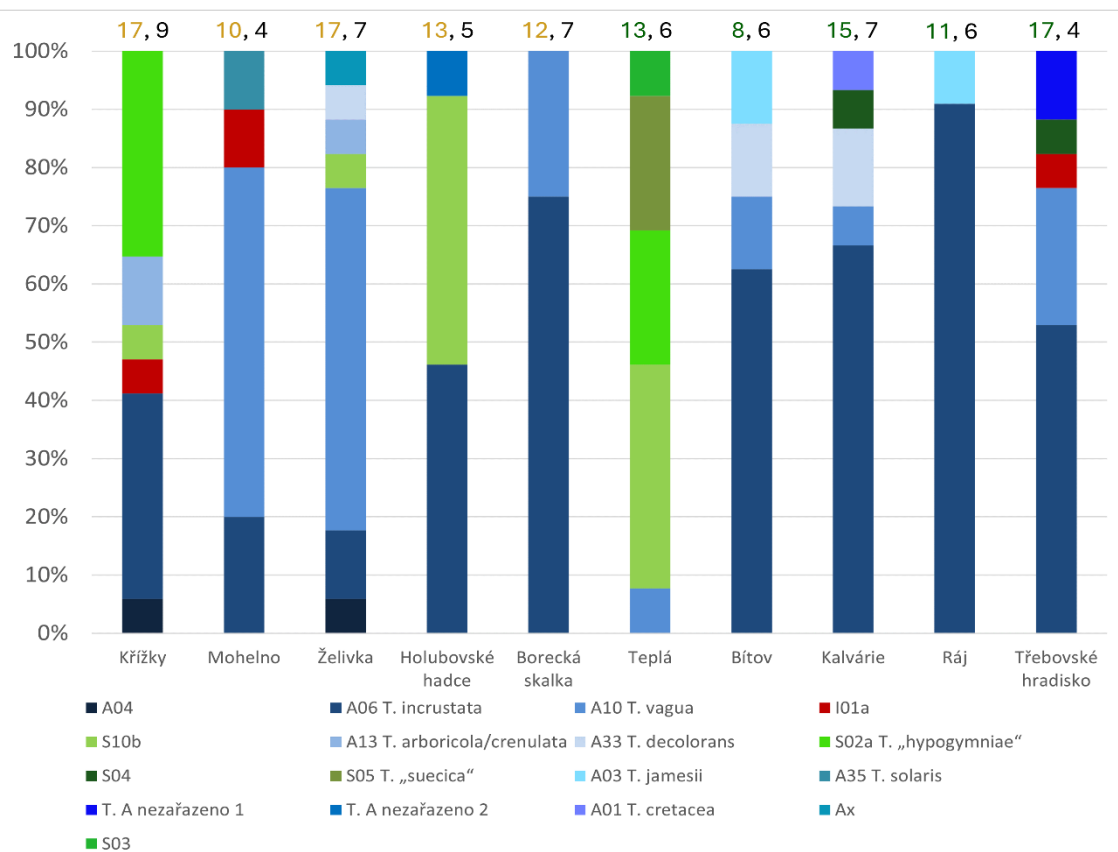
Někteří mykobionti sice asociovali s více liniemi fotobiontů, ale vykazovali preferenci pro některou z linií – *Candelariella coralliza*, *Candelariella vitellina* a *Lecidella carpathica* obsahovaly ve více než 60 % stélek linií A06 (**Obr. 30**). Tato linie byla přítomná ve všech sbíraných druzích, devět z deseti druhů obsahovalo i druhou nejhojněji zastoupenou linii A10. Tyto dvě linie se vyskytovaly nejhojněji i ve studii Peksa a kol. (Peksa *et al.*, 2022). Clade S byl obsažen v pěti druzích, nejvíce v 11 stélkách druhu *Rhizocarpon geographicum*. Fotobionti náležející do cladu I se vyskytovali pouze ve třech druzích (*Acarospora fuscata*, *Candelariella coralliza* a *Lecanora rupicola*). Nejvíce linií je zastoupeno ve druzích *R. geographicum* (deset) a *L. rupicola* (sedm).



Obr. 30 Zastoupení linií rodu *Trebouxia* ve sbíraných druzích lišejníků, čísla nad sloupci udávají celkový počet stélek daného druhu mykobionta.



Obr. 31 Asociace jednotlivých linií fotobiontů rodu *Trebouxia* s mykobionty, čísla nad sloupci udávají celkový počet stélek s danou linií fotobionta.

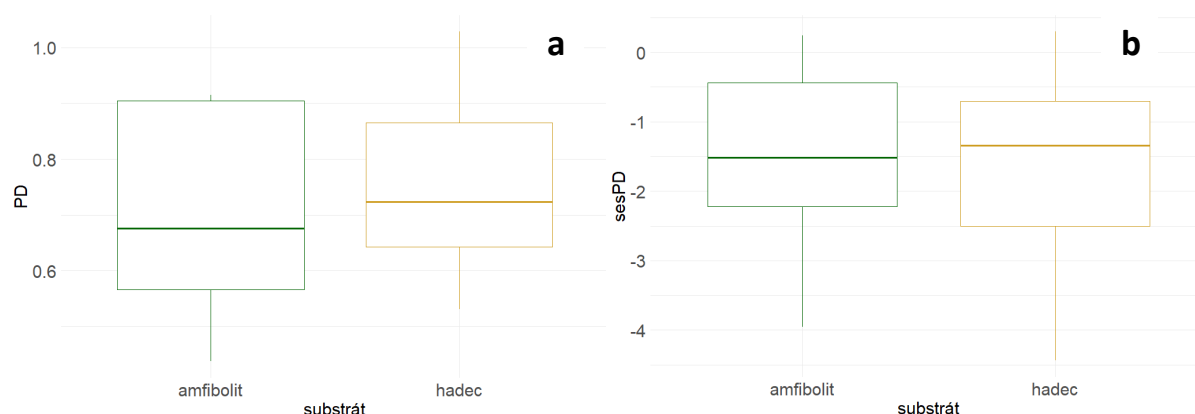


Obr. 32 Zastoupení linií rodu *Trebouxia* v rámci lokalit, barevné číslo udává počet stélek, barva odpovídá typu horniny – zelená = amfibolit, žlutá = hadec, černé číslo udává počet mykobiontů z dané lokality.

Na všech lokalitách byl zastoupen clade A, clade S se vyskytoval na osmi lokalitách (na všech kromě Bítova a Borecké skalky) a clade I na třech (Křížkách, Mohelně a Třebovském hradisku). Lokality Ráj a Borecká skalka byly co do počtu linií fotobiontů nejchudší – lišejníky z obou lokalit asociovaly jen se dvěma liniemi. Naopak nejvíce linií se vyskytovalo na lokalitě Želivka (sedm) a Křížky (šest). Na všech lokalitách kromě lokality Teplá se nacházela linie A06 (**Obr. 32**).

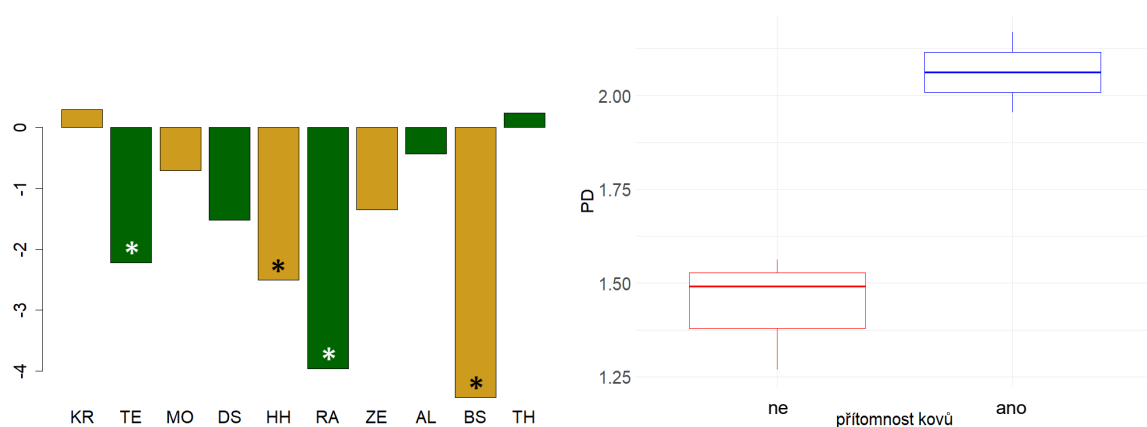
Jednotlivé klimatické páry se vždy překrývaly v přítomnosti minimálně jedné linie řas. V případě čtyř párů se jednalo o linii A06, tři páry pak sdílely i linii A10 (Mohelno–Bítov, Želivka–Kálvária, Borecká skalka–Třebovské hradisko). Jedinou výjimku vytvářel klimatický pár Křížky–Teplá, kde nedocházelo ke sdílení řas z cladu A, ale z cladu S, konkrétně linií S10b a S02a. Všechny sdílené linie představují linie, které se v rámci daných cladů vyskytují nejčastěji.

Z **Obr. 33a** je patrné, že fylogenetická diverzita fotobiontů se mezi oběma typy substrátu téměř neliší stejně jako fylogenetická struktura (**Obr. 33b**). *sesPD* dosahuje ve většině případů záporných hodnot (**Obr. 35**), což znamená, že se v rámci lokality může jednat o vzájemně příbuznější si druhy, jejichž přítomnost na dané lokalitě způsobil tlak daného substrátu. V případě kladných hodnot by se jednalo o tlak způsobený např. kompeticí.



Obr. 33 a – porovnání fylogenetické diverzity fotobiontů na hadci a amfibolitu, **b** – porovnání fylogenetické struktury fotobiontů na hadci a amfibolitu

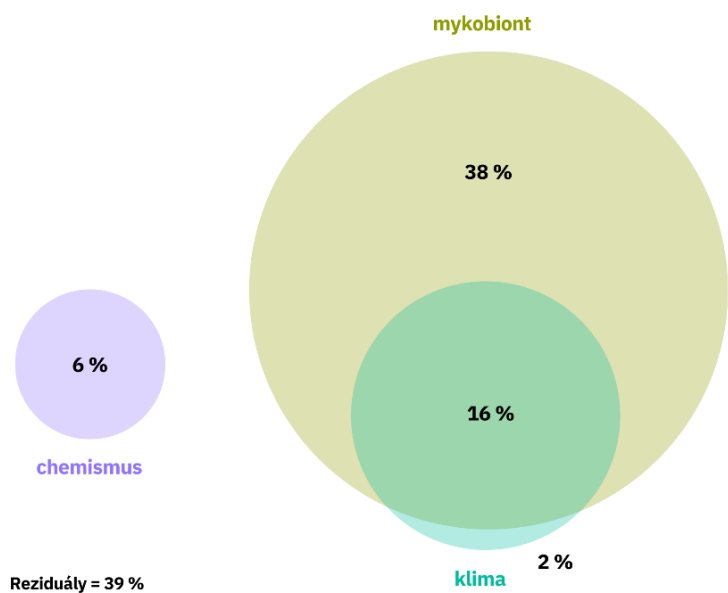
Fylogenetickou diverzitu a strukturu jsem zjišťovala i v rámci přítomnosti některých těžkých kovů (Ti, Ni, Cr). Ačkoliv diverzita fotobiontů se liší mezi stélkami, které rostly na těžkých kovech a mimo ně (**Obr. 35**), hodnoty *sesPD* byly pozitivní, ale a nevyšly signifikantně ani v jediném případě. Jako důležitější se tedy jeví vliv jiných podmínek dané lokality než to, zda byla pod stélkou zjištěna přítomnost některého z výše zmíněných těžkých kovů.



Obr. 35 Fylogenetická struktura společenstva fotobiontů, žlutě hadec, zeleně amfibolit, hvězdička označuje signifikantní výsledek s $p < 0,02$.

Obr. 35 Fylogenetická diverzita fotobiontů v závislosti na přítomnosti kovů v místě růstu stélky

Na **Obr. 36** jsou zobrazeny výsledky rozkladu variability. Genetickou variabilitu fotobiontů jsem vysvětlovala chemismem substrátu (pH, hodnoty prvků Mg, Si, Ti, Fe, Mn, Cr, Ni měřené pod každou stélkou), klimatem (průměrná teplota mezi lety 2014 a 2019, pátý percentil nejnižší a 95. nejvyšší naměřené teploty ve stejném časovém rozmezí) a genetickou diverzitou asociovaných mykobiontů. Nejvíce variability vysvětluje vztah mykobionta a fotobionta (celkem 38 %, 54 % v kombinaci s klimatickými proměnnými), následně klima (2 %, 18 % v kombinaci s asociovaným mykobiontem) a chemismus substrátu (6 %).

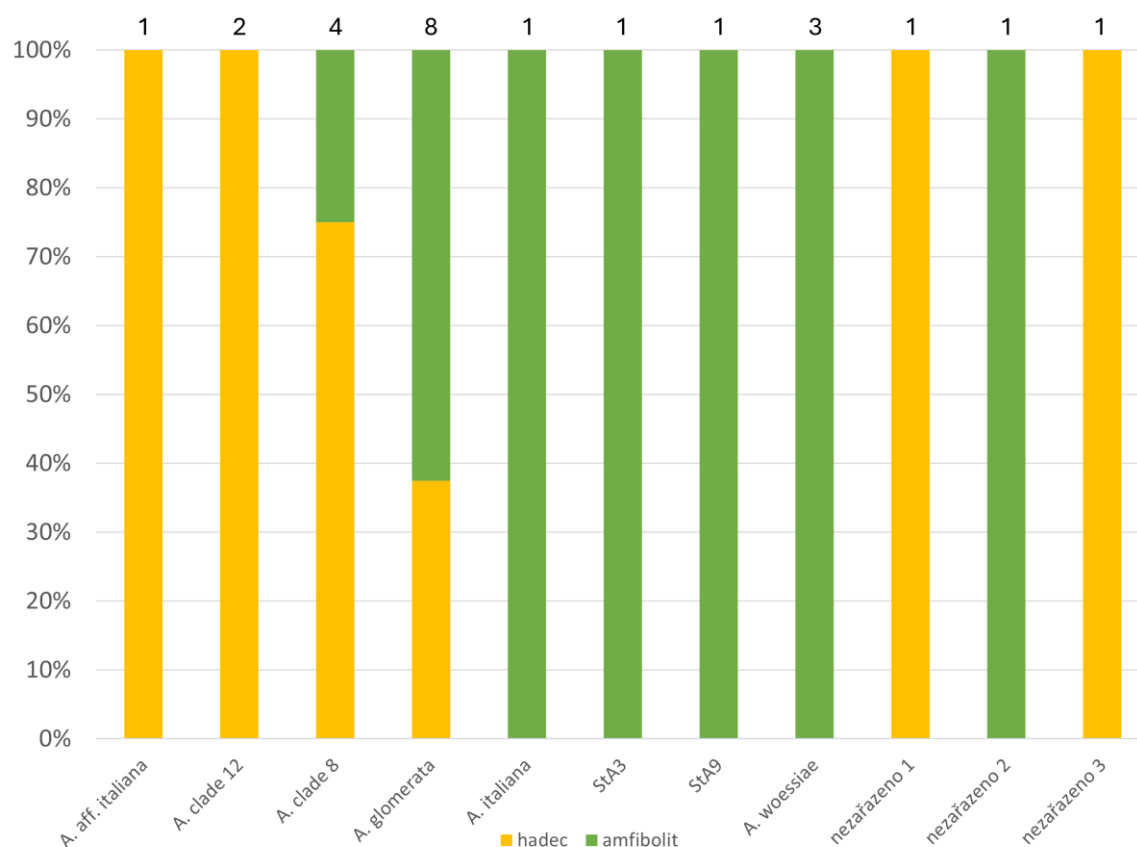


Obr. 36 Vennův diagram zobrazující rozklad variability genetické diverzity fotobiontů rodu *Trebouxia*.

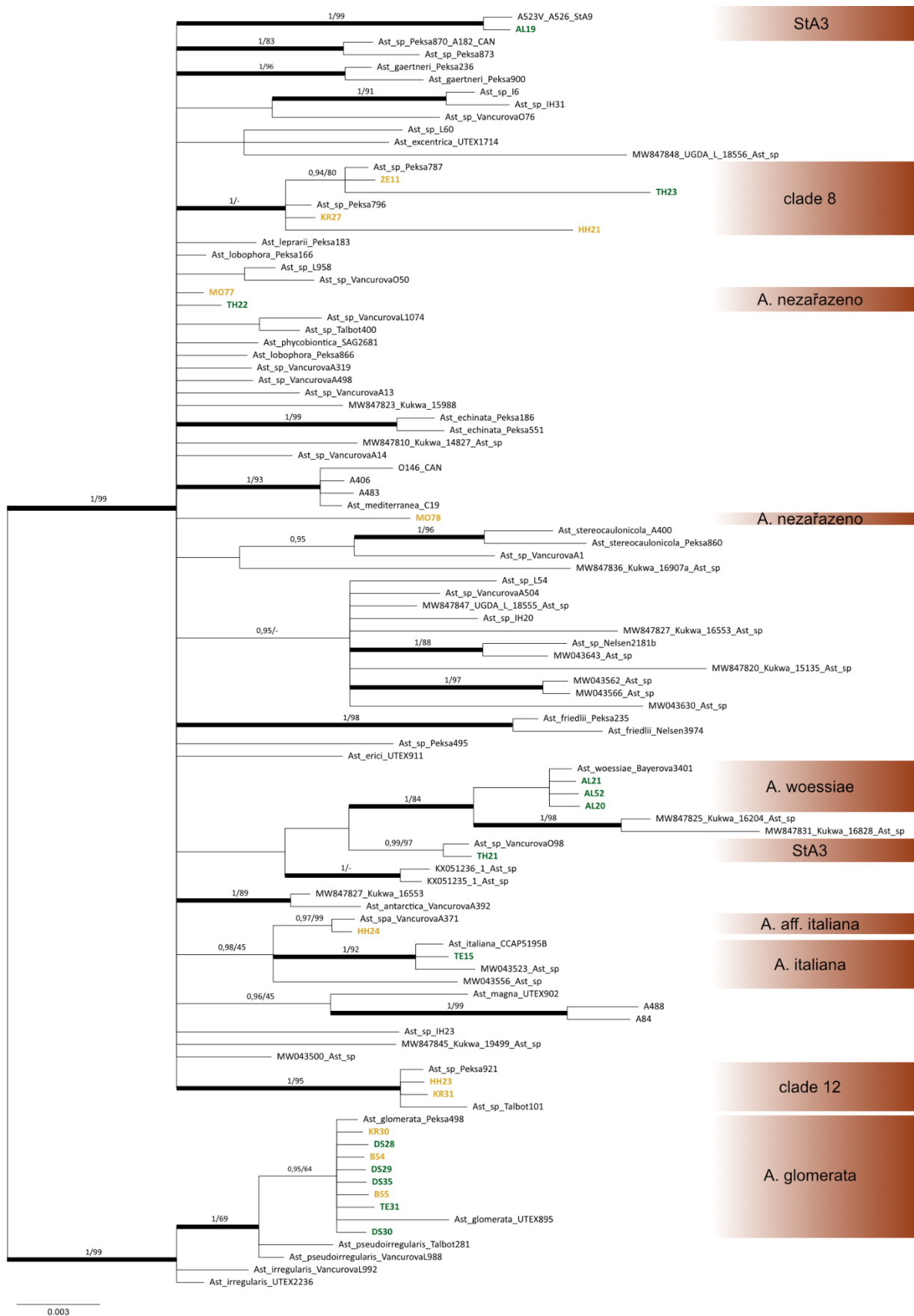
4.5.2 Fotobionti rodu *Asterochloris*

Fylogenetický strom (**Obr. 38**) zobrazuje fylogenezi 102 fotobiontů, z čehož 78 pochází ze studie Vančurové a kol. (Vančurová *et al.*, 2021) a 24 z této práce z druhu *Cladonia pyxidata*. Příslušnost fotobiontů k jednotlivým liniím jsem určila podle Vančurové a kol. (Vančurová *et al.*, 2021).

Celkem fotobionti přísluší sedmi již dříve popsáným liniím rodu *Asterochloris* – *Asterochloris* aff. *italiana*, *Asterochloris* clady 12 a 8, *A. glomerata*, *A. italiana*, StA3, StA9 a *A. woessiae*. Tři fotobionti pak vytvářejí tři nové linie. Všechny linie jsou vysoce statisticky podpořené. Přesné počty fotobiontů zastoupených ve výše zmíněných liniích shrnuje **Příloha 3**. Tři linie jsem našla na hadci i amfibolitu, dvě pouze na hadci a čtyři pouze na amfibolitu (**Obr. 37**).

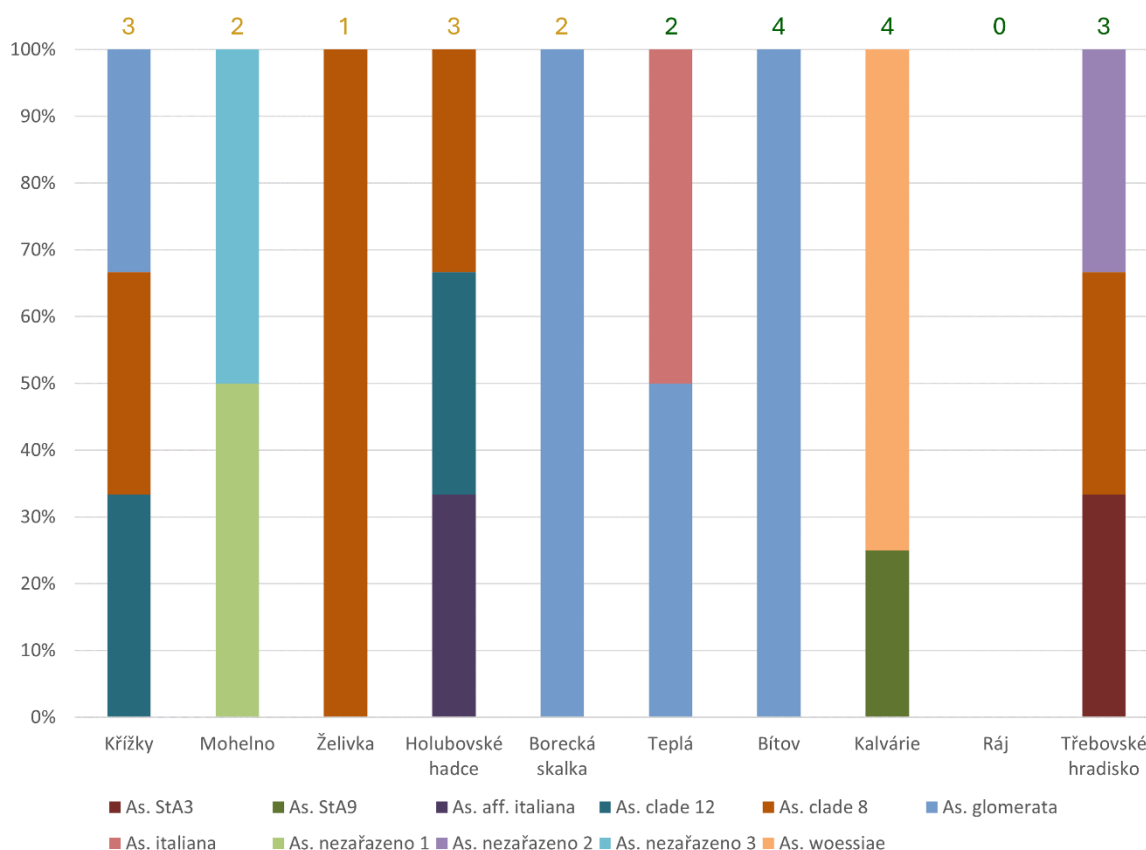


Obr. 37 Zastoupení jednotlivých linií rodu *Asterochloris* na hadci a amfibolitu, čísla nad sloupci udávají počet stélek, ve kterých se daná linie nacházela.



Obr. 38 Nezakořeněný BI strom fotobiontů rodu *Asterochloris* vytvořený na základě úseku ITS. Čísla nad větvemi zobrazují statistickou podporu určenou dvěma metodami – BI posteriorní pravděpodobnost / ML bootstrap. Zobrazeny jsou hodnoty > 89 pro BI a jim odpovídající hodnoty ML. Tučně jsou vyznačené linie s BI = 1. Barva odpovídá substrátu, na kterém stélka rostla – **žlutá** = hadec, **zelená** = amfibolit, vyznačeny jsou pouze linie obsahující vzorky z mé diplomové práce.

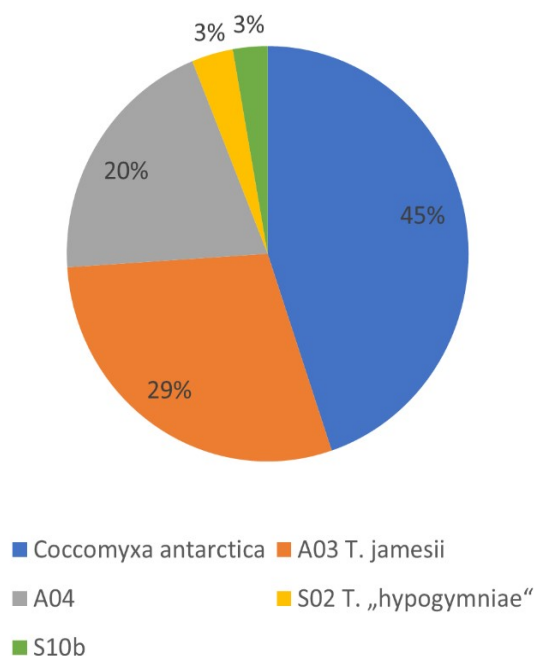
V lišejnících z hadcového substrátu jsem zaznamenala celkem osm linií, v lišejnících na amfibolitech sedm. Lokalitami s nejvyšší zaznamenanou diverzitou fotobiontů rodu *Asterochloris* jsou Holubovské hadce, Křížky a Třebovské hradisko, kde byly tři různé stélky dutohlávky asociované se třemi různými liniemi fotobiontů (**Obr. 39**). V případě Holubovských hadců se jednalo o linie *A. aff. italiana*, *A. clade 8* a 12, v případě Křížků *A. clade 8* a 12 a *A. glomerata* a na Třebovském hradisku se pak nacházely clady *A. StA3*, *A. clade 8* a jedna blíže nezařazená linie. Naopak v případě Bítova byl ve všech 4 stélkách *A. glomerata*. Blíže nezařazené linie pocházejí z Mohelna (dvě) a Třebovského hradiska.



Obr. 39 Zastoupení linií rodu *Asterochloris* v rámci lokalit, čísla nad sloupci udávají počet stélek, ze kterých pocházejí.

4.5.3 Pluralita fotobiontů ve stélce

Z jediného vzorku (K7, druhu *Lecanora rupicola* z Křížků), u kterého byl proveden Illumina metabarcoding, jsem získala 121441 readů v 39 OTU (operational taxonomic unit). Z nich jsem vyloučila všechny OTU, které nepatřily zeleným řasám. Po spočítání relativní abundance jednotlivých linií jsem vyřadila všechny, které měly relativní abundanci nižší než jedno procento. Celkem jsem tedy pracovala s devíti OTU, které patří do dvou rodů zelených řas – *Coccomyxa* a *Trebouxia*. V rámci rodu *Coccomyxa* jsem získala tři OTU, přičemž všechny představují druh *Coccomyxa antarctica*. Všechny OTU náležející do rodu *Trebouxia* jsem přidala do společného alignmentu ostatních sekvencí tohoto rodu, vytvořila z nich fylogenetický strom a na základě studie Peksy a kol. (Peksa *et al.*, 2022) jsem je identifikovala. Celkem pět OTU spadá do čtyř linií, které náleží dvěma cladům – A a S (**Obr. 40**).

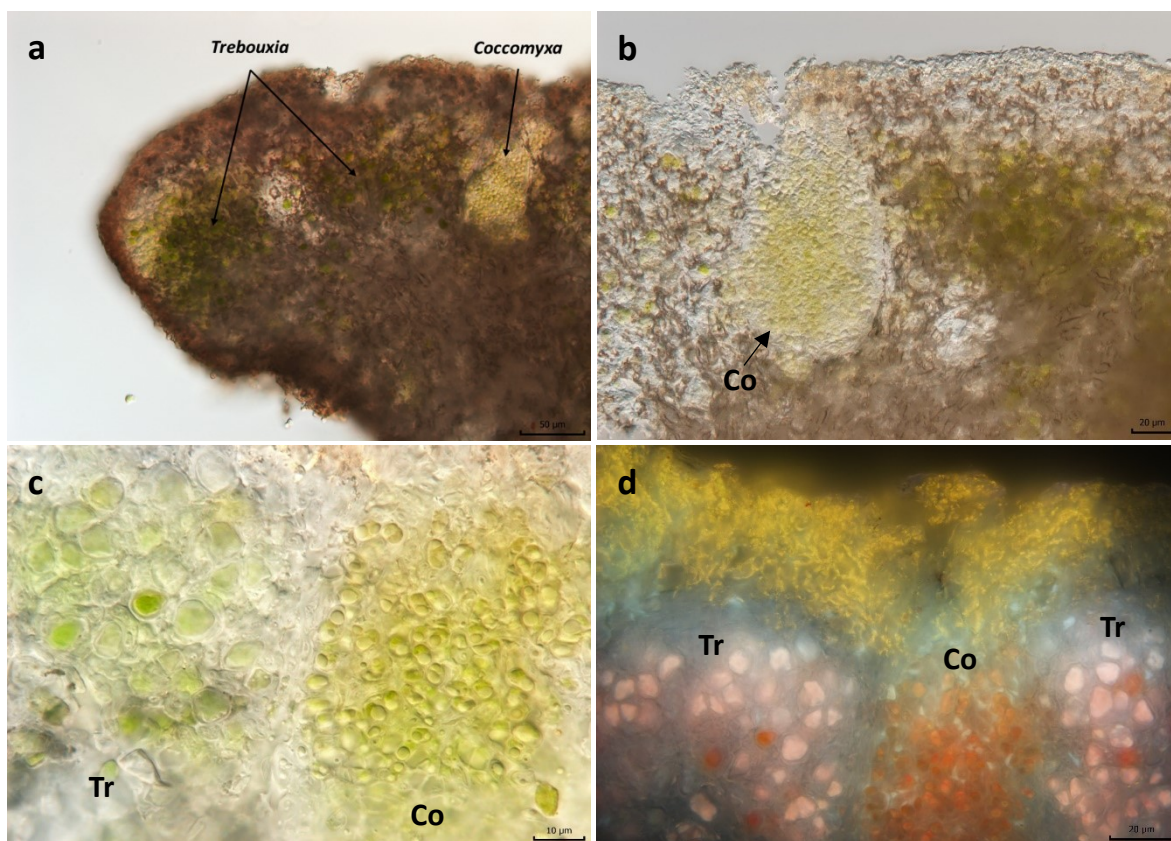


Obr. 40 Relativní abundance jednotlivých linií fotobiontů ve vzorku KR7

4.5.3.1 Morfologické potvrzení plurality fotobiontů

Řasy rodu *Trebouxia* a *Coccomyxa* jsou morfologicky odlišné, hlavním odlišovacím znakem je absence pyrenoidu u řas rodu *Coccomyxa*, a naopak jeho přítomnost u řas rodu *Trebouxia*. Z tohoto důvodu jsem se rozhodla provést příčné řezy stélkou, abych mohla potvrdit výsledky metabarcodingu, tedy přítomnost obou výše zmíněných řas v jedné stélce. Na základě morfologických znaků se mi povedlo potvrdit společnou přítomnost obou rodů řas v různých částech stélky. V některých areolách se však nacházely pouze řasy rodu *Trebouxia*. Řasy se vzájemně liší barvou, velikostí, (ne)přítomností pyrenoidů a tukových tělísek, ale i způsobem růstu. Zatímco *Trebouxia* tvoří typickou podkorovou vrstvu fotobionta, *Coccomyxa* roste odděleně od řasy rodu *Trebouxia* a nedochází tak k jejich vzájemnému prolínání. V některých areolách se nachází dokonce až pod vrstvou řasy rodu *Trebouxia*, tedy přímo v dřevné vrstvě. Jindy ji lze nalézt v pomyslných „váčcích“, které ji od druhé přítomné řasy oddělují (**Obr. 41b**).

Pro zajímavost jsem provedla i pozorování ve fluorescenci (**Obr. 41d**). Tato pozorování odhalila, že zatímco jsou buňky fotobionta rodu *Trebouxia* z většiny mrtvé, buňkám řas rodu *Coccomyxa* chlorofyl nedegradoval, což může poukazovat na jejich větší životaschopnost. Lze také spatřit žlutě svítící vrstvu sekundárních metabolitů v korové vrstvě lišejníku.



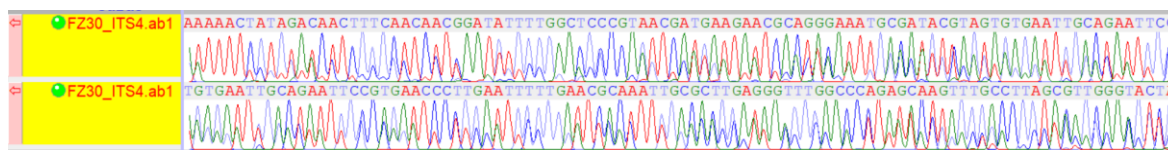
Obr. 41 a–c – příčný řez stélkou lišejníku *Lecanora rupicola* ve světelném mikroskopu, **d** – příčný řez stélkou ve fluorescenci – žlutá vrstva = sekundární metabolity, modrá vrstva = korová vrstva, růžová = mrtvé buňky fotobionta s degradovaným chlorofylem, červená = buňky fotobionta s nedegradovaným chlorofylem, *Co* = *Coccomyxa antarctica*, *Tr* = *Trebouxia*, zvětšení je uvedeno na fotografiích

5 Diskuse

5.1 Výhody a nevýhody použitých metod

5.1.1 Molekulární metody

Druhové složení fotobiontů jsem zjišťovala pomocí Sangerova sekvenování, což je nejběžněji používaná metoda studia identity fotobiontů. Touto metodou však nelze zjistit druhové složení v případě lišejníků obsahujících více fotobiontů v jedné stélce. Pokud přítomnost minoritního fotobionta přesáhne 30 %, dojde k narušení signálu a získání nekvalitní sekvence (Paul *et al.*, 2018; Moya *et al.*, 2021). Dvojí signál (**Obr. 42**), který může indikovat více fotobiontů ve stélce (např. Vančurová *et al.*, 2020), jsem zaregistrovala ve 40 případech (vše u lišejníků s fotobiontem rodu *Trebouxia*).



Obr. 42 Část sekvencí z jedné stélky lišejníku *Candelariella vitellina* ze Želivky pocházejících ze dvou různých izolátů DNA

Pro postihnutí celkové diverzity řas v lišejníku a zachycení případné plurality fotobiontů je nutné použít metabarcoding. Tato metoda je náročnější jak na přípravu, tak finančně. Je také nutná pečlivá příprava položek (důkladné omytí), aby se zamezilo kontaminaci např. volně žijícími řasami. Při použití metabarcodingu může dojít k nadhodnocení počtu přítomných fotobiontů, a tak je důležitým krokem výsledná interpretace výsledků. Ideální je kombinace metabarcodingu a některé z mikroskopických metod, např. světelné mikroskopie nebo TEM (Dědková, 2023).

5.1.2 Měření pH

Charakterizovat lokality pomocí pH se ukázalo být nelehkým úkolem. Ačkoliv metoda analýzy výluhu z namleté horniny nejspíše nejlépe odráží skutečné pH horniny, získaná hodnota pravděpodobně není relevantní pro lišejníky. Ty se ve většině případů nesetkávají se zdravou horninou, ale s horninou zvětralou. Významnější by proto byla hodnota pH zvětralého povrchu horniny, ovšem použitá metodika měření se ukázala jako nepřilíš vyhovující (důvody jsou popsány v kapitole 4.1). Jinou metodu získávání pH použili ve své studii Peksa a kol. (Peksa *et al.*, 2022) – 10 g hrubě drcené horniny nechali louhovat v destilované vodě po dobu 24 hod., poté měřili pH výluhu. Při použití této metody však také dochází k většinové reakci zdravé horniny s destilovanou vodou a získané hodnoty pH nemusí odpovídat pH, kterému je vystaven lišejník (např. pokud na horninu zaprší a stélky začnou být metabolicky aktivní, a tedy také citlivější vůči chemismu substrátu). Ideální by tedy bylo odebrat pouze svrchní zvětralou část horniny, louhovat ji nedrcenou v destilované vodě po dobu cca 24 hodin a pH výluhu následně analyzovat. Tato metoda je náročná na přípravu a také není jasné, jak tlustá vrstva zvětralé horniny by měla být z položky odebrána, aby výsledná hodnota opravdu odrážela hodnoty pH, kterému jsou stélky lišejníku vystavené.

Příjem kovů do stélky lišejníku je především děj fyzikálně-chemický a pH tak představuje jeden z hlavních faktorů, které ho mohou ovlivnit (Nieboer *et al.*, 1976). Se snižujícím se pH může vzrůstat

rozpuštěnost některých kovů a mohou se začít více uvolňovat z částic substrátu nebo atmosférické depozice (Bačkor & Loppi, 2009). pH udržované uvnitř stélky lišejníku tedy může přímo ovlivňovat uvolňování kovových kationtů z částic, které jsou ve stélce obsažené (viz kapitulu 5.2).

5.1.3 XRF

Měření těžkých kovů příručním XRF analyzátozem představuje rychlou a velmi levnou metodu, díky které lze během dvou minut získat představu o prvkovém složení měřeného objektu. Analyzátor je vybaven kamerou, díky které jej lze přiložit přesně na místo, které zvolíme. Na rozdíl od jiných XRF metod používaných pro měření obsahu prvků v lišejnících (Favero-Longo *et al.*, 2015; Herrero Fernández *et al.*, 2016; Ibarrondo *et al.*, 2017), není v tomto případě před měřením nutná žádná příprava vzorků, což přispívá k rychlosti této metody. Měření je tak možné provádět přímo v terénu, což umožňuje vytipovat konkrétní místa s vysokým (nebo nízkým, v závislosti na předmětu výzkumu) obsahem prvků těžších než Mg. Měření Mg bohužel nebylo v mém případě v mnoha případech průkazné, v případě Želivky byl Mg ve 100 % případů pod limitem detekce, i když díky měření obsahu prvků pomocí SEM-EDS vím, že se zde Mg vyskytuje (**Obr. 19**). Ačkoliv se zaměřuji na přítomnost těžkých kovů (především Ni a Cr) v hadcovém substrátu, Mg je jedním z prvků charakterizujících hadec – a také limitujících růst cévnatých rostlin (Alexander *et al.*, 2007), proto by bylo zajímavé znát jeho obsah v hornině. Druhou nevýhodou pro toto „terénní“ použití je fakt, že měření probíhá nejpřesněji na rovném povrchu. V případě nerovností dochází k odrazení záření mimo detektor a tím pádem ke zkreslení výsledků měření. Ačkoliv jsem se snažila odsekávat a měřit co nejrovnější plošky, dokonale rovný povrch jsem nikdy získat nedokázala. V této práci sice uvádím konkrétní hodnoty naměřených prvků, ale je třeba je brát spíše orientačně. Poslední nevýhodu představuje neznámá hloubka měření – nemohla jsem proto zjistit, zda měřím ještě stélku nebo už horninu. I když jsem zde vyjmenovala hned několik nevýhod, které tato metoda přináší, je díky své rychlosti i terénnímu využití unikátní metodou pro zjištění obsahu těžkých kovů (nejen) v horninách. Důvěryhodnost této metody potvrzuje i fakt, že výsledky měření jsou srovnatelné s jinými metodami měření obsahu prvků v horninách, které byly prováděny laboratorně (Sarala, 2016; Brent *et al.*, 2017).

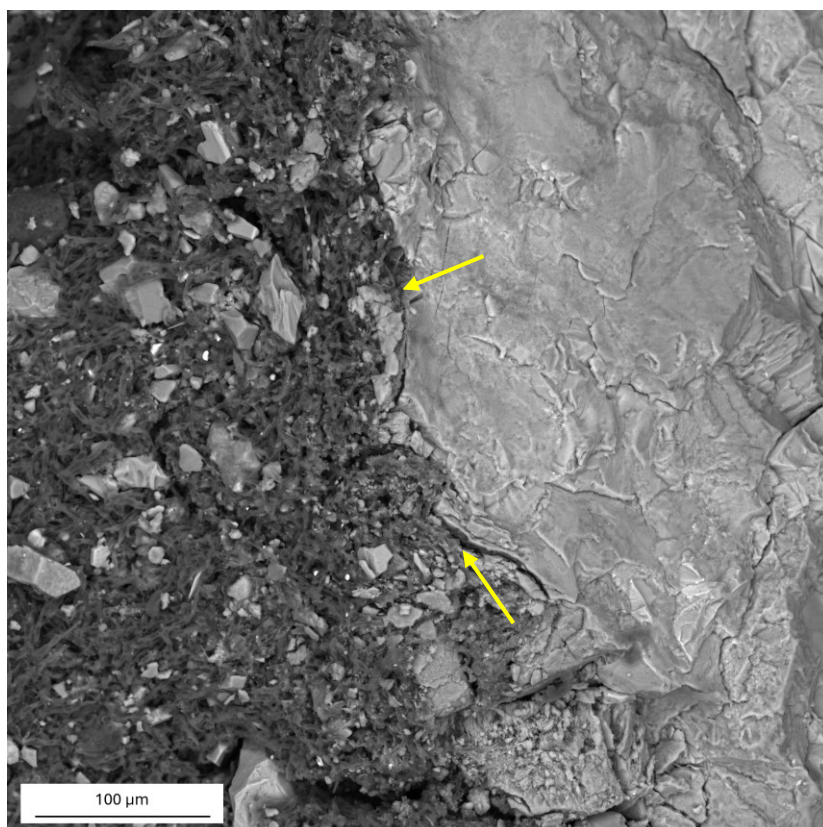
5.1.4 SEM-EDS

Ze všech typů stélky jsou korovité lišejníky v největším kontaktu se substrátem, na kterém rostou, a proto mohou být nejvíce ovlivňovány jeho chemickými vlastnostmi. Studium těchto lišejníků je však poměrně náročné – získat dostatečné množství materiálu pro analýzy může v některých případech představovat problém. Právě z tohoto důvodu je ideální metodou pro studium obsahu těžkých kovů SEM-EDS, pro kterou stačí pouze malé množství materiálu (Williamson *et al.*, 1998; Bačkor & Fahselt, 2008). SEM-EDS byla použita pro studium zvětrávacích procesů horniny způsobených přítomností lišejníku již před více než 40 lety (Jones *et al.*, 1981; Wilson *et al.*, 1981), od té doby se těší oblibě právě při studiu příjmu částic ze substrátu a jejich zvětrávání (Acaso & Wierzechos, 1994; Vingiani *et al.*, 2013; De Vasconcelos *et al.*, 2015), ale i při studiu atmosférické depozice (Marié *et*

al., 2018; Ramić *et al.*, 2019; Yavuz & Çobanoğlu, 2021). Jelikož je SEM-EDS velmi citlivou metodou, nesmí být při přípravě vzorků použity žádné kovové nástroje, které by mohly zanechat „otisk“ na připravovaném vzorku – pokud není stélka dostatečně tlustá, je příprava vzorku keramickým nožem (který jsem pro tyto účely používala) téměř nemožná. Ve většině případů se v rámci této metody snímají výbrusy anorganických materiálů – tedy plochy vzorků, které jsou úplně rovné. Příprava výbrusu zároveň z organického i anorganického materiálu je složitější s nejistým výsledkem, proto jsme se s M. Vítkovou rozhodly od ní pro účely diplomové práce upustit. Sledované vzorky tak nebyly dokonale hladké, což v některých případech způsobilo ne zcela spolehlivá měření. Zároveň není možné určit přesnou hloubku měření (1–5 µm pod povrchem vzorku), a to především u organického materiálu, který může překrývat částici, která se nachází jen kousek pod jeho povrchem. I přes tyto drobné nedostatky však považuji tuto metodu za přínosnou, jelikož umožňuje nejen vizualizaci přesné lokalizace částic horniny ve stélce, ale zároveň umožňuje vytipovat částice s prvky s vyšším atomovým číslem, ve kterých lze změřit jejich obsah. Navíc lze provést měření i velmi malých částic díky elektronovému paprsku o průměru 1 µm.

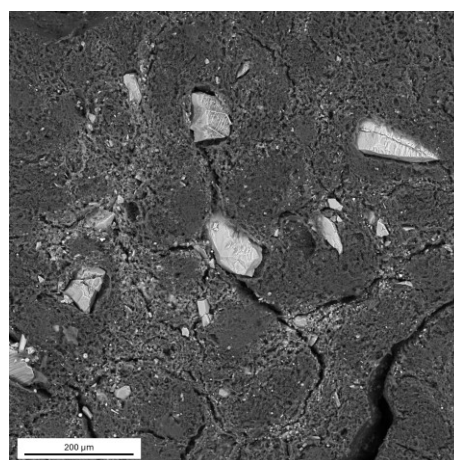
5.2 Příjem částic horniny do stélky lišejníku

Pozorováním vzorků z obou typů horniny v SEM jsem potvrdila výskyt anorganických částic uvnitř stélky lišejníku. Částice bohaté na kovy pronikají do stélky lišejníku ze dvou směrů – skrze spodní i svrchní povrch stélky. Na detailu rozhraní stélky a horniny (**Obr. 44**) je možné sledovat růst hyf mykobionta, které vnikají do prasklin v hornině, čímž může docházet k oddělování částíček od zbytku horniny a jejich postupnému začlenění do stélky lišejníku. Toto zvětrávání horniny je nejspíš způsobené fyzikálními vlivy jako např. mrznoucí vodou (Fahey, 1983), mechanickým působením houbových hyf (Acaso & Wierzechos, 1994), ale může k němu docházet i společným působením rozrůstání houbových hyf a vylučování sekundárních metabolitů (Wilson *et al.*, 1981; detailně v Chen *et al.*, 2000; De Vasconcelos *et al.*, 2015). Jelikož jsou lišejníky dlouhodobě pomalu rostoucí organismy, je možné, že dochází i k inkorporaci prachových částic rozličného původu, které pokrývají substrát (Acaso & Wierzechos, 1994). Provedená měření, která se v obsahu prvků shodují mezi jednotlivými částicemi a substrátem (přítomnost Mg a Ni nebo Cr v případě hadců, Fe, Mn a vyššího obsahu Si v případě amfibolitů), a lokalizace prvků ve spodní části stélky lišejníku však poukazují spíše na substrátový zdroj těchto částic. Příjem částic substrátu do stélky byl již dříve potvrzen, a to u lišejníků se všemi základními typy stélky – korovitou, lupenitou (Acaso & Wierzechos, 1994) i keříčkovitou/dimorfickou (De Vasconcelos *et al.*, 2015).



Obr. 44 Detail rozhraní lišejníku *Lecanora rupicola* a hadce z Mohelenské hadcové stepi, žluté šipky označují místa, kde pronikají hyfy mykobionta do prasklin v substrátu.

Druhým zdrojem částic bohatých na kovy je suchá i mokrá atmosférická depozice (Nash, 2008). Tyto částice lze nalézt v korové vrstvě, kam pronikají skrze svrchní povrch lišejníku (**Obr. 43**). Částice z atmosférické depozice je možné pozorovat i v epihymeniu apothecií (**Obr. 20 a** – příčný řez apotheciem lišejníku *Lecidea fuscoatra* z PR U doutné skály (BSE), šipka označuje místo měření, **1** = okraj apothecia, **2** = epithecium, **3** = thecium (hymenium), **b** + **c** – spektrum prvků naměřených v místech měření,



Obr. 43 Svrchní povrch stélky lišejníku *Lecanora rupicola*

d – detail spodního povrchu stélky lišejníku *Acarospora fuscata* (BSE), šipka označuje místo měření, kroužek zvýrazňuje částici na povrchu vzorku, **e** – detail spodního povrchu stélky lišejníku *Acarospora fuscata* (SE)a). Zdroj těchto částic je nejspíš jak v okolním substrátu, tak mohou být přineseny z větších vzdáleností. Jejich přítomnost je proto ovlivněna převládajícím prouděním větru na dané lokalitě.

Z řezu stélkou (**Obr. 16**) je patrné, že množství částic se snižuje směrem k vrstvě fotobionta. To je logické, vzhledem k faktu, že se vrstva fotobionta nachází pod korovou vrstvou a od substrátu ji

tudíž odděluje celá dřevná vrstva, která většinu částic ze substrátu zachytí. Stejně tak je vrstva fotobionta chráněná před atmosférickou depozicí svrchní korovou vrstvou. Stejně pozorování provedl v lišejníku rodu *Acarospora* i Purvis (2014). Vrstva fotobionta je tak více chráněná před přímým kontaktem s částicemi, ze kterých by mohlo dojít k úniku kationtů těžkých kovů do okolního prostoru. Stejně tak je chráněná výtrusorodá vrstva v apotheciích – zde se částičky vyskytují v hypotezii a epihymeniu.

5.3 Diverzita fotobiontů na hadci a amfibolitu

Druhovité složení fotobiontů dvou zkoumaných substrátů se víceméně neliší. Na každém substrátu se nacházejí linie, které na druhém typu substrátu scházejí, na amfibolitu je těchto linií více. Tím se tedy vyvrátila hypotéza, že se na hadcích budou ve většině stélek nacházet jiné linie fotobiontů než na amfibolitech, nebo že se zde budou ve stélkách lišejníků ve větší míře vyskytovat linie řas specifické pouze pro hadce a jiné lokality s vysokým obsahem těžkých kovů. To je poměrně překvapivé zjištění vzhledem k faktu, že jsem v hadcích naměřila vysoké hodnoty těžkých kovů (Ni, Cr), vůči kterým jsou fotobionti citliví (Bačkor *et al.*, 2007; Bačkor & Fahselt, 2008). Předpokládá se, že se na substrátech s vysokými hladinami těžkých kovů budou vyskytovat právě takoví fotobionti, kteří dokážou zatížení těžkými kovy dobře tolerovat (Bačkor *et al.*, 2010; Álvarez *et al.*, 2012; Osyczka *et al.*, 2020).

5.3.1 Toxicita hadcových substrátů

Oba studované substráty obsahují těžké kovy – hadec Ni a Cr, amfibolit Mn a Ti. Na hadcích se navíc vyskytuje ve velkém množství Mg, zatímco na amfibolitech Fe. Důležitějším faktorem než konkrétní druh přítomného kovu však může být obecně zvýšený obsah těžkých kovů v substrátu, který lišejník porůstá. Lišejníky totiž reagují na přítomnost kationtů těžkých kovů pomocí stejných mechanismů, ať už se jedná o kterýkoliv těžký kov (viz kapitulu 1.1, Tyler *et al.*, 1989; Bačkor *et al.*, 2009). Lišejníky z obou substrátů tak přicházejí do styku s těžkými kovy.

Pro pochopení interakce mezi lišejníky a kovy v substrátu je třeba znát širší kontext příjmu kovů do stélky lišejníku. Pod spojením „příjem kovů do stélky“ se skrývají tři mechanismy – prosté zachycení částic uvnitř stélky lišejníku, extracelulární a intracelulární příjem kovových iontů (Nieboer *et al.*, 1978; Richardson, 1995; Bargagli & Mikhailova, 2002). Tyto mechanismy podrobněji popisují v kapitole 1.1. Ačkoliv se některé (především korovité) druhy lišejníku považují za hyperakumulátory těžkých kovů, je tento termín nedostatečně definován – zatímco někteří autoři jej používají pro zachycení částic bohatých na těžké kovy, jiní jej spojují s obsahem iontů kovů ve stélce lišejníku (Chisholm *et al.*, 1987; Pawlik-Skowrońska *et al.*, 2006). Pokud však dojde pouze k zachycení/příjmu částice ze substrátu nebo atmosférické depozice, neznamená to nutně, že jsou kovy z ní pro lišejník dostupné. Tyto částice mohou zůstat po dlouhou dobu uvnitř lišejníku, aniž by z nich docházelo k uvolňování iontů (Brown & Beckett, 1985). Důležité je zmínit, že kov se stává pro lišejník toxickým až ve chvíli, kdy dojde k jeho intracelulárnímu příjmu (Tyler, 1989; Purvis & Pawlik-

Skowrońska, 2008; Bačkor & Loppi, 2009). Korovité saxikolní lišejníky obsahují velké množství drobných částic horniny, kterou porůstají (viz kapitoly 4.3 a 5.1.4), což ale nutně nemusí znamenat, že se mykobionti a fotobionti potýkají s vysokými koncentracemi iontů těžkých kovů, které by ohrožovaly jejich vitalitu. Stejně jako v případě částic horniny dosáhne vrstvy fotobionta jen minimum iontů těžkých kovů (Richardson & Nieboer, 1983; Garty, 2001; Toppi *et al.*, 2004; Sanità Di Toppi *et al.*, 2005), díky čemuž je fotobiont chráněn před přímým působením těchto kovů.

Uvolňování iontů kovů závisí na dalším faktoru, který hraje při příjmu kovů roli – na pH. Čím je pH substrátu nižší, tím snáze se z něj ionty kovů uvolňují (Lucas & Davis, 1961; Bačkor & Loppi, 2009; Paukov *et al.*, 2019). České hadce dosahují vysokých hodnot pH, což může zmírňovat dostupnost kovů ze substrátu a tím i jejich toxicitu. Ačkoli pH substrátu hraje velkou roli při uvolňování těžkých kovů, je otázkou, jaké pH panuje v lišejníku. Pokud by bylo pH uvnitř stélky nižší než pH substrátu, mohlo by zde docházet k uvolňování kationtů z částic, které jsou ve stélce zachycené. V regulaci pH uvnitř lišejníku hrají roli sekundární metabolity (Favero-Longo *et al.*, 2015), které zároveň přispívají k vylučování těžkých kovů na povrch hyf mykobionta nebo na povrch stélky. Oběma těmito funkcemi přispívají k homeostázi v lišejníku a ochraně fotobionta před stresem z přítomnosti těžkých kovů.

Vitalita fotobionta je důležitá pro celkové fungování lišejníku. Těžké kovy mohou způsobit poškození fotosyntézy (Bačkor & Fahselt, 2008), což vede ke snížení produkce cukerných alkoholů (Fahselt, 1994), které jsou základním stavebním kamenem sekundárních metabolitů (Lines *et al.*, 1989). To vede k dalšímu snížení tvorby sekundárních metabolitů a ještě většímu pronikání těžkých kovů dovnitř buněk obou symbiontů (Fahselt, 1994). Udržení homeostáze v lišejníku je proto zásadní pro odolávání stresu způsobeném těžkými kovy.

Ze sekundárních metabolitů se na hadcích dostávají ke slovu především šťavelany. Hořčík se z větší části sráží extracelulárně ve formě dihydrátu šťavelanu hořečnatého, což je ve vodě nerozpustná sůl, která zůstává extracelulárně vyloučená na povrchu hyf. Dihydrát šťavelanu hořečnatého je podobný a izomorfní s dihydráty šťavelanu Ni, Fe, Zn, Co a Mn (Lagier *et al.*, 1969; Dubernat & Pezerat, 1974 cit. v Wilson *et al.*, 1981), což znamená, že se tyto prvky mohou vzájemně zastupovat v krystalové mřížce. Na hadcích by tímto způsobem mohlo dojít k zamezení intracelulárního příjmu kovů (Wilson *et al.*, 1981).

Fotobionti lišejníků z hadcových substrátů se nemusejí potýkat s kationty těžkých kovů pouze ve stélkách lišejníků, kde jsou díky výše zmíněným mechanismům dostatečně chráněni před působením těžkých kovů. Všechny lišejníky, které jsem v rámci své diplomové práce studovala, se rozmnožují převážně pohlavně. To znamená, že si spora po vyklíčení musí najít vhodného fotobionta v prostředí (Honegger, 1986) nebo ho získat z vyvinuté stélky jiného lišejníku (Ott, 1987). Volně žijící fotobiont je před započítím lichenizačního procesu v bezprostředním kontaktu se substrátem. To je také důvod, proč jsem očekávala, že budou lišejníky z hadců obsahovat specifické linie

fotobiontů, které jsou na substráty s vysokým obsahem kovů adaptované. Jak už jsem zmínila výše, biologická dostupnost těžkých kovů souvisí s hodnotou pH, která je na hadcích vysoká a těžké kovy by tedy měly být dostupné minimálně. To se potvrdilo měřením konduktivity výluhu namleté horniny. Hadce sice mají konduktivitu vyšší než amfibolity, obě hodnoty jsou ale velmi nízké a poukazují na malé množství rozpuštěných iontů v měřeném výluhu. Paukov *et al.* (2019) ve své studii naměřili na hadcích podobné pH (> 8), ale konduktivitu mnohonásobně vyšší (v přepočtu 2900 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Přesto však předpokládají, že lišejníky z hadců přicházejí do styku s poměrně koncentrovanými roztoky iontů, ovšem ty patří z většiny Mg a Ca a jen minimálně ostatním prvkům, které jsou biologicky málo dostupné. Nutno však dodat, že v porovnání s touto studií jsem naměřila nižší obsah Mg, ale zato vyšší obsah Ni a Cr, což může znamenat, že jsou i poměry iontů jednotlivých kovů v měřeném roztoku rozdílné. Ani to však nemění nic na faktu, že výluh z hadců má velmi nízkou konduktivitu. Pro účely měření pH i konduktivity jsem namlela z většiny zdravou horninu – lze tedy předpokládat, že zvětralý povrch horniny bude obsahovat ještě méně dostupných kovů, protože jsou po tisíciletí vystaveny vnějším vlivům a došlo tak k jejich vymytí. Druhou možností však je, že budou kovy ze zvětralé vrstvy dostupnější z důvodu nižšího pH způsobeném zvětrávacími silami jako např. kyselé deště.

Různá hadcová tělesa se vzájemně liší v obsahu těžkých kovů, jejich biologické dostupnosti i pH (Kruckeberg, 1992; Paukov, 2009; Paukov *et al.*, 2019). Je proto možné, že na jiných lokalitách budou hadce představovat stanoviště, na kterých budou kovy biologicky dostupnější a budou tedy více působit na oba lišejníkové symbionty.

Jelikož je na hadci jen málo biologicky dostupných kovů, nepředstavují hadce pro fotobionty (ani mykobionty) překážku, kterou by museli překonávat, a z hlediska obsahu těžkých kovů tedy není důvod, aby se zde vyskytovaly jiné linie fotobiontů než na kontrolní amfibolitové hornině.

5.3.2 Co ovlivňuje druhovou skladbu fotobiontů?

5.3.2.1 Selektivita & specifita

Protože nebylo prokázáno, že má přítomnost těžkých kovů v substrátu zásadní vliv na druhovou skladbu fotobiontů na hadcích a amfibolitech (pouze 6 %), lze předpokládat, že je přítomnost fotobiontů na studovaných lokalitách ovlivňována především jinými faktory. U lišejníků v této studii je přítomnost konkrétní linie fotobionta nejvíce řízená druhem mykobionta, se kterým vytváří lišejníkovou stélku (**Obr. 36**). Jak zmiňuji výše, všechny lišejníky, které jsem studovala, se rozmnožují převážně pohlavně a musí si tudíž najít vhodného fotosyntetického partnera v místě dopadu spory. Zásadní pro vznik vztahu mezi oběma symbionty je míra jejich pružnosti ve výběru partnera – tedy jejich specifita (množství druhů/linií, se kterými je daný symbiont schopen započít symbiózu, Rambold *et al.*, 1998). Partneri k sobě však mohou být i různě selektivní – mohou preferovat spojení jen s jedním druhem/linií nebo naopak akceptovat širokou škálu druhů/linií. Mezi oběma extrémy se nachází i řada přechodných typů (Yahr *et al.*, 2004; Otálora *et al.*, 2013; Belinchón *et al.*, 2015). U

kosmopolitně se vyskytujícími lišejníky s širokou ekologickou amplitudou tak hraje roli nízká specifita i selektivita mykobiontů, která jim umožňuje započít lichenizaci s lokálně adaptovanými fotobionty, a tím i osídlit stanoviště s nejrůznějšími klimatickými i chemickými podmínkami (Muggia *et al.*, 2014).

Žádný z morfologicky určených druhů mykobiontů, které jsem studovala, nevykazoval jako celek specifitu vůči některé linii fotobiontů. Specifitu vůči některé linii fotobiontů jsem zaznamenala pouze u dvou genetických linií, a to v rámci druhu *Protoparmeliopsis muralis* a *Candelariella vitellina*. U prvního zmíněného druhu asociovali mykobionti ze stélek ze stejné lokality (Želivky) ZE22, ZE24 a ZE3 (**Obr. 22**) s fotobionty linie A10. Linie A10 představuje linii, která je na této lokalitě nejhojněji zastoupená – nachází se v deseti stélkách z celkového počtu 18 stélek, které obsahují trebouxioidních fotobionta. V rámci druhu *C. vitellina* jsem našla fotobionty linie A06 ve třech vzorcích (DS23, MO11, TH3) tvořících jeden clade, které pocházejí ze dvou amfibolitových (Bítov, Třebovské hradisko) a jedné hadcové lokality (Mohelno).

U některých genetických linií mykobiontů převažoval výskyt jedné linie fotobionta. V rámci druhu *Lecidella carpathica* (**Obr. 22**) se v šesti stélkách jednoho cladu (KR17, KR36, KR41, HH12–14) nacházela linie A06 a v jedné stélce (HH11) blíže nezařazená linie z cladu A. Všechny tyto položky zároveň představují mykobionty, kteří na základě úseku ITS nevykazovali vysokou shodu (> 98 %) s druhem *L. carpathica* (viz kapitulu 4.4). Jiná genetická linie téhož druhu pak obsahovala ve třech případech linii A10 (vzorky ZE18, ZE5, BS9) a v jedné stélce linii A06 (BS18).

U čtyř druhů mykobiontů (*Candelariella vitellina*, *Lecidella carpathica*, *Protoparmeliopsis muralis* a *Pertusaria chiodectionoides*) jsem však zaznamenala pouze linie z cladu A. Stejného výsledku dosáhli u prvních tří jmenovaných druhů i Peksa a kol. (Peksa *et al.*, 2022), fotobionti lišejníku *Pertusaria chiodectionoides* nebyli podrobeni bližšímu zkoumání. V lišejníku *Protoparmeliopsis muralis* potvrzují přítomnost fotobiontů pouze z cladu A Muggia a kol. (Muggia *et al.*, 2013). Naopak linie fotobiontů z různých cladů v lišejníku *Lecanora rupicola* našli i Blaha a kol. (Blaha *et al.*, 2006). Mykobionti druhů *Candelariella vitellina*, *Candelariella coralliza* a *Lecidella carpathica* vykazovali selektivitu vůči linii A06, kterou obsahovalo 60 a více procent sebraných stélek. Všechny lišejníky, kterým jsem se v rámci své diplomové práce věnovala, proto považuji za generalisty, co se výběru linie fotobionta týče. To jim spolu s širokou ekologickou amplitudou, ve které jsou schopni růst, umožňuje osídlit nejrůznější stanoviště a stát se tak úspěšnými druhy na rozsáhlém geografickém území.

Ačkoliv je průměrný počet linií fotobiontů vyskytujících se na lokalitách 4,3, některé lokality jsou na linie fotobiontů bohatší (Želivka – sedm, Křížky – šest), zatímco na jiných jsem zaznamenala jen nízký počet linií fotobiontů (Borecká skalka, Ráj – dvě). Jedním z možných vysvětlení je vyšší dostupnost kovových iontů na této lokalitě. Ráj je lokalitou, kde byla naměřena nejvyšší konduktivita ze všech amfibolitových lokalit (64,92 $\mu\text{S}/\text{cm}$, průměr všech amfibolitových lokalit je pouze 40,03

$\mu\text{S}/\text{cm}$) a nejvyšší obsah Fe, Mn i Ti. Do vodného roztoku se tedy uvolnilo více iontů, které patří některému nebo všem výše zmíněným prvkům. Je nutné mít na paměti, že ačkoliv je tato konduktivita vyšší než na ostatních amfibolitových lokalitách, je stále velmi nízká a množství iontů, které jsou ze substrátu dostupné, tak zůstává také nízké. Podobný trend v nízké diverzitě fotobiontů z lokality bohaté na Fe zjistil i Beck (1999), který v devíti druzích z okruhu *Acarosporium sinopicae* zaznamenal jediného fotobionta *Trebouxia jamesii*. Ve stélkách z Ráje jsem zaznamenala v deseti stélkách linii A06 (*T. incrustata*) a v jedné stélce linii A03 (*T. jamesii*). Na lokalitě Borecká skalka jsem naměřila podobnou konduktivitu jako na lokalitě Ráj (64,26 $\mu\text{S}/\text{cm}$), zároveň hornina na této lokalitě a nevyniká v obsahu žádného kovu. Je proto sporné, zda na Ráji může za nízkou diverzitu fotobiontů vyšší obsah dostupných např. železitých iontů nebo zda hraje roli jiný faktor.

5.3.2.2 Podmínky prostředí

Podmínky prostředí určují, zda na daném stanovišti dokáže volně žijící fotobiont přežít a bude tak k dispozici pro klíčící spory. Klíčovou roli v rozšíření fotobiontů tak může sehrávat pH (Brodo, 1973; Beck, 2002; Helms, 2003; Peksa & Škaloud, 2011; Peksa *et al.*, 2022; Škvorová *et al.*, 2022), klimatické poměry v rámci studované lokality (Helms, 2003; Blaha *et al.*, 2006; Guzow-Krzemińska, 2006; Muggia *et al.*, 2008; Peksa & Škaloud, 2011; Vančurová *et al.*, 2021) i mikroklima jednotlivých stanovišť (Noh *et al.*, 2020).

Předpokládá se, že fotosyntetický aparát řas je citlivý vůči pH a dokáže tolerovat jen určité rozmezí jeho hodnot (Lechowicz, 1982; Scott & Hutchinson, 1987). Jednotlivé linie řas rodu *Trebouxia* rozřadili Peksa a kol. (Peksa *et al.*, 2022) do tří skupin podle jejich preference pH: (i) acidofilní linie (pH < 5,7) – S02a, S02b, S04, S05, S10a, A03, A04, Ax, I01a, (ii) subneutrální linie (pH 5,7–7) – A06, A10 a (iii) bazofilní linie (pH > 7) – Ay, A01 a A11. Helms (2003) určil jednotlivé kategorie pH podobně jako Peksa a kol., tedy kyselé prostředí dosahuje hodnot pH < 6, ± neutrální 6–8 a zásadité > 8. Clade S podle Peksy a kol. vykazuje výhradně acidofilní charakter, což potvrzuje i Helms (2003). Beck (2002) našel zástupce tohoto cladu i na substrátech s vysokým obsahem těžkých kovů. Nejvyšší počet linií z cladu S (celkem čtyři) jsem zaznamenala na amfibolitové lokalitě v Údolí Teplé (ve 12 stélkách z celkového počtu 13 sebraných stélek). Údolí Teplé představuje druhou nejkyselejší lokalitu v rámci této práce (pH 7,52). Na nejkyselejší lokalitě (Bítov, pH = 6,83) jsem však nezaznamenala jedinou linii z tohoto cladu. Je zajímavé, že na Křížkách (pH 9,14), tedy lokalitě sousedící s Údolím Teplé, byly řasy z cladu S přítomné v sedmi stélkách ze 17 analyzovaných.

Zároveň je nutné podotknout, že hodnoty pH, které jsem na lokalitách naměřila, jsou výrazně vyšší než ty naměřené ve studii Peksy a kol. (Peksa *et al.*, 2022) a jejich rozdělení linií na základě preferencí pH tím pádem neodpovídá mým výsledkům. pH substrátů, které porůstají lišejníky s fotobiontem z cladu S v rámci mé práce, dosahuje v průměru hodnoty 8,2, což je o 2,5 stupně vyšší hodnota než maximální pH, ve kterém rostly lišejníky s fotobiontem z cladu S ve výše zmíněné

studii. Na jediné hadcové lokalitě v této studii naměřili Peksa a kol. pH 6,32, zatímco aritmetický průměr pH všech hadcových lokalit z této práce dosahuje hodnoty 8,98. Takto rozdílné hodnoty pH jsou způsobené použitím odlišné metody měření pH, resp. odlišné přípravy výluhu. Problematiku měření pH substrátu rozebírám podrobněji v kapitole 5.1.2.

Prekvapivým zjištěním je, že nejčastějšími liniemi trebouxioidních řas v obou porovnávaných pracích jsou linie A06 a A10, které podle studie Peksy *et al.* vykazují subneutrální preference. Z bazofilních linií jsem zaznamenala pouze linii A01 v jediné stélce z amfibolitové lokality Kalvárie (pH 8,02), která představuje nejzásaditější amfibolitovou lokalitu. Na hadcích, na kterých je pH vyšší, jsem ale žádnou z bazofilních linií neidentifikovala. Ačkoliv jsou rozdíly v naměřeném pH mezi hadcem a amfibolitem významné, druhové složení fotobiontů v rámci zkoumaných lokalit tyto rozdíly nereflkuje. Tato skutečnost jen podporuje fakt, že zvětralá vrstva horniny má jiné pH než zdravá hornina a je tudíž možné, že pH povrchu horniny, které jsem naměřila, je i přes problematický průběh měření blíže tomu, s čím přichází lišejník do přímého kontaktu. Zjištění hodnoty pH, které je lišejník vystaven, se mi proto jeví jako zásadní pro pochopení biogeochemických procesů, které se odehrávají mezi substrátem, mykobiontem a fotobiontem.

K výměně fotobiontů v lišejníku nemusí docházet jen vlivem měnícího se pH, ale i na základě jiného gradientu prostředí, především teploty nebo teploty a srážek (Blaha *et al.*, 2006; Rolshausen *et al.*, 2018, 2020; Vančurová *et al.*, 2021; Nelsen *et al.*, 2022). V rámci své diplomové práce jsem nezaznamenala afinitu některé z linií fotobiontů k určitému rozmezí teplot, ačkoliv klima společně s druhem mykobionta vysvětluje 18 % genetické variability fotobiontů (klima samotné však pouze 2 %). Mezi lokalitami ale nejsou velké teplotní rozdíly na rozdíl od studií, které zmiňují výše.

5.4 Diverzita mykobiontů na hadci

Existují dvě hypotézy, jak hadce ovlivňují spektrum druhů lišejníků, které na nich dokážou růst. První přikládá význam působení těžkých kovů a předpokládá proto, že se na hadcích vyskytují pouze druhy, které dokážou vysoké koncentrace těžkých kovů dobře tolerovat (Bačkor & Loppi, 2009). Druhá teorie naopak vlivu těžkých kovů význam nepřikládá, ale zaměřuje se spíše na ostatní vlastnosti hadce, jako je společné působení jeho chemických a fyzikálních vlastností (viz kapitolu 1.3), mikroklimatu (Paukov, 2009) i makroklimatu (Rajakaruna *et al.*, 2009). Vzhledem k výsledkům mé diplomové práce se přikláním k druhé teorii, jelikož těžké kovy jsou ze substrátu pravděpodobně jen velmi málo dostupné. Provedená měření navíc potvrzují, že jsou v hadcích jednotlivé prvky nehomogenně rozmístěné, což jen podporuje množství mikrostanišť, na kterých mohou lišejníky růst, a tím i vyšší diverzitu přítomných druhů. O tom, že hadce nepředstavují substrát, na který se lišejníky musí adaptovat, svědčí i malé množství známých hadcových lišejníkových endemitů.

5.5 Fotobionti hadců a postindustriálních stanovišť

Hadce představují přirozeně vzniklé stanoviště s vysokým obsahem těžkých kovů. Nabízí se proto srovnání druhové skladby fotobiontů s antropogenně vzniklými stanovišti zatíženými těžkými kovy, kterými jsou nejruznější postindustriální stanoviště jako haldy nebo výsypky.

Na postindustriálních stanovištích s vysokým obsahem těžkých kovů byla zjištěna přítomnost alternativních fotobiontů ve stélkách lišejníku rodu *Cladonia* (Osyczka *et al.*, 2020). Dutohlávky preferují tvorbu symbiózy s řasami rodu *Asterochloris* (Bačkor *et al.*, 2010; Peksa, 2011a; Peksa & Škaloud, 2011), vlivem těžkých kovů však mohou řasu rodu *Asterochloris* vyměnit za řasy rodu *Trebouxia* (Beck, 2002). Právě fotobionty rodu *Trebouxia* objevili ve stélkách dutohlávek na postindustriálních stanovištích Osyczka *et al.* (2020), přičemž jejich přítomnost byla ovlivněná obsahem těžkých kovů v substrátu – čím vyšší hladiny těžkých kovů substrát obsahoval, tím více stélek obsahovalo trebouxioidní fotobionty. V případě, že se v prostředí vyskytovaly i řasy rodu *Asterochloris*, došlo k jejich preferenčnímu zapojení do tvorby lišejníkové stélky. Řasy rodu *Trebouxia* tak představují alternativní fotobionty pro lišejníky, které s ní umí započít symbiózu. Tím mohou pionýrské lišejníky zvýšit svůj kolonizační potenciál a rozšířit tak svou ekologickou amplitudu (Osyczka *et al.*, 2020). Druhy rodu *Cladonia* studované v této práci obsahovaly pouze řasy rodu *Trebouxia* z cladů A a I – to může být v lehkém rozporu s tvrzením, že řasy z cladu S nalezneme na substrátech obsahujících těžké kovy (Beck, 2002). Zároveň však clade S preferuje kyselé substráty a na studovaných stanovištích bylo naměřeno subneutrální pH (6–7).

Nejvyšší koncentrace těžkých kovů ve stélkách dutohlávek na postindustriálních stanovištích byla zjištěna ve spodní části podecia a přizemních šupinách – tedy v částech stélky, které jsou v bezprostředním kontaktu se substrátem. Kationty těžkých kovů jsou do stélek přijaty pasivním příjmem vodného roztoku (skrze kapilaritu), ve kterém se vyskytují (Osyczka *et al.*, 2016). To svědčí o jejich biologické dostupnosti a uvolňování ze substrátu.

Sekvence fotobiontů druhu *Cladonia pyxidata* jsem získala ze všech studovaných hadcových lokalit. Ani v jedné stélce jsem však nezjistila alternativního fotobionta jiného rodu, což potvrzuje mou teorii o nedostupnosti kovů z hadcového substrátu. Zatímco přirozené hadcové výchozy představují dlouhodobě stabilní stanoviště se stálými podmínkami a ustáleným druhovým složením, postindustriální stanoviště jsou opuštěná jen desítky až stovky let a jedná se tak o raně sukcesní stanoviště (Osyczka *et al.*, 2020). Tomu odpovídá nejen dostupnost kovů ze substrátu, ale i druhová skladba lišejníků, kdy na výše popsaných industriálních stanovištích rostou pionýrské druhy lišejníků. Druhové složení fotobiontů lišejníků závisí právě i na sukcesním stádiu daného stanoviště (Osyczka *et al.*, 2020). Přítomnost alternativního fotobionta nemusí poukazovat pouze na chemismus substrátu, ale může být i reakcí na mikroklimatické podmínky v místě růstu stélky. Noh a kol. (2020) zjistili, že ve stélce lišejníku *Cladonia squamosa* dominují v jejích bazálních částech fotobionti z třídy *Trebouxiophyceae* a *Ulvophyceae*, zatímco v apikálních částech se vyskytují především

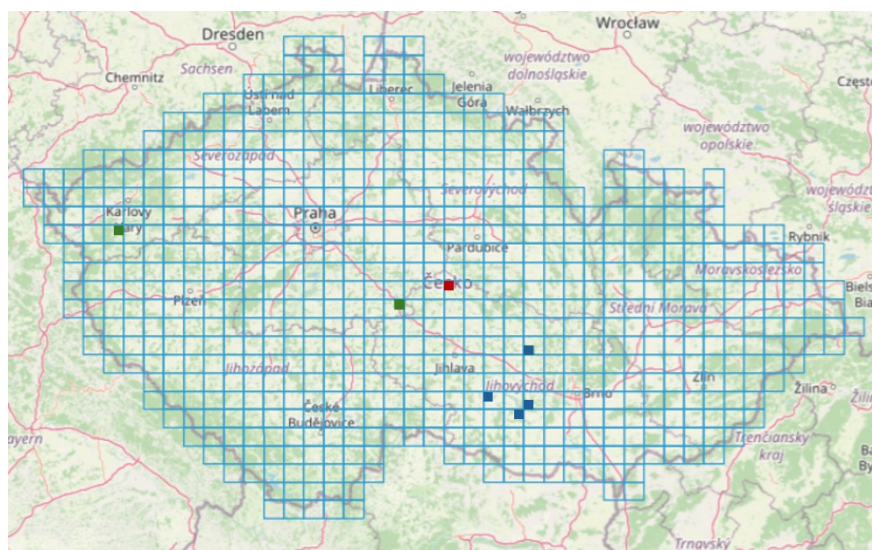
fotobionti druhu *Asterochloris erici*, který dokáže tolerovat vyšší míru desikace (Noh *et al.*, 2020). Schopnost vyměnit fotobionta za méně preferovaného, ale dostupného, představuje účinnou a nutnou strategii, jak na takovém stanovišti přežít a být minimálně citlivý vůči podmínkám prostředí (Wornik & Grube, 2010; Dal Grande *et al.*, 2018). Nabízí se otázka, zda neobsahují stélky druhu *Cladonia pyxidata* z této práce v přízemních šupinách jiné fotobionty než v podeciích, ze kterých jsem jejich sekvence získala.

5.6 Hadcový specialista a jeho preference

Pertusaria chiodectionoides je druhem, který (minimálně v rámci ČR) preferuje hadcové substráty a je možné ho spolu s druhem *Porpidia nadvornikana* označit za hadcového specialistu. Jeho vzhled je nenápadný a v terénu je možná záměna za některý z druhů rodu *Aspicilia*, o čemž svědčí i její synonymní jméno *Pertusaria aspicilioides* (Nimis, 2024). Rozšíření této dřatky je v ČR sporé. V minulosti byl její růst potvrzen pouze na čtyřech moravských lokalitách – Mohelně, Rouchovanech, Stříteži a Dolních Libochovanech (Suza, 1944; Vězda, 1959), na kterých se však v současné době výskyt ověřit nepodařilo (Malíček *et al.*, 2024). Recentně došlo k zaznamenání tohoto druhu na dvou nových lokalitách – Hadcích u Želivky (Malíček & Vondrák, 2013) a na několika hadcových výchozech ve Slavkovském lese (NPP Křížky – Peksa, 2011b; PP Dominova skalka – Peksová & Peksa, 2022; Palice nepubl.). Přítomnost druhu na lokalitách NPP Křížky a NPP Hadce u Želivky se mi podařilo ověřit. Zároveň jsem odhalila i novou lokalitu výskytu tohoto lišejníku – jedná se o bývalý hadcový lom Borek nedaleko Chotěboře (PP Borecká skalka), kde roste ve svrchních partiích na drobných hadcových výchozech.



Obr. 46 *Pertusaria chiodectionoides* (BS22) z nově objevené lokality Borecká skalka, foto: F. Bouda



Obr. 45 Rozšíření lišejníku *Pertusaria chiodectionoides* v ČR, **modře** – historicky udávané lokality, **zeleně** – současně známé lokality, **červeně** – nově zaznamenaná lokalita v PP Borecká skalka. (upraveno z Malíček *et al.*, 2024)

Jelikož je *Pertusaria chiodectonoides* hadcovým specialistou, předpokládala jsem, že bude po-
růstat místa obsahující nadprůměrná množství jednotlivých kovů a bude obsahovat fotobionty, kteří
jsou na takový substrát adaptovaní. Těmi by mohli být fotobionti z cladu S, kteří se vyskytují právě
na substrátech s vysokým obsahem těžkých kovů (Beck, 2002). Tento předpoklad se však nepotvrdil.
Všechny vzorky obsahovaly fotobionta rodu *Trebouxia* z cladu A, konkrétně stélky z Borecké skalky
a Křížků asociovaly s fotobiontem z linie A06 (*T. incrustata*), stélky z Želivky s fotobiontem z linie
A10 (*T. vaga*). Fotobionta z těchto linií obsahuje celkem 85 stélek sebraných lišejníků. Ačkoliv se
mi podařilo získat DNA pouze z pěti vzorků lišejníku *Pertusaria chiodectonoides*, zahrnují všechny
recentní oblasti výskytu. Skrze většinu stélek jsem naměřila nadprůměrný obsah Cr, Fe i Ni (**Tab.
13**). Pro vyvozování obecných závěrů o vazbě na tyto kovy však nemám k dispozici dostatečné
množství vzorků.

Tab. 13 Obsah kovů naměřený skrze stélky lišejníku *Pertusaria chiodectonoides*, **žlutě** jsou vyznačené
nadprůměrné hodnoty, všechny hodnoty jsou uvedeny v mg/kg.

kód	lokalita	Cr	Mn	Fe	Ni
ZE15	Želivka	12197,5	5745,5	583650,0	54000,0
ZE16	Želivka	16421,5	6262,5	610350,0	56350,0
ZE17	Želivka	10545,0	6413,0	593800,0	44200,0
Želivka průměr	Želivka	10957,7	6741,3	563153,1	39512
BS22	Borecká skalka	1263,0	564,0	50864,0	1062,5
Borecká skalka průměr	Borecká skalka	998,6	468,4	45488,7	1121,6
KR40	Křížky	681	360,0	38550	1243
Křížky průměr	Křížky	625,1	382,9	27773,3	669,9

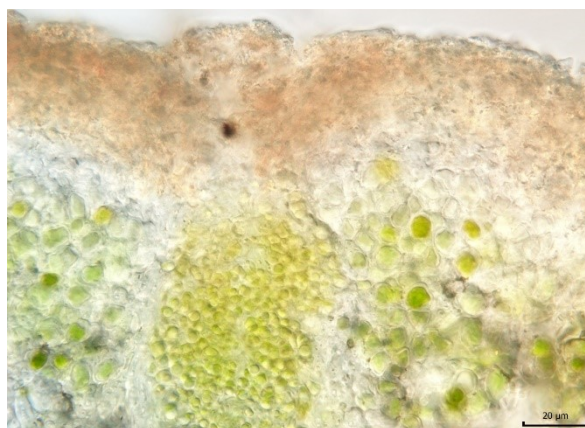
5.7 Pluralita fotobiontů ve stélce

V posledních letech se ukazuje, že pluralita fotobiontů v rámci jedné stélky lišejníku je nejspíš
častějším jevem, než se dříve předpokládalo (Dědková, 2023). Ve většině studií zabývajících se plu-
ralitou fotobiontů bylo ve stélce lišejníku objeveno více druhů řas téhož rodu (Bačkor *et al.*, 2010;
Muggia *et al.*, 2011, 2011; Park *et al.*, 2015; Voytsekhovich & Beck, 2016; Molins *et al.*, 2021),
nikoli více rodů – avšak i takové případy jsou známe (např. Vančurová *et al.*, 2018; Christmas *et al.*,
2021). Přítomnost více druhů/rodů fotobiontů ve stélce může představovat výhodu v disturbovaném
prostředí s měnícími se podmínkami (Casano *et al.*, 2011; Muggia *et al.*, 2014; Vančurová *et al.*,
2020; Christmas *et al.*, 2021).

Lišejník *Lecanora rupicola* není vyhraněný, co se asociovaných fotobiontů týče, naopak je aso-
ciován s mnoha liniemi řas rodu *Trebouxia* z různých cladů (Blaha *et al.*, 2006). V rámci této diplo-
mové práce jsem vůbec poprvé v jedné stélce tohoto druhu lišejníku objevila řasy dvou rodů – *Tre-
bouxia* a *Coccomyxa*, a to jak na základě molekulárních dat pocházejících z Illumina metabar-
codingu, tak na základě jejich morfologické odlišnosti. Rod *Coccomyxa* navíc dosud nebyl zazna-
menán jako fotobiont tohoto druhu lišejníku.

Zatímco buňky náležející rodu *Trebouxia* jsou ve stélce volně roztroušené a tvoří fotosyntetizující vrstvu, jakou známe z ostatních lišejníků s heteromerickou stélkou, buňky patřící rodu *Coccomyxa* se vyskytují ve „váčcích“ nebo minimálně prostorově oddělené houbovými vlákny od buněk druhého fotobionta (**Obr. 41**). Oba rody řas produkují stejný cukerný alkohol – ribitol (Richardson, 1973), důvodem pro oddělení buněk rodu *Coccomyxa* tedy nebude rozdíl v produktu fotosyntézy poskytovaném houbě. Řasy rodu *Coccomyxa* můžeme nalézt i volně žijící, v takovém případě mohou buňky produkovat slizové pochvy – díky nim vytvářejí kolonie a pro jiné řasy by mohlo být obtížné růst mezi takovými buňkami. Díky této schopnosti nejspíš mohou buňky tvořit kompaktní kolonii i v lišejníku a vytvářet tak pomyslný váček. Na druhou stranu bylo pozorováno, že pokud se buňky tohoto rodu nacházejí v lišejníku v roli fotosyntetizujícího partnera, tento sliz vytvářejí v mnohem menší míře (Tschermak-Woess, 1988).

Nabízí se tedy otázka, zda je takto pozorovaná *Coccomyxa* opravdu druhým rovnocenným fotobiontem daného lišejníku, či zda se jedná pouze o epilichenicky rostoucí řasu, která využila např. drobné praskliny korové vrstvy či jiného mechanického poškození dané areolky a vytvořila kolonii mezi houbovými vlákny. V některých případech byly buňky rodu *Coccomyxa* pozorovány až hluboko ve dřevěné vrstvě, tedy pod vrstvou řasy rodu *Trebouxia*, což by rozporovalo teorii o vniku do stélky porušením



Obr. 47 Detail oddělení řasy rodu *Coccomyxa* od svrchního povrchu stélky rodu *Trebouxia*

svrchní korové vrstvy. *Coccomyxa* byla také přítomna ve většině areol dané stélky, nejedná se tedy o náhodný výskyt v několika málo areolách. To potvrzují i výsledky metabarcodingu, které ukazují, že relativní abundance řasy *Coccomyxa antarctica* v tomto vzorku dosahuje 45 %. Na dalších lišejnících z této hadcové lokality jsem pozorovala epilichenicky rostoucí řasy, avšak po provedení příčných řezů a pozorování ve světelném mikroskopu, jsem je uvnitř stélek nikdy nenacházela, a to ani přímo v místě jejich růstu. Nutno také podotknout, že pozorování řas na povrchu jiných lišejníků není podloženo molekulárními daty a nevím tak, o které řasy se přesně jednalo.

Ačkoliv jsou řasy rodu *Coccomyxa* v rámci této stélky přítomné ve většině areol, stélka obsahuje i areoly, ve kterých jsem tuto řasu nepozorovala. Z toho usuzuji, že „hlavním“ fotobiontem zůstává rod *Trebouxia* a rod *Coccomyxa* představuje jakýsi druh „doplňkového“ fotobionta, jehož přítomnost představuje pro danou část stélky nějakou výhodu. Jak ukazuje fotografie fluorescence chlorofylu obou řas (**Obr. 41d**), buňky řasy rodu *Coccomyxa* mají i po necelých dvou letech v herbáři, tedy v podmínkách, při kterých došlo k úplnému vysušení zkoumané stélky, stále nedegradovaný chlorofyl – na rozdíl od buněk řasy rodu *Trebouxia*, což by mohlo poukazovat na její schopnost lépe

odolávat dlouhodobé desikaci. Přítomnost řas rodu *Coccomyxa* může být pro lišejník výhodná právě pro překlenutí dlouhých období sucha.

Volně žijící řasy rodu *Coccomyxa* můžeme nalézt rostoucí i přímo na substrátu, a to včetně substrátů s vysokým obsahem těžkých kovů nebo na radioaktivních substrátech. Z tohoto důvodu lze předpokládat, že buňky disponují účinnými mechanismy, jak se s vysokou koncentrací těžkých kovů vypořádat (např. tvorbou kyseliny askorbové) (Kováčik *et al.*, 2017), a mohly by tím pádem představovat efektivního fotobionta pro lišejníky rostoucí na substrátech s vysokým obsahem těžkých kovů. Je také možné, že *Coccomyxa* může představovat fotobionta, který je přítomný ve stélce, ale mykobiont jej začne využívat až ve chvíli, kdy jeho dosavadní fotobiont přestane fungovat např. právě z důvodu toxicity těžkých kovů. V tomto bodě je však nutné zmínit, že hodnoty Ni a Cr naměřené XRF analyzátozem přímo skrze stélky těchto pluralitních lišejníků nebyly nikterak vysoké, dokonce byly podprůměrné, stejně jako celkově hodnoty naměřené v rámci této lokality (**Obr. 11, Tab. 11**). Zde se také nabízí otázka, co znamená „vysoká koncentrace těžkých kovů“ z pohledu fotobionta. Vysoká koncentrace kovů ve stélce se navíc nutně nemusí rovnat míře toxicity, neboť záleží i na schopnosti obou symbiontů detoxikovat těžké kovy.

Díky SEM/EDS také víme, že se ve vrstvě fotobionta nachází méně částic bohatých na těžké kovy (**Obr. 16**). Fotobionti jsou tedy účinně chráněni před přímým kontaktem s nimi, a to z obou stran – ze svrchní strany zajišťuje ochranu před atmosférickou depozicí svrchní korová vrstva, ze strany spodní chrání před částicemi ze substrátu především vrstva dřevná, ve které je zachycena většina těchto částic. Toto se však týká pouze pevných částic, nikoli iontů těžkých kovů, které se z těchto částic uvolnily a mohou putovat stélkou lišejníku, dokud nedojde k jejich detoxikaci. Vzhledem k lokalizaci částic horniny ve stélce, nižší koncentraci kovů v nich a jejich biologické nedostupnosti je možné, že přítomnost dvou fotobiontů ve stélce pomáhá lišejníku překonat jiné nepříznivé podmínky prostředí, než jakými je přítomnost těžkých kovů v hornině.

Stále zde zůstává možnost, že se nejedná o fotobionta, ale pouze o epilichenicky rostoucí řasu, která se dostala skrze mechanickým poškozením povrchu areoly dovnitř stélky, kde dokázala přežít. To by pro ni mohlo být výhodné – využívala by všech „služeb“ mykobionta (ochrana před UV zářením, vysycháním, těžkými kovy), ale nemusela by se dělit o své produkty fotosyntézy. Pokud by tomu tak bylo, mohl by se ji mykobiont snažit izolovat od zbytku stélky, aby nedocházelo k jejímu většímu rozrůstání. K potvrzení nebo vyvrácení těchto teorií by bylo ideální ověřit přítomnost nebo absenci houbových vláken mezi buňkami řasy rodu *Coccomyxa* pomocí konfokálního mikroskopu.

5.8 Lišejníky vs. cévnaté rostliny – 1:0

Zatímco lišejníky hadcový substrát výrazně neovlivňuje v druhové skladbě, růstu, ani ve výběru fotosyntetického partnera, cévnaté rostliny jsou vůči hadcové půdě citlivější. Projevují se u nich změny na anatomické i morfologické úrovni, tzv. serpentinomorfózy (Novák, 1928 cit. v Proctor & Woodell, 1975; Ritter-Studnička, 1972), ale i v druhovém složení, které se odlišuje od okolních nehadcových substrátů. Přítomnost odlišných druhů může být způsobena více faktory, které souvisí s fyzikálními i chemickými vlastnostmi hadců.

Hlavní roli limitující schopnost cévnatých rostlin růst na hadcové půdě nehraje vysoký obsah těžkých kovů, ale vysoký obsah Mg. Hořčík totiž snižuje dostupnost vápenatých iontů pro rostliny, přičemž některé hadcové půdy jsou navíc na Ca chudé. Důležitý je celkový poměr Ca:Mg v půdě (Walker, 1954; Walker *et al.*, 1955). Zásadní adaptací umožňující rostlinám růst na hadcovém substrátu je proto schopnost přijímat přednostně Ca a příjem Mg omezit (Walker, 1954). Těžké kovy na rostliny také působí (Hunter & Vergnano, 1953; Kabata-Pendias & Pendias, 2001), ale opět vyvstává stejná otázka – do jaké míry jsou těžké kovy z hadcové půdy pro rostliny dostupné? O nedostupnosti těžkých kovů může svědčit fakt, že se projevy toxicity těžkých kovů (nekróza a intervenální chloróza listů) neobjevují obecně na všech hadcových lokalitách (Hunter & Vergnano, 1953). Kovy se navíc vzájemně ovlivňují v toxickém působení (např. nízký obsah Fe v půdě zvyšuje toxicitu Ni), pro stanovení jejich vlivu na rostliny je proto nutné znát obsahy všech přítomných kovů (Hunter & Vergnano, 1953; Crooke & Inkson, 1955).

Kdybychom rostliny z hadců přesadili do úrodné půdy, prosperovaly by lépe – přesto je však v okolí hadců nenajdeme. To je nejspíš způsobené tím, že jsou konkurenčně slabé a jsou tedy vytlačeny na hadcové ostrovy (Kruckeberg, 1951). Na hadcích roste řada endemických druhů, ale také druhů reliktních, které hadce osídlily před rozšířením zapojeného lesa a pro které nyní hadce představují refugium (Kolář & Vít, 2008). Mezi lišejníky se naopak vyskytuje jen velmi málo hadcových endemitů (viz kapitolu 1.3).

Chemické vlastnosti hadců limitují růst cévnatých rostlin, ale nikoli lišejníků. Podobné trendy byly zaznamenány i u ostatních kryptogam. Houby dosahují na hadcích stejné i vyšší diverzity než na nehadcových substrátech a nejsou tedy limitovány jeho chemismem (Hopkins, 1987; Urban *et al.*, 2008; Moser *et al.*, 2009; Branco, 2010; Branco & Ree, 2010). Stélky mechorostů z hadcového substrátu obsahují vyšší koncentrace Ni, Cr a Mg a nižší poměr Ca:Mg, což se shoduje s trendy zaznamenanými u vyšších rostlin (Briscoe *et al.*, 2009; Rajakaruna *et al.*, 2009). Oproti cévnatým rostlinám se však mechorosty shodují s lišejníky a houbami v nízké míře endemismu na hadcových substrátech. Stejně jako u lišejníků byly některé druhy mechů popsány z hadce a považovány za endemické pro tento substrát, následně však byly nalezeny i na nehadcových substrátech (Favero-Longo *et al.*, 2004). Řasy z hadců byly studovány pouze v několika studiích, v rámci kterých bylo zjištěno, že hadce neovlivňují jejich diverzitu (Terlizzi & Karlander, 1979; Venter *et al.*, 2018).

Kryptogamické organismy jsou považovány za vysoce tolerantní vůči vlastnostem substrátu a vykazují rozsáhlé geografické areály zahrnující i více než jeden kontinent (Schuster 1983 v Rajakaruna *et al.*, 2009). Je však nutné podotknout, že vliv hadců na výše zmíněné skupiny organismů byl dosud studován nedostatečně (Rajakaruna *et al.*, 2009; Hugonnot, 2019).

Na rozdíl od cévnatých rostlin, které jsou vůči hadcové půdě citlivé, lze považovat bezcévné rostliny a lišejníky za tolerantní vůči vlastnostem hadcových substrátů.

6 Další směr výzkumu

Biogeochemické procesy mezi lišejníky a substrátem, který porůstají, si jistě zaslouží další pozornost. Na následujících řádcích proto uvádím možné směry výzkumu a nastiňuji jejich metodiku.

Hodnota pH, které je lišejník vystaven, se ukazuje jako zásadní pro interpretaci výsledků. Je proto nutné zvolit správnou metodiku měření, aby naměřená hodnota pH odpovídala skutečnému pH v místě, které lišejník porůstá. Pro měření pH je proto nutné seříznout pouze tenkou vrstvu zvětřalé horniny tak, aby nedošlo k odhalení zdravé horniny. Tento seříznutý kus horniny nechat vyluhovat v destilované vodě po dobu, po kterou může vlhkost působit na horninu i v přírodě, tedy asi 24 hod. Použití destilované vody také není zcela ideální, jelikož v přírodě vzniká vodný roztok, do kterého se kovy mohou uvolňovat, z dešťové vody, která může výsledné pH roztoku (a tedy i množství kationtů, které se do něj uvolní) ovlivnit. Nabízí se ještě možnost provést silikátovou analýzu horniny. Touto metodou lze zjistit poměr zásado- a kyselotvorných minerálů, který pak lze porovnat s naměřenou hodnotou pH.

Fakt, že hadce obsahují vysoké hladiny těžkých kovů, ještě nutně neznamená, že jsou tyto kovy biologicky dostupné, a tedy ovlivňují lišejníky nebo jejich jednotlivé symbionty. Je proto nutné zjistit biologickou dostupnost kovů ve svrchní vrstvě horniny, která je se stélkou lišejníku v bezprostředním kontaktu. To lze provést pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Touto metodou lze také zjistit množství kovů, které lišejník do stélky absorboval. Při přípravě vzorků však nestačí pouze ručně odebrat viditelné částičky horniny ze spodního povrchu stélky, jako to dělali např. Osyczka *et al.* (2021) a Rola *et al.* (2019, 2021). Částice horniny se totiž vyskytují i ve stélce lišejníku (viz kapitulu 4.3), a je tak nutné zajistit, že při rozkladu organického materiálu v roztoku kyselin nedojde i k rozkladu těchto zrníček. Tomu lze zamezit rozdílnou dobou rozkladu organického materiálu (který se rozkládá kratší dobu) a materiálu anorganického. Zajímavé také bude porovnání biologické dostupnosti kovů ve zdravé hornině a jejího zvětřalého povrchu.

Přesnou lokalizaci kovů lze vizualizovat prvkovou mapou, kterou pomocí energiově dispersního spektrometru vytvořil např. Purvis (2014). Ukazuje se, že některé kovy se vyskytují preferenčně ve specifických částech stélky – např. Cu je shromažďována v apotheciích, ve kterých se vyskytují pigmenty melaninu (Bačkor & Fahselt, 2008; Osyczka *et al.*, 2016). Ty mají schopnost absorbovat velká množství těžkých kovů (Gadd, 1993; Fogarty & Tobin, 1996). Známé „úložiště“ těžkých kovů v rámci stélky by mohlo pomoci k celkovému obrazu, jak lišejníky s těžkými kovy nakládají a k hlubšímu porozumění mechanismům detoxikace těžkých kovů uvnitř stélky. Nejprínosnější by bylo vytvoření prvkové mapy příčného řezu lišejníkem, zvětřalou i zdravou vrstvou horniny, kde by bylo možné sledovat distribuci jednotlivých prvků a jejich kontakt s lišejníkem.

Ideální by také bylo pozorovat řez stélkou lišejníku v SEM, ovšem před vložením do mikroskopu provést výbrus horniny i lišejníku. To by umožnilo přesná měření obsahu prvků v částicích horniny přijatých do stélky lišejníku pomocí EDS. Zároveň by bylo také přínosné provést tato

pozorování i ve stélkách lupenitých a keříčkovitých, které jsou v menším kontaktu se substrátem než korovité druhy. Osyczka *et al.* (2016) zjistili, že lišejníky rodu *Cladonia* rostoucí na substrátech s vysokým obsahem těžkých kovů obsahují nejvíce těžkých kovů ve spodních částech podecií, zatímco jejich svrchní části (kromě apothecií) zůstávají těžkými kovy téměř nedotčené. To připisují pasivnímu příjmu kovů rozpuštěných ve vodě. Je však otázkou, do jaké míry a případně i výšky, se v podeciu (i přízemních šupinách) vyskytují částičky horniny, jako je tomu u korovitých lišejníků.

Vyvstává také otázka, proč některé lišejníky preferují hadcový substrát. Má teorie, že zde tvoří symbiózu se specifickými druhy řas, se ukázala jako lichá (byť pouze na základě jednoho druhu specializujícího se na hadce). Je otázkou, zda existuje nějaký faktor ovlivňující jejich výskyt (např. úzké rozmezí pH, které tolerují, nebo fyzikální vlastnosti hadce) nebo zda jde o souhrn různých faktorů, které pro ně činí hadec jediným vhodným substrátem k růstu.

Vzhledem k objevené pluralitě fotobiontů ve stélce lišejníku *Lecanora rupicola* očekávám, že přítomnost více fotobiontů ve stélce lišejníků bude častějším jevem, který si jistě zaslouží pozornost, a to nejen na hadcových substrátech.

Některé linie mykobiontů vykazují preference k hadcovému nebo amfibolitovému substrátu. Bylo by proto užitečné zaměřit pozornost nejen na fotobionty, ale i mykobionty z hadcových substrátů.

Otázce biologické dostupnosti kovů v hornině a jejich příjmu a lokalizaci v lišejníkové stélce a pluralitě fotobiontů se budu věnovat v rámci svého doktorského studia.

7 Závěr

V rámci své diplomové práce jsem se věnovala diverzitě fotobiontů lišejníků rostoucích na hadcovém substrátu. Za kontrolní horninu jsem zvolila amfibolit, abych mohla výsledky porovnat s jinou přirozeně vzniklou horninou, která se však liší v množství obsažených těžkých kovů. Na pěti hadcových a pěti amfibolitových lokalitách v České republice jsem sbírala deset druhů lišejníků s širokou ekologickou amplitudou (*Acarospora fuscata*, *Candelariella coralliza*, *Candelariella vitellina*, *Cladonia pyxidata*, *Lecanora polytropa*, *Lecanora rupicola*, *Lecidea fuscoatra*, *Lecidella carpathica*, *Protoparmeliopsis muralis* a *Rhizocarpon geographicum*) a jeden druh rostoucí výlučně na hadcích (*Pertusaria chiodectonoides*).

Fotobionty i mykobionty jsem identifikovala na základě úseku ITS rDNA. Celkem jsem ve 157 stélkách lišejníků zaznamenala 28 linií fotobiontů – 17 linií řas rodu *Trebouxia* a jedenáct linií řas rodu *Asterochloris*. Na obou substrátech jsem celkově zaznamenala stejný počet linií fotobiontů (17). Nejčastěji zastoupenými fotobionty byly linie řas rodu *Trebouxia* A06 a A10. Jednu linii řas preferovaly pouze dvě genetické linie mykobiontů v rámci druhů *Candelariella vitellina* a *Protoparmeliopsis muralis*, nikoliv jednotlivé druhy jako celek. Někteří mykobionti sice obsahovali více linií, ale vykazovali preference vůči jedné linii – *Candelariella coralliza*, *Candelariella vitellina* a *Lecidella carpathica* preferovaly linii A06. Tři druhy pak vykazovaly preferenci cladu A a řasy z jiných cladů jsem v jejich stélkách nezjistila. Většina linií na hadcích a amfibolitech (a tedy i na jednotlivých hadcových lokalitách) se vzájemně překrývala.

Abych zjistila geochemickou charakteristiku studovaných hornin, provedla jsem měření pH, konduktivity a obsahu těžkých kovů pomocí přenosného XRF analyzátoru na všech studovaných lokalitách. Hadce a amfibolity se liší v obsahu těžkých kovů – zatímco hadce obsahují vysoké hladiny Ni a Cr, v amfibolitech se vyskytuje velké množství Mn a Fe. Dlouhá doba zvětrávání a vysoké pH (průměr 8,98) naměřené na hadcích vede k nižší biologické dostupnosti přítomných kovů. To se potvrdilo i měřením konduktivity, která se na obou typech horniny ukázala jako velmi nízká (< 75 $\mu\text{S/cm}$). Předpokládám proto, že hadce nepředstavují pro lišejníky toxický substrát a není tedy nutné, aby lišejníky obsahovaly speciální (toxitolerantní) linie fotobiontů. Vysoký počet linií ve studovaných druhích svědčí o nízké selektivitě i specifitě daných mykobiontů – to umožňuje těmto euryekním druhům osidlovat široké rozpětí substrátů i klimatických podmínek.

Pomocí SEM-EDS jsem ověřila, že korovité lišejníky přijímají do stélky velké množství částic podložní horniny, které mohou obsahovat těžké kovy. Samotná přítomnost částic horniny ve stélce však nic nevypovídá o schopnosti lišejníků tolerovat těžké kovy, protože tyto kovy nemusí být pro lišejník dostupné. Termín „hyperakumulátor“ by se tak měl používat pouze pro lišejníky, které jsou schopné se vypořádat s vysokým obsahem iontů kovů, a to jak extracelulárními, tak intracelulárními mechanismy.

V jedné stélce lišejníku *Lecanora rupicola* z hadcové lokality Křížky jsem pomocí Illumina metabarcodingu a následně i světelné mikroskopie zaznamenala dva rody fotobiontů – *Trebouxia* a *Coccomyxa*. Otázkou stále zůstává, jakou výhodu lišejníku přináší přítomnost druhého fotobionta ve stélce.

Přijem kovů ze substrátu do stélky lišejníku a jejich toxicita pro lišejník (a potažmo i fotobionta, který je ve stélce přítomný) je velmi komplexním tématem, ve kterém hraje roli řada proměnných – pH substrátu, pH v lišejníku, stáří substrátu, interakce s ostatními kovy, ale i morfologická stavba lišejníku, tvorba sekundárních metabolitů nebo schopnost oddálit intracelulární příjem iontů kovů pomocí extracelulárních mechanismů detoxikace. Ačkoliv již víme, jak spolu některé proměnné souvisí, zaslouží si toto téma v budoucnu jistě další pozornost.

8 Seznam literatury

- Acaso C. & Wierzechos J. 1994. Structural aspects of lichen-rock interface using back-scattered electron imaging. *Bot. Acta.* **107**: 251–256.
- Ahmadjian V. 1993. The lichen symbiosis. John Wiley, New York. 266 pp.
- Alexander E.B., Coleman R.G., Harrison S.P. & Keeler-Wolfe T. 2007. Serpentine geoecology of Western North America: Geology, soils, and vegetation. Oxford University Press, USA, 521 pp.
- Alonso J., García M.A., Pérez-López M. & Melgar M.J. 2003. The concentrations and bioconcentration factors of copper and zinc in edible mushrooms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* **44**: 180–188.
- Álvarez R., Del Hoyo A., García-Breijo F., Reig-Armiñana J., Del Campo E.M., Guéra A., Barreno E. & Casano L.M. 2012. Different strategies to achieve Pb-tolerance by the two *Trebouxia* algae coexisting in the lichen *Ramalina farinacea*. *Journal of Plant Physiology.* **169**: 1797–1806.
- Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Bačkor M. & Fahselt D. 2004a. Using EDX-microanalysis and X-ray mapping to demonstrate metal uptake by lichens. *Biologia, Bratislava.* **59**: 39–45.
- Bačkor M. & Fahselt D. 2004b. Physiological attributes of the lichen *Cladonia pleurota* in heavy metal-rich and control sites near Sudbury (Ont., Canada). *Environmental and Experimental Botany.* **52**: 149–159.
- Bačkor M. & Fahselt D. 2008. Lichen photobionts and metal toxicity. *Symbiosis.* **46**: 1–10.
- Bačkor M. & Loppi S. 2009. Interactions of lichens with heavy metals. *Biologia plant.* **53**: 214–222.
- Bačkor M., Peksa O., Škaloud P. & Bačkorová M. 2010. Photobiont diversity in lichens from metal-rich substrata based on ITS rDNA sequences. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **73**: 603–612.
- Bačkor M., Váczi P., Barták M., Bud'ová J. & Dzubaj A. 2007. Uptake, photosynthetic characteristics and membrane lipid peroxidation levels in the lichen photobiont *Trebouxia erici* exposed to copper and cadmium. *bryo.* **110**: 100–107.
- Baldwin B.G., Sanderson M.J., Porter J.M., Wojciechowski M.F., Campbell C.S. & Donoghue M.J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A Valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden.* **82**: 247.
- Bálint M., Schmidt P.-A., Sharma R., Thines M. & Schmitt I. 2014. An Illumina metabarcoding pipeline for fungi. *Ecology and Evolution.* **4**: 2642–2653.
- Bargagli R. & Mikhailova I. 2002. Accumulation of inorganic contaminants. Monitoring with lichens — Monitoring lichens, Springer Netherlands, Dordrecht.
- Beck A. 1999. Photobiont inventory of a lichen community growing on heavy-metal-rich rock. *The Lichenologist.* **31**: 501–510.
- Beck A. 2002. Selektivität der Symbionten schwermetalltoleranter Flechten. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Beck A., Friedl T. & Rambold G. 1998. Selectivity of photobiont choice in a defined lichen community: inferences from cultural and molecular studies. *New Phytologist.* **139**: 709–720.
- Beck A. & Koop H.-U. 2001. Analysis of the photobiont population in lichens using a single-cell manipulator. *Symbiosis.* **31**: 57–67.
- Belinchón R., Yahr R. & Ellis C.J. 2015. Interactions among species with contrasting dispersal modes explain distributions for epiphytic lichens. *Ecography.* **38**: 762–768.
- Bhattacharya D., Friedl T. & Damberger S. 1996. Nuclear-encoded rDNA group I introns: origin and phylogenetic relationships of insertion site lineages in the green algae. *Molecular Biology and Evolution.* **13**: 978–989.
- Blaha J., Baloch E. & Grube M. 2006. High photobiont diversity associated with the euryoecious lichen-forming ascomycete *Lecanora rupicola* (*Lecanoraceae*, Ascomycota): Photobionts in *L. rupicola*. *Biological Journal of the Linnean Society.* **88**: 283–293.

- Bouckaert R., Vaughan T.G., Barido-Sottani J., Duchêne S., Fourment M., Gavryushkina A., Heled J., Jones G., Kühnert D., Maio N.D., Matschiner M., Mendes F.K., Müller N.F., Ogilvie H.A., Plessis L. du, Poppinga A., Rambaut A., Rasmussen D., Siveroni I., Suchard M.A., Wu C.-H., Xie D., Zhang C., Stadler T. & Drummond A.J. 2019. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLOS Computational Biology*. **15**: e1006650.
- Branco S. 2010. Serpentine soils promote ectomycorrhizal fungal diversity. *Molecular Ecology*. **19**: 5566–5576.
- Branco S. & Ree R.H. 2010. Serpentine soils do not limit mycorrhizal fungal diversity. *PLoS ONE*. **5**: e11757.
- Breiman L. 2001. Random forests. *Machine Learning*. **45**: 5–32.
- Brent R.N., Wines H., Luther J., Irving N., Collins J. & Drake B.L. 2017. Validation of handheld X-ray fluorescence for in situ measurement of mercury in soils. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. **5**: 768–776.
- Briscoe L.R.E., Harris T.B., Broussard W., Dannenberg E., Olday F.C. & Rajakaruna N. 2009. Bryophytes of adjacent serpentine and granite outcrops on the Deer Isles, Maine, U.S.A. *Rhodora*. **111**: 1–20.
- Brodo I.M. 1973. Chapter 12: - Substrate ecology. pp. 401–441. *The Lichens*, Academic Press,
- Brown, D.H. and Beckett, R.P. 1985. Minerals and lichens: localisation and effect. Vicente, C., Brown, D.H., Legaz, M.E. (ed.): *Surface Physiology of Lichens*. pp 127–149. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Cardarelli M., Serino G., Campanella L., Ercole P., De Cicco Nardone F., Alesiani O. & Rossiello F. 1997. Antimicrobial effects of usnic acid on different biological systems. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. **53**: 667–672.
- Casano L.M., del Campo E.M., García-Breijo F.J., Reig-Armiñana J., Gasulla F., del Hoyo A., Guéra A. & Barreno E. 2011. Two *Trebouxia* algae with different physiological performances are ever-present in lichen thalli of *Ramalina farinacea*. Coexistence versus Competition?. *Environmental Microbiology*. **13**: 806–818.
- Chatterjee, N., Electron-probe microanalysis, https://web.mit.edu/e-probe/www/JEOL_presentation.pdf
- Chen J., Blume H.-P. & Beyer L. 2000. Weathering of rocks induced by lichen colonization — a review. *CATENA*. **39**: 121–146.
- Chisholm J.E., Jones G.C. & Purvis O.W. 1987. Hydrated copper oxalate, moolooite, in lichens. *Mineral. mag.* **51**: 715–718.
- Christmas N.A.M., Allen R., Hollingsworth A.L., Taylor J.D. & Cunliffe M. 2021. Complex photobiont diversity in the marine lichen *Lichina pygmaea*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. **101**: 667–674.
- Crooke W.M. & Inkson R.H.E. 1955. The relationship between nickel toxicity and major nutrient supply. *Plant Soil*. **6**: 1–15.
- Cubero O.F., Crespo A., Fatehi J. & Bridge P.D. 1999. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. *Pl Syst Evol*. **216**: 243–249.
- Dal Grande F., Alors D., Divakar P.K., Bálint M., Crespo A. & Schmitt I. 2014. Insights into intrathalline genetic diversity of the cosmopolitan lichen symbiotic green alga *Trebouxia decolorans* Ahmadjian using microsatellite markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **72**: 54–60.
- Dal Grande F., Rolshausen G., Divakar P.K., Crespo A., Otte J., Schleuning M. & Schmitt I. 2018. Environment and host identity structure communities of green algal symbionts in lichens. *New Phytologist*. **217**: 277–289.
- Dal Grande F., Widmer I., Wagner H.H. & Scheidegger C. 2012. Vertical and horizontal photobiont transmission within populations of a lichen symbiosis. *Molecular Ecology*. **21**: 3159–3172.
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R. & Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods*. **9**: 772–772.
- De Vasconcelos T.L., De Oliveira A.K., Pereira E.C., Da Silva N.H., Vicente C. & Legaz M.-E. 2015. The lichen *Cladonia verticillaris* retains and modifies mineral soil particles inside the thallus. *CATENA*. **135**: 70–77.
- Dědková K. 2023. Pluralita fotobiontů ve stélkách lišejníků. Karlova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky, Praha.

- Dray S., Dufour A.-B., Thioulouse J., Jombart with contributions from T., Pavoine S., Lobry J.R., Ollier S., Borcard D., Legendre P. & Chessel S.B. and A.S.B. on earlier work by D. 2023. ade4: Analysis of ecological data: Exploratory and euclidean methods in environmental sciences.
- Dubernat J. & Pezerat H. 1974. Fautes d'Empilement dans les Oxalates Dihydratés des Métaux Divalents de la Série Magnésienne (Mg, Fe, Co, Ni, Zn, Mn). *J. Appl. Cryst.* **1**: 387–393.
- Ertz D., Guzow-Krzemińska B., Thor G., Łubek A. & Kukwa M. 2018. Photobiont switching causes changes in the reproduction strategy and phenotypic dimorphism in the Arthoniomycetes. *Sci Rep.* **8**: 4952.
- Fahey B.D. 1983. Frost action and hydration as rock weathering mechanisms on schist: A laboratory study. *Earth Surf Processes Landf.* **8**: 535–545.
- Fahselt D. 1994. Carbon metabolism in lichens. *Symbiosis.* **17**: 127–182.
- Fahselt D., Hayden D.B. & Mirando M. 1973. Structure of the lichen *Parmelia aurulenta*. *Canadian Journal of Botany.* **51**: 2197–2200.
- Faust G.T. & Fahey J.J. 1962. The serpentine-group minerals. U.S. Government Printing Office.
- Faust G.T., Murata K.J. & Fahey J.J. 1956. Relation of minor-element content of serpentines to their geological origin. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* **10**: 316–320.
- Favero-Longo S.E., Isocrono D. & Piervittori R. 2004. Lichens and ultramafic rocks: a review. *The Lichenologist.* **36**: 391–404.
- Favero-Longo S.E., Matteucci E., Morando M., Rolfo F., Harris T.B. & Piervittori R. 2015. Metals and secondary metabolites in saxicolous lichen communities on ultramafic and non-ultramafic rocks of the Western Italian Alps. *Aust. J. Bot.* **63**: 276–291.
- Fogarty R.V. & Tobin J.M. 1996. Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme and Microbial Technology.* **19**: 311–317.
- Gadd G.M. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist.* **124**: 25–60.
- García M.Á., Alonso J. & Melgar M.J. 2009. Lead in edible mushrooms. Levels and bioaccumulation factors. *Journal of Hazardous Materials.* **167**: 777–783.
- Gardes M. & Bruns T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology.* 113–118.
- Garty J. 2001. Biomonitoring atmospheric heavy metals with lichens: Theory and application. *Critical Reviews in Plant Sciences.* **20**: 309–371.
- Gekeler W., Grill E., Winnacker E.-L. & Zenk M.H. 1988. Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatins complexes. *Arch. Microbiol.* **150**: 197–202.
- Goga M., Elečko J., Marcinčinová M., Ručová D., Bačkorová M. & Bačkor M. 2020. Lichen Metabolites: An overview of some secondary metabolites and their biological potential. pp. 175–209. V: Mérillon J.M. & Ramawat K. (eds), *Co-Evolution of Secondary Metabolites*,
- Goyal R. & Seaward M.R.D. 1981. Metal uptake in terricolous lichens I. Metal localization within the thallus. *New Phytologist.* **89**: 631–645.
- Grill E., Winnacker E.-L. & Zenk M.H. 1985. Phytochelatin: The principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science.* **230**: 674–676.
- Grube M. & Spribille T. 2012. Exploring symbiont management in lichens: News and Views: Perspective. *Molecular Ecology.* **21**: 3098–3099.
- Guzow-Krzemińska B. 2006. Photobiont flexibility in the lichen *Protoparmeliopsis muralis* as revealed by ITS rDNA analyses. *The Lichenologist.* **38**: 469–476.
- Hafellner V.J. 1991. Die Flechtenflora eines hochgelegenen Serpentinistockes in den Ostalpen (Österreich, Steiermark). **121**: 95–106.
- Harmon L., Pennell M., Brock C., Brown J., Challenger W., Eastman J., FitzJohn R., Glor R., Hunt G., Revell L., Slater G., Uyeda J., Weir J. (and CRAN team (corrections 2023)). *geiger*: Analysis of evolutionary diversification.
- Harris T.B., Olday F.C. & Rajakaruna N. 2007. Lichens of pine hill, a peridotite outcrop in Eastern North America. *Rhodora.* **109**: 430–447.

- Hartley J., Cairney J.W.G. & Meharg A.A. 1997. Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment ?. *Plant and Soil*. **189**: 303–319.
- Hauck M., Helms G. & Friedl T. 2007. Photobiont selectivity in the epiphytic lichens *Hypogymnia physodes* and *Lecanora conizaeoides*. *The Lichenologist*. **39**: 195–204.
- Helms G. 2003. Taxonomy and symbiosis in associations of *Physciaceae* and *Trebouxia*. Georg-August Universität, Göttingen.
- Hengl T., Heuvelink G.B.M. & Stein A. 2004. A generic framework for spatial prediction of soil variables based on regression-kriging. *Geoderma*. **120**: 75–93.
- Hepperle D. 2004. SeqAssem©. A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Win32-Version. <http://www.sequentix.de>
- Herrero Fernández Z., Estevez Álvarez J.R., Montero Álvarez A., Pupo González I., Dos Santos Júnior J.A., Ortueta Milan M., Mesa Pérez G., Leyva Bombuse D., Rodríguez González M., Hernández Torres D., Alberro Macías N., Blanco Hernández N. & Padilla Álvarez R. 2016. Multielement analysis of lichen samples using XRF methods. Comparison with ICP-AES and FAAS. *X-Ray Spectrometry*. **45**: 77–84.
- Honegger R. 1986. Ultrastructural studies in lichens II. Mycobiont and photobiont cell wall surface layers and adhering crystalline lichen products in four *Parmeliaceae*. *New Phytol.* **103**: 797–808.
- Hopkins N. 1987. Mycorrhizae in a California serpentine grassland community. *Can. J. Bot.* **65**: 484–487.
- Hruďička J. 1937. Klimatografie jihozápadní Moravy se zřetelem k poměrům refugia mohelenského. pp. 5–47. Mohelno, Svaz pro ochranu přírody a domoviny v zemi Moravskoslezské, Brno.
- Hugonnot V. 2019. Bryophyte flora and vegetation of serpentine sites in the French Massif Central. *Plant Biosystems – An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*. **153**: 589–599.
- Hunter J.G. & Vergnano O. 1953. Nickel and cobalt toxicities in oat plants. *Annals of Botany*. **17**: 317–329.
- Ibarrondo I., Martínez-Arkarazo I. & Madariaga J.M. 2017. Biomineralization in saxicolous lichens: Raman spectroscopic study supported with XRF and SEM-EDX analyses: Biomineralization in saxicolous lichens. *J. Raman Spectrosc.* **48**: 161–169.
- Jones D., Wilson M.J. & McHardy W.J. 1981. Lichen weathering of rock-forming minerals: application of scanning electron microscopy and microprobe analysis. *Journal of Microscopy*. **124**: 95–104.
- Juříková M. 2021. Rastrovací elektronová mikroskopie jako technika pro analýzu povrchu vzorků. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Brno.
- Kabata-Pendias A. & Pendias H. 2001. Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca Raton, Fla. 413 pp.
- Kantvilas G. 1991. Records of East African lichens in cool temperate Australia. *Nordic Journal of Botany*. **11**: 369–373.
- Kanz B., Brackel W.V., Cezanne R., Eichler M., Hohmann M.-L., Teuber D. & Printzen C. 2015. DNA barcodes for the distinction of reindeer lichens: A case study using *Cladonia rangiferina* and *C. stygia*. *Herzogia*. **28**: 445–464.
- Karathanasis A.D. & Hajek B.F. 2018. Elemental analysis by X-Ray fluorescence spectroscopy. pp. 161–223. V: Sparks D.L., Page A.L., Helmke P.A., Loepfert R.H., Soltanpour P.N., Tabatabai M.A., Johnston C.T., & Sumner M.E. (eds), SSSA Book Series, Soil Science Society of America, American Society of Agronomy, Madison, WI, USA.
- Katoh K., Rozewicki J. & Yamada K.D. 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*. **20**: 1160–1166.
- Kelly L.J., Hollingsworth P.M., Coppins B.J., Ellis C.J., Harrold P., Tosh J. & Yahr R. 2011. DNA barcoding of lichenized fungi demonstrates high identification success in a floristic context. *New Phytologist*. **191**: 288–300.
- Kembel S.W., Ackerly D.D., Blomberg S.P., Cornwell W.K., Cowan P.D., Helmus M.R., Morlon H. & Webb C.O. 2020. picante: Integrating Phylogenies and Ecology.
- Khullar S. & Reddy M.S. 2018. Ectomycorrhizal fungi and its role in metal homeostasis through metallothionein and glutathione mechanisms. *CBIOT*. **7**: 231–241.
- Kolář F. & Vít P. 2008. Endemické rostliny českých hadců 1. Zvláštnosti hadcových ostrovů. *Živa*. 14–17.

- Kováčik J., Rotková G., Bujdoš M., Babula P., Peterková V. & Matuš P. 2017. Ascorbic acid protects *Coccomyxa subellipsoidea* against metal toxicity through modulation of ROS/NO balance and metal uptake. *Journal of Hazardous Materials*. **339**: 200–207.
- Krause W. 1958. Andere Bodenspezialisten. pp. 755–806. V: Adriani M.J., Åslander A., Baumeister W., Bergmann W., Biebl R., v. Boguslawski E., Ellenberg H., Eschrich W., Fischer H., Gessner F., Hewitt E.J., Jensen H.L., Kalle K., Krause W., Leyton L., Linnemann G., Melin E., Metzner H., Michael G., Pirson A., Robertson R.N., Russell R.S., Scharrer K., Schmucker Th., Steiner M., Stenlid G., Stiles W., Tamm C.O., Wiklander L., & v. Witsch H. (eds), *Die Mineralische Ernährung der Pflanze / Mineral Nutrition of Plants*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Krist E. & Křivý M. 1985. *Petrologie*. Alfa, Bratislava. 464 pp.
- Kruckeberg A.R. 1951. Intraspecific variability in the response of certain native plant species to serpentine soil. *American Journal of Botany*. **38**: 408–419.
- Kruckeberg A.R. 1992. Plant life of western North American ultramafics. pp. 31–73. V: Roberts B.A. & Proctor J. (eds), *The Ecology of Areas with Serpentinized Rocks*, Springer Netherlands, Dordrecht.
- Krumeich F. 2023. SEM: Imaging with secondary electrons. The Electron Microscopy Site.
- Kuhn M., Wing J., Weston S., Williams A., Keefer C., Engelhardt A., Cooper T., Mayer Z., Kenkel B., R Core Team, Benesty M., Lescarbeau R., Ziem A., Scrucca L., Tang Y., Candan C. & Hunt T. 2023. caret: Classification and regression training.
- Lagier J.P., Pezerat H. & Dubernat J. 1969. Oxalates dihydrates de Mg, Mn, Fe, Co, Ni, et Zn divalents: Evolution vers la forme la plus ordonnée des composés présentant des fautes d'empilement. *Revue Chim. Miner.* **6**: .
- Lawrey J.D. 1986. Biological role of lichen substances. *The Bryologist*. **89**: 111.
- Lechowicz M.J. 1982. The effects of simulated acid precipitation on photosynthesis in the caribou lichen *Cladonia stellaris* (Opiz) Brodo. *Water Air Soil Pollut.* **18**: 421–430.
- Lines C.E.M., Ratcliffe R.G., Rees T.A.V. & Southon T.E. 1989. A ¹³C NMR study of photosynthate transport and metabolism in the lichen *Xanthoria calcicola* Oxner. *New Phytologist*. **111**: 447–456.
- Lucas R.E. & Davis J.F. 1961. Relationship between pH values of organic soils and availabilities of 12 plant nutrients. *Soil Science*. **92**: 177–182.
- Mahé F., Rognes T., Quince C., de Vargas C. & Dunthorn M. 2015. Swarm v2: highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ*. **3**: e1420.
- Malíček J. 2022. Lišejníky přírodní rezervace Ptačí stěna v Blanském lese. *Bryonora*. **70**: 1–14.
- Malíček J. & Vondrák J. 2013. Inventarizační průzkum NPP Hadce u Želivky z oboru lichenologie. AOPK ČR, Praha.
- Marié D.C., Chaparro M.A.E., Lavernia J.M., Sinito A.M., Castañeda Miranda A.G., Gargiulo J.D., Chaparro M.A.E. & Böhnelt H.N. 2018. Atmospheric pollution assessed by in situ measurement of magnetic susceptibility on lichens. *Ecological Indicators*. **95**: 831–840.
- McCune B., Arup U., Breuss O., Di Meglio E., Di Meglio J., Esslinger T.L., Miadlikowska J., Miller A.E., Rosentreter R., Schultz M., Sheard J., Tønsberg T. & Walton J. 2020. Biodiversity and ecology of lichens of Kenai Fjords National Park, Alaska. *Plant and Fungal Systematics*. **65**: 586–619.
- Messeri A. 1936. Ricerche Sulla Vegetazione dei Dintorni di Firenze: 4. — La Vegetazione Delle Rocce Ofiolitiche di Monte Ferrato (Presso Prato). *Giornale botanico italiano*. **43**: 277–372.
- Miller M.A., Pfeiffer W. & Schwartz T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 1–8.
- Molins A., Chiva S., Calatayud Á., Marco F., García-Breijo F., Reig-Armiñana J., Carrasco P. & Moya P. 2020. Multidisciplinary approach to describe *Trebouxia* diversity within lichenized fungi *Buellia zoharyi* from the Canary Islands. *Symbiosis*. **82**: 19–34.
- Molins A., Moya P., Muggia L. & Barreno E. 2021. Thallus Growth stage and geographic origin shape microalgal diversity in *Ramalina farinacea* lichen holobionts. *Journal of Phycology*. **57**: 975–987.
- Moser A.M., Frank J.L., D'Allura J.A. & Southworth D. 2009. Ectomycorrhizal communities of *Quercus garryana* are similar on serpentine and nonserpentine soils. *Plant Soil*. **315**: 185–194.

- Moya P., Chiva S., Molins A., Garrido-Benavent I. & Barreno E. 2021. Unravelling the symbiotic microalgal diversity in *Buellia zoharyi* (Lichenized Ascomycota) from the Iberian Peninsula and Balearic Islands using DNA metabarcoding. *Diversity*. **13**: 220.
- Muggia L., Baloch E., Stabentheiner E., Grube M. & Wedin M. 2011. Photobiont association and genetic diversity of the optionally lichenized fungus *Schizoxylon albescens*: Optional lichenization in *Schizoxylon albescens*. *FEMS Microbiology Ecology*. **75**: 255–272.
- Muggia L., Grube M. & Tretiach M. 2008. Genetic diversity and photobiont associations in selected taxa of the *Tephromela atra* group (Lecanorales, lichenised Ascomycota). *Mycol Progress*. **7**: 147–160.
- Muggia L., Nelsen M.P., Kirika P.M., Barreno E., Beck A., Lindgren H., Lumbsch H.T. & Leavitt S.D. 2020. Formally described species woefully underrepresent phylogenetic diversity in the common lichen photobiont genus *Trebouxia* (*Trebouxiophyceae*, Chlorophyta): An impetus for developing an integrated taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **149**: 106821.
- Muggia L., Pérez-Ortega S., Kopun T., Zellnig G. & Grube M. 2014. Photobiont selectivity leads to ecological tolerance and evolutionary divergence in a polymorphic complex of lichenized fungi. *Annals of Botany*. **114**: 463–475.
- Muggia L., Vancurova L., Škaloud P., Peksa O., Wedin M. & Grube M. 2013. The symbiotic playground of lichen thalli - a highly flexible photobiont association in rock-inhabiting lichens. *FEMS Microbiol Ecol*. **85**: 313–323.
- Nash T.H. 2008. *Lichen Biology*. Cambridge University Press, New York. 486 pp.
- Nelsen M.P., Leavitt S.D., Heller K., Muggia L. & Lumbsch H.T. 2022. Contrasting patterns of climatic niche divergence in *Trebouxia*—A Clade of lichen-forming algae. *Front. Microbiol*. **13**: 791546.
- Nieboer E., Puckett K.J. & Grace B. 1976. The uptake of nickel by *Umbilicaria muhlenbergii*: a physicochemical process. *Can. J. Bot*. **54**: 724–733.
- Nieboer E., Richardson D.H.S. & Tomassini F.D. 1978. Mineral uptake and release by lichens: An Overview. *The Bryologist*. **81**: 226–246.
- Noh H.-J., Lee Y.M., Park C.H., Lee H.K., Cho J.-C. & Hong S.G. 2020. Microbiome in *Cladonia squamosa* is vertically stratified according to microclimatic conditions. *Front. Microbiol*. **11**: 268.
- Novák F.A. 1928. Quelques remarques relatives au problème de la végétation sur les terrains serpentiniques. *Preslia*. **6**: 42–71.
- Nussbaum M., Spiess K., Baltensweiler A., Grob U., Keller A., Greiner L., Schaepman M.E. & Papritz A. 2018. Evaluation of digital soil mapping approaches with large sets of environmental covariates. *SOIL*. **4**: 1–22.
- Ohmura Y., Kawachi M., Kasai F., Watanabe M.M. & Takeshita S. 2006. Genetic combinations of symbionts in a vegetatively reproducing lichen, *Parmotrema tinctorum*, based on ITS rDNA sequences. *The Bryologist*. **109**: 43–59.
- Ohmura Y., Takeshita S. & Kawachi M. 2019. Photobiont diversity within populations of a vegetatively reproducing lichen, *Parmotrema tinctorum*, can be generated by photobiont switching. *Symbiosis*. **77**: 59–72.
- Oksanen J., Simpson G.L., Blanchet F.G., Kindt R., Legendre P., Minchin P.R., O'Hara R.B., Solymos P., Stevens M.H.H., Szoecs E., Wagner H., Barbour M., Bedward M., Bolker B., Borcard D., Carvalho G., Chirico M., De Caceres M., Durand S., Evangelista H.B.A., FitzJohn R., Friendly M., Furneaux B., Hannigan G., Hill M.O., Lahti L., McGlinn D., Ouellette M.-H., Ribeiro Cunha E., Smith T., Stier A., Ter Braak C.J.F. & Weedon J. 2001. *vegan: Community Ecology Package*. 2.6-6.1.
- Onuț-Brännström I., Benjamin M., Scofield D.G., Heiðmarsson S., Andersson M.G.I., Lindström E.S. & Johansson H. 2018. Sharing of photobionts in sympatric populations of *Thamnolia* and *Cetraria* lichens: evidence from high-throughput sequencing. *Sci Rep*. **8**: 4406.
- Osyczka P., Latkowska E. & Rola K. 2021. Metabolic processes involved with sugar alcohol and secondary metabolite production in the hyperaccumulator lichen *Diploschistes muscorum* reveal its complex adaptation strategy against heavy-metal stress. *Fungal Biology*. **125**: 999–1008.
- Osyczka P., Lenart-Boroń A., Boroń P. & Rola K. 2020a. Lichen-forming fungi in postindustrial habitats involve alternative photobionts. *Mycologia*. **113**: 43–55.
- Osyczka P., Rola K. & Jankowska K. 2016. Vertical concentration gradients of heavy metals in *Cladonia* lichens across different parts of thalli. *Ecological Indicators*. **61**: 766–776.

- Otálora M.A.G., Salvador C., Martínez I. & Aragón G. 2013. Does the reproductive strategy affect the transmission and genetic diversity of bionts in cyanolichens? A case study using two closely related species. *Microb Ecol.* **65**: 517–530.
- Ott S. 1987. Reproductive strategies in lichens. pp. 81–93. *Progress and problems in lichenology in the eighties*, Cramer: Berlin-Stuttgart,
- Pageš H, Aboyoun P, Gentleman R, DebRoy S (2024). Biostrings: Efficient manipulation of biological strings. R package version 2.72.1, <https://bioconductor.org/packages/Biostrings>.
- Paradis E., Claude J. & Strimmer K. 2004. APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics.* **20**: 289–290.
- Park C.H., Kim K.M., Elvebakk A., Kim O., Jeong G. & Hong S.G. 2015. Algal and fungal diversity in antarctic lichens. *J Eukaryotic Microbiology.* **62**: 196–205.
- Paukov A., Teptina A., Morozova M., Kruglova E., Favero-Longo S.E., Bishop C. & Rajakaruna N. 2019. The effects of edaphic and climatic factors on secondary lichen chemistry: A case study using saxicolous lichens. *Diversity.* **11**: 94.
- Paukov A.G. 2009. The lichen flora of serpentine outcrops in the Middle Urals of Russia. *Northeastern Naturalist.* **16**: 341–350.
- Paul F., Otte J., Schmitt I. & Dal Grande F. 2018. Comparing Sanger sequencing and high-throughput metabarcoding for inferring photobiont diversity in lichens. *Sci Rep.* **8**: 8624.
- Pawlik-Skowrońska B. 2000. Relationships between acid-soluble thiol peptides and accumulated Pb in the green alga *Stichococcus bacillaris*. *Aquatic Toxicology.* **50**: 221–230.
- Pawlik-Skowrońska B., Di Toppi L.S., Favali M.A., Fossati F., Pirszel J. & Skowroński T. 2002. Lichens respond to heavy metals by phytochelatin synthesis. *New Phytologist.* **156**: 95–102.
- Pawlik-Skowrońska B., Purvis O.W., Pirszel J. & Skowroński T. 2006. Cellular mechanisms of Cu-tolerance in the epilithic lichen *Lecanora polytropa* growing at a copper mine. *The Lichenologist.* **38**: 267–275.
- Peksa O. 2011a. The study of photobionts in the lichenized genus *Lepraria*. Univerzita Karlova, Praha.
- Peksa O. 2011b. Lišejníky národní přírodní památky Křížky. *Sborník muzea Karlovarského kraje.* **19**: 259–272.
- Peksa O., Gebouská T., Škvorová Z., Vančurová L. & Škaloud P. 2022. The guilds in green algal lichens—an insight into the life of terrestrial symbiotic communities. *FEMS Microbiology Ecology.* **98**: fiac008.
- Peksa O. & Škaloud P. 2011. Do photobionts influence the ecology of lichens? A case study of environmental preferences in symbiotic green alga *Asterochloris (Trebouxiophyceae)*. *Molecular Ecology.* 3936–3948.
- Peksová Z., Peksa O. 2022. Lichenologická inventarizace lokality PP Dominova skalka. AOPK ČR, Praha.
- Pelant F. 2020. Plži, stromy, pH, podloží a epifytické lišejníky. Karlova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky, Praha.
- Piercey-Normore M.D. & DePriest P.T. 2001. Algal switching among lichen symbioses. *Am. J. Bot.* **88**: 1490–1498.
- Proctor J. 1971. The plant ecology of serpentine: II. plant response to serpentine soils. *The Journal of Ecology.* **59**: 397.
- Proctor J. & Woodell S. 1975. The ecology of serpentine soils. *Advances in Ecological Research.* 112.
- Puckett K.J., Nieboer E., Gorzynski M.J. & Richardson D.H.S. 1973. The Uptake of Metal Ions by Lichens: A modified ion-exchange process. *New Phytologist.* **72**: 329–342.
- Purvis O.W. 1984. The occurrence of copper oxalate in lichens growing on copper sulphide-bearing rocks In Scandinavia. *The Lichenologist.* **16**: 197–204.
- Purvis O.W. 2014. Adaptation and interaction of saxicolous crustose lichens with metals. *Bot Stud.* **55**: 23.
- Purvis O.W., Elix J.A., Broomhead J.A. & Jones G.C. 1987. The occurrence of copper—norstictic acid in lichens from cupriferous substrata. *The Lichenologist.* **19**: 193–203.
- Purvis O.W. & James P.W. 1985. Lichens of the coniston Copper mines. *The Lichenologist.* **17**: 221–237.
- Purvis O.W. & Pawlik-Skowrońska B. 2008. Chapter 12: Lichens and metals. pp. 175–200. *British Mycological Society Symposia Series*, Elsevier,

- Purvis O.W., Pawlik-Skowrońska B., Cressey G., Jones G.C., Kearsley A. & Spratt J. 2008. Mineral phases and element composition of the copper hyperaccumulator lichen *Lecanora polytropa*. *Mineral. mag.* **72**: 607–616.
- Rajakaruna N., Harris T.B. & Alexander E.B. 2009. Serpentine geoecology of Eastern North America: A Review. *Rhodora*. **111**: 21–108.
- Rakovan J. 2011. Word to the Wise: Serpentine, California's State Rock. *Rocks & Minerals*. **86**: 63–68.
- Rambaut A. & Drummond A.J. 2020. FigTree. 2018. Institute of evolutionary biology, University of Edinburgh, Edinburgh.
- Rambold G., Friedl T. & Beck A. 1998. Photobionts in lichens: Possible indicators of phylogenetic relationships?. *The Bryologist*. **101**: 392.
- Ramić E., Huremović J., Muhić-Šarac T., Đug S., Žero S. & Olovčić A. 2019. Biomonitoring of air pollution in Bosnia and Herzegovina using epiphytic lichen *Hypogymnia physodes*. *Bull Environ Contam Toxicol*. **102**: 763–769.
- Rasch R., Privat K., Trimby P., Netting A., Wade B. & Muhling J. 2024. Energy-Dispersive-Spectroscopy. Available at: https://myscope.training/pdf/MyScope_EDS.pdf.
- René M. 2007. Geochemie a petrografie amfibolitů z Tulešic. *Geologické výzkumy na Moravě a ve Slezsku*. **14**: 72–74.
- Revell L.J. 2024. phytools: Phylogenetic Tools for Comparative Biology (and Other Things).
- Richardson D.H.S. 1973. Photosynthesis and carbohydrate movement. pp. 249–288. *The Lichens*, Elsevier,
- Richardson D.H.S. 1995. Metal uptake in lichens. *Symbiosis*. **18**: 119–127.
- Richardson D.H.S. & Nieboer E. 1983. The uptake of nickel ions by lichen thalli of the genera *Umbilicaria* and *Peltigera*. *The Lichenologist*. **15**: 81–88.
- Ritter-Studnička H. 1972. Die erhöhte Sukkulenz bei Serpentinpflanzen. *Phyton (Austria)*. **14**: 239–249.
- Ritter-Studnička H. & Klement O. 1968. Über Flechtenarten und deren Gesellschaften auf Serpentin in Bosnien. *Osterr bot Z*. **115**: 93–99.
- Roberts D.R., Bahn V., Ciuti S., Boyce M.S., Elith J., Guillerá-Arroita G., Hauenstein S., Lahoz-Monfort J.J., Schröder B., Thuiller W., Warton D.I., Wintle B.A., Hartig F. & Dormann C.F. 2017. Cross-validation strategies for data with temporal, spatial, hierarchical, or phylogenetic structure. *Ecography*. **40**: 913–929.
- Rola K., Latkowska E., Myśliwa-Kurdiel B. & Osyczka P. 2019. Heavy-metal tolerance of photobiont in pioneer lichens inhabiting heavily polluted sites. *Science of The Total Environment*. **679**: 260–269.
- Rola K., Lenart-Boroń A., Boroń P. & Osyczka P. 2021. Heavy-metal pollution induces changes in the genetic composition and anatomical properties of photobionts in pioneer lichens colonising post-industrial habitats. *Science of The Total Environment*. **750**: 141439.
- Rola K., Osyczka P. & Kafel A. 2016. Different heavy metal accumulation strategies of epilithic lichens colonising artificial post-smelting wastes. *Arch Environ Contam Toxicol*. **70**: 418–428.
- Rolshausen G., Dal Grande F., Sadowska-Deś A.D., Otte J. & Schmitt I. 2018. Quantifying the climatic niche of symbiont partners in a lichen symbiosis indicates mutualist-mediated niche expansions. *Ecography*. **41**: 1380–1392.
- Rolshausen G., Hallman U., Grande F.D., Otte J., Knudsen K. & Schmitt I. 2020. Expanding the mutualistic niche: parallel symbiont turnover along climatic gradients. *Proc. R. Soc. B*. **287**: 20192311.
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A. & Huelsenbeck J.P. 2012. MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol*. **61**: 539–542.
- Rundel P.W. 1978. The ecological role of secondary lichen substances. *Biochemical Systematics and Ecology*. **6**: 157–170.
- Sánchez-Biezma M.J. & López de Silanes M.E. 1999. *Porpidia Nadvornikiana*, A species of ultrabasic rocks: Second record for Europe. *LIC*. **31**: 637–648.
- Sánchez-Biezma Serrano M.J. & Álvarez Andrés J. 2001. Líquenes de las rocas ultramáficas en la Sierra de A Capelada (A Coruña, NW de España). *Botanica Complutensis*. **25**: 261–269.

- Sanità Di Toppi L., Musetti R., Vattuone Z., Pawlik-Skowrońska B., Fossati F., Bertoli L., Badiani M. & Favali M.A. 2005. Cadmium distribution and effects on ultrastructure and chlorophyll status in photobionts and mycobionts of *Xanthoria parietina*. *Microscopy Res & Technique*. **66**: 229–238.
- Sarala P. 2016. Comparison of different portable XRF methods for determining till geochemistry. *GEEA*. **16**: 181–192.
- Scott M.G. & Hutchinson T.C. 1987. Effects of a simulated acid rain episode on photosynthesis and recovery in the Caribou-Forage lichens, *Cladina stellaris* (opiz.) Brodo and *Cladina rangiferina* (L.) Wigg. *New Phytologist*. **107**: 567–575.
- Serif (Europe) Ltd. 1987. Affinity Photo (Version 1.10.4). <https://store.serif.com/update/windows/photo/1/>
- Sesli E. & Tüzen M. 1999. Levels of trace elements in the fruiting bodies of macrofungi growing in the East Black Sea region of Turkey. *Food Chemistry*. **65**: 453–460.
- Škaloud P., Moya P., Molins A., Peksa O., Santos-Guerra A. & Barreno E. 2018. Untangling the hidden intra-thalline microalgal diversity in *Parmotrema pseudotinctorum*: *Trebouxia crespoana* sp. nov. *The Lichenologist*. **50**: 357–369.
- Škvorová Z., Černajová I., Steinová J., Peksa O., Moya P. & Škaloud P. 2022. Promiscuity in lichens follows clear rules: Partner switching in *Cladonia* is regulated by climatic factors and soil chemistry. *Front. Microbiol.* **12**: 781585.
- Smith C.W., Aptroot A., Coppins B.J., Fletcher A., Gilbert O.L., James P.W. & Wolseley P.A. 2009. The lichens of Great Britain and Ireland. London Natural History Museum, 1046 pp.
- Smith S.E. & Read D.J. 2010. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, 815 pp.
- South A. 2011. rworldmap: A new R package for mapping global data. *The R Journal*. **3**: 35–43.
- Spridille T., Tuovinen V., Resl P., Vanderpool D., Wolinski H., Aime M.C., Schneider K., Stabenheiner E., Toome-Heller M., Thor G., Mayrhofer H., Johannesson H. & McCutcheon J.P. 2016. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science*. **353**: 488–492.
- Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. **30**: 1312–1313.
- Suza J. 1928. Lichenologický ráz západočeských serpentínů. *Časopis Moravského musea zemského*. **25**: 1–32.
- Suza J. 1944. Sedmý příspěvek k lichenologii Moravy. *Sborník Klubu přírodovědného v Brně*. **25**: 78–89.
- Tamura K., Stecher G. & Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*. **38**: 3022–3027.
- Terlizzi D.E. & Karlander E.P. 1979. Soil algae from a Maryland serpentine formation. *Soil Biology and Biochemistry*. **11**: 205–207.
- Toppi L.S.D., Musetti R., Marabottini R., Corradi M.G., Vattuone Z., Favali M.A. & Badiani M. 2004. Responses of *Xanthoria parietina* thalli to environmentally relevant concentrations of hexavalent chromium. *Functional Plant Biol.* **31**: 329.
- Tyler G. 1989. Uptake, retention and toxicity of heavy metals in lichens. *Water, Air, and Soil Pollution*. **47**: 321–333.
- Uphof J.C.Th. 1925. The occurrence of purple bacteria as symbionts of a lichen. *American Journal of Botany*. **12**: 97–103.
- Urban A., Puschenreiter M., Strauss J. & Gorfer M. 2008. Diversity and structure of ectomycorrhizal and co-associated fungal communities in a serpentine soil. *Mycorrhiza*. **18**: 339–354.
- Urbanek S. 2024. rJava: Low-Level R to Java Interface.
- Vančurová L., Kalníková V., Peksa O., Škvorová Z., Malíček J., Moya P., Chytrý K., Černajová I. & Škaloud P. 2020. Symbiosis between river and dry lands: Phycobiont dynamics on river gravel bars. *Algal Research*. **51**: 102062.
- Vančurová L., Malíček J., Steinová J. & Škaloud P. 2021. Choosing the right life partner: Ecological drivers of lichen symbiosis. *Front. Microbiol.* **12**: 769304.

- Vančurová L., Muggia L., Peksa O., Řídká T. & Škaloud P. 2018. The complexity of symbiotic interactions influences the ecological amplitude of the host: A case study in *Stereocaulon* (lichenized Ascomycota). *Mol Ecol.* **27**: 3016–3033.
- Venter A., Siebert S., Rajakaruna N., Barnard S., Levanets A., Ismail A., Allam M., Peterson B. & Sanko T. 2018. Biological crusts of serpentine and non-serpentine soils from the Barberton Greenstone Belt of South Africa. *Ecological Research.* **33**: 629–640.
- Větrovský T., Baldrian P. & Morais D. 2018. SEED 2: a user-friendly platform for amplicon high-throughput sequencing data analyses. *Bioinformatics.* **34**: 2292–2294.
- Vězda A. 1959. Doplnky k rozšíření lišejníků na Moravě. *Sborník Klubu přírodovědeckého v Brně.* **31**: 51–58.
- Vězda A. 1972. *Haplocarpon nadvornikianum* Vězda sp. n. *Preslia.* **44**: 208–212.
- Vingiani S., Adamo P. & Terribile F. 2013. Lichen-rock interaction in volcanic environments: evidences of soil-precursor formation. *Geoderma.* **207–208**: 244–255.
- Vondrák J., Svoboda S., Malíček J., Palice Z., Kocourková J., Knudsen K., Mayrhofer H., Thüs H., Schultz M., Košnar J. & Hofmeister J. 2022. From Cinderella to Princess: an exceptional hotspot of lichen diversity in a long-inhabited central-European landscape. *Preslia.* **94**: 143–181.
- Voytsekhovich A. & Beck A. 2016. Lichen photobionts of the rocky outcrops of Karadag massif (Crimean Peninsula). *Symbiosis.* **68**: 9–24.
- Walker R.B. 1954. Factors affecting plant growth on serpentine soils. *Ecology.* **35**: 259–266.
- Walker R.B., Walker H.M. & Ashworth P.R. 1955. Calcium-magnesium nutrition with special reference to serpentine soils 1. *Plant Physiol.* **30**: 214–221.
- Wedin M., Maier S., Fernandez-Brime S., Cronholm B., Westberg M. & Grube M. 2016. Microbiome change by symbiotic invasion in lichens. *Environmental Microbiology.* **18**: 1428–1439.
- Wei T., Simko V., Levy M., Xie Y., Jin Y., Zemla J., Freidank M., Cai J. & Protivinsky T. 2021. corrplot: Visualization of a correlation Matrix.
- Werth S. & Sork V.L. 2010. Identity and genetic structure of the photobiont of the epiphytic lichen *Ramalina menziesii* on three oak species in southern California. *American J of Botany.* **97**: 821–830.
- White T.J., Bruns T.D., Lee S.B. & Taylor J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. pp. 315–322. *PCR – Protocols and Applications - A Laboratory Manual*, Academic Press, New York.
- Wickham H., François R., Henry L., Müller K. & Vaughan D. 2014. dplyr: A grammar of data manipulation. 1.1.4.
- Wilkinson L. 2024. venneuler: Venn and euler diagrams.
- Williamson, McLean, & Purvis 1998. Application of X-ray element mapping across the lichen–rock interface. *Journal of Microscopy.* **191**: 91–96.
- Wilson M.J., Jones D. & McHardy W.J. 1981. The weathering of serpentinite by *Lecanora atra*. *The Lichenologist.* **13**: 167–176.
- Wirth V. 1972. *Die Silikatflechten-Gemeinschaften im ausseralpinen Zentraleuropa.* Verlag von J. Cramer, Lehre. 313 pp.
- Wirth V. 1995. *Die Flechten Baden-Württembergs. Teil 1 und 2.* Eugen Ulmer, 1006 pp.
- Wirth V. & Hertel E. 2009. Die Serpentin-Flechte *Porpidia nadvornikiana* in Deutschland nachgewiesen. *Denkschriften der Königlich-Baierischen Botanischen Gesellschaft in Regensburg.* **70**: 283–285.
- Wornik S. & Grube M. 2010. Joint dispersal does not imply maintenance of partnerships in lichen symbioses. *Microb Ecol.* **59**: 150–157.
- Yahr R., Vilgalys R. & Depriest P.T. 2004. Strong fungal specificity and selectivity for algal symbionts in Florida scrub *Cladonia* lichens. *Molecular Ecology.* **13**: 3367–3378.
- Yavuz M. & Çobanoğlu G. 2021. Biomonitoring of Ca, Mg and Na accumulation in lichens as evidence of air pollution stress in Isparta, Turkey. **24**: 11–28.
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L. & Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology.* **7**: 203–214.

Zoller S., Scheidegger C. & Sperisen C. 1999. PCR Primers for the amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of lichen-forming Ascomycetes. *The Lichenologist*. **31**: 511–516. Online zdroje

Internetové zdroje

Malíček J., Palice Z., Bouda F., Knudsen K., Šoun J., Vondrák J. & Novotný P. 2024. Atlas českých lišejníků. – *da-lib.cz*. [7. 07. 2024]

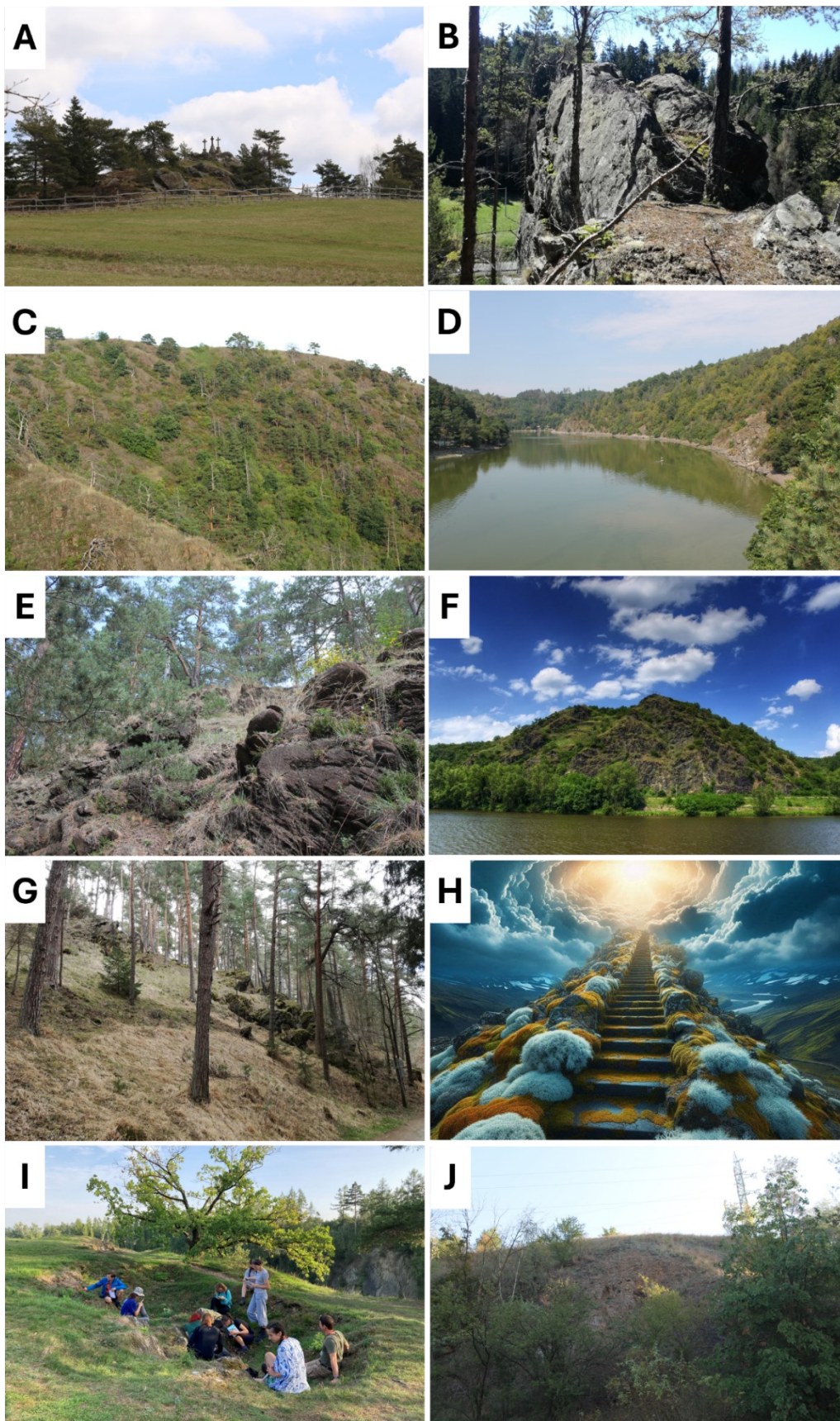
MATCA. <https://matca.cz/technologie/analyticke-metody/eds/>. [8. 07. 2024]

Nimis P.L., 2024. ITALIC – The Information System on Italian Lichens. Version 7.0. University of Trieste, Dept. of Biology. <https://dryades.units.it/italic>. [7. 07. 2024]

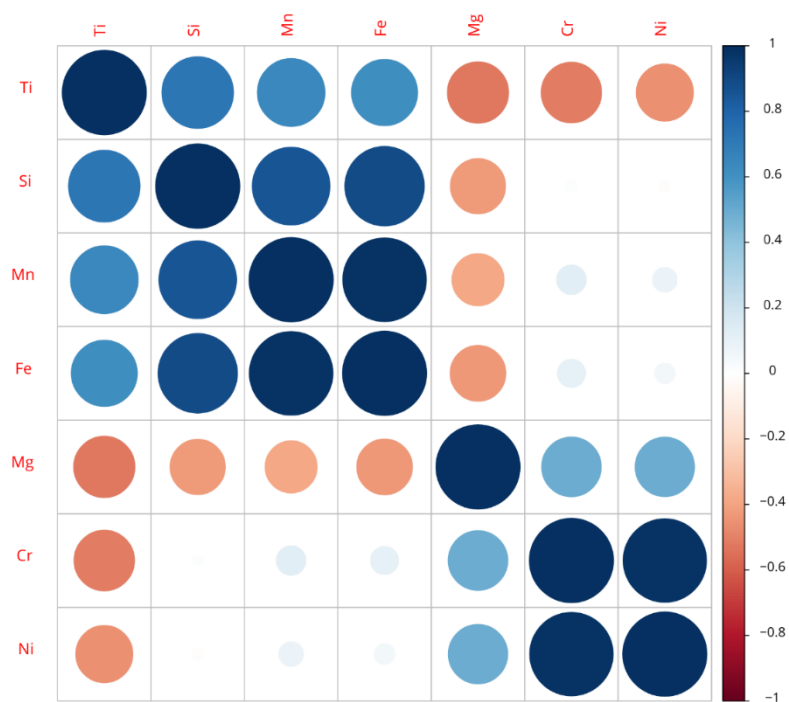
AI – Copilot „schody do nebe v nebi s modrým nebem a lišejníky“

9 Příloha

Příloha 1 Fotografie studovaných lokalit: **A** – Křížky, **B** – Údolí Teplé, **C** – Mohelenská hadcová step, **D** – U doutné skály, **E** – Želivka, **F** – Kalvárie (foto: Maryška, P.), **G** – Holubovské hadce, **H** – Ráj (z důvodu chybějící fotodokumentace přikládám ilustrační obrázek; AI-Copilot), **I** – Borecká skalka, **J** – Třebovské hradisko; levý sloupec = hadce, pravý sloupec = amfibolity, každá dvojice představuje klimatický pár.



Příloha 2 Korelační matice obsahu kovů naměřených XRF analyzátozem skrze stélku lišejníku vytvořená na základě Pearsonova korelačního koeficientu.



Příloha 3 Počty stélek s jednotlivými liniemi řas rodu *Asterochlo-*
ris na hadci a amfibolitu

linie	hadec	amfibolit	počet celkem
A. aff. italiana	1	0	1
A. clade 12	2	0	2
A. clade 8	3	1	4
A. glomerata	3	5	8
A. italiana	0	1	1
StA3	0	1	1
StA9	0	1	1
A. woessiae	0	3	3
nezařazeno 1	1	0	3
nezařazeno 2	0	1	0
nezařazeno 3	1	0	0

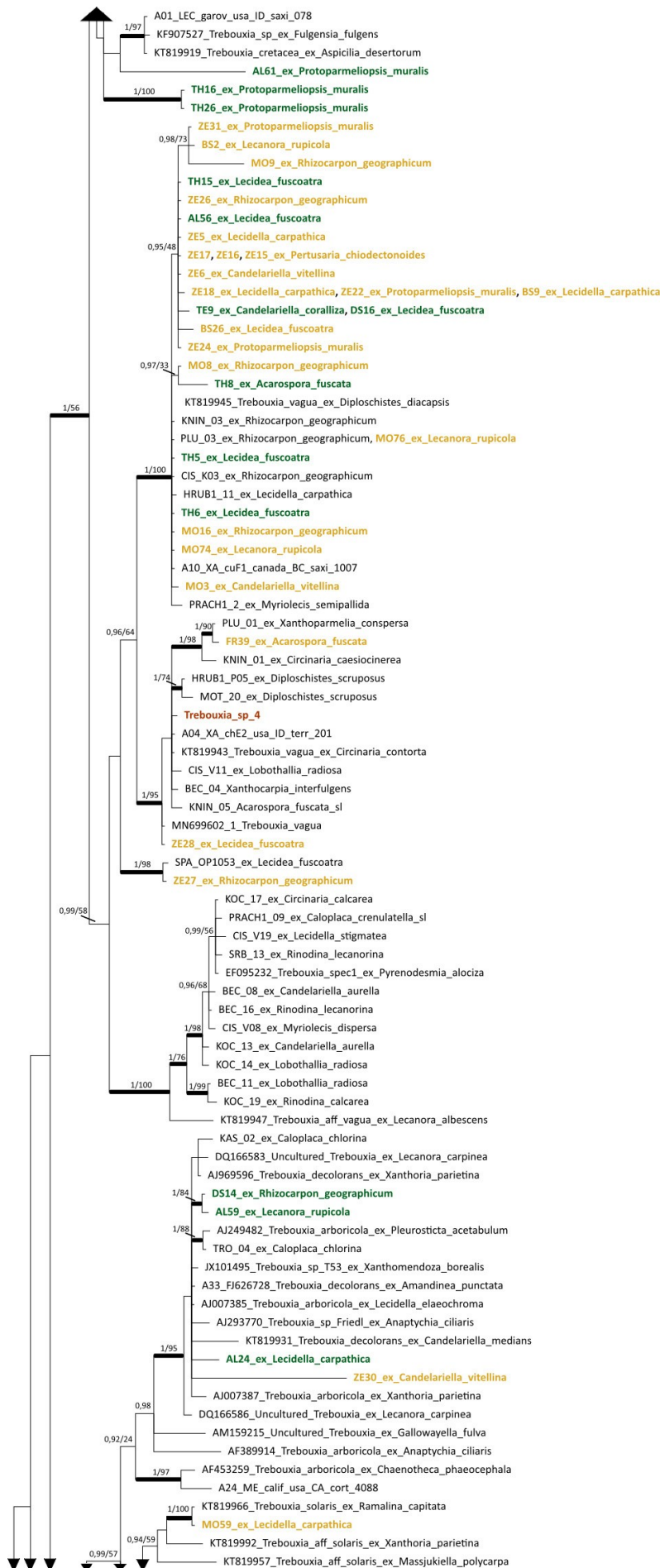
Příloha 4 Počty stélek s jednotlivými liniemi řas rodu Trebouxia na hadci a amfibolitu

linie	hadec	amfibolit	počet celkem
A01 (T. cretacea)	0	1	1
A03 (T. jamesii)	0	2	2
A04	2	0	2
A06 (T. incrustata)	25	34	59
A10 (T. vaga)	19	7	26
A13 (T. arboricola/crenulata)	3	0	3
A33 (T. decolorans)	1	3	4
A35 (T. solaris)	1	0	1
Ax	1	0	1
nezařazeno 1	0	2	2
nezařazeno 2	1	0	1
I01a	2	1	3
S02 (T. „hypogymniae“)	6	3	9
S03	0	1	1
S04	0	2	2
S05	0	3	3
S10b	8	5	13

Příloha 5 Nezakořeněný BI strom fotobiontů rodu *Trebouxia* vytvořený na základě úseku ITS. Čísla nad větvemi zobrazují statistickou podporu určenou dvěma metodami – BI posteriorní pravděpodobnost / ML bootstrap. Zobrazeny jsou hodnoty > 89 pro BI a jim odpovídající hodnoty ML. Tučně jsou vyznačené linie s BI = 1. Barva odpovídá substrátu, na kterém stélka roste – **žlutá** = hadec, **zelená** = amfibolit, vyznačeny jsou pouze linie obsahující vzorky z mé diplomové práce.



A06 (T. incrustata)



A01 (T. cretacea)

A (nezařazeno)

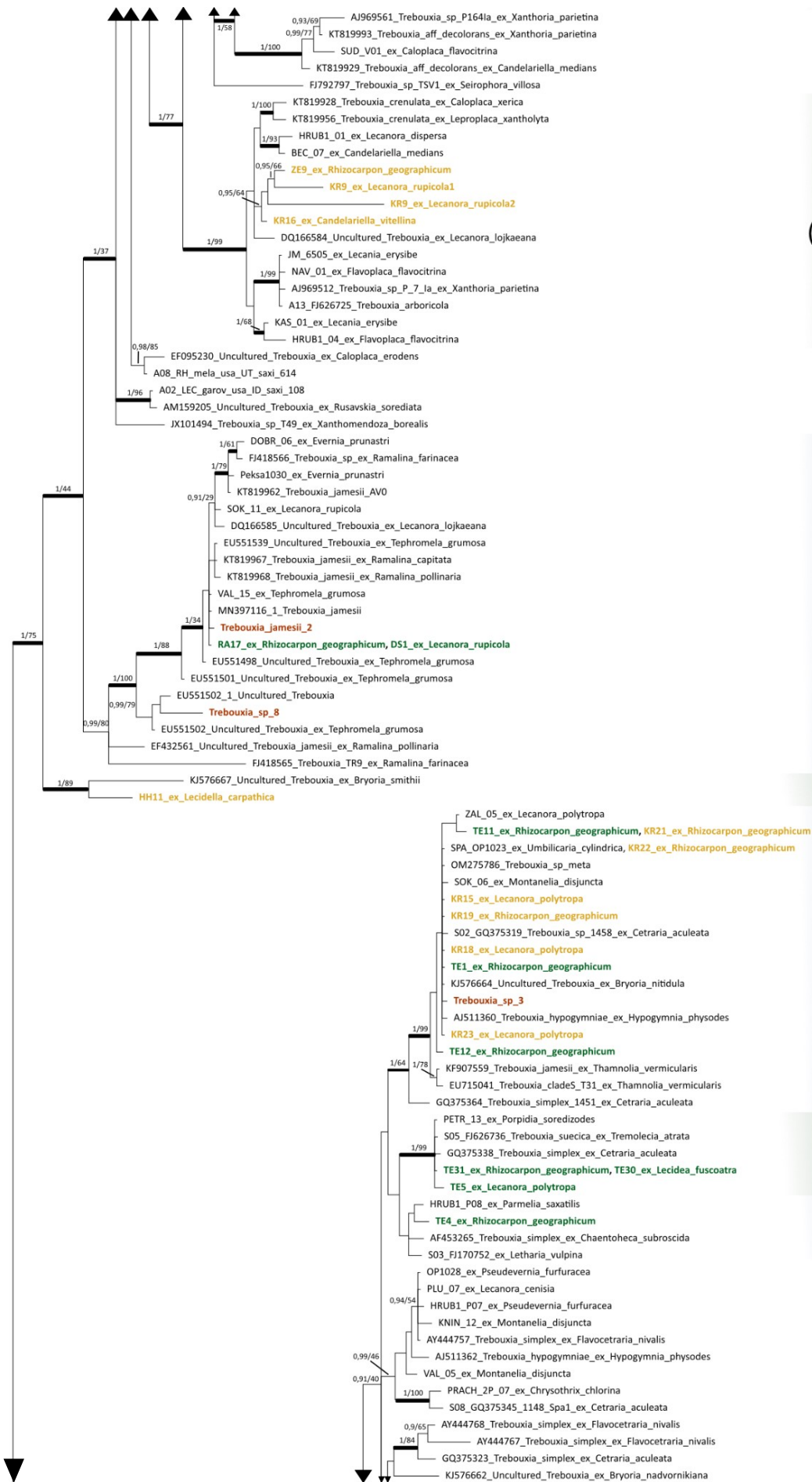
A10 (T. vagua)

A04

Ax

A33 (T. decolorans)

A35 (T. solaris)



A13
(*T. arboricola/crenulata*)

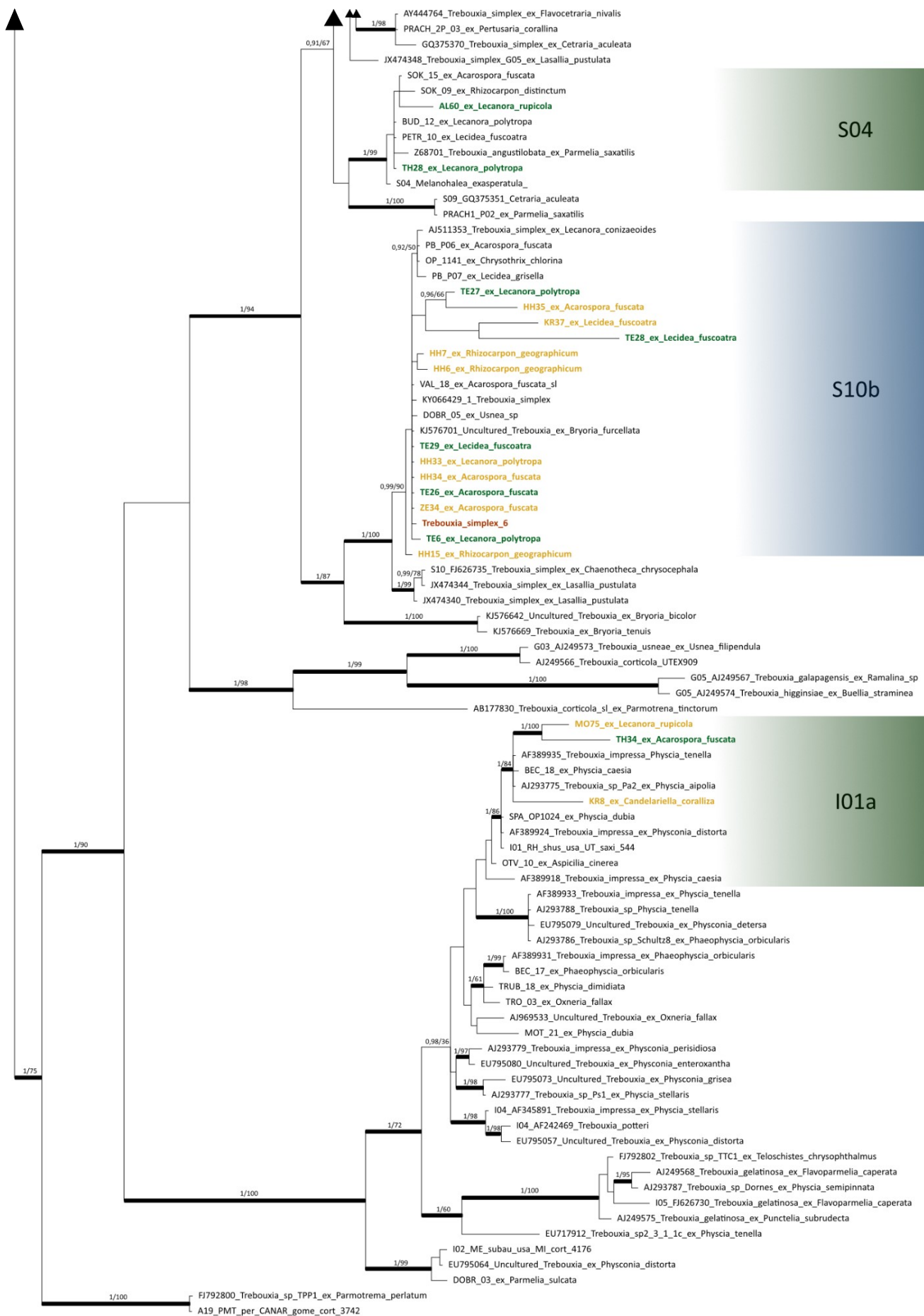
A03 (*T. jamesii*)

A (nezařazeno)

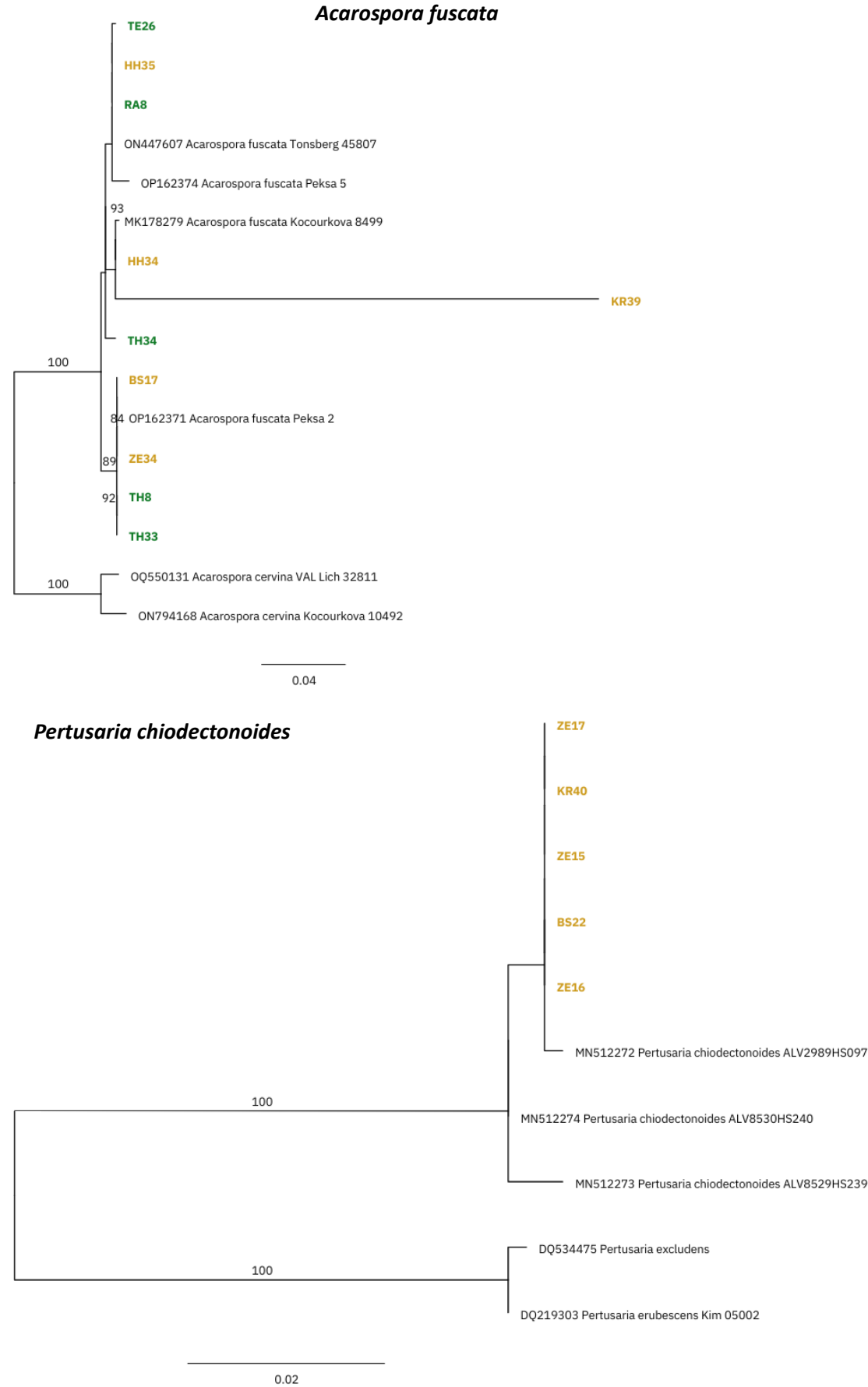
S02a
(*T. „hypogymniae“*)

S05 (*T. „suecica“*)

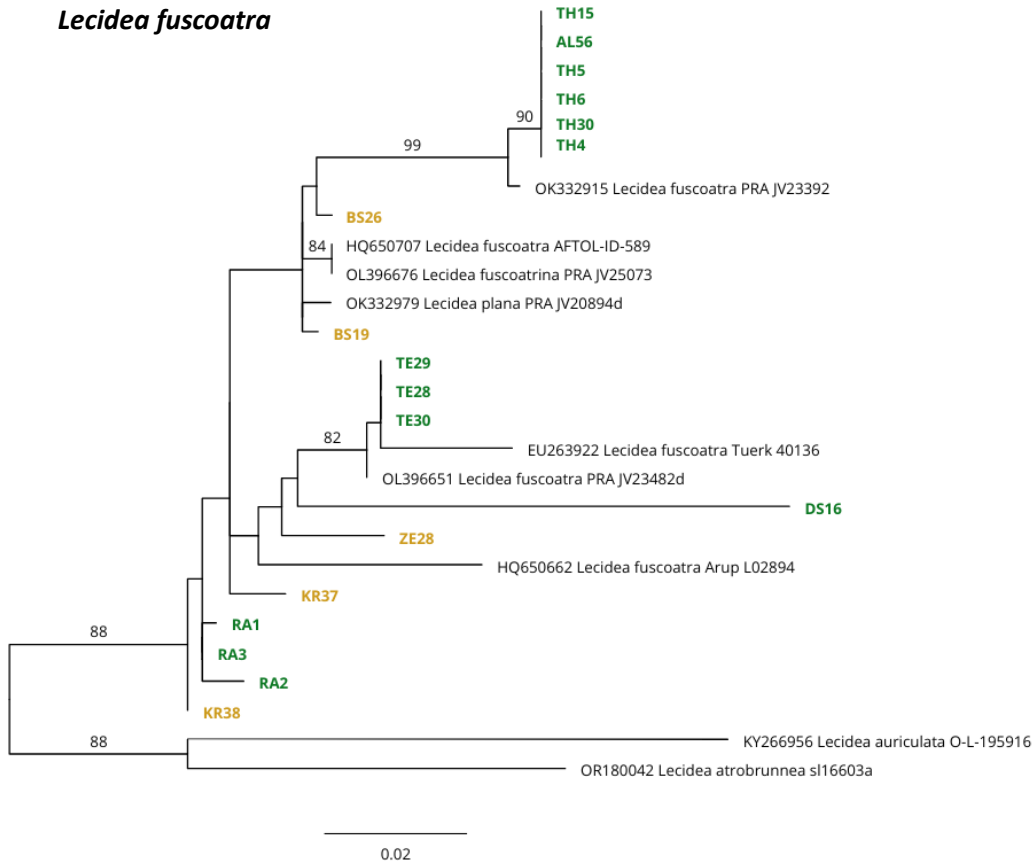
S03



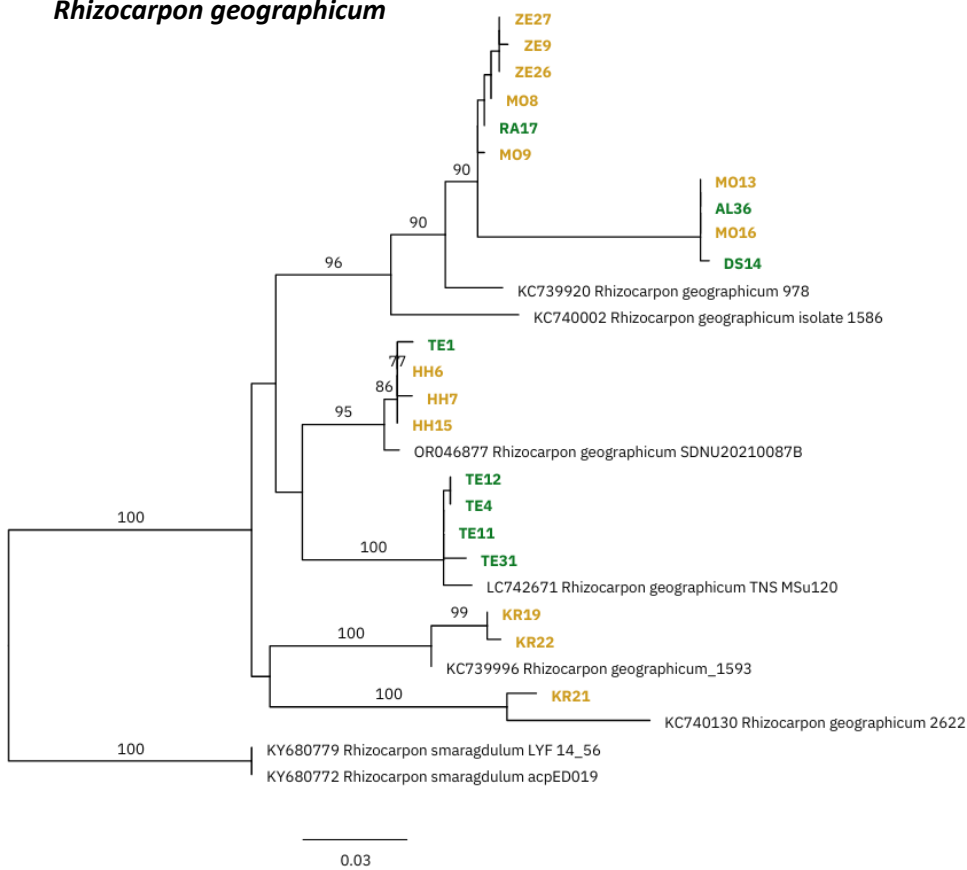
Příloha 6 *Fylogenetické stromy mykobiontů druhu *Acarospora fuscata*, *Lecidea fuscoatra*, *Lecanora polytropa*, *L. rupicola*, *Pertusaria chiodectionoides*, *Protoparmeliopsis muralis*, *Rhizocarpon geographicum* a rodu *Candelariella* vytvořené metodou ML na základě úseku ITS rDNA. Čísla nad větvemi zobrazují ML bootstrap, zobrazeny jsou hodnoty >75. Tučně vyznačené vzorky pocházejí z této práce, barva určuje typ substrátu – **žlutá** = hadec, **zelená** = amfibolit.*



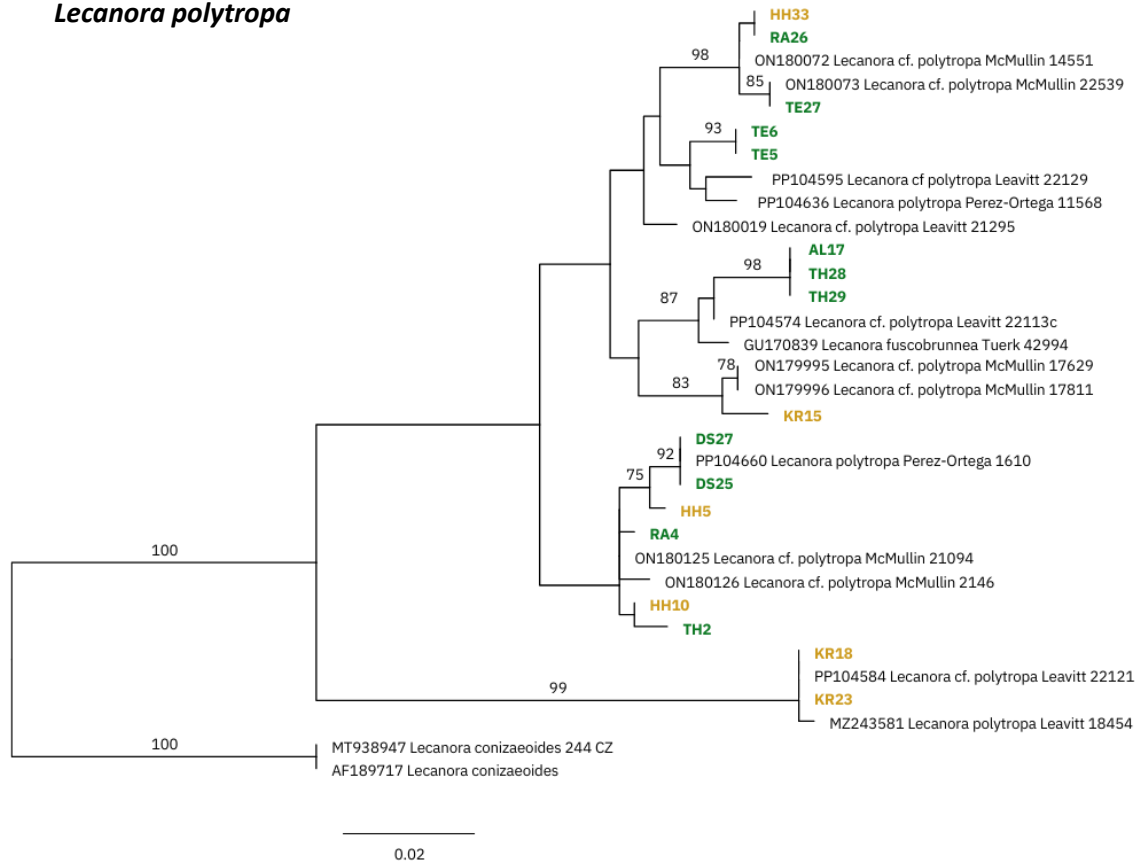
Lecidea fuscoatra



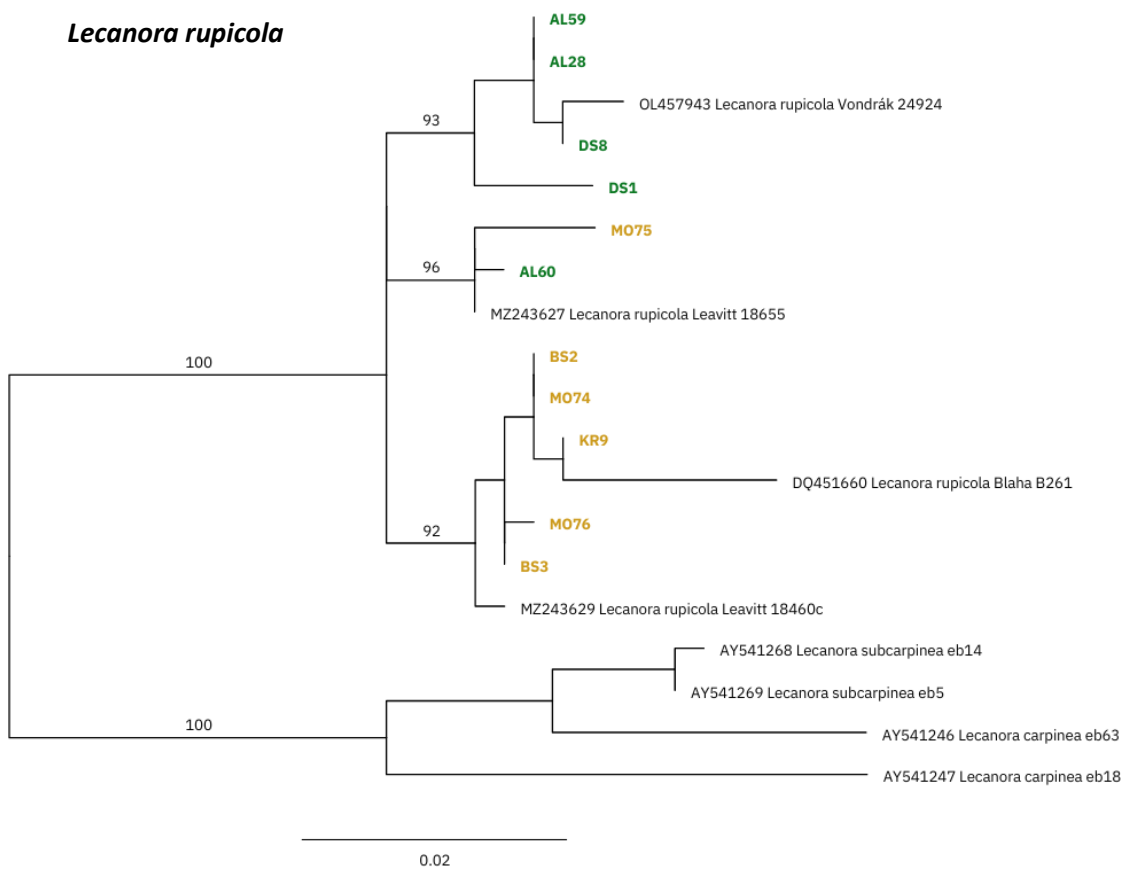
Rhizocarpon geographicum



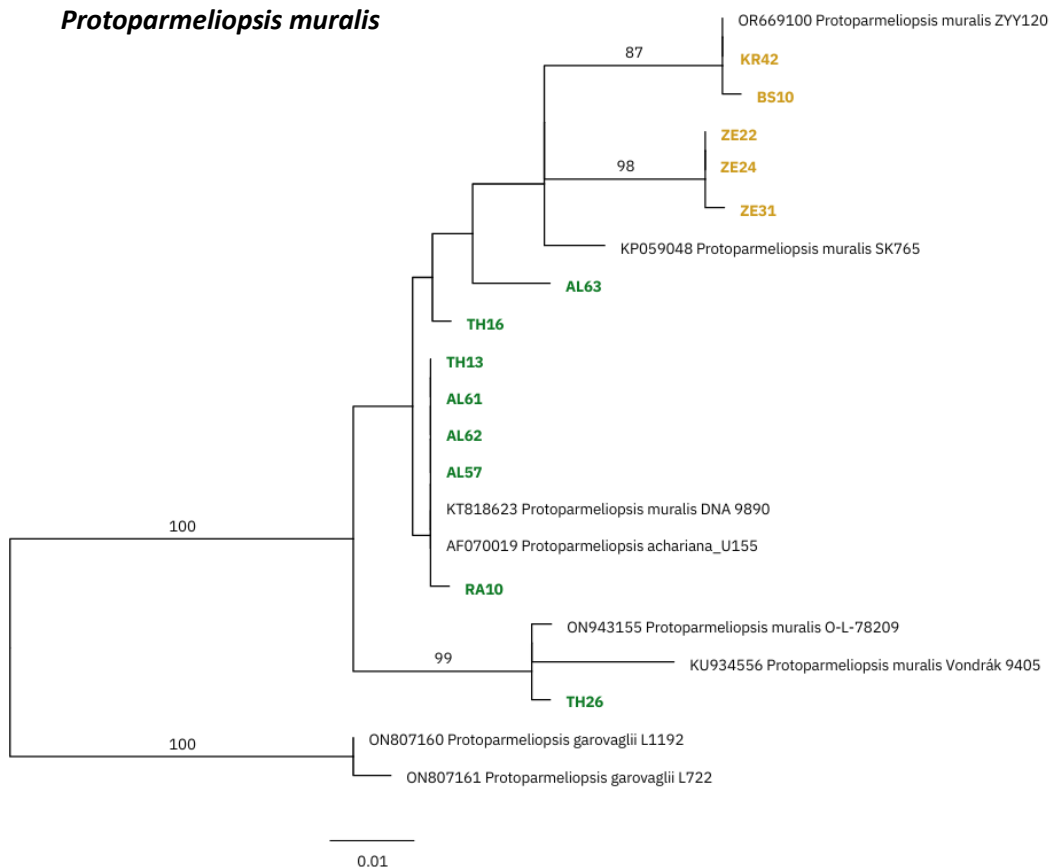
Lecanora polytropa



Lecanora rupicola



Protoparmeliopsis muralis



Candelariella coralliza, *C. vitellina*

