

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Bc. Jana Schmidtová

Sejdeme se v litorálu: Diverzita symbiontů lišejníků čeledi Verrucariaceae
Let's meet in the littoral: Diversity of symbiosis in the Verrucariaceae lichens

Diplomová práce

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

Konzultantka: Mgr. Ivana Černajová

Praha, 2022

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, 11. 8. 2022

.....

Jana Schmidtová

Poděkování

Můj největší dík patří mému školiteli Pavlu Škaloudovi a konzultantce Ivaně Černajové, bez kterých by tato práce nikdy ani nevznikla. Za všechny jejich odborné i neodborné rady, ochotu pomoci a poradit kdykoliv bylo potřeba, za zaučení v laboratoři i v terénu a povzbuzování až do konce. Stejně tak děkuji Ulfu Schiefelbeinovi z Rostocku, který pro mou diplomovou práci sesbíral většinu položek z pobřeží Baltského a Severního moře, a to na jízdním kole. Se sběrem položek mi dále pomáhali Iva Jadrná, Zuzana Škvorová a Martin Malý, kterým také patří můj velký dík. V laboratoři mi byla ochotná vždy pomoci i Lenka Flašková, které tímto také děkuji.

Ráda bych poděkovala i všem svým ostatním kamarádům a spolužákům z algologie, kteří mi dodávali odvalu po celou dobu studia, sdíleli se mnou všechny radosti i starosti a vytvářeli tak úžasnou atmosféru ke studiu.

V neposlední řadě chci také poděkovat své rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali, měli se mnou ve všem velikou trpělivost a vytvářeli mi zázemí, které jsem zejména v nelehkých chvílích potřebovala.

Abstrakt

Lišejníky jsou organismy tvořené několika symbiotickými partnery, z nichž nejdůležitější je houba (mykobiont) a řasa či sinice (fotobiont). Přestože většina lišejníků je terestrická, některé lze nalézt i ve vodním prostředí. Černé korovité lišejníky z čeledi Verrucariaceae (Verrucariales, Eurotiomycetes, Ascomycota) se dokázaly tomuto prostředí velmi dobře přizpůsobit a tvoří často dominantu mořského pobřeží v těsné blízkosti kolísající vodní hladiny. Schopnost těchto lišejníků obývat nejrůznější prostředí je spojována s jejich neobvykle širokou škálou fotobiontů. Přesto však u většiny z nich není tento symbiont známý.

Tato práce zkoumá diverzitu lišejníků čeledi Verrucariaceae v litorální zóně pobřeží Baltského a Severního moře, vztahy mezi symbionty a spojitost mezi diverzitou lišejníků a gradientem salinity. Pomocí metabarcodingu zjišťuje diverzitu volně žijících řas v okolí studovaných lišejníků a symbiotické řasy porovnává s fotobionty, nalezenými v lišejnících.

Mykobionti a fotobionti byli identifikováni pomocí ITS a 18S rDNA. Nalezeno bylo celkem devět linií mykobiontů i fotobiontů. Nejčastějším lišejníkem se ukázal být druh *Hydropunctaria maura* se svým fotobiontem *Pseudendoclonium submarinum*. Pro řadu lišejníků je zde jejich fotobiont popsán molekulárně poprvé. Objevení mnoha molekulárně neznámých linií značí skrytou diverzitu mykobiontů i fotobiontů. Srovnání diverzity volně žijících symbiotických řas s fotobionty lišejníků ukázalo, že ne vždy si mykobiont vybírá nejvíce dostupnou řasu v okolí. Vztahy některých z lišejníků vykazují při výběru partnera nízkou specificitu, ale velmi vysokou selektivitu. Porovnání počtů druhů s měnící se salinitou mezi Baltským a Severním mořem potvrzuje růst diverzity lišejníků spolu se vzrůstající koncentrací soli ve vodě.

Klíčová slova: lišejníky, Verrucariaceae, *Hydropunctaria*, *Verrucaria*, *Pseudendoclonium*, *Urospora*, litorál, taxonomie, fylogeneze, mykobiont, fotobiont, metabarcoding, specificita, selektivita, diverzita, gradient salinity, Baltské moře, Severní moře, volně žijící symbiotické řasy

Abstract

Lichens are organisms formed by several symbiotic partners, most importantly a fungus (mycobiont) and an alga or cyanobacteria (photobiont). Although most lichens are terrestrial, some can be found also in aquatic environments. Black crustose lichens from the family Verrucariaceae (Verrucariales, Eurotiomycetes, Ascomycota) were able to adapt to this environment very well and often dominate in the seashore near fluctuating water level. The ability of these lichens to inhabit various environments is associated with their unusually wide range of photobionts. However, this symbiont is not known to most of them.

This work investigates the diversity of lichens of the family Verrucariaceae in the littoral zone of the Baltic and the North Sea coasts, the relationships between symbionts and the connection between lichen diversity and the salinity gradient. Using metabarcoding, the diversity of free-living algae in the vicinity of the studied lichens is determined and the symbiotic algae are compared with the photobionts found in the lichens.

Mycobionts and photobionts were identified using ITS and 18S rDNA. A total of nine lineages of mycobionts and photobionts were found. The most common lichen turned out to be the species *Hydropunctaria maura* with its photobiont *Pseudendoclonium submarinum*. For several lichens, their photobiont is described molecularly for the first time. The discovery of many molecularly unknown lineages indicates a cryptic diversity of both mycobionts and photobionts. The comparison of the diversity of free-living symbiotic algae with lichen photobionts showed that the mycobiont does not always choose the alga most available in the vicinity. The relationships of some of the lichens show low specificity but very high selectivity in partner choice. The comparison of species numbers with changing salinity between the Baltic and the North Sea confirms the growth of lichen diversity along with the increasing concentration of salt in the water.

Keywords: lichens, Verrucariaceae, *Hydropunctaria*, *Verrucaria*, *Pseudendoclonium*, *Urospora*, littoral, taxonomy, phylogeny, mycobiont, photobiont, metabarcoding, specificity, selectivity, diversity, salinity gradient, Baltic Sea, North Sea, free-living symbiotic algae

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1 Zonace mořských lišejníků.....	2
1.2 Diverzita mořských lišejníků v litorálu.....	4
1.3 Symbiotické vztahy v lišejnících.....	5
1.4 Diverzita fotobiontů.....	5
1.5 Výběr fotobionta.....	6
1.6 Adaptace a odolnost vůči stresům.....	7
2. Cíle práce.....	9
3. Materiál a metody.....	10
3.1 Materiál.....	10
3.2 Izolace DNA.....	10
3.3 PCR reakce a sekvenování DNA.....	12
3.4 Tvorba alignmentu.....	14
3.5 Tvorba fylogenetického stromu.....	15
3.6 Illumina metabarcoding.....	16
3.7 Zpracování dat.....	17
3.8 Izolace a kultivace fotobiontů.....	17
4. Výsledky.....	18
4.1 Diverzita mykobiontů.....	18
4.2 Diverzita fotobiontů.....	22
4.3 Kultivace fotobiontů.....	27
4.4 Diverzita volně žijících řas.....	28
4.5 Výběr fotobiontů a vztahy mezi partnery.....	29
4.6 Diverzita symbiontů na gradientu salinity.....	33
5. Diskuse.....	36
5.1 Diverzita lišejníků a jejich symbiotické vztahy.....	36

5.2 Kde najít toho správného partnera?	38
5.3 Jak se mění diverzita lišejníků na gradientu salinity?	40
6. Závěr.....	42
7. Zdroje	43
8. Přílohy	54
8.1 Lokality metabarcodingu.....	54
8.2 Morfologie litorálních lišejníků.....	55
8.3 Fylogenetický strom metabarcodových sekvencí.....	56
8.4 Přehledová tabulka	58

Seznam zkratek

rDNA	<i>ribosomal DNA</i>	ribosomální DNA
eDNA	<i>enviromental DNA</i>	enviromentální DNA
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>	
SSU	<i>small subunit</i>	malá podjednotka
LSU	<i>large subunit</i>	velká podjednotka
OTU	<i>Operational taxonomic unit</i>	Operační taxonomická jednotka
ML	<i>Maximum Likelihood</i>	Maximální věrohodnost
BIC	<i>Bayesian information criterion</i>	Bayesovské informační kritérium
PSU	<i>Practical salinity unit</i>	jednotka salinity (1 PSU = 1 g/kg)
rpm	<i>revolutions per minute</i>	otáčky za minutu
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	polymerázové řetězové reakce
aff.	z latiského <i>affinis</i>	příbuzný, nejbližší k druh; za rodovým jménem/
sp.	z latinského <i>species</i>	čeledí značí fakt, že daný vzorek lze určit pouze do rodu/čeledě
s. str.	<i>sensu stricto</i>	v úzkém slova smyslu

1. Úvod

Lišejníky pokrývají asi 8 % zemského povrchu (Ahmadjian 1995). Vyskytují se po celém světě ve všech podnebných pásech od polárních oblastí až po tropické deštné pralesy. Dominují především v tundře, boreálních lesích, chladných i horkých pouštích, ve vysokých nadmořských výškách, na útesech mořského pobřeží a tvoří nedílnou součást stromových epifytů v deštných pralesích mírného pásma (Galloway 2008). Kolonizují širokou škálu přírodních substrátů jako je půda, kůra stromů, ztrouchnivělé dřevo, kameny a skály, listí, ale také povrchy některých zvířat jako například krunýře želv nebo brouků (Ahmadjian 1995). Lišejníky se ale dokázaly přizpůsobit také člověku a běžně je můžeme najít i na zcela umělých substrátech jako je asfalt, beton, kov, plast či pryž (Seaward 2008).

Lišejníky jsou primární producenti vytvářející kyslík a ukládající uhlík do biomasy a jsou součástí potravního řetězce. Jako jedni z prvních kolonizátorů ve stádiu ranné sukcese hrají významnou roli v utváření půdy. Spolu se sinicemi, řasami, mikroskopickými houbami a bakteriemi jsou součástí půdních krust, které půdu zpevňují a zabraňují tak erozi (Belnap et al. 2001). Díky schopnosti akumulovat prvky jako je dusík, fosfor a síra zúrodňují půdu a dělají ji dostupnější pro další kolonizátory (Seaward 2008).

V extrémních podmínkách a prostředích (např. nízké teploty a mráz, vysoké teploty a ozáření, sucho, vlhko, zvýšená salinita atd.), které jsou pro většinu organismů na planetě neobyvatelné, mohou být dokonce jedinou dominující formou života (Kranner et al. 2008).

Přestože většina lišejníků je terestrická, část z nich se dokázala přizpůsobit i vodnímu prostředí. Jako poikilohydrické organismy jsou lišejníky schopné snášet extrémní období sucha i mokra a pro svou fyziologii často přímo vyžadují střídání období vysychání a zavlažování. Vodu získávají nejčastěji z dešťových srážek, vystačí si však i s pouhou vzdušnou vlhkostí či rosou (Green et al. 2008). Jen velmi málo druhů dokáže žít většinu života skutečně pod vodní hladinou, i když existují výjimky (Ahmadjian 1995). Termín „vodní lišejníky“ je velmi široký a zahrnuje všechny sladkovodní i mořské lišejníky, které se vyskytují v blízkosti vodních ploch a více či méně jsou jimi ovlivňovány. Vhodnější název by tak byl spíše „obojživelné lišejníky“. V minulosti byly tyto lišejníky velmi často opomíjeny, to se ale v posledních letech mění a získávají si stále větší pozornost lichenologů (Sonina & Androsova 2020).

Mořské pobřeží či břehy potoků, řek a jezer jsou habitaty, kde můžeme vodní lišejníky najít. Jde o prostředí, kde se setkávají dva zcela odlišné ekosystémy – vodní a terestrický. Tyto lišejníky se tedy musely adaptovat na velmi specifické podmínky. Ze sladkých vod je popsáno zhruba 200 druhů lišejníků, z mořského prostředí kolem 700 (Hawksworth 2000). Podobně jako

jsou využívány terestrické lišejníky k monitorování kvality ovzduší, mají i vodní lišejníky potenciál ve využití k bioindikaci a kontrole kvality vod (Gilbert & Giavarini 1997; Nokes et al. 2020; Thüs et al. 2014).

1.1 Zonace mořských lišejníků

Je mnoho faktorů, které ovlivňují distribuci lišejníků na mořském pobřeží, např. charakter pobřeží musí být příznivý pro uchycení a růst stélky. V písku ani na neustále se pohybujících oblázcích nemá lišejník šanci na přežití. Naopak stabilní kameny a hrubé skály jsou vhodným stanovištěm s bohatou druhovou diverzitou (Wolseley et al. 1996).

Mezi další aspekty určující přítomnost lišejníků patří expozice vlnám, slunečnímu záření, vysychání a celkový sklon a složení substrátu včetně pH (Dobson 2014). Nejvýznamnější roli hraje však vzdálenost od vodní hladiny a její kolísání během přílivu a odlivu. Záleží také na míře a četnosti, s jakou jsou lišejníky zaplavovány. Jednotlivé druhy lišejníků se navzájem liší v preferencích habitatu a schopnostech snášet takové podmínky. Podle toho jsou na pobřeží znatelná pásma s určitými druhy lišejníků a lze je rozdělit do jednotlivých zón (Dobson 2014; Fletcher 1973a,b; Hawksworth 2000; Sheard 1968; Vail & Walker 2021):

- I. **Sublitorální zóna** – Trvale pod vodou s výjimkou extrémně nízkých odlivů; bez lišejníků.
- II. **Litorální zóna** – Zóna pravidelně zaplavovaná přílivem, skládající se ze dvou částí:
 - i **Eulitorál** – Častá přítomnost svijonožců (Cirripedia, Crustacea), na jejich schránkách roste *Pyrenocollema halodytes*, dalšími lišejníky jsou např. *Wahlebergiella mucosa*, *Lichina pygmaea* (často v blízkosti drobného mlže *Lasaea rubra*).
 - ii **Okraj litorálu** – Jen občasně zaplavován přílivem, ale značný vliv příboje a vln; horní výskyt mořských plžů *Littorina littorea*; dominance lišejníku *Hydropunctaria maura* (černý pás viditelný i z dálky).
- III. **Supralitorální zóna** – Jen výjimečně zaplavovaná v dolní části, vliv příboje a vln, má tři části:
 - i **Mesická** – Lišejníky *Flavoplaca marina*, *Lichina confinis*, *Lecanora helicopsis* na stinných místech a *Polyozosia actophila* na lépe osvětlených místech.
 - ii **Submesická** – Vliv příboje klesá, díky mořským ptákům a jejich exkrementům často na živiny bohatá část; lišejníky rodu *Xanthoria* (*X. parietina*, *X. aureola*)

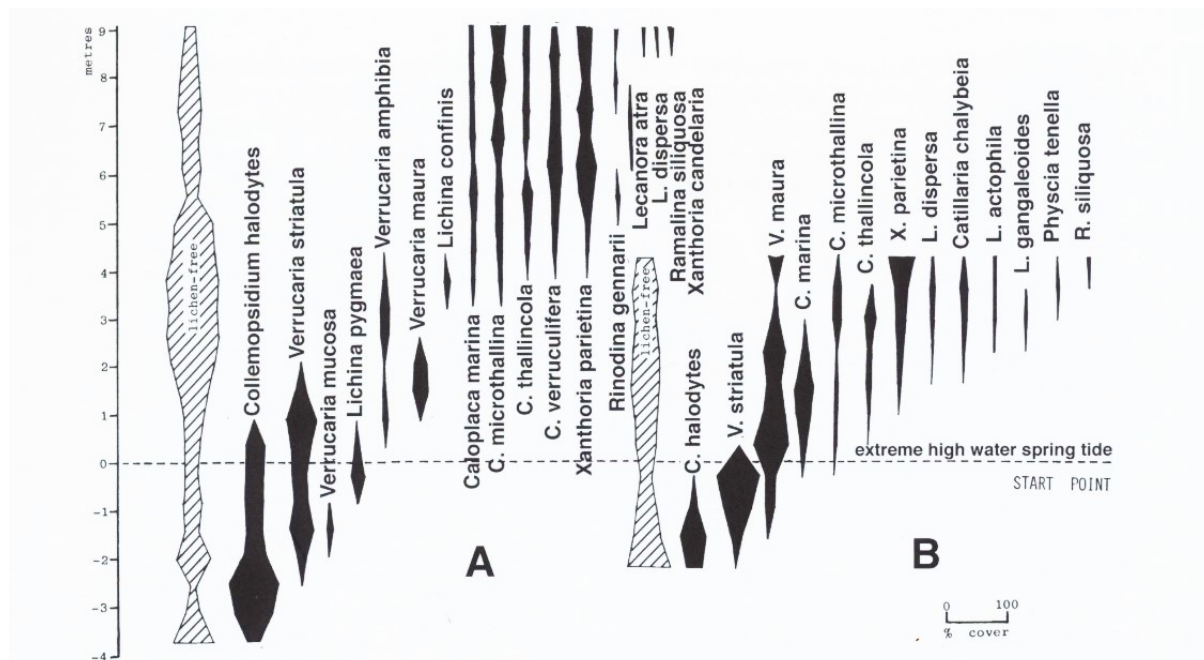
společně s rodem *Flavoplaca* a *Caloplaca* z mesické zóny tvoří žlutooranžový pás, *Verrucoplaca verruculifera*, *Circinaria leproscens*.

- iii **Xerická** – Jen lehký dostřik mořské vody, ale časté střídání sucha a vlhka; lišejníky rodu *Parmelia*, *Anaptychia runcinata*, *Ramalina siliquosa*, na dobře osvětlených skalách také *Lecidella asema*, *Rhizocarpon richardii* a *Diploschistes caesioplumbeus* (v raném stádiu parazitující na *Lecanora gangaleoides*), šedé pásmo.

IV. Terestriální zóna – Malý až žádný efekt mořské vody.

- i **Halofilní** – Druhy, které můžeme najít i ve vnitrozemí a které jsou schopné snést mírné zasolení, např. *Parmelia saxatilis*, *Lecanora polytropa*.
- ii **Halofóbní** – Lišejníky, které nesnesou zasolení a vyskytují se ve vnitrozemí, např. *Parmelia omphalodes*, *Sphaerophorus globosus*, *Platismatia glauca*.

Šířka zón není vždy stejná, záleží na topografii pobřeží a síle větru a vln (Příloha 8.1 Lokality metabarcodingu). Čím více je pobřeží těmto vlivům vystavované, tím širší zóny jsou. Hawksworth (1980) ve své studii z jižního Devonu srovnává dvě pobřeží se stejným substrátem, vzdálená od sebe jen 100 metrů, s rozdílnou orientací na jih a na sever. Jižní pobřeží je daleko více exponované, zatímco severní pobřeží je od větru a vln chráněnější. Rozdíl v šířce, ve které se jednotlivé druhy vyskytují, je patrný z Obrázek 1. Na chráněnějším pobřeží (B) je



Obrázek 1: Zonace lišejníků na exponovaném (A) a krytém (B) pobřeží; *Collempsidium halodytes* = *Pyrenocollema halodytes*, *Verrucaria striatula* = *Wahlenbergiella striatula*, *V. mucosa* = *W. mucosa*, *V. amphibia* = *Hydropunctaria amphibia*, *V. maura* = *H. maura*, *Caloplaca marina* = *Flavoplaca marina*, *C. microthallina* = *F. microthallina*, *C. thallincola* = *Variospora thallincola*, *C. verruculifera* = *Verrucoplaca verruculifera*, *Lecanora atra* = *Tephromela atra*, *L. dispersa* = *Polyozosia dispersa*, *L. actophila* = *P. actophila* (Dobson 2014 podle Hawkswortha 1980).

vliv vln a větru menší, proto se lišejníky supralitorální zóny (např. *Xanthoria parietina*) nachází mnohem blíže vodní hladině než ty na exponovaném pobřeží (A). Na krytém pobřeží se tak mohou lišejníky z okraje litorálu prolínat s lišejníky supralitorální zóny (např. *Hydropunctaria maura* a *Flavoplaca marina*).

Jednotlivé zóny se od sebe ekologicky značně odlišují, a proto je toto rozdělení druhů patrné nejen u lišejníků, ale u všech organismů, které obývají mořské pobřeží (Acosta et al. 2007; Gendron 1977; Lubchenco 1980). Podobná zonace se ovšem vyskytuje i na březích sladkých vod (Scott 1967).

1.2 Diverzita mořských lišejníků v litorálu

Pokud se zaměříme pouze na litorální zónu, ve které dochází k největšímu kontaktu s vodou a nachází se zde lišejníky, které jsou nejčastěji považovány za skutečně „vodní“, tak ve srovnání se supralitorální zónou nacházíme poměrně malou variabilitu v morfologii i taxonomii. Nejvíce druhů patří do řádů Verrucariales (Eurotiomycetes, Ascomycota) a Lichinales (Lichinomycetes, Ascomycota) (Thüs et al. 2014). Mořské druhy v rámci Verrucariales jsou převážně v rodech *Wahlenbergiella*, *Hydropunctaria* a *Verrucaria* (Gueidan et al. 2009). Rod *Verrucaria* je silně polyfyletický a jeho taxonomie stále není dostatečně vyřešená (Gueidan et al. 2007, 2009). Patří sem však pravděpodobně nejhloběji žijící mořský lišejník *Verrucaria serpuloides*, popsáný z Antarktidy, který byl nalezen v hloubce až 10 metrů pod hladinou při průměrném odlivu (Lamb 1973). Z chladných oblastí byl popsán i podivný lišejník *Mastodia tessellata*, jehož stélku tvoří převážně jeho fotobiont rodu *Prasiola* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) (Pérez-Ortega et al. 2010). Tento lišejník je blízce příbuzný rodu *Wahlenbergiella* a obývá exponované útesy v místech bohatých na živiny. Byl však nalezen i vzdálený až několik set metrů od moře (Kohlmeyer et al. 2004; Kováčik & Pereira 2001). Podél západního pobřeží Severní Ameriky roste stejně podivný lišejník *Turgidosculum ulvae*, který je v symbióze s řasou *Blidingia* (Ulvophyceae, Chlorophyta). Molekulární studie ukázala příbuznost s lišejníkem *Verrucaria ditmarsica* (Pérez-Ortega et al. 2018), který je hojný u ústí řek vlévajících se do moře (Smith et al. 2009).

V rámci řádu Lichinales je nevýznamnější pro mořský biotop rod *Lichina*, zajímavý svou keříčkovitou stélkou černé barvy a vyskytující se běžně v severozápadní Evropě. *Pyrenocollema halodytes* z řádu Pyrenulales (Eurotiomycetes, Ascomycota) je oproti tomu velmi nenápadný lišejník, viditelný jen jako pouhé zelenohnědé až černé tečky. Je však rozšířený po celém světě a nejčastěji roste na schránkách mořských bezobratlých (Fish & Fish 1989).

1.3 Symbiotické vztahy v lišejnících

Lišejník je z tradičního pohledu organismus tvořený symbiózou houby (mykobionta) a řasy nebo sinice (fotobionta). V minulosti se lichenologové zabývali převážně houbovými partnery a na fotobionty se zapomínalo (Tschermak-Woess 1989). To se však v dnešní době mění a ukazuje se, že fotobionti hrají důležitou roli nejen ve fyziologii lišejníku, kde zajišťují výživu celému systému, ale také v ekologii. Řasy jsou k danému prostředí daleko citlivější a záleží tedy na jejich schopnostech adaptovat se na dané podmínky (Helms 2003; Peksa & Škaloud 2011). Šířka ekologické niky fotobionta může být tak pro lišejník limitující, ale v různých podmínkách mohou mykobionti své symbionty měnit („photobiont switching“) (Piercey-Normore & DePriest 2001; Rolshausen et al. 2020) nebo mají ve stélce přítomných více různých řas (Moya et al. 2020; Thüs et al. 2011; Vančurová et al. 2020; Voytsekhovich & Beck 2016) či genotypů (Helms et al. 2001; Muggia et al. 2013).

Kromě toho bylo ve stélkách lišejníků objeveno i bohaté mikrobiální společenstvo (Grube & Berg 2009) včetně kvasinek (Mark et al. 2020; Spribille et al. 2016). Zajímavé je, že bakteriální společenstvo mořských lišejníků je odlišné od těch terestrických a v rámci mořských lišejníků se liší i mezi jednotlivými zónami. Jejich role v lišejnících stále není vyjasněna, ale mohou významně přispívat k celkové odolnosti lišejníku vůči abiotickým faktorům (Bjelland et al. 2011; West et al. 2018) či se podílet na přenosu živin ve stélce (Sigurbjörnsdóttir et al. 2014). Jako zdroj zajímavých bioaktivních látek mohou mít význam i pro lidstvo (Parrot et al. 2015). S vývojem moderních technologií máme možnost získat o lišejnících zcela nové poznatky. Nejen lichenologie zažívá novou éru, kdy je třeba pohlížet na lišejník jako na komplexní samostatně fungující mikroekosystém, ve kterém figuruje mnoho více či méně závislých jednotek (Christmas et al. 2021; Hawksworth & Grube 2020).

1.4 Diverzita fotobiontů

V terestrickém prostředí je nejběžnějším fotobiontem řasa *Trebouxia* a *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), případně *Trentepohlia* (Ulvophyceae, Chlorophyta) (Honegger 2009). Na mořském pobřeží se *Trebouxia* vyskytuje až v lišejnících supralitorální zóny (Watanabe et al. 1997). V litorálu, kde dochází k pravidelnému zaplavování, se *Trebouxia* vůbec nevyskytuje (Hawksworth 2000), naopak zde dominují řasy z třídy Ulvophyceae. Zaznamenan byl rod *Pseudendoclonium* a druhy *Halofilum ramosum* a *Paulbroadya petersii* patřící dříve do rodu *Dilabifilum* (Dariencko & Pröschold 2017; Gasulla et al. 2019; Thüs et al. 2011; Tschermak-Woess 1989). Nově popsány fotobionty z lišejníků litorální zóny jsou

Undulifilum symbioticum a *Urospora*, dříve známá jen jako samostatně žijící makroskopická řasa z řádu Ulotrichales (Černajová et al. 2022).

Ze třídy Xanthophyceae byl objeven jako fotobiont *Heterococcus caespitosus* (Parra & Redon 1977), ale molekulárně potvrzen nebyl a ani zařazení mykobionta (*Hydropunctaria maura*) není jisté (Thüs et al. 2011). Spíše zvláštností je pak fotobiont *Petroderma maculiforme* ze třídy Phaeophyceae, popsáný v symbióze s lišejníkem *Wahlenbergiella tavaresiae* ze sanfranciského zálivu v Kalifornii (Gueidan et al. 2011; Peters & Moe 2001; Sanders et al. 2004, 2005).

Ze sinic (Cyanobacteria) je v asociaci s „obojživelnými lišejníky“ popsáno pravděpodobně nejméně sedm druhů. Např. rod *Rivularia* z lišejníků rodu *Lichina* (Ortiz-Álvarez et al. 2015) nebo blízce příbuzný rodu *Chroococcus* a *Hyella caespitosa* popsané z epizoicky žijících lišejníků *Halographis runica* (Arthoniomycetes, Ascomycota) a *Pyrenocollema halodytes* (Carpenter & Foster 2002; Kohlmeyer & Volkmann-Kohlmeyer 1988).

1.5 Výběr fotobionta

Při výběru fotobionta hraje roli specifická a selektivita obou partnerů. Specifitou se myslí taxonomická šíře geneticky kompatibilních partnerů a selektivitou četnost výskytu (Yahr et al. 2004). Nízká specifická znamená možnost soužití s více taxonomicky rozdílnými partnery, naopak vysoká specifická je omezena jen na jednoho. Obojí může mít své výhody i nevýhody. Pro lišejníky, které se rozmnožují sexuálně bez svého fotosyntetizujícího partnera, je výhodná nízká specifická. Klíčící hyfy si tak snáz najde partnera z okolí nebo ze stélky jiných lišejníků (Dal Grande et al. 2014; Rikkinen 2003). Naopak lišejníky šířící se pomocí vegetativních propagulí si nesou svou řasu s sebou a nemusí se tak spoléhat jen na své okolí. I takto rozmnožující se lišejníky jsou však schopné výměny partnera (Nelsen & Gargas 2008). Více symbiotických partnerů totiž znamená širší ekologickou niku a tím větší možnosti v kolonizaci nových stanovišť (Blaha et al. 2006; Vančurová et al. 2018, 2021). Dobře adaptovaná řasa na lokální podmínky bude mít plně efektivní fotosyntézu a prosperovat tak bude celý holobiont. Zvláště v extrémních podmínkách, jakými jsou např. substráty zatížené těžkými kovy, je pak výhodné najít si z okolí řasu, která je schopna toto znečištění snášet (Osyczka et al. 2021; Vančurová et al. 2018).

Ve stejných ekologických podmínkách se vytvářejí komunity lišejníků, takzvané gildy, které mezi sebou své fotobionty sdílejí (Peksa & Škaloud 2011; Peksa et al. 2022; Piercey-Normore & Deduke 2011; Rikkinen 1995; Rikkinen et al. 2002). Přítomnost určitých fotobiontů

je pak determinována především klimatem a složením substrátu (Peksa et al. 2022; Škvorová et al. 2022; Vančurová et al. 2018).

Otázkou zůstává, jaká je skutečná diverzita řas a sinic ve stélkách lišejníků. Diverzita fotobiontů je většinou studována pomocí klasického Sangerova sekvenování, které však zachytí často pouze dominantního partnera (Paul et al. 2018). Pokud se k identifikaci fotobionta použijí i metody vysokokapacitního sekvenování (*high throughput sequencing*, HTS), např. metabarcoding, pak získáme daleko detailnější představu o diverzitě symbiontů, včetně minoritních partnerů. Jak velkou roli hrají tyto minoritní řasy je však stále nejasné (Christmas et al. 2021; Moya et al. 2020, 2021).

1.6 Adaptace a odolnost vůči stresům

Mořské pobřeží je velmi extrémním habitatem se silným efektem abiotických faktorů. Kolísání vodní hladiny způsobuje neustálou změnu v příjmu vody, slunečního záření, teploty a salinity. Vlny se vlivem větru mohou dostat vysoko a jejich efekt může ovlivnit i lišejníky supralitorální zóny, záleží na tom, jak moc je pobřeží exponované. Těmto drsným podmínkám se lišejníky musely adaptovat.

Největší vliv na růst a život lišejníků mořského prostředí má salinita (Delmail et al. 2013). Vysoká koncentrace soli v prostředí snižuje vodní potenciál v lišejnicích, které jakožto poikilohydrické organismy nekontrolují poměr vody v sobě a v okolí. Sůl ze stélky odvede vodu a lišejníky se dostávají do stresu z vysychání. Nedostatek vody a nadměrné sluneční záření má pak destruktivní vliv na fotosyntézu.

Lišejníky vyvinuly mnoho způsobů, jak se proti těmto stresům bránit a ty jsou často druhově specifické a odpovídají umístění lišejníků na mořském prostředí (Gasulla et al. 2019; Higgins et al. 2015). Morfologie pravděpodobně nehraje v halotoleranci příliš velkou roli (Delmail et al. 2013). Mykobionti i fotobionti produkují celou řadu metabolitů a specifických proteinů. Proti vysychání jsou to nejčastěji cukry, cukerné alkoholy a komplexy redukující vodní potenciál a zabraňující ztrátám vody (Delmail et al. 2013; Françoise et al. 2014). Fotoinhibici předchází nahromadění karotenoidů a dalších fotoprotektivních pigmentů (Rastogi et al. 2010). Hlavním osmolytem, jehož akumulace koreluje s koncentrací soli v prostředí, je glycerol (Delmail et al. 2013). Rezistence vůči salinitě se velmi liší v litorální a supralitorální zóně. Potvrzena byla i experimentálně, kdy byli klíčoví mykobionti vystavováni různým koncentracím soli a jejich odpovědi se shodovaly s jejich přirozeným výskytem (Ramkaer 1978).

Důležitá je i adaptabilita samotného fotobionta. Studie ukázaly, že přestože lišejníky ze dvou různých zón mají stejný druh fotobionta, jde vždy o jiný specifický kmen, který navzájem nesdílejí (Gasulla et al. 2019; Ortiz-Álvarez et al. 2015). Samotná symbióza s houbami nejspíš zvyšuje odolnost fotobiontů vůči stresu. V experimentu byly lichenizované sinice na rozdíl od těch volně žijících schopnější přežít vysychání (Büdel 2011; Delmail et al. 2013).

Kromě abiotických faktorů mohou lišejníky ovlivňovat také mořští bezobratlí živočichové. Působí buďto jako predátoři (Françoise et al. 2014; Higgins et al. 2015), nebo jejich schránka slouží lišejníkům za substrát (Fiorentino 2008).

2. Cíle práce

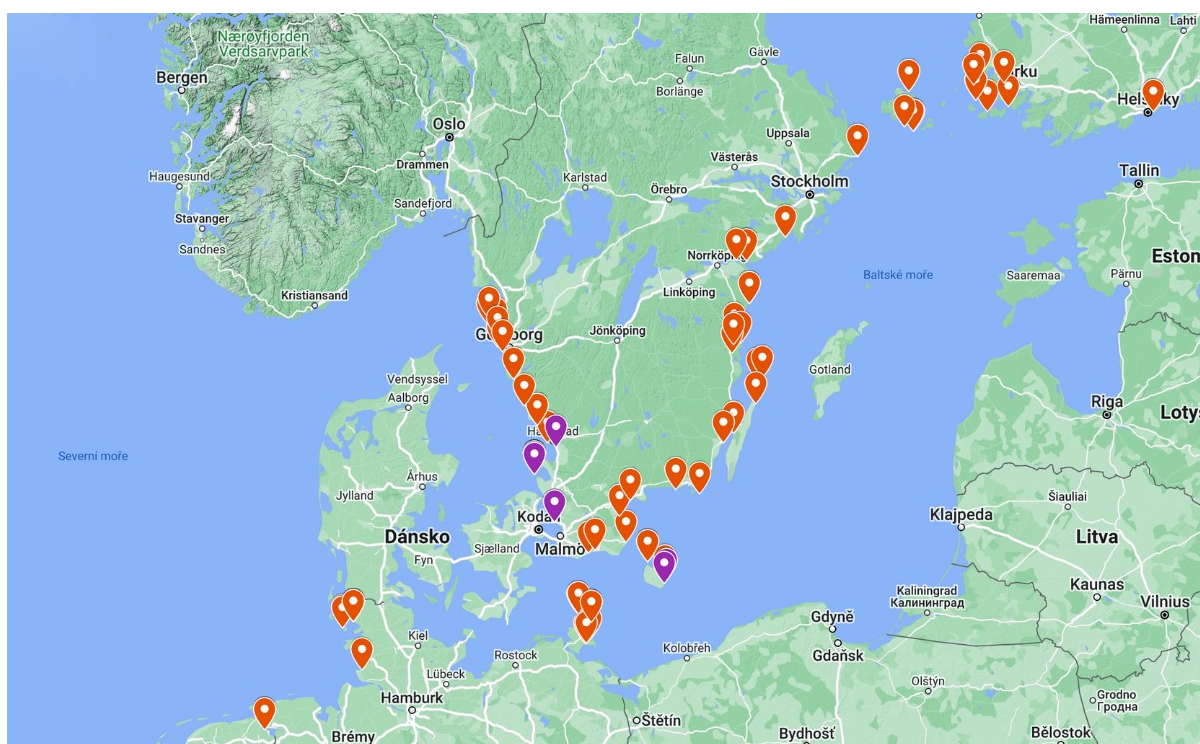
Cílem této práce je zjistit diverzitu hlavních symbiontů lišejníků čeledi Verrucariaceae z litorálu mořského pobřeží a zodpovědět následující otázky:

- Jaká je diverzita volně žijících symbiotických řas v okolí lišejníků? Z jakého „poolu“ si mořské lišejníky vybírají své partnery?
- Mění se diverzita symbiontů na gradientu salinity?

3. Materiál a metody

3.1 Materiál

Materiál byl sesbírán v letech 2019–2021 z pobřeží Baltského a Severního moře (Obrázek 2). Podrobnosti ohledně položek včetně popisu a GPS souřadnic jsou uvedeny v Příloze (8.4 Přehledová tabulka). Jelikož se jedná o saxikolní lišejníky, bylo nutné získat jednotlivé položky i s kouskem substrátu pomocí majzlíků a kladiva. V blízkosti některých položek (Obrázek 2, fialově značené body) byla odebrána také enviromentální DNA (eDNA) pro metabarcoding (více viz kapitola 3.6 Illumina metabarcoding). Položky jsou uloženy v herbářové sbírce Univerzity Karlovy v Praze (PRC) a v herbáři univerzity v Rostocku (Mecklenburg-Vorpommern, Německo).



Obrázek 2: Mapa pobřeží Baltského a Severního moře s vyznačenými body odběrů lišejníků; fialově jsou značena místa s odběrem pro metabarcoding.

(zdroj podkladové mapy: <https://www.google.com/maps/@57.5284111,13.1068312,5z/data=!5m1!1e4>).

3.2 Izolace DNA

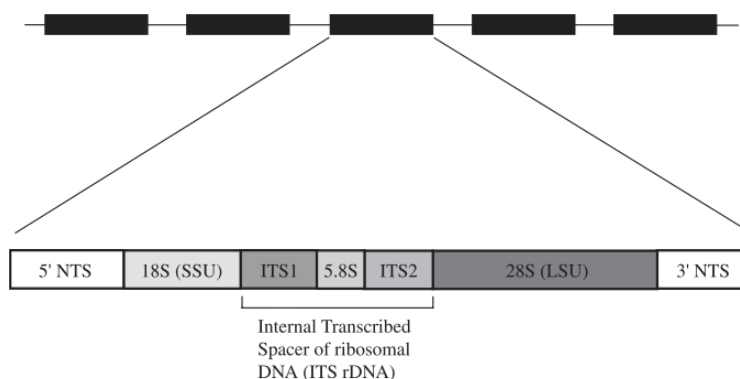
Před vlastní extrakcí DNA bylo potřeba nejprve připravit vzorky z jednotlivých položek. Dostatečné množství materiálu bylo získáno pomocí sterilních nástrojů a přeneseno do 2ml mikrokumavky typu Eppendorf. Bylo nutné pracovat pod binolupou (LEICA S9E). Pro snížení rizika kontaminace epifytickými řasami byla stélka nejprve vizuálně zhodnocena a poté lehce otřena ubrouskem navlhčeným ethanolem. Z některých položek bylo získáno více izolátů, a to

zejména z těch, kde byly odebírány i vzorky pro metabarcoding a bylo důležité sekvence pro porovnání získat. Izolace DNA byla provedena pomocí cetyltrimethylamoniumbromidu (CTAB), podle následujícího postupu, který vychází z protokolu Cubera et al. (1999) optimalizovaného pro lichenizované i nelichenizované houby:

1. Materiál byl rozdrčen pomocí 2-3 wolfram-karbidových kuliček v mlýnku na drcení rostlinného materiálu (Retsch MM200) cca 3 min při 30 000 rpm. Některé vzorky (zejména ty s menším množstvím materiálu) byly ještě před samotným drcením ponořeny cca 10 min v tekutém dusíku pro lepší dezintegraci buněčných stěn.
2. K rozdrčenému materiálu bylo přidáno 700 μ l roztoku CTAB a na špičku špachtličky prášku polyvinylpyrrolidonu (PVP). Následně se vzorky nechaly inkubovat na termobloku při 60 °C a 1 200 rpm po dobu 30 min.
3. Po inkubaci bylo do každé zkumavky přidáno 500 μ l roztoku chloroformu:isoamylalkoholu (24:1). Celý obsah zkumavky byl protřepán a ponechán cca 5 min v klidu. Poté byly vzorky centrifugovány 6 min při 13 200 rpm v pokojové teplotě.
4. Supernatant byl pomocí automatické pipety opatrně přesunut do čistých 1,5ml zkumavek s 500 μ l vychlazeného izopropanolu (skladovaného při -20 °C). Spodní fáze s nepotřebným obsahem byla řádně zlikvidována podle pravidel laboratoře. Obsah zkumavek byl opět protřepán a ponechán minimálně 30 min v -20 °C.
5. Po uplynulé době byly vzorky opět v pokojové teplotě 3 min centrifugovány při 13 200 rpm. Supernatant byl slit do odpadu a ve zkumavkách zbyl drobný pelet s vysráženou DNA.
6. Pelet byl promyt nejprve přidáním 400 μ l vychlazeného 96% ethanolu a poté inkubován 15 min na termobloku při 37 °C a 1 200 rpm. Následně byl opět centrifugován 3 min při 13 200 rpm. Supernatant byl opět vylit do odpadní nádoby a pelet promyt tentokrát 200 μ l vychlazeného 70% ethanolu. Zkumavky byly ponechány stát cca 5 min v klidu a poté opět centrifugovány (3 min při 13 200 rpm). Supernatant byl opět vylit a zkumavky byly ponechány otevřené v digestoři, aby zcela vyschly (cca 30 min).
7. Vysušený pelet byl rozpuštěn ve 100 μ l TE pufru a poté inkubován 30 min na termobloku při 37 °C a 600 rpm. Nakonec byly vzorky krátce promíchány na vortexu. DNA byla uchovávána v mrazáku při -20 °C.

3.3 PCR reakce a sekvenování DNA

Pro identifikaci mykobiontů a fotobiontů na úrovni rodu až druhu byly vybrány vhodné molekulární markery, které se běžně používají v moderní fylogenetice. Internal transcribed



Obrázek 3: Postavení úseků 18S a ITS rDNA v eukaryotickém genomu (Nolan & Cribb 2005).

spacer (ITS) je nekódující část jaderné DNA ležící mezi geny, které kódují malou a velkou ribosomální podjednotku (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Skládá se ze tří částí ITS1, 5,8S a ITS2, přičemž 5,8S je součástí velké ribosomální podjednotky, zatímco ITS1 a ITS2 jsou při transkripci vystřižené. U fotobiontů byl zvolen ještě úsek 18S kódující malou ribosomální podjednotku (SSU rDNA).

Vybrané úseky DNA byly amplifikovány pomocí specifických primerů (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) metodou Polymerázové řetězové reakce (PCR, anglicky *polymerase chain reaction*).

Tabulka 1: Přehled použitých primerů; F = forward, přední primer; R = reverse, zadní primer

název	úsek	specifita	orientace	sekvence	zdroj
ITS4	ITS	univerzální	R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	(White et al. 1990)
ITS1F	ITS	Ascomycota	F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	(Gardes & Bruns 1993)
KlebsF	ITS	Zelené řasy	F	GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG	(Škaloud & Rindi 2013)
ZelenýF1	ITS	Zelené řasy	F	CCGCCCGTCGCTCCTACCGA	Škaloud nepublik.
268rev	LSU	Univerzální pro rostliny (Zygnematophyceae)	R	GCATTCCTCAACAACCCGAC	(Kuzoff et al. 1998)
18S-Ulvo-F	18S	Ulvophyceae	F	CCATGCATGTCTAAGTA	(Černajová et al. 2022)
18S-Ulvo-R	18S	Ulvophyceae	R	ACCTTGTTACGACTTCWCCT	(Černajová et al. 2022)

Pro získání úseku ITS mykobionta byla použita kombinace primerů ITS1F a ITS4. Pro fotobionta byla nejčastější kombinace KlebsF + ITS4, případně KlebsF + 268rev

a v ojedinělých případech ZelenýF1 + 268rev. Úsek 18S byl získán pomocí primerů 18S-Ulvo-F a 18S-Ulvo-R. Obsah reakční směsi jedné PCR reakce je uveden v Tabulka 2.

Koncentrace DNA jednotlivých vzorků byla měřena na NanoDropu 1000 (Thermo Scientific) a pohybovala se od cca 5 do 70 ng/μl. Při neúspěšné PCR reakci a příliš vysokých koncentracích DNA byla DNA zředěna destilovanou vodou na 0,5-1 ng/μl. Naopak u velmi nízkých koncentrací byla DNA zahuštěna pomocí vakuového koncentrátoru SpeedVac.

Tabulka 2: Složení PCR reakce pro fotobionta i mykobionta

	FOTOBIONT	MYKOBIONT
Voda (ddH₂O)	13,2 μl	14,2 μl
Pufř MyTaq (Bioline)	4 μl	4 μl
Primer F (25 pmol/μl)	0,3 μl	0,3 μl
Primer R (25 pmol/μl)	0,3 μl	0,3 μl
Polymeráza MyTaq (Bioline)	0,2 μl	0,2 μl
DNA	2 μl	1 μl
Celkový objem reakce	20 μl	20 μl

PCR reakce probíhala v termocycleru Eppendorf Mastercycler pro a používané cykly jsou uvedeny v Tabulka 3. U některých vzorků bylo třeba zvýšit specificitu nasedání primerů zvýšením teploty v této fázi cyklu či navýšit celkový počet cyklů pro zvětšení výsledného množství DNA.

Tabulka 3: Použité cykly PCR reakce pro mykobionta i fotobionta

	Mykobiont (ITS)	Fotobiont (ITS)	Fotobiont (18S)
Iniciální denaturace	95 °C 2 min	95 °C 2 min	95 °C 1 min
Denaturace	95 °C 30 s	95 °C 30 s	95 °C 45 s
Nasedání primerů	54 °C/59 °C 30 s	58 °C/62 °C 30 s	52 °C 40 s
Elongace	72 °C 30 s	72 °C 45 s	72 °C 3 min
Počet cyklů	30/38	30/35	35
Závěrečná elongace	72 °C 5 min	72 °C 5 min	72 °C 5 min

Výsledek PCR reakce byl zkontrolován pomocí elektroforézy. 2 μl PCR produktu byly naneseny na 1% TAE agarózový gel a DNA byla značena ethidium bromidem a vizualizována pomocí UV záření. Přibližná délka DNA byla odhadnuta pomocí žebříčku NZYDNA Ladder

VI (50-1500 bp), VII (100-3000 bp) a O'GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus (100-3000 bp). Pokud bylo z jednoho vzorku získáno více různých úseků DNA (2 či více proužků viditelných na gelu), bylo nutné PCR reakci zopakovat a vyvarovat se případných kontaminací, nebo vzorek zcela vyloučit či od sebe oba úseky dostatečně dobře rozdělit pomocí elektroforézy v 1,8% TBE agarózovém gelu, vyříznout skalpelem pod UV světlem a přečistit pomocí MinElute gel extraction kitu dle návodu. PCR produkty obsahující jen jeden fragment DNA byly přečištěny pomocí paramagnetických kuliček SPRI AMPure XP (Beckman Coulter). Koncentrace přečištěné DNA byla změřena pomocí nanodropu a v případě potřeby naředěna na cca 20 ng/μl. Vzorky byly spolu s příslušnými primery odeslány k sekvenaci do firmy Macrogen Europe (Meibergdreef 39, 1105AZ Amsterdam, Nizozemsko).

Sekvence DNA proběhla pomocí Sangerovy metody sekvenování a kvalita jednotlivých sekvencí byla zkontrolována v programu SeqAssem ver. 09/2004 (Hepperle 2004). V témže programu došlo i ke spojení úseků 18S rDNA, které bylo nutné kvůli své délce osekvenovat pomocí obou primerů a následně spojit dohromady.

3.4 Tvorba alignmentu

Získané sekvence byly identifikovány pomocí algoritmu BLAST (Boratyn et al. 2013), který srovnává sekvence s již známými sekvencemi dostupnými v databázi GenBank. Do alignmentu byly kromě vlastních sekvencí (ve formátu FASTA) přidány také nejpodobnější sekvence z GenBanku (Clark et al. 2016). Pro každou taxonomickou skupinu a daný úsek DNA byl vytvořen zvlášť jeden alignment. Alignments byly vytvořeny v programu MAFFT ver. 7 (Kato et al. 2019) s použitím iterační metody zpřesňování G-INS-i a dále upravovány v programu MEGA7 (Kumar et al. 2016). Bylo třeba sekvence znovu ručně zkontrolovat a vyvarovat se uměle zvýšené variability, vzniklé chybou při sekvenování.

Pro následné fylogenetické analýzy byly z výsledného alignmentu odstraněny introny a dále pozice, ve kterých měla většina sekvencí mezery. Z důvodu často chybějících dat byl odstraněn také začátek a konec alignmentu. Pozice, které byly zarovnané nejasně, byly odstraněny pomocí programu GBLOCKS v. 0.91b (Castresana 2000).

Ze všech získaných sekvencí mykobiontů nebylo možné vytvořit jeden alignment, proto byly na základě ITS rDNA vytvořeny alignmenty tři, a to pro skupiny *Hydropunctaria*, *Turgidosculum* a *Wahlenbergiella*. U sekvencí vzorků 133, 134 a 137 bylo nutné části sekvence odstranit, protože nebylo možné je s ničím srovnat. V BLASTu vycházel rozsah pokrytí (Query coverage) jen na 39 % a 46 %. Co se týče fotobiontů, pro každou skupinu (Kornmanniaceae a

Ulotrichales) byly vytvořeny 2 alignmenty, první na základě ITS rDNA a druhý na základě 18S rDNA. Sekvence a alignmenty jsou k dispozici na vyžádání u autorky nebo u školitele.

3.5 Tvorba fylogenetického stromu

Substituční modely pro jednotlivé fylogenetické stromy byly vypočítány v programu JModelTest v. 2.1.4. a 2.1.6 (Darriba et al. 2012) pomocí Bayesovského informačního kritéria (BIC). Úsek ITS bylo třeba rozdělit na tři části, protože v každé části probíhá evoluce jinou rychlostí. Pro mykobionty jsou modely uvedeny v Tabulka 4 a pro fotobionty v Tabulka 5.

Tabulka 4: Substituční modely mykobiotů

Taxon	<i>Hydropunctaria</i>			<i>Turgidosculum</i>			<i>Wahlengeriella</i>		
Úsek DNA	ITS1	5,8S	ITS2	ITS1	5,8S	ITS2	ITS1	5,8S	ITS2
Substituční model	TPM1uf+G	K80+I	HKY+I	TrN+G	K80	TrN+I	HKY+G	TPM2+G	TrN+I

Tabulka 5: Substituční modely fotobiontů

Taxon	<i>Kornmanniaceae</i>				Ulotrichales			
Úsek DNA	18S	ITS1	5,8S	ITS2	18S	ITS1	5,8S	ITS2
Substituční model	SYM+I+G	K80+G	K80+I	K80+G	K80+I+G	SYM+I+G	K80+I	SYM+G

Fylogenetické stromy byly nalezeny pomocí metody maximální věrohodnosti (ML, Maximum Likelihood) a Bayesovské metody. Do analýz byly použity pouze alignmenty s unikátními sekvencemi. ML analýza proběhla v programu RAxML v. 8.2.12 (Stamatakis 2014) se substitučním modelem GTR a 1000 bootstrapovými replikacemi pro mykobionty a GTR + Γ + I substitučním modelem a 100 bootstrapovými replikacemi pro fotobionty.

Bayesovská analýza proběhla v programu MrBayes v. 3.2.7a (Ronquist et al. 2012) se substitučními modely uvedenými v Tabulkách 4 a 5. Byly použity dva paralelní MCMC (Markov Chain Monte Carlo) chody, každý se třemi horkými a jedním studeným řetězcem. Konvergence běhů byla vyhodnocena na základě SDSF (standard deviation of split frequencies) a prvních 25 % stromů bylo vyřazeno jako burn-in. Pro strom skupiny *Hydropunctaria* běžela analýza po 15 milionů generací (SDSF = 0,002405), pro *Turgidosculum* po 5 mil. generací (SDSF = 0,001368) a pro *Wahlenbergiella* také 5 mil. generací (SDSF = 0,000867). PSRF (potential scale reduction factor) byl ve všech případech 1. U fotobiontů běžela analýza po dobu 5 mil. generací.

Větvení bylo statisticky podpořeno bootstrapy ML analýzy a posteriorními pravděpodobnostmi uzlů (Bayesovská analýza). Fylogenetické stromy byly graficky

zpracovány v programech FigTree v. 1.4.4. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) a Adobe Illustrator CS3 v 13.0.1.

3.6 Illumina metabarcoding

Pro Illumina metabarcoding bylo odebráno celkem sedm vzorků eDNA (1, 2, 7, 8, 11, 14 a 16; Přílohy 8.1 Lokality metabarcodingu a 8.4 Přehledová tabulka). Místo pro seškrab vzorků bylo vybíráno vždy co nejbližše studovaným lišejníkům a sebraným položkám, avšak bez viditelných nárostů stélek lišejníků či jiných organismů. Odběr probíhal pomocí předem vysterilizovaných nástrojů.

Vzorky byly uchovávány v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Izolace DNA byla provedena pomocí kitu Fast DNATM SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) dle návodu. Eluce proběhla ve $100\text{ }\mu\text{l}$ vody. ITS2 rDNA amplikony pro Illumina MiSeq sekvenování byly získány pomocí barcodových primerů 5.8F-Chlorophyta (5'-GAA TTC CGT GAA CCA TCG AAT CTT T-3') a ITS4 (Vančurová et al. 2020). PCR reakce probíhala ve 35 cyklech. Každá reakce obsahovala $10\text{ }\mu\text{l}$ Q5 High-Fidelity DNA polymerázy (BioLabs Inc.), $5\text{ }\mu\text{l}$ ddH₂O, $1,5\text{ }\mu\text{l}$ každého primeru a $2\text{ }\mu\text{l}$ DNA (celkový objem byl $20\text{ }\mu\text{l}$). Každý vzorek probíhal ve třech opakováních včetně tří negativních kontrol. Podmínky PCR reakce byly: Iniciální denaturace 30 s při $98\text{ }^{\circ}\text{C}$, denaturace 10 s při $98\text{ }^{\circ}\text{C}$, amplifikace (nasedání primerů) 45 s při $52\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 min elongace při $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ a závěrečná elongace 2 min při $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. PCR produkty byly přečištěny pomocí paramagnetických kuliček SPRI AMPure XP (Beckman Coulter) a následně ve stejných koncentracích sloučeny do jednoho vzorku. Příprava knihovny a sekvenování proběhlo ve firmě Genesupport SA (Planles-Ouates, Švýcarsko).

Kontrola kvality získaných sekvencí byla provedena v program FastQC v. 0.11.8 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Následně byly sekvence zpracovány dle metodiky publikované v Bálint et al. (2014), včetně filtrování nekvalitních sekvencí, sloučení párových sekvencí, odstraňování artefaktů primerů, odlišení vzorků dle barcodů, reorientace sekvencí na 5'-3', demultiplexing, dereplikace, shlukování OTU a filtrování chimér. Na rozdíl od metodiky podle Bálinta et al. (2014) byly OTU shlukovány pomocí metody swarm v2 (Mahé et al. 2015), přičemž denoising byl nastaven na $d=3$. Do dalších analýz vstupovaly pouze ty OTU, které byly nalezeny alespoň ve 100 kopiích a alespoň ve dvou ze tří replikátů.

Získané metabarcodové sekvence byly spolu s nejbližšími BLAST sekvencemi zarovnány do alignmentu a metodou ML v programu RAxML v. 8.2.12 (Stamatakis 2014) byl stejně, jako je uvedeno výše, vytvořen fylogenetický strom. Na základě této analýzy byly

sekvence přiřazeny k jednotlivým rodům zelených řas. Pro porovnání metabarcodových sekvencí se sekvencemi získanými ze stélek lišejníků byly vytvořeny separátní fylogenetické stromy dvou dominantních rodů fotobiontů (Obrázek 18 a 19). Tyto stromy vznikly na základě datasetu, ze kterého byly odfiltrovány chimerické sekvence detekované programem UCHIME (Edgar 2016; Edgar et al. 2011) a vizuální inspekcí alignmentu.

3.7 Zpracování dat

Tabulky a grafy byly vytvořeny v programu Microsoft Excel 365. Graf diverzity lišejníků v závislosti na gradientu salinity (Obrázek 22) byl vytvořen na základě počtu druhů vydělených celkovým počtem záznamů z jednotlivých oblastí podle salinity.

Mapy na Obrázcích 23 a 24 byly vytvořeny v programu R 4.1.0 (R Core Team 2022) s pomocí knihoven *rgdal*, *raster*, *scales*, *GISTools* a *RColorBrewer*. Síť vztahů mezi symbionty (Obrázky 20 a 25) byly vytvořeny v programu Gephi 0.9.2 (Bastian et al. 2009) a dále upravovány v programu Adobe Illustrator CS3 v. 13.0.1.

3.8 Izolace a kultivace fotobiontů



Obrázek 4: Řasová vrstva lišejníku *V. ceuthocarpa* po odstranění svrchní korové vrstvy

Izolace fotobiontů probíhala následovně: Nejprve byla stélka očištěna od případných epifytů ubrouskem navlhčeným etanolem. Pomocí binolupy (LEICA S9E) byly přednostně vybírány ty části stélky, které měly relativně čistý povrch. Sterilními nástroji (žiletkou či řezacím nožem) byla odstraněna svrchní korová vrstva lišejníku (Obrázek 4). Řasová vrstva nacházející se pod povrchem byla poté sterilní jehlou z lišejníku vyjmuta a přenesena na Petriho misku s médiem. Miska byla řádně popsána a místa s buňkami či větší vrstvou fotobionta byla označena permanentním fixem.

Řasy byly kultivovány v kultivačním boxu při teplotě 19 °C a intenzitě záření 10–30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nebo v pokojové teplotě za přirozených světelných podmínek. Kultury byly pravidelně sledovány a po cca 2-3 měsících přeočkovány do misek s novým médiem. V případě nejruznějších houbových či bakteriálních kontaminací byla zasažená část média či celá miska odstraněna.

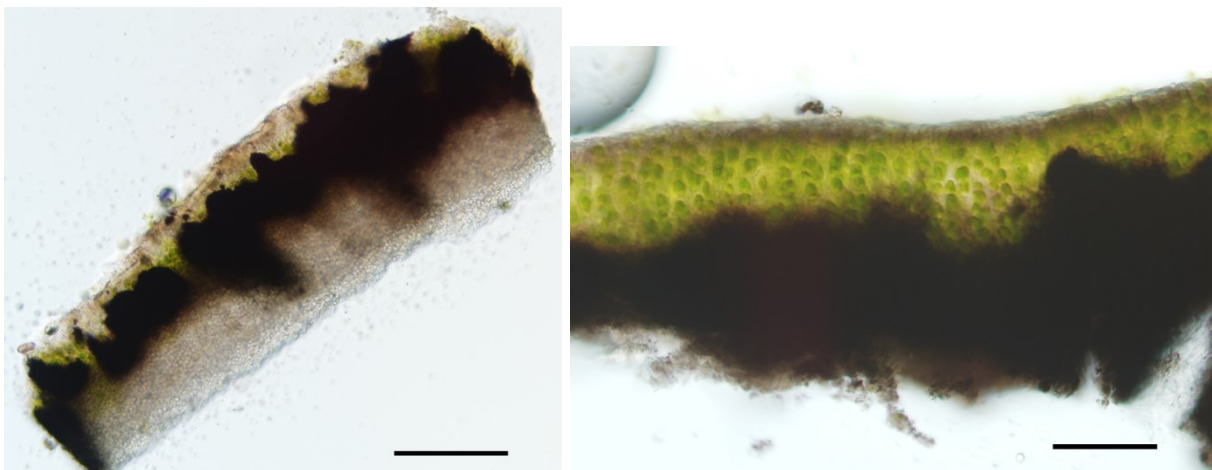
Pro kultivaci byla použita tři různá média: BBM (Bold's Basal Medium, Bischoff & Bold 1963), ASW-agar (Artificial Seawater s agarem, Starr & Zeikus 1993) a ES (West and McBride's Modified ES medium, West & McBride 1999). Kultury byly identifikovány morfolologicky pomocí mikroskopu Olympus BX51 a pomocí DNA (ITS rDNA, izolace a sekvenace viz výše).

4. Výsledky

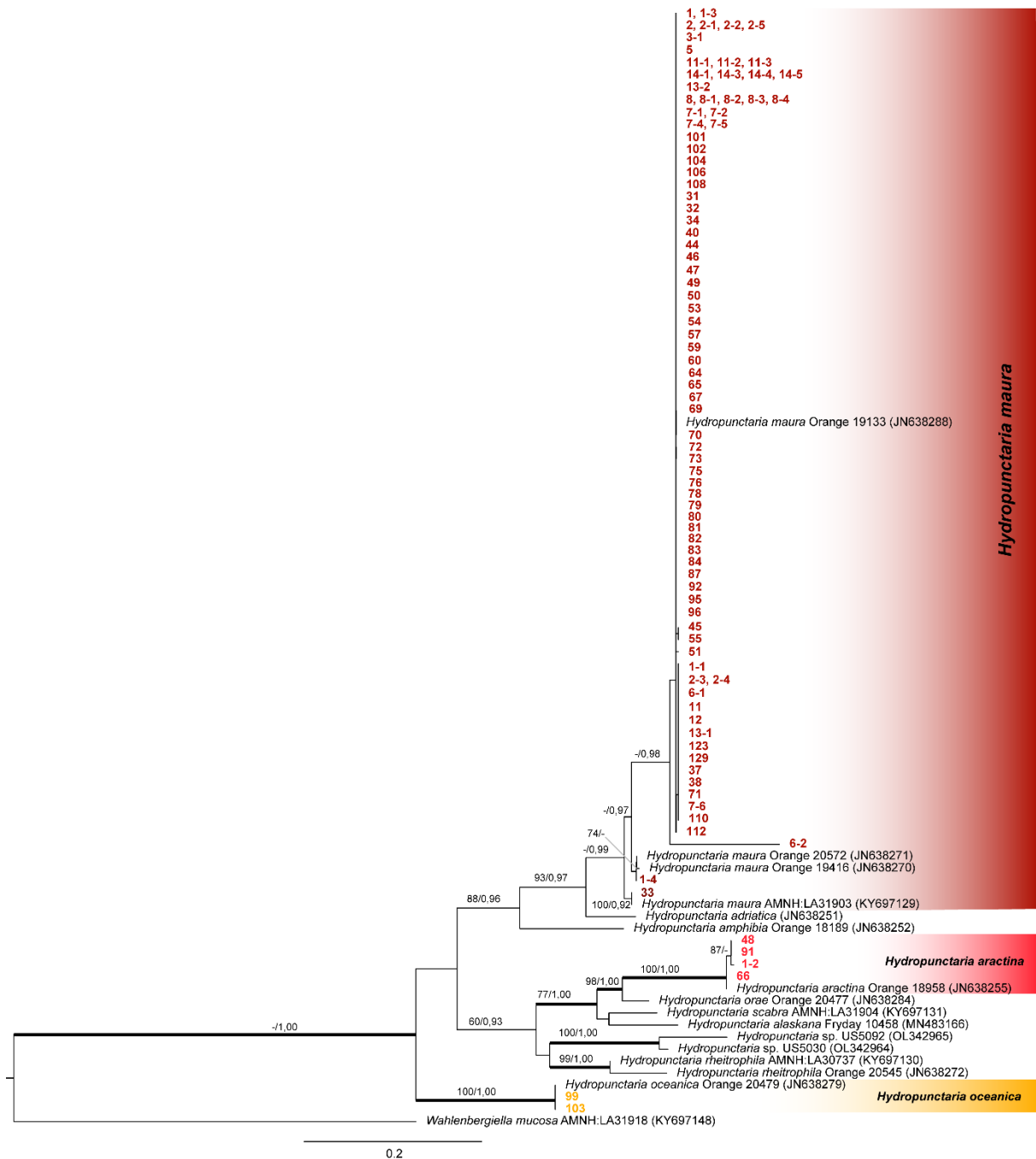
Získáno bylo celkem 130 položek. Z 86 z nich se podařilo získat sekvenci mykobionta a ze 75 z nich fotobionta. Sekvence obou symbiotických partnerů se podařilo získat ze 72 položek. Přehled všech určených druhů včetně informací o položkách, ze kterých se podařilo získat DNA je v Příloze 8.4 Přehledová tabulka.

4.1 Diverzita mykobiontů

Všechny studované lišejníky patří do čeledi Verrucariaceae (Eurotiomycetes, Ascomycota), a to do třech hlavních linií – *Hydropunctaria*, *Turgidosculum* a *Wahlenbergiella*. Z rodu *Hydropunctaria* byly nalezeny tři druhy: *Hydropunctaria maura*, *H. aractina* a *H. oceanica* (Obrázek 5 a 6). Největší podíl tvoří *H. maura*. Z některých položek bylo získáno více izolátů, jejichž sekvence se zcela shodují (1, 1-3; 2, 2-1, 2-2, 2-5; 11-1, 11-2, 11-3; 14-1, 14-3, 14-4, 14-5; 8, 8-1, 8-2, 8-3, 8-4; 7-1, 7-2, 7-4, 7-5; 2-3, 2-4) nebo naopak neshodují (2, 2-1, 2-2, 2-5 x 2-3, 2-4; 11 x 11-1, 11-2, 11-3; 13-1 x 13-2; 7-6 x 7-4, 7-5, 7-2, 7-1), ale stále se jedná o stejné druhy. To ovšem neplatí pro položku 1, ze které bylo získáno více různých mykobiontů (1-2 je *H. aractina*, 1 a 1-3 *H. maura* a 1-1 a 1-4 jiné genotypy *H. maura*).



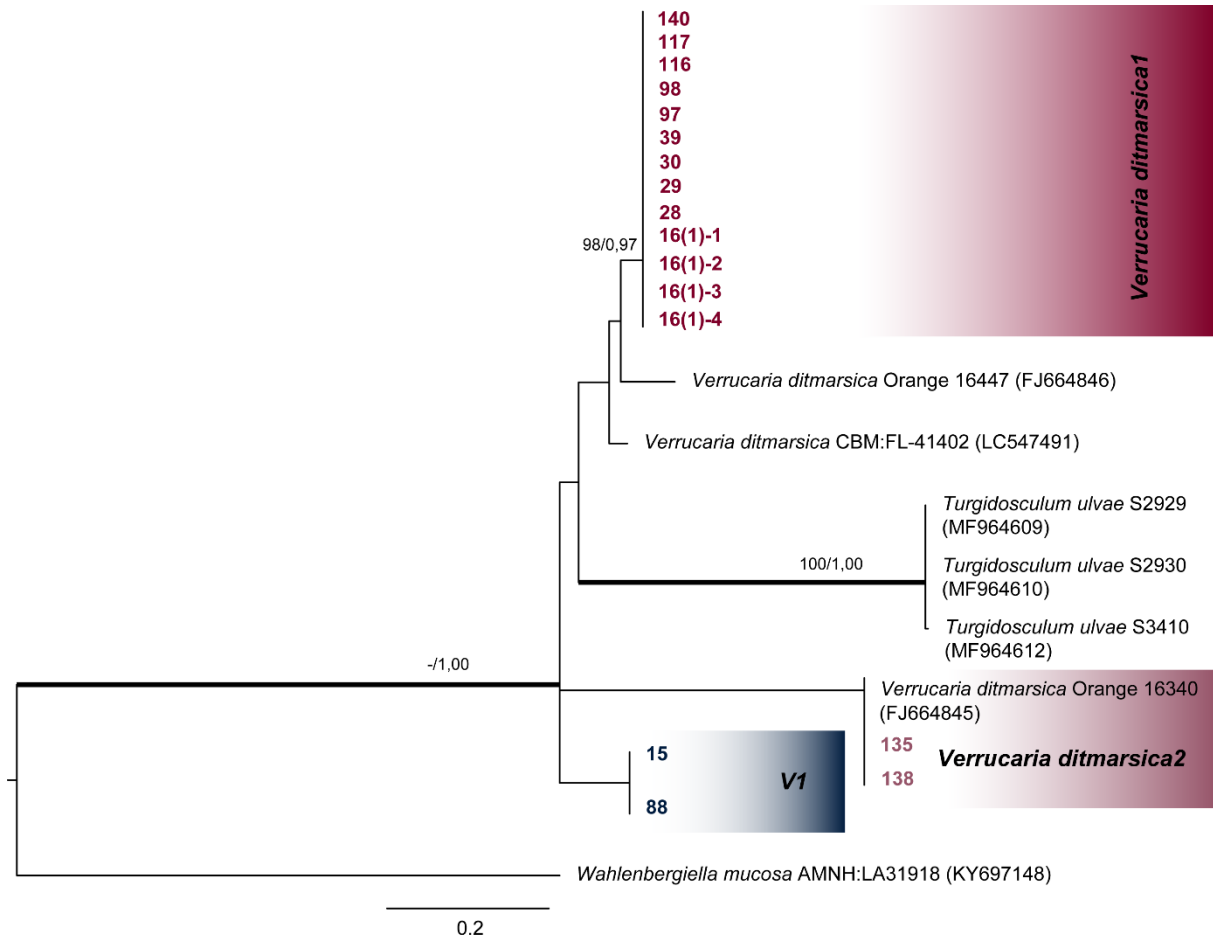
Obrázek 5: řez lišejníky *H. aractina* (vlevo; položka č. 91), měřítko = 400 μm a *H. maura* (vpravo; položka č. 87), měřítko = 100 μm ; anatomie stélky: zelená vrstva fotobionta a kůra s tmavými pigmenty; foto Ivana Černajová.



Obrázek 6: Fylogenetický strom rodu *Hydropunctaria* získaný na základě ITS rDNA pomocí metody Maximum Likelihood (ML). Hodnoty na větvích udávají statistickou podporu větvení: bootstrapy ML jsou uvedeny jen od hodnot >60, posteriorní pravděpodobnosti uzlů (PP) od hodnot >0,90. Zvýrazněné jsou větve s plnou podporou PP. U sekvencí z GenBanku jsou uvedeny kódy označující jednotlivé kmeny (pokud byly k dispozici) a v závorce je přístupové číslo z GenBanku. Barevně jsou vyznačené nově získané sekvence.

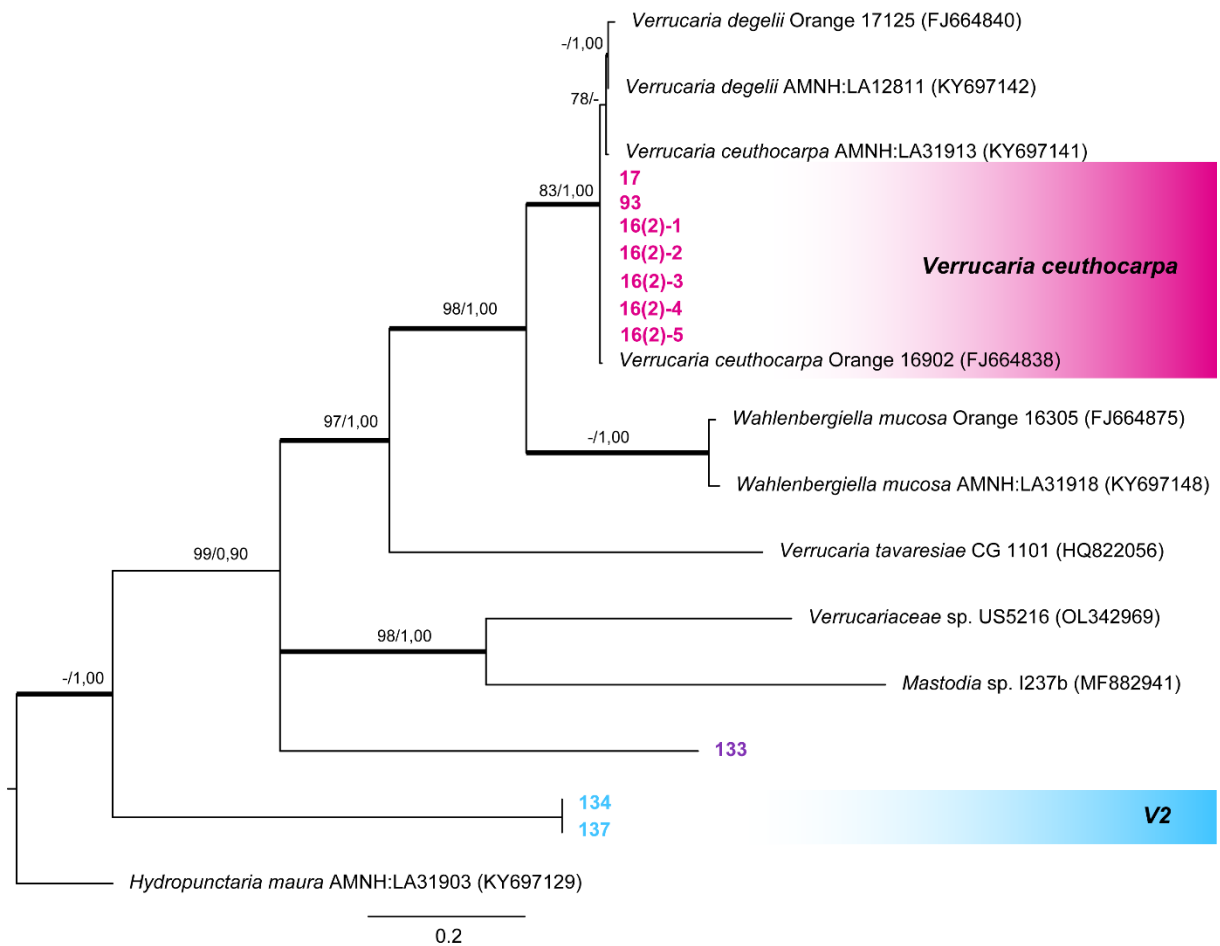
Rod *Verrucaria* zahrnuje ze starší literatury nejvíce popsanych druhů čeledi Verrucariaceae. Přestože se ukázalo, že je rod silně polyfyletický, nebyl ještě zcela dostatečně taxonomicky revidován (Gueidan et al. 2009). Patrné je to i z fylogenetických stromů na Obrázcích 7 a 8. *Verrucaria ditmarsica*, kam spadá 15 získaných sekvencí, zde vytváří dvě

různé vývojové linie (Obrázek 7). Položky 15 a 88 tvoří neznámou samostatně stojící vývojovou linii (V1), ovšem blízko *V. ditmarsica*.

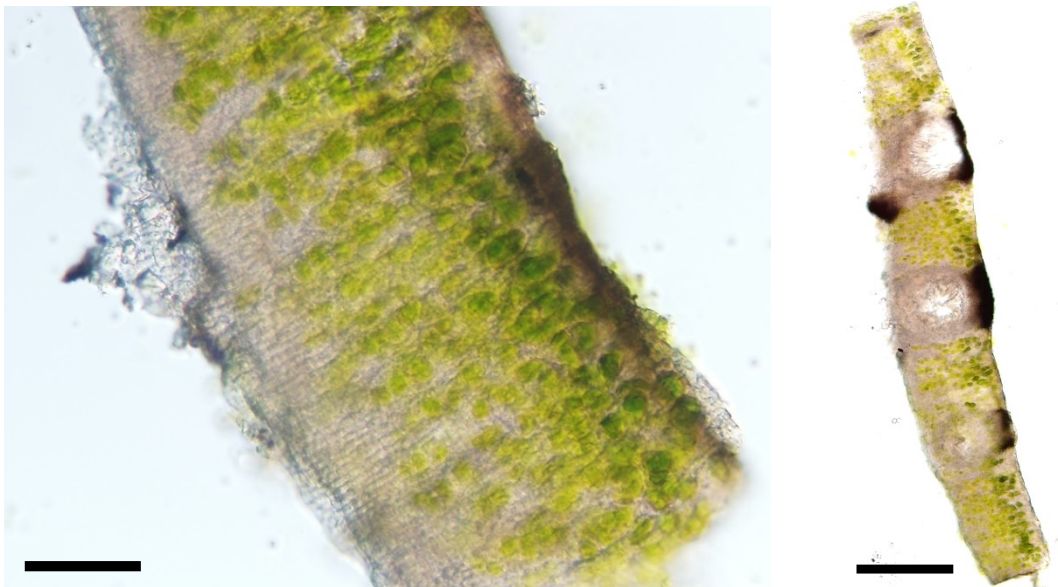


Obrázek 7: Fylogenetický strom skupiny *Turgidosculum* získaný na základě ITS rDNA pomocí metody Maximum Likelihood (ML). Hodnoty na větvích udávají statistickou podporu větvení: bootstrapy ML jsou uvedeny jen od hodnot >60, posteriorní pravděpodobnosti uzlů (PP) od hodnot >0,90. Zvýrazněné jsou větve s plnou podporou PP. U sekvencí z GenBanku jsou uvedeny kódy označující jednotlivé kmeny (pokud byly k dispozici) a v závorce je přístupové číslo z GenBanku. Barevně jsou vyznačeny nově získané sekvence.

Dalším nalezeným mykobiontem je *Verrucaria ceuthocarpa* (Obrázek 8), která byla potvrzena i morfologicky díky typickému upořádání houbových buněk ve sloupcích (Obrázek 9) (Smith et al. 2009). Mykobionti z položek 133, 134 a 137 nemají v GenBanku žádné podobné sekvence a nelze je tedy blíže určit.



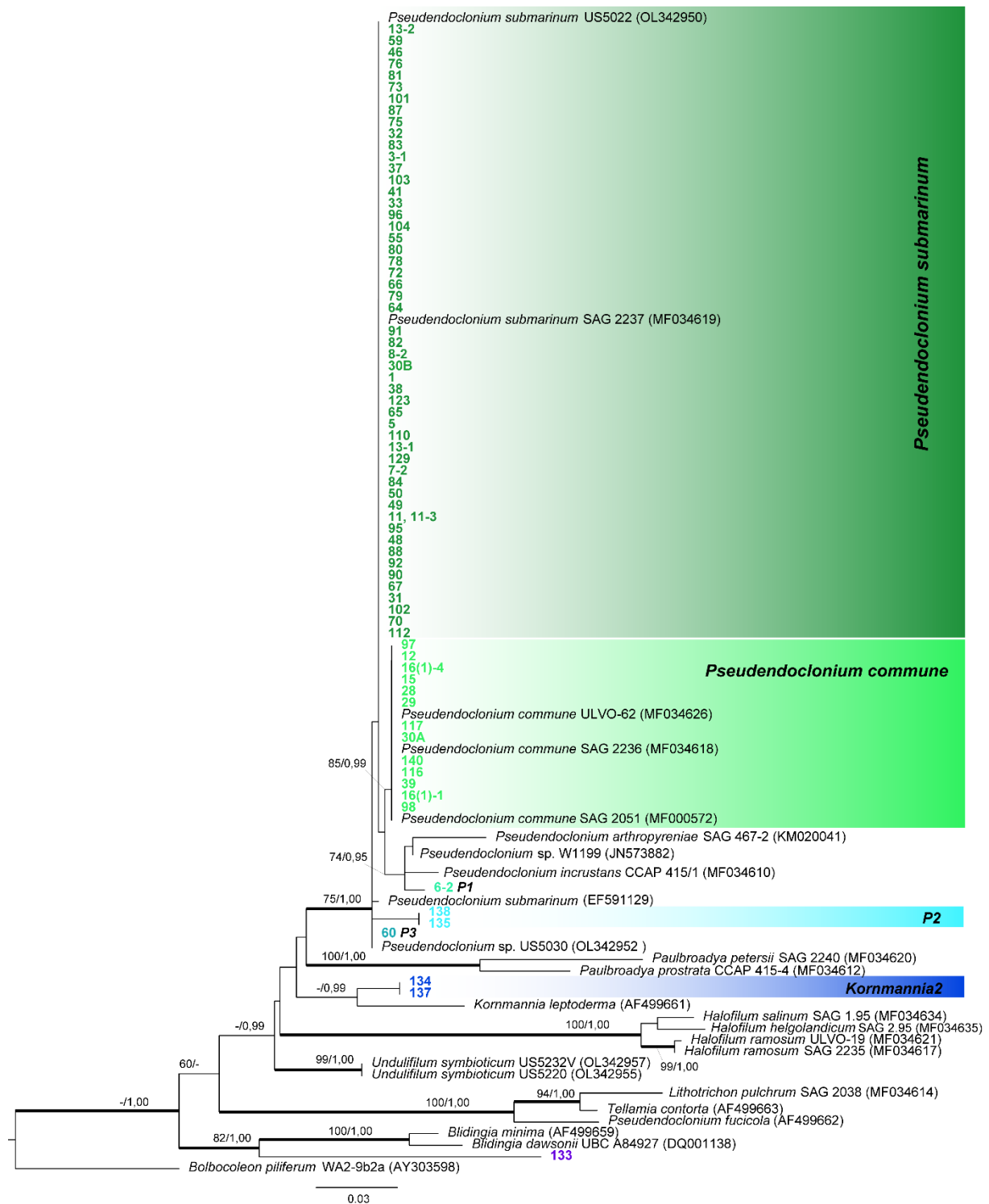
Obrázek 8: Fylogenetický strom skupiny *Wahlenbergiella* získaný na základě ITS rDNA pomocí metody Maximum Likelihood (ML). Hodnoty na větvích udávají statistickou podporu větvení: bootstrapy ML jsou uvedeny jen od hodnot >60, posteriorní pravděpodobnosti uzlů (PP) od hodnot >0,90. Zvýrazněné jsou větve s plnou podporou PP. U sekvencí z GenBanku jsou uvedeny kódy označující jednotlivé kmeny (pokud byly k dispozici) a v závorce je přístupové číslo z GenBanku. Barevně jsou vyznačené nově získané sekvence.



Obrázek 9: Řez lišejníkem *Verrucaria ceuthocarpa* (položka č. 16(2)); foto: Ivana Černajová; měřítko vlevo = 50 µm, měřítko vpravo = 200 µm.

4.2 Diverzita fotobiontů

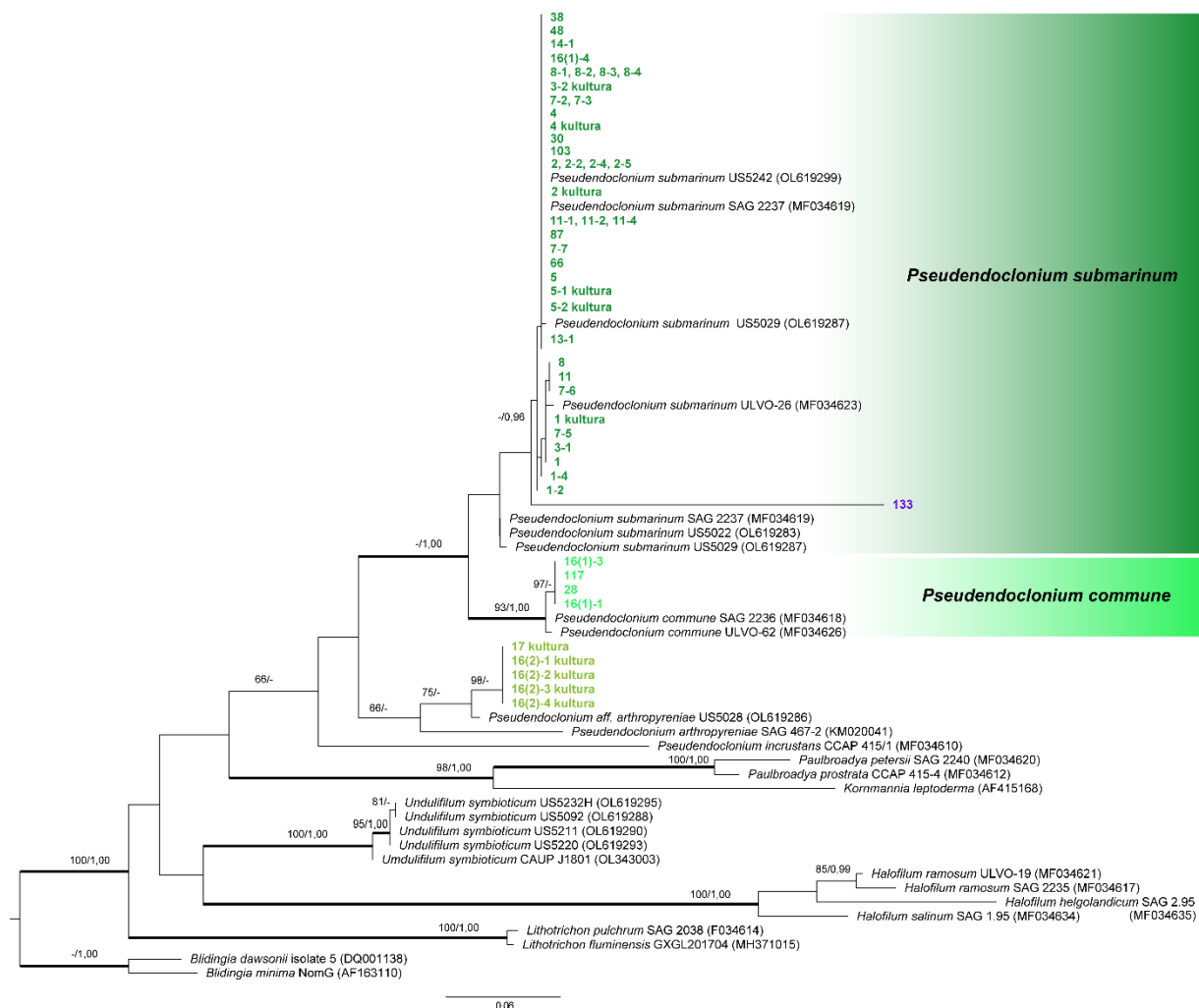
Identifikace fotobiontů proběhla pomocí fylogenetických stromů zkonstruovaných na základě sekvencí genů ITS a 18S rDNA. Většina fotobiontů je určena pomocí genů malé ribosomální



Obrázek 8: Fylogenetický strom čeledi Kornmanniaceae získaný na základě 18S rDNA pomocí metody Maximum Likelihood (ML). Hodnoty na větvích udávají statistickou podporu větvení: bootstrapy ML jsou uvedeny jen od hodnot >60, posteriorní pravděpodobnosti uzlů (PP) od hodnot >0,90. Zvýrazněné jsou větve s plnou podporou PP. U sekvencí z GenBanku jsou uvedeny kódy označující jednotlivé kmeny (pokud byly k dispozici) a v závorce je přístupové číslo z GenBanku. Barevně jsou vyznačeny nově získané sekvence.

podjednotky (18S), nějaké jen pomocí ITS. Z některých položek se podařilo získat oba úseky DNA (položky číslo 28, 30, 38, 48, 66, 87, 103, 117, 133, 1, 3, 5, 8, 7, 11, 13, 16(1), 17). Přestože úsek 18S rDNA není tak variabilní jako ITS, pro rozlišení druhů *Pseudendoclonium submarinum* a *P. commune* se ukázal jako dostatečný.

Všechny získané sekvence fotobiontů patří do třídy Ulvophyceae (Chlorophyta). Většina sekvencí spadá do čeledi Kornmanniaceae, a to do rodu *Pseudendoclonium* (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.). Tím nejčastějším fotobiontem je *Pseudendoclonium submarinum* (více jak 70 % získaných sekvencí). Druhým nejčastějším fotobiontem je *Pseudendoclonium commune*. Byly získány i sekvence, které nemají žádnou shodu se sekvencemi s GenBanku a nelze je proto blíže určit (položky číslo 133, 134 a 137).



Obrázek 9: Fylogenetický strom čeledi Kornmanniaceae získaný na základě ITS rDNA pomocí metody Maximum Likelihood (ML). Hodnoty na větvích udávají statistickou podporu větvení: bootstrapy ML jsou uvedeny jen od hodnot >60, posteriorní pravděpodobnosti uzlů (PP) od hodnot >0,90. Zvýrazněné jsou větve s plnou podporou PP. U sekvencí z GenBanku jsou uvedeny kódy označující jednotlivé kmeny (pokud byly k dispozici) a v závorce je přístupové číslo z GenBanku. Barevně jsou vyznačeny nově získané sekvence. Sekvence získané kultivací fotobiontů jsou označeny jako kultura.

Z některých položek bylo získáno více izolátů, jejichž sekvence se zcela shodují (Obrázek 10, 18S: 11, 11-3; 13-1, 13-2; Obrázek 11, ITS: 8-1, 8-2, 8-3, 8-4; 7-2, 7-3; 2, 2-2, 2-4, 2-5; 11-1, 11-2, 11-4). Jiné sice patří do stejného druhu, ale jejich sekvence nejsou zcela totožné a jde tedy o jiné genotypy (Obrázek 11, ITS: 8 x 8-1, 8-2, 8-3, 8-4; 7-5 x 7-6, 7-7; 11 x 11-1, 11-2, 11-4; 1 x 1-2 x 1-4).

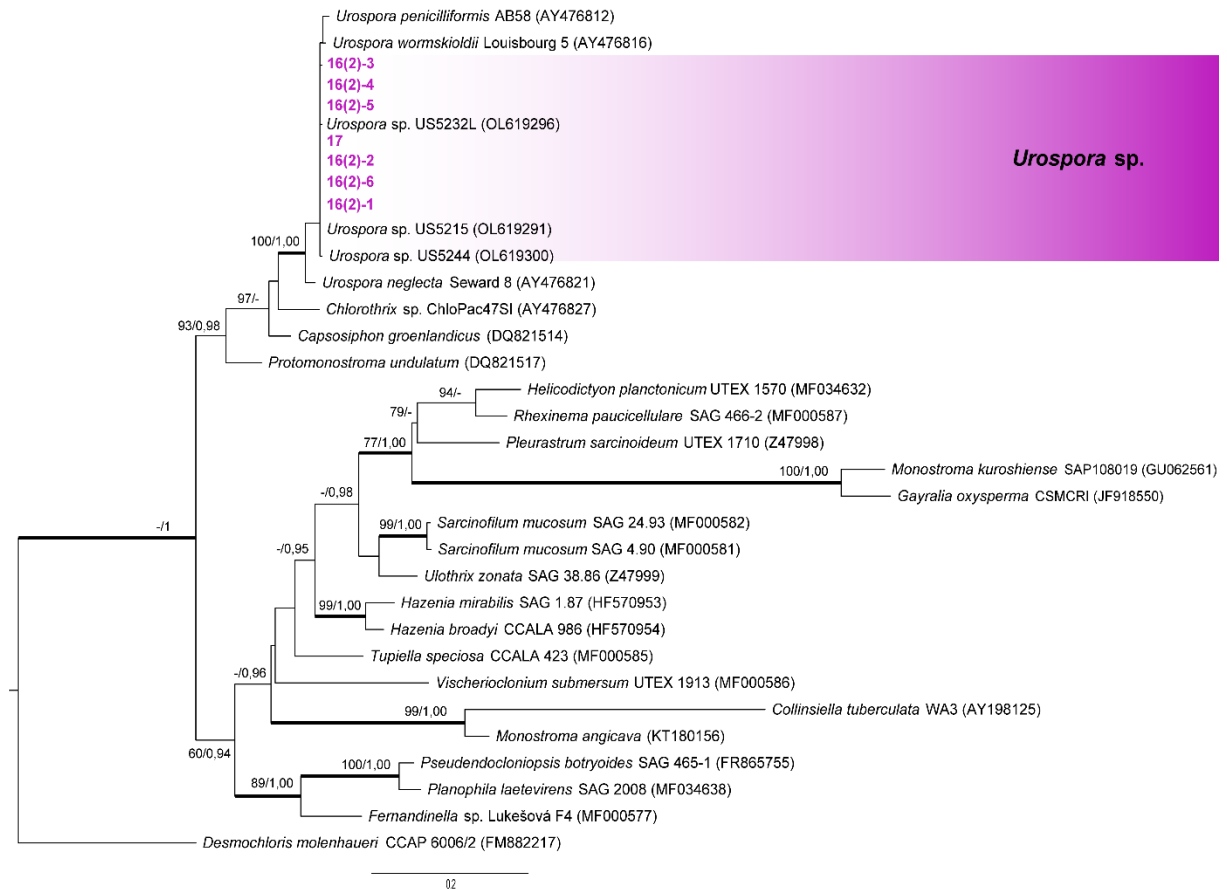
Zvláštním případem je pak položka číslo 30, kde byly z jedné sekvence úseku 18S rDNA získány sekvence rovnou dvě, každá patřící do jiného druhu. Z alignmentu se ukázalo, že existují dvě místa úseku 18S rDNA, která jsou klíčová pro rozlišení dvou druhů rodu *Pseudendoclonium*. Na 610. pozici v alignmentu má *P. submarinum* nukleotid T (thymin), zatímco *P. commune* C (cytosin) a na 1565. pozici C, respektive A (adenin). Ve vzorku 30 se nacházely obě dvě varianty nukleotidů (Obrázek 12), proto byly pro účely analýzy vytvořeny dvě sekvence, každá s jinou variantou nukleotidu (30A a 30B).



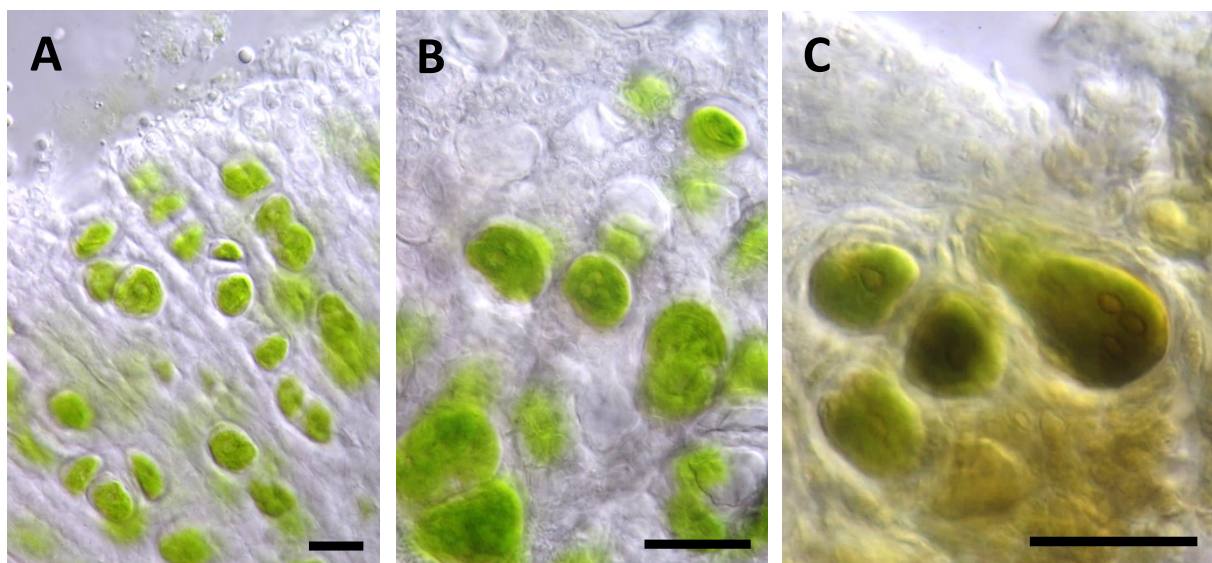
Obrázek 10: Část sekvence 18S rDNA (y – 610. pozice v alignmentu), ve které jsou zachyceny nukleotidy obou fotobiontů lišejníku *Verrucaria ditmarsica* (položka 30).

Z položky 16, která obsahovala dva různé druhy lišejníků, bylo získáno více izolátů. Lišejníky 16(1) spadají do linie *V. ditmarsical* (Obrázek 7; 16(1)-1, 16(1)-2, 16(1)-3 a 16(1)-4). Fotobiontem těchto lišejníků je především *Pseudendoclonium commune*. Vzorek označený jako 16(1)-4 má pravděpodobně dva různé fotobionty, *P. commune* a *P. submarinum* (Obrázek 10 a 11).

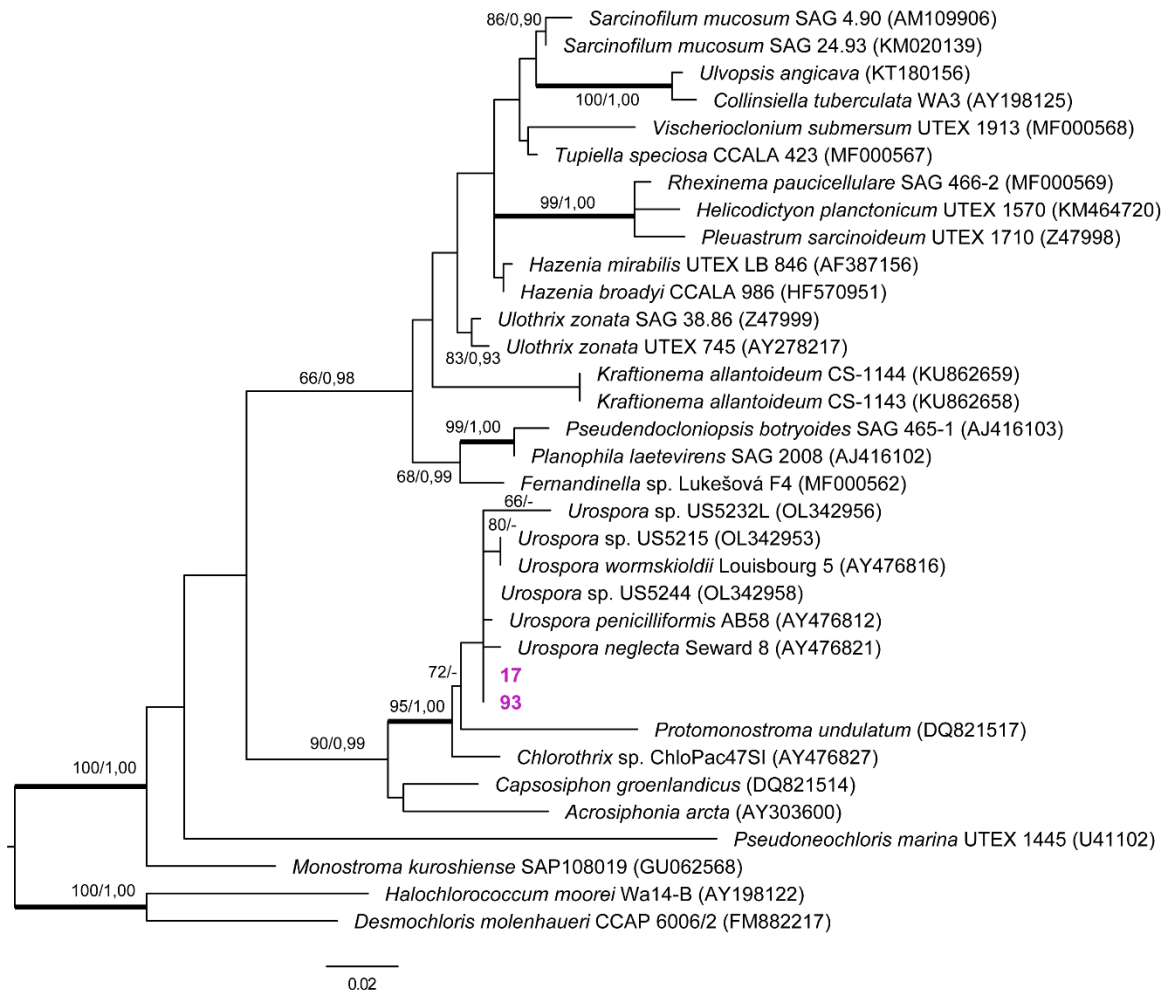
Lišejníky z položky 16(2), identifikované jako *V. ceuthocarpa*, mají pravděpodobně dva různé fotobionty, získané dvěma různými metodami (více kapitola 4.3 Kultivace fotobiontů). Ze stélek lišejníků byla vyizolovaná řasa *Urospora* z řádu Ulotrichales (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Stejného fotobionta pak mají i lišejníky z položek 93 a 17 (Obrázek 13 a 15). Na obrázku 14 jsou vidět detaily fotobionta ve stélce. Oproti rodu *Pseudendoclonium* má *Urospora* v chloroplastu přítomných více pyrenoidů (Škaloud et al. 2018).



Obrázek 11: *Fylogenetický strom řádu Ulotrichales získaný na základě ITS rDNA pomocí metody Maximum Likelihood (ML). Hodnoty na větvích udávají statistickou podporu větvení: bootstrapy ML jsou uvedeny jen od hodnot >60, posteriorní pravděpodobnosti uzlů (PP) od hodnot >0,90. Zvýrazněné jsou větve s plnou podporou PP. U sekvencí z GenBanku jsou uvedeny kódy označující jednotlivé kmeny (pokud byly k dispozici) a v závorce je přístupové číslo z GenBanku. Barevně jsou vyznačené nově získané sekvence.*



Obrázek 14: *Urospora sp. ve stélce lišejníku V. ceuthocarpa (položka č. 16(2)); A – uspořádání buněk ve stélce; B – detail buněk; C – viditelné pyrenoidy obarvené Lugolovým roztokem; měřítko = 20 µm.*



Obrázek 15: Fylogenetický strom řádu Ulotrichales získaný na základě 18S rDNA pomocí metody Maximum Likelihood (ML). Hodnoty na větvích udávají statistickou podporu větvení: bootstrapy ML jsou uvedeny jen od hodnot >60, posteriorní pravděpodobnosti uzlů (PP) od hodnot >0,90. Zvýrazněné jsou větve s plnou podporou PP. U sekvencí z GenBanku jsou uvedeny kódy označující jednotlivé kmeny (pokud byly k dispozici) a v závorce je přístupové číslo z GenBanku. Barevně jsou vyznačené nově získané sekvence.

4.3 Kultivace fotobiontů

Získat kultury fotobiontů se podařilo celkem ze sedmi položek. Z položek 1 (1 kultura), 2 (2 kultura), 3 (3-2 kultura), 4 (4 kultura) a 5 (5-1 kultura a 5-2 kultura) z Bornholmu byla vykultivována řasa *Pseudendoclonium submarinum* (Obrázek 11 a 16). Kromě kultury 3-2 se všechny sekvence přesně shodují s některými z přímých izolátů z lišejníků. Ve všech případech se však jedná o ten samý druh.

Úplně jiná je situace s lišejníky 16(2) (16(2)-1, 16(2)-2, 16(2)-3, 16(2)-4) a 17 ze kterých byl vyizolován neznámý druh rodu *Pseudendoclonium* příbuzný řase *Pseudendoclonium arthropyreniae* (Obrázek 11). Tato řasa nebyla vůbec zachycena z přímé izolace DNA ze stélek těchto lišejníků. Místo toho byla jako fotobiont detekována řasa *Urospora* (Obrázek 13, 14 a 15).



Obrázek 16: *Pseudendoclonium submarinum* z kultury (položka č. 2); měřítko = 20 μ m

4.4 Diverzita volně žijících řas

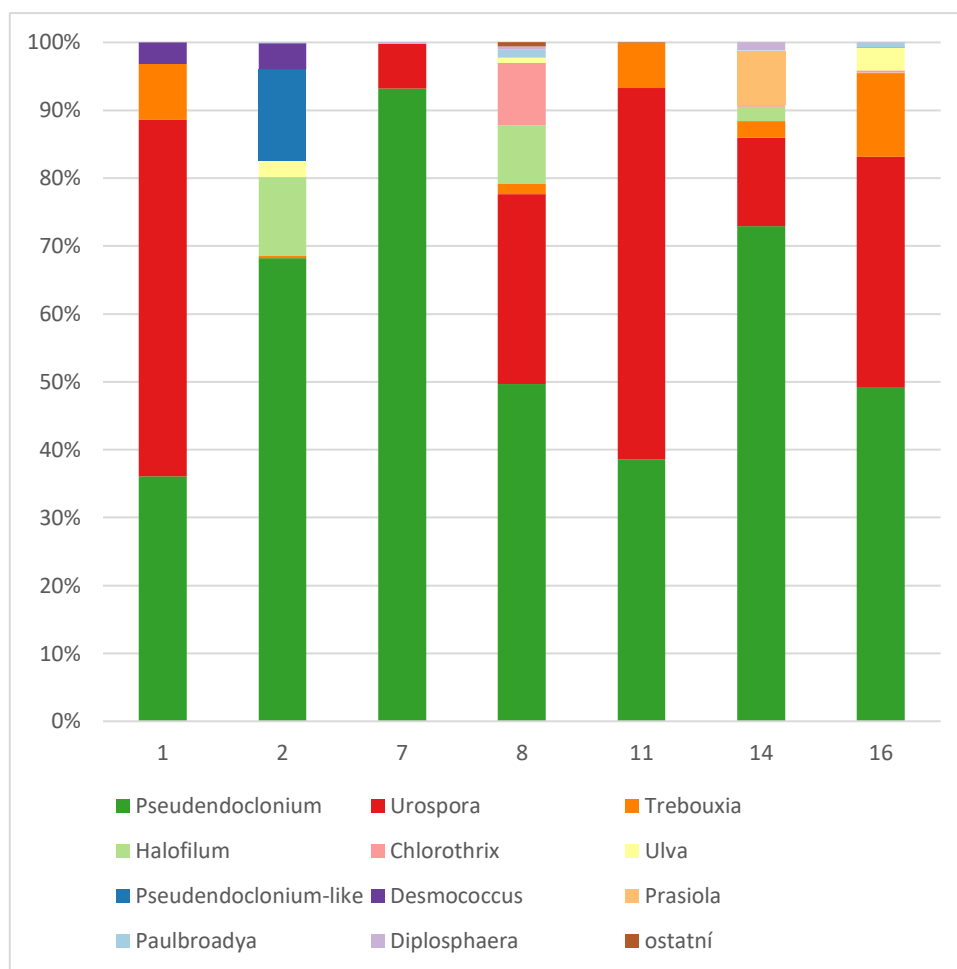
Z dat získaných pomocí Illumina metabarcodingu byly vyfiltrovány sekvence patřící do oddělení Chlorophyta, ze kterých byl vytvořen fylogenetický strom s rozlišením na jednotlivé linie zelených řas, z nichž dominovaly třídy Ulvophyceae a Trebouxiophyceae (Příloha 8.3 Fylogenetický strom metabarcodových sekvencí).

Celkové počty získaných sekvencí rodů z jednotlivých vzorků jsou uvedené v Tabulce 6. Procentuální zastoupení volně žijících řas ze vzorků je vyobrazeno na Obrázku 17. Na většině místech dominují rody *Pseudendoclonium* a *Urospora*. Vzorky 2 a 7 jsou ekologicky nejvíce odlišené s minimem trebouxiophytních řas a řasy *Urospora*.

Nejčastějšími volně žijícími druhy řas jsou *Urospora* sp., *Pseudendoclonium commune* a *Pseudendoclonium submarinum*. Ve vzorku 2 zcela chybí *Urospora* a v 11 je minimum *P. submarinum* (Tabulka 7, kapitola 4.5 Výběr fotobiontů a vztahy mezi partnery).

Tabulka 6: Celkové počty získaných sekvencí rodů z jednotlivých vzorků; modře Ulvophyceae, oranžově Trebouxiophyceae, zeleně Chlorophyceae.

	1	2	7	8	11	14	16
<i>Pseudendoclonium</i>	96641	67603	277287	210019	137666	103666	152289
<i>Urospora</i>	140464	0	19510	117940	194746	18557	105189
<i>Halofilum</i>	0	11450	156	36326	0	2965	276
<i>Chlorothrix</i>	0	17	0	38739	0	340	869
<i>Ulva</i>	0	2385	0	3114	0	74	10514
<i>Pseudendoclonium-like</i>	0	13382	0	0	0	0	0
<i>Paulbroadya</i>	0	102	94	5103	0	84	2286
<i>Capsosiphon</i>	0	0	0	2384	0	0	0
<i>Lithotrichon</i>	0	2316	0	0	0	0	0
<i>Blidingia</i>	0	0	0	341	0	0	0
<i>Hazenia</i>	0	0	92	0	0	0	0
<i>Trebouxia</i>	21861	365	0	6767	23770	3485	38272
<i>Desmococcus</i>	8608	3816	0	0	0	0	48
<i>Prasiola</i>	0	0	0	0	0	11333	0
<i>Diplosphaera</i>	0	0	423	2121	0	1638	20
<i>Chlorella</i>	0	0	245	0	0	0	0
<i>Symbiochloris</i>	0	0	0	158	0	0	0
<i>Chloroidium</i>	0	0	70	0	0	0	0
<i>Apatococcus</i>	0	0	0	0	61	0	0
<i>Chlamydomonas</i>	0	0	0	0	134	0	0



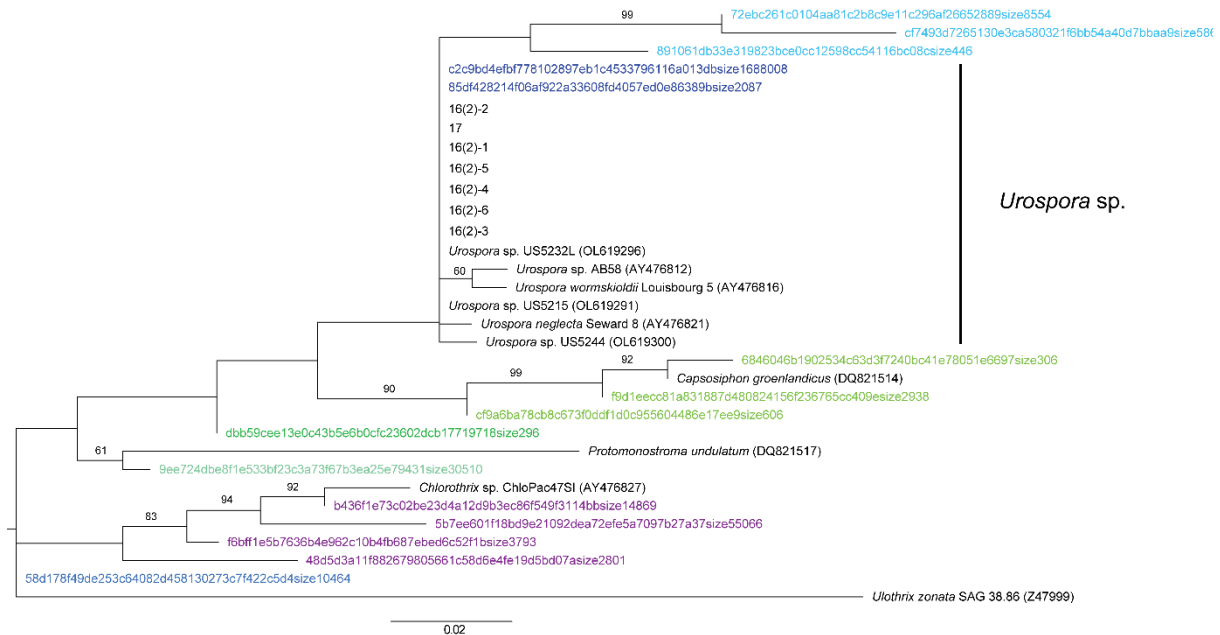
Obrázek 17: Procentuální zastoupení volně žijících řas ze vzorků z blízkosti vybraných položek, získané pomocí Illumina metabarcodingu.

4.5 Výběr fotobiontů a vztahy mezi partnery

Porovnání diverzity volně žijících a endosymbiotických řas poukázalo na přítomnost fotobiontů i ve volně žijícím stavu, a zároveň na přítomnost několika linií, které nebyly jako fotobionti lišejníků odhaleny. V rámci řádu Ulotrichales byly detekovány volně žijící řasy rodu *Urospora* s. str. a dále několik dalších příbuzných řas (Obrázek 18). V rámci rodu *Pseudendoclonium* byly ve volně žijícím stavu nalezeny všechny čtyři linie, do kterých spadají fotobionti lišejníků, a navíc byly nalezeny dvě nové linie, které nemají žádné podobné sekvence v GenBanku a s velkou pravděpodobností se tak jedná o dosud geneticky necharakterizované linie řas (Obrázek 19).

Srovnání počtů druhů řas nalezených jako fotobionti ve stélkách lišejníků s volně dostupnými řasami v okolí, a tudíž potenciálními symbiotickými partnery (Tabulka 7), naznačuje vysokou specificitu partnerů. Z položky 11 má lišejník *H. maura*, stejně jako ve většině jiných vzorků, svého fotobionta *P. submarinum*, přestože se zde tato řasa volně skoro

nevyskytuje. Položka 16 je druhově bohatá, jsou zde přítomní dva různé mykobionti a každý má jiné fotobionty, přestože si vybírali se stejného „poolu“ řas.

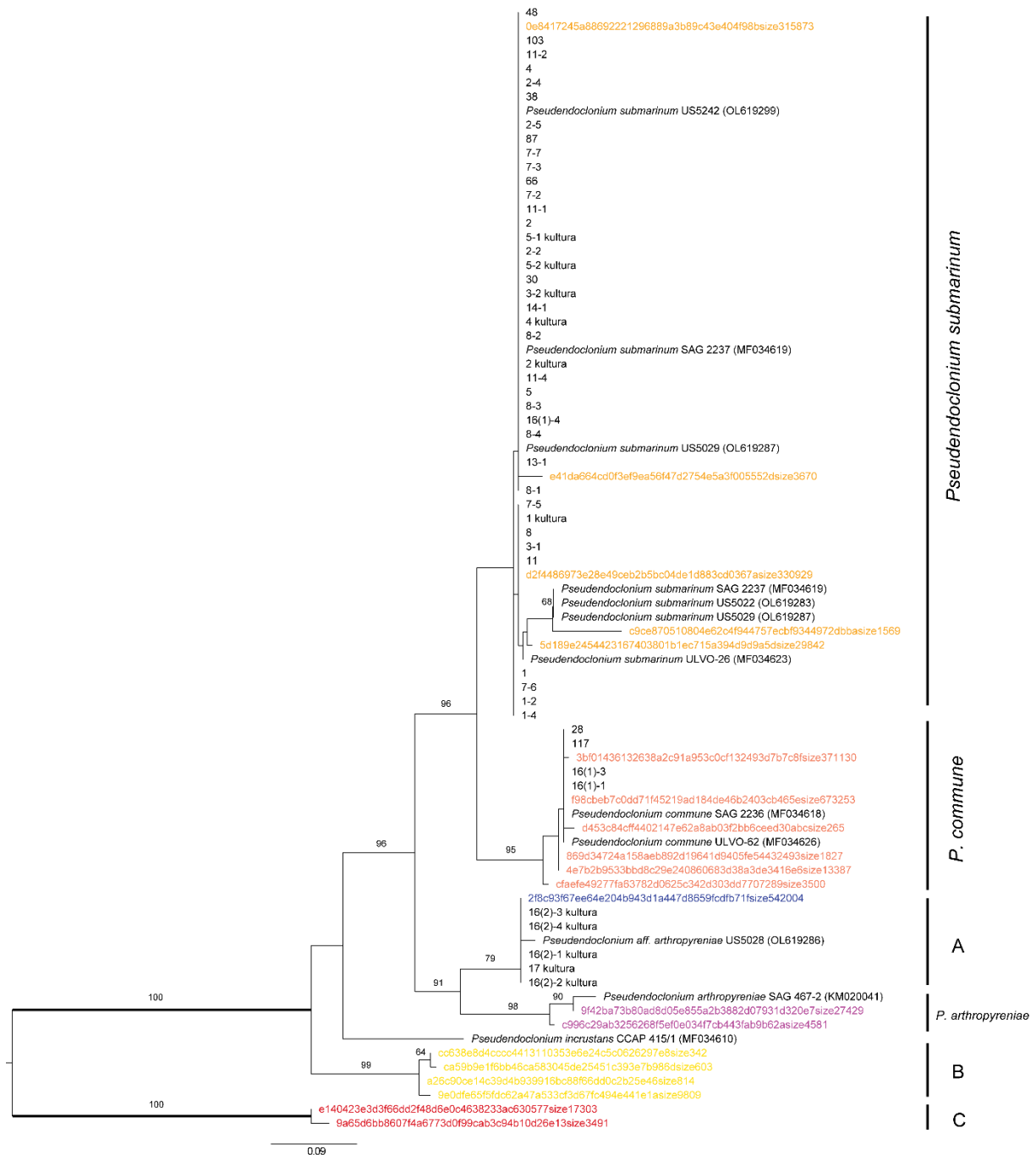


Obrázek 18: Fylogenetický strom řádu Ulotrichales získaný pomocí metody Maximum Likelihood (ML). Hodnoty na větvích udávají statistickou podporu větvení, bootstrapy ML jsou uvedeny jen od hodnot >60; U sekvencí z GenBanku jsou uvedeny kódy označující jednotlivé kmeny (pokud byly k dispozici) a v závorce je přístupové číslo z GenBanku. Barevně jsou vyznačeny sekvence získané z Illumina metabarcodingu.

Analýza symbiotických vztahů (Obrázek 20) rovněž poukazuje na úzkou selektivitu partnerů. Mykobionti rodu *Hydropunctaria* byli nalezeni v asociaci s různými druhy rodu *Pseudendozonium*. Nejčastěji nalezenou dvojicí je *H. maura* a *P. submarinum*. *P. submarinum* však není vždy nejčastější volně žijící řasou, alespoň ve studovaných vzorcích. Co se celkových počtů týče, běžnější je v prostředí *P. commune* (Tabulka 7). S tímto druhem tvořil symbiózu nejčastěji lišejník *Verrucaria ditmarsica* (linie *V. ditmarsica*1).

Lišejník *Verrucaria ceuthocarpa* byl nalezen v asociaci se dvěma řasami (*Urospora* a řasa podobná *Pseudendozonium arthrophyreniae*) získanými dvěma různými metodami (izolace DNA ze stélky a kultivace).

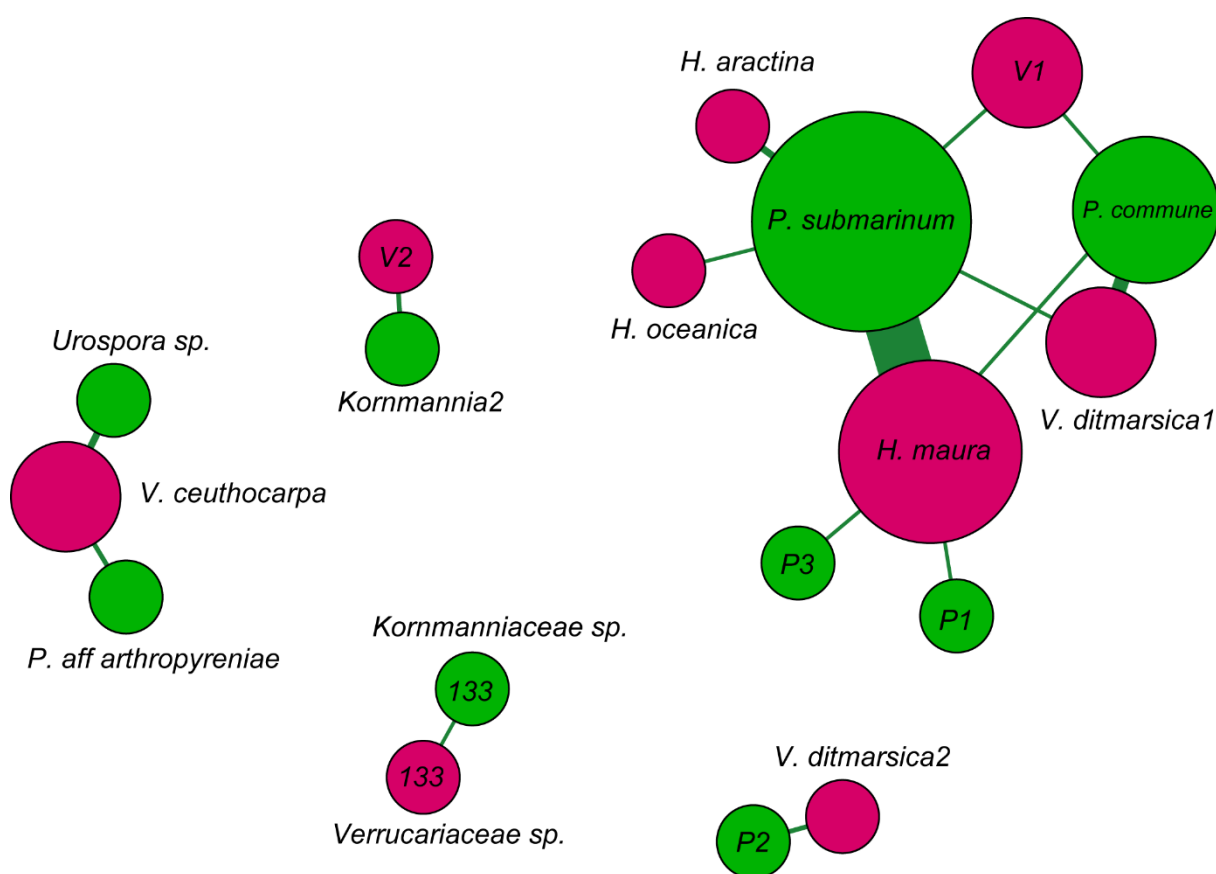
Nově nalezené linie mykobiontů, které nelze blíž identifikovat, v sobě mají často i neznámé linie fotobiontů značící skrytou diverzitu mořských lišejníků, čekající na detailní charakterizaci.



Obrázek 19: Fylogenetický strom rodu *Pseudodoconium* získaný pomocí metody Maximum Likelihood (ML). Hodnoty na větvích udávají statistickou podporu větvení, bootstrapy ML jsou uvedeny jen od hodnot >60; plně podpořené linie jsou zvýrazněné tučně. U sekvencí z GenBanku jsou uvedeny kódy označující jednotlivé kmeny (pokud byly k dispozici) a v závorce je přístupové číslo z GenBanku. Barevně jsou vyznačeny sekvence získané z Illumina metabarcodingu. A = *P. aff. Arthropryeniae*; B = *Pseudodoconium* sp. a C = *Pseudodoconium*-like.

Tabulka 7: Počty získaných sekvencí (readů) volně žijících symbiotických druhů řas („pool“ řas) z blízkosti daných položek; tučně ohraničené buňky značí, které řasy byly v položkách detekovány jako fotobionti.

	1	2	7	8	11	14	16
<i>P. submarinum</i>	11180	27874	134717	13892	17	35014	40623
<i>P. commune</i>	75296	19011	131336	177304	121661	20533	28538
<i>P. aff. arthropyreniae</i>	0	0	0	2348	0	34331	56958
<i>P. arthropyreniae</i>	0	9115	0	67	0	0	0
<i>Pseudodoctonium</i> sp.	0	2919	2259	162	0	18	24
<i>Pseudodoctonium</i> -like	0	11690	0	0	0	0	0
<i>Urospora</i> sp.	140464	0	17226	116896	194746	16197	105141



Obrázek 20: Síť vztahů mezi mykobionty (růžově) a fotobionty (zeleně); velikost koleček je daná početností druhů v datech a tloušťka čar vyjadřuje frekvenci vztahů.

4.6 Diverzita symbiontů na gradientu salinity

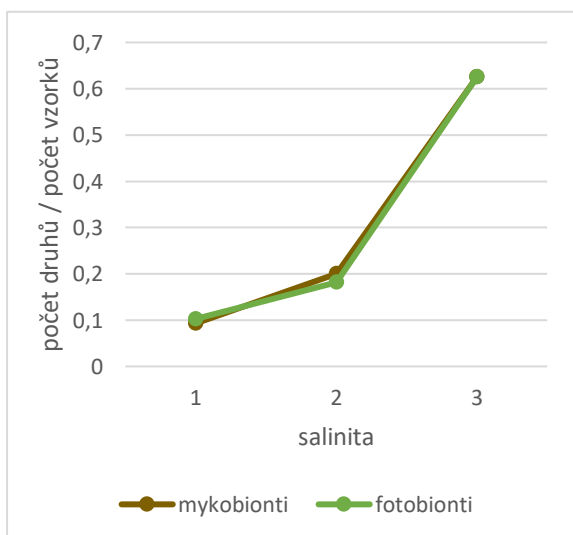
Baltské a Severní moře bylo pro účely diplomové práce rozděleno na tři části podle koncentrace soli ve vodě (Obrázek 21), podobně jako v jiných studiích (Geburzi et al. 2021; Olofsson et al. 2020; Paavola et al. 2005):

1. Baltské moře 5-8 PSU
2. Prostřední část 8-26 PSU
3. Severní moře 26-35 PSU

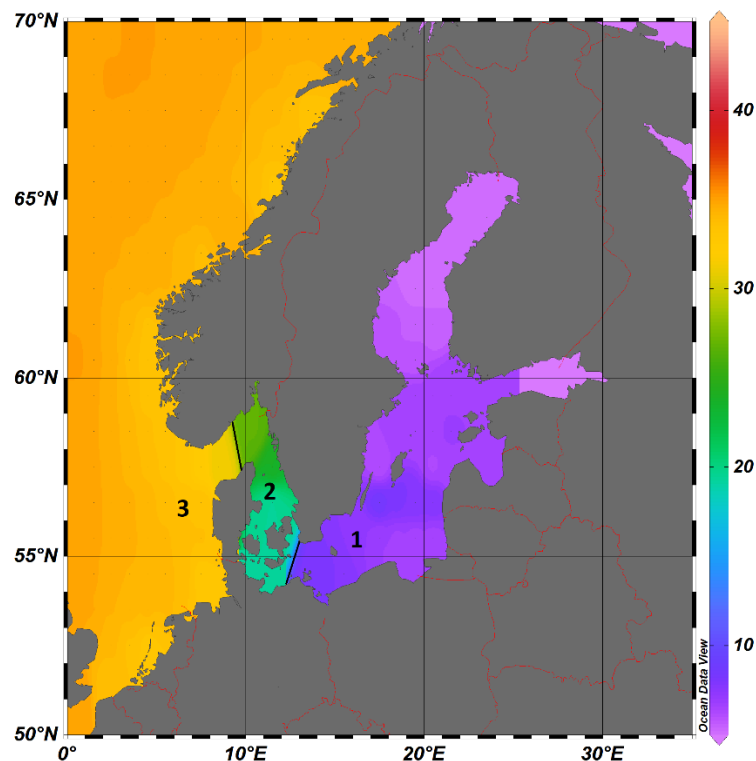
Prostřední část zahrnuje dánské úžiny Kattegat, Malý a Velký Belt a Öresund, které tvoří přechod mezi Severním mořem a Baltem. Přestože nejvíce vzorků pochází z oblasti s nejnižší salinitou (část 1 – Baltské moře),

je zde patrná velmi nízká druhová diverzita, a to jak mykobiontů, tak fotobiontů (Obrázek 23 a 24). S přibývajícím koncentrací soli (Prostřední část 2 a Severní moře 3) druhová bohatost roste. Lze tedy říct, že se vzrůstající salinitou roste celková diverzita lišejníků (Obrázek 22).

Vztahy mezi symbiotickými partnery a četnost jejich výskytu v jednotlivých oblastech

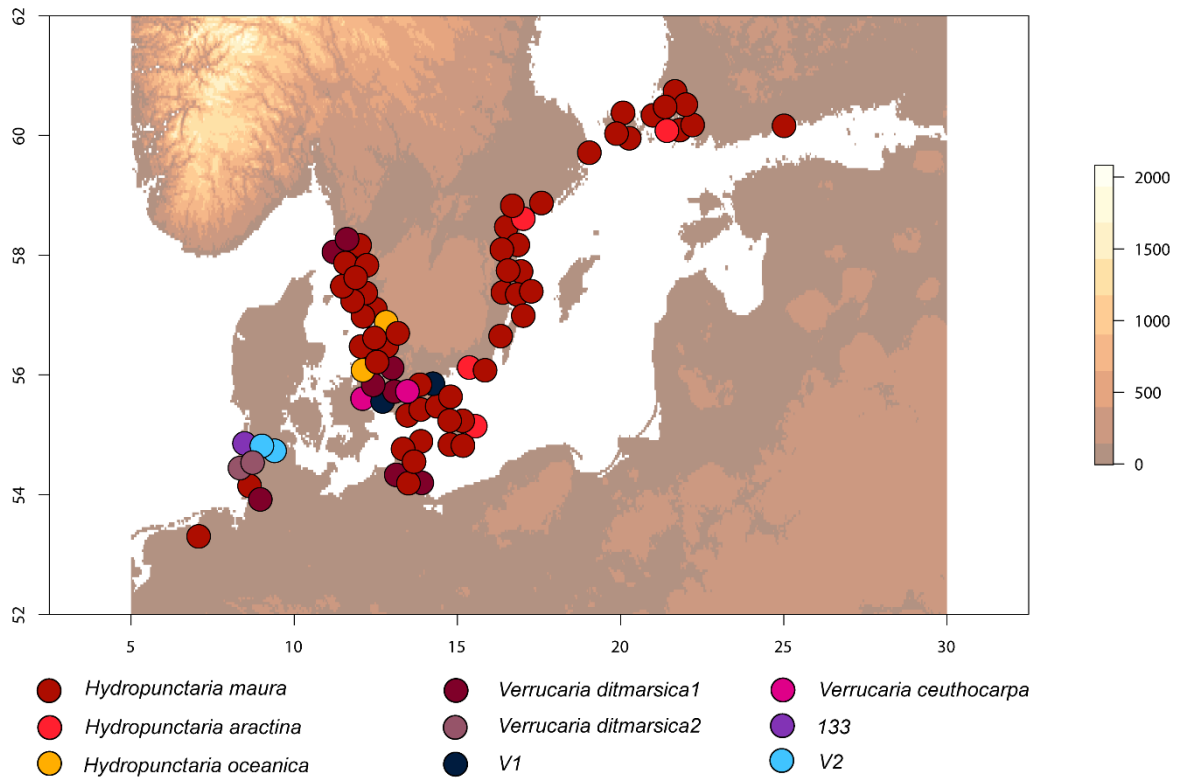


Obrázek 22: Diverzita lišejníků v závislosti na koncentraci soli ve vodě od nejnižší salinity (1) po nejvyšší (3).

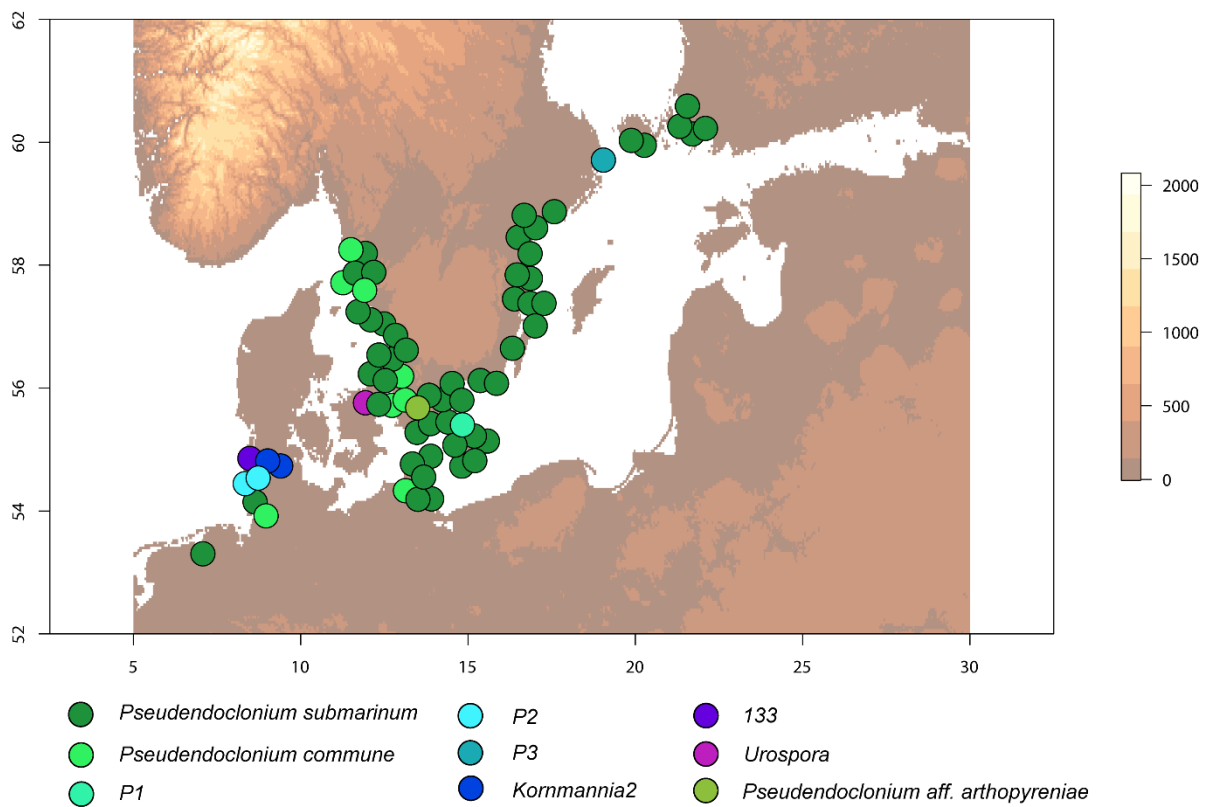


Obrázek 21: Gradient salinity v Baltském a Severním moři; 1 PSU (Practical Salinity Unit) = 1 g/kg; Schlitzer, R., Ocean Data View, <https://odv.awi.de>, 2018.

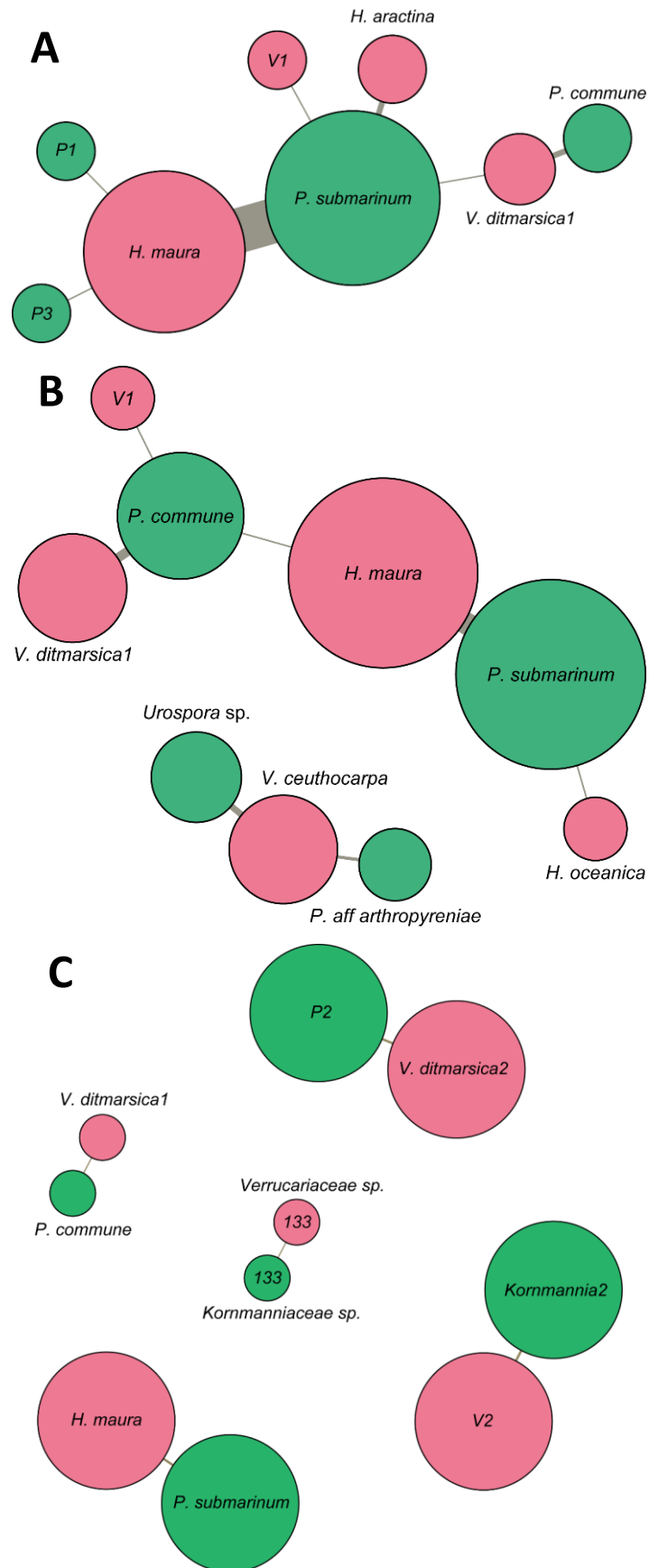
mořského pobřeží s rozdílnou salinitou jsou vyobrazeny na Obrázku 25. V oblasti s nejvyšší koncentrací soli (Obrázek 25C) je viditelná velmi vysoká specificita, kdy spolu tvoří symbiózu jen určité taxony. V této oblasti však bylo k dispozici nejméně dat, proto je třeba brát výsledek s rezervou. Naopak v oblastech s nižší salinitou (Obrázek 25A a B) jsou mykobionti schopni spolupráce s větším počtem řas. Jasně preference vůči určitým partnerům však značí vysokou selektivitu těchto lišejníků.



Obrázek 23: Mapa diverzity mykobiontů na pobřeží Baltského a Severního moře.



Obrázek 24: Mapa diverzity fotobiontů na pobřeží Baltského a Severního moře.



Obrázek 25: Síť vztahů mezi mykobionty (růžově) a fotobionty (zeleně) podle salinity (A – část 1, Baltské moře; B – část 2, Prostřední část; C – část 3, Severní moře). Velikost koleček je daná početností druhů v datech a tloušťka čar vyjadřuje frekvenci vztahů.

5. Diskuse

5.1 Diverzita lišejníků a jejich symbiotické vztahy

Lišejníky čeledi Verrucariaceae patří mezi významné organismy obývající litorální zónu mořského pobřeží. Okraj litorálu zbarvený černě díky dominantnímu lišejníku *Hydropunctaria maura* lze vidět i z dálky a může být dokonce zaměněn s ropnou havárií (Dobson 2014). *H. maura* dominuje i na pobřeží Baltského moře a jen občas ji doprovází jiné druhy rodu *Hydropunctaria* nebo *Verrucaria* (Obrázek 23). Je zvláštní, že zde nebyl zaznamenán žádný lišejník rodu *Wahlenbergiella*, který je kosmopolitní a často tvoří součást litorálního společenství (Smith et al. 2009). Pro svou tenkou nazelenalou stélku však může být snadno přehlédnut.

Mykobiont *Hydropunctaria maura* zde tvoří lišejník nejčastěji s řasou *Pseudendoclonium submarinum*, ale nalezen byl i v asociaci s *P. commune* a se dvěma dalšími neznámými druhy rodu *Pseudendoclonium* (Obrázek 20). První dva druhy již byly z tohoto lišejníku v minulosti zaznamenány (Darienko & Pröschold 2017; Gasulla et al. 2019). Další záznamy fotobiontů jako např. *Halofilum ramosum* svědčí o nízké specificitě tohoto lišejníku (Darienko & Pröschold 2017; Thüs et al. 2011), i když se jedná o příbuzné řasy patřící do čeledě Kornmanniaceae (Obrázek 10 a 11). Přestože je lišejník schopný navázat úzký kontakt se širokou škálou řas, časté záznamy fotobionta *P. submarinum* ukazují, že zde dochází k vysoké selektivitě. Z pohledu řasy *P. submarinum* lze říci, že tento fotobiont je také ochoten spolupracovat s řadou mykobiontů (Obrázek 20). Oba symbionti jsou, soudě podle jejich častého výskytu, velmi úspěšní (Obrázek 23 a 24).

Hydropunctaria aractina a *H. oceanica* jsou snadno zaměnitelné s *H. maura* (Příloha 8.2 Morfologie litorálních lišejníků). Liší se složením pigmentů v pseudokortexu, tloušťkou stélky, která je vždy tenčí, než u *H. maura*, a výskytem, který není tak častý (Orange 2012, 2013). *H. oceanica*, zaznamenaná zatím jen na Britských ostrovech, byla nalezena i poměrně daleko od mořského pobřeží, a to na skále vzdálené 200 m od moře nebo dokonce až na 4,5 km vzdálených kamenech u sladkovodního jezera (Orange 2013). Jejich fotobiont nebyl molekulárně popsán. V této práci byl molekulárně identifikován jako *P. submarinum* (Obrázek 6, 10 a 11).

Lišejník *Verrucaria ceuthocarpa* je poměrně vzácný (Smith et al. 2009), i když možná jen přehlížený. O jeho fotoautotrofním partnerovi se nic neví a molekulárně nikdy určen nebyl. Zde byl nalezen v asociaci se dvěma řasami z rodů *Urospora* a *Pseudendoclonium*. Každá byla získána jinou metodou. Rod *Urospora* představuje makroskopické vláknité řasy s poměrně

komplexní stélkou a jako fotobiont byl objeven teprve nedávno. Sekvence tohoto fotobionta se však přesně shodují se vzorky z Chile (Obrázek 13) (Černajová et al. 2022) a je tedy pravděpodobné, že se jedná o určitý druh rodu *Urospora*, který se naučil spolupracovat s určitými houbami skupiny *Wahlenbergiella* (Verrucariaceae). Do této skupiny molekulárně patří i *Mastodia tessellata* se svým fotobiontem *Prasiola* (Obrázek 8). Jedná se tedy pravděpodobně o velmi zajímavou skupinu lišejníků s velmi neobvyklými fotobionty. Pokusy o kultivaci řasy *Urospora* se bohužel nezdařily, ale podařilo se vykultivovat zcela jiný, neznámý druh rodu *Pseudendoclonium*, molekulárně nejbližší řase *Pseudendoclonium arthrospyreniae* a řase získané rovněž z Chile z lišejníku této čeledě (Obrázek 11) (Černajová et al. 2022). *P. arthrospyreniae* má širokou škálu výskytu od moře, sladkých vod až po jeskyně i terestrické prostředí a rovněž je znám jako fotobiont vodních lišejníků (Škaloud et al. 2018).

Verrucaria ditmarsica je běžným lišejníkem litorální zóny, vyskytující se častěji na krytém pobřeží nebo u ústí řek do moře, kde může být zaměněna i se sladkovodním lišejníkem *Verrucaria aquatilis* (Orange 2013; Smith et al. 2009). Jedná se o polyfyletický druh a bude třeba jej taxonomicky revidovat (Obrázek 7). K určení a rozlišení různých linií tohoto druhu by mohla pomoci identifikace fotobionta. Zde objevené linie *V. ditmarsica1* a *V. ditmarsica2* mají každá jiného fotobionta. *V. ditmarsica1* měla jako fotobionta nejčastěji *Pseudendoclonium commune* a v jednom případě měla ve stélce fotobionty dva – *P. commune* a *P. submarinum*, zatímco *V. ditmarsica2* má pravděpodobně zcela jiný druh rodu *Pseudendoclonium* (Obrázek 20). Bylo by však třeba získat více vzorků těchto lišejníků, molekulární studie ohledně jejich fotobiontů opět zcela chybí. Je však otázkou, nakolik je určování lišejníků podle fotobionta spolehlivé. Jisté pokusy tu v minulosti byly (Ahmadjian 1993), ovšem hodí se pravděpodobně spíše na rozlišení vyšších taxonomických úrovní, než jsou druhy (Rambold et al. 1998). Výjimkou je případ tří fenotypově odlišných lišejníků rodu *Cladonia*, kde vymezeným druhům odpovídá více fotobiont než mykobiont (Steinová et al. 2022), ale to je trochu jiný případ.

Ostatní nalezené lišejníky se morfologicky podobají polyfyletickému rodu *V. ditmarsica* (Příloha 8.2 Morfologie litorálních lišejníků), ale v GenBanku nemají žádné podobné sekvence. Pravděpodobně tedy představují kryptickou diverzitu tohoto morfotypu. Linie pojmenovaná pracovním jako *VI* je geneticky nejbliž ostatním liniím *V. ditmarsica* (Obrázek 7).

Skrytá diverzita lišejníků čeledi Verrucariaceae a jejich fotobiontů je patrná i z recentní studie Černajové et al. (2022). Pravděpodobně je evolučně výhodné tvořit tento jednoduchý fenotyp v prostředí, jakým je mořské pobřeží, a proto k němu dospělo více linií nezávisle na

sobě. Je zajímavé, že s neznámými mykobionty se objevují často i geneticky neznámé linie řas, naznačující významnou specificitu a koevoluci těchto symbiotických partnerů (Obrázek 20).

5.2 Kde najít toho správného partnera?

Metabarcoding je metoda, která umožňuje současnou identifikaci mnoha taxonomických skupin z jediného vzorku eDNA či jiného komplexu obsahujícího genetický materiál (Deiner et al. 2017; Ruppert et al. 2019). Přestože má své limity, je v současnosti hojně využívána napříč všemi biologickými obory (Lutz et al. 2015; Mitchell et al. 2022; Topstad et al. 2021; Větrovský et al. 2020). V lichenologii má obrovský potenciál odhalit celkovou diverzitu všech symbiontů, kteří se ve stélkách lišejníků nacházejí. V poslední době je využívána nejen pro odhalení diverzity fotobiontů (Christmas et al. 2021; Dal Grande et al. 2018; Molins et al. 2021; Moya et al. 2021), ale také celé komunity hub v lišejnících, tzv. mykobiomu (Banchi et al. 2018; Fernández-Mendoza et al. 2017), a samozřejmě i mikrobiomu (Christmas et al. 2021).

Kupodivu existuje jen jedna studie, kdy byl metabarcoding využit jak k analýze fotobiontů ze stélky, tak ke zjištění diverzity volně žijících řas v prostředí (Vančurová et al. 2020). V této studii se zjistilo, že složení symbiotických řas v půdě neodpovídá plně obsahu stélky. Mnoho linií symbiotických řas sice bylo nalezeno jak v půdě, tak v lišejnících, ale naprosto v jiných abundancích. Haplotypy, které se běžně vyskytovaly v lišejnících, byly v půdě vzácné a naopak. Některé poměrně abundantní druhy lišejníkových symbiontů nebyly nalezeny v půdě vůbec.

Přesto však víme, že volně v prostředí běžně žijí řasy, které jsou známé jako symbionti lišejníků (Frey et al. 2013; Hedenås et al. 2007; Rippin et al. 2018) a bylo zdokumentováno, jak si klíčící hyfy chytá svého fotobionta z prostředí (Garty & Delarea 1988; Sanders 2014; Sanders & Masumoto 2021).

Přestože potenciál metabarcodingu nebyl v této otázce ještě dostatečně využit, jinými metodami bylo zjišťováno, zda se fotobionti shodují s řasami vyskytujícími se v okolí. Většina těchto studií byla provedena na cyanolišejnících. Zúñiga et al. (2017) ve své studii zjistili, že volně žijící sinice *Nostoc* může být pro lišejníky potencionálním zdrojem fotobiontů, avšak diverzita v rámci stélky je jiná než v substrátu, podobně jako ve studii Vančurové et al. (2020). V jiné studii zjistili, že lichenizovaný a volně žijící *Nostoc* se geneticky liší (Oksanen et al. 2002) a další studie dokonce naznačují, že v rámci lichenizovaných sinic a řas došlo v evoluci k jisté specializaci a mohou tak tvořit dokonce vlastní vývojovou linii, kterou mezi sebou mykobionti sdílejí (Dal Grande et al. 2014; Lücking et al. 2009). Fotobionti a volně žijící řasy se navíc mohou lišit nejen v genetice, ale také v rychlosti růstu či produkci polysacharidů

a fotosyntetických pigmentů (Elshobary et al. 2015). Sdílení fotobiontů horizontálním přenosem mezi sebou se tak jeví jako velmi pravděpodobné (Beck et al. 2002; Cardós et al. 2019), vezmeme-li v úvahu i přítomnost gild (Peksa et al. 2022; Rikkinen 2003).

Existují samozřejmě výjimky: lišejníky z Antarktidy vykazují velmi nízkou selektivitu oproti lišejníkům z teplejších oblastí a v jejich stélkách se našel ten samý kmen sinice *Nostoc*, jako v okolí (Wirtz et al. 2003). Nízká selektivita mykobiontů v extrémních podmínkách, kde pravděpodobně ani není tak velká diverzita řas v prostředí, se zdá účinnou evoluční strategií lišejníků pro přežití (Romeike et al. 2002; Wirtz et al. 2003).

Podobné poznatky jsou známé i ze studií mořských korálů, které povahou své symbiózy připomínají lišejníky. V jedné studii se symbiotické řasy v sedimentu a v korálech velmi lišily (Quigley et al. 2017), jinde sediment představoval významný zdroj potenciálních symbiontů (Ali et al. 2019).

V této práci vzorky z metabarcodingu potvrzují přítomnost volně žijících fotobiontů v prostředí, a tudíž potencionální zdroj řas pro symbiózu (Obrázek 18 a 19). Mykobionti si zde však nevybírali vždy nejdostupnější řasu z okolí (Tabulka 7). Ze sedmi vzorků z blízkosti studovaných položek dominovala třikrát *Urospora* sp., stejně tak *P. submarinum* a jednou *P. commune*. Lišejník *H. maura*, který byl přítomen nejčastěji, vykazuje vysokou selektivitu a drží si svého fotobionta *P. submarinum*, i když by měl k dispozici i jiné a možná mnohem snáz dostupné řasy (minimálně ve třech případech). *V. ditmarsica* (linie *V. ditmarsical*) si také nevybírá ty nejhojnější řasy, kterými jsou *Urospora* sp. a *P. aff. arthropyreniae*, naopak *V. ceuthocarpa* ano (Tabulka 7, vzorek 16), ale i zde je patrná jistá selektivita (Obrázek 20). Lišejníky si tedy své symbionty buďto aktivně vybírají, nebo je z daného místa vůbec nemají.

Pokud si však lišejníky nevybírají nejsnadněji dostupné řasy z okolí, odkud je tedy získávají? Pokud se lišejník nerozmnožuje společně se svým fotobiontem některým z možných způsobů vegetativního rozmnožování (pomocí sorédií, izidií, či fragmentací stélky) nebo nemá řasy přítomné společně s výtrusy přímo v plodnici (Gueidan et al. 2007), musí si obstarat svého fotoautotrofního partnera jinak. To je i případ mořských lišejníků čeledi Verrucariaceae, které se rozmnožují pravděpodobně výhradně sexuálně. Jejich stélky vždy obsahují zanořené plodnice typu perithecium (Gueidan et al. 2007).

Možnosti získání fotobiontů pro tyto lišejníky jsou různé. Jejich zdrojem mohou být vegetativní propagule asexuálně se množících lišejníků (Rikkinen 2003), ovšem takto rozmnožující se lišejníky se v litorální zóně nevyskytují. Další možností je získat jednotlivé buňky fotobiontů, které za různých okolností unikly ze stélky jiných lišejníků (Peksa et al. 2022;

Rikkinen et al. 2002; Slocum et al. 1980), případně z fragmentů lišejníků, získaných činností herbivorů (Boch et al. 2011).

Pro detailnější porovnání diverzity v lišejnících s diverzitou v okolí by bylo vhodné provést metabarcoding i ze vzorků stélek lišejníků. Možná však ani metabarcoding nedokáže plně zodpovědět naše otázky. Příroda je velmi složitý a dynamický systém a společenstvo řas, které je v okolí lišejníků nyní, nemusí nutně odpovídat tomu, které tam bylo v době, kdy si mladá klíči hyfa mykobionta hledala svého partnera. Změny společenstev v čase jsou časté a nejen vlivem klimatických změn (Cox et al. 2013; Marcías et al. 2017; Ortega 1987; Rouf et al. 2008).

5.3 Jak se mění diverzita lišejníků na gradientu salinity?

Baltské moře je jednou z největších vodních ploch s brakickou vodou na světě a spolu se Severním mořem představuje významný gradient salinity od téměř sladké vody (méně než 2 PSU) na severu Botnického a Finského zálivu až po zcela oceánickou vodu severozápadně od Dánska (35 PSU) (Janssen et al. 1999; Kautsky & Kautsky 2000). Je to právě koncentrace soli v prostředí, která nejvíce ovlivňuje místní biotu. Počet mořských druhů se snižující se salinitou klesá, a naopak roste počet sladkovodních druhů (Ojaveer et al. 2010). Baltské moře je ve srovnání s jinými moři druhově poměrně chudé, navíc jde o velmi mladý (cca 12 000 let) a dynamický ekosystém, který vznikl táním ledovců při posledním zalednění (Kautsky & Kautsky 2000). Populace organismů se však mezi sebou geneticky liší a je zde zvýšená vnitrodruhová variabilita (Elmgren & Hill 1997; Geburzi et al. 2021; Kostamo et al. 2012; Ojaveer et al. 2010). Speciace druhů zde tedy pravděpodobně stále probíhá. Zaznamenán byl takto vznik endemického druhu Baltského moře, *Fucus radicans*, který se vyvinul jako varianta *Fucus vesiculosus*, tolerující extrémně nízkou salinitu (Bergstrom et al. 2005; Pereyra et al. 2009). V takto mladém ekosystému ještě nejsou plně využity všechny ekologické niky, ani tu není mnoho predátorů (Kautsky & Kautsky 2000) a je tedy náchylný na invazivní druhy (Paavola et al. 2005).

Dříve se zastával názor, že druhová bohatost se snižující se salinitou klesá. Dnes se ale ukazuje, že to platí pouze pro makroorganismy a že druhová bohatost planktonu naopak roste (Ojaveer et al. 2010; Telesh et al. 2013). Nehledě na to se nedá říct, že by místa s nejnižší salinitou byla opravdu druhově nejchudší (Schubert et al. 2011), mimo Baltské moře může být naopak druhově bohatší brakická voda (Watson & Byrne 2009). Jisté je, že salinita významně ovlivňuje složení druhů, a to např. i u hub (Rojas-Jimenez et al. 2019).

Jak je to ale v litorálu, kde jsou organismy přímo adaptované na kolísání salinity? A jak je to u lišejníků? Ze všech odebraných lišejníků byly zaznamenány jen mořské druhy, i když *Verrucaria ditmarsica* se často nachází u ústí řek, a tudíž v brakické vodě. Nedá se ovšem říci, že by tento lišejník byl častější v méně slané vodě, ba naopak (Obrázek 23). Stejně tak *H. oceanica* je spíš ve slanější části Baltského moře (Obrázek 23), ač byla nalezena i u sladkovodního jezera, vzdáleného až 4,5 km od moře (Orange 2013). Sladkovodní lišejníky nebyly v této práci zaznamenány, ale chybí zde sběry z Botnického a Finského zálivu, kde je voda nejméně slaná. Gilbert (2001) v laguně Fleet v jižní Anglii nezaznamenal žádné změny v distribuci lišejníků podél gradientu salinity až na lišejník *Verrucaria halizoa*, který preferoval slanější část laguny. Salinita v této laguně značně kolísá, ale může být srovnatelná s Baltským mořem (Robinson 1983). Nikdo se však dopodrobna tímto problémem nezabýval.

Diverzita lišejníků na pobřeží Baltského a Severního moře se zvyšuje spolu se salinitou (Obrázek 22) a odpovídá tak vzoru jiných makroorganismů (Ojaveer et al. 2010). Platí to jak pro mykobionty (Obrázek 23), tak pro fotobionty (Obrázek 24). Je ale rostoucí diverzita fotobiontů se salinitou daná prostředím, anebo specificitou mykobionta? *H. maura* a *V. ditmarsica* (linie *V. ditmarsica1*) jsou jedinými lišejníky, které se vykytují ve všech třech salinitních zónách a všude mají toho samého fotobionta. V oblastech s nižší salinitou dokonce spolupracují s více symbiotickými řasami, než v oblastech s nejvyšší salinitou (Obrázek 25). Z oblasti s nejvyšší salinitou však není získáno tolik dat, jako z centra Baltu. Pravděpodobně zde však nedochází k rozšiřování ekologické niky pomocí výměny partnera jako jinde (Rolshausen et al. 2018; Vančurová et al. 2018). Řasa *P. submarinum* je velkým generalistou, který se vyskytuje všude po světě (Guiry & Guiry 2022) a není tedy důvod ho měnit. Hlavní roli v diverzitě fotobiontů tak hraje s největší pravděpodobností právě diverzita mykobiontů a jejich specificita a selektivita, což je obecně sledovaný trend (Pino-Bodas & Stenroos 2021; Vančurová et al. 2018).

Nízká diverzita lišejníků na pobřeží Baltského moře však může mít ještě jiné vysvětlení než obecně sledované trendy, např. že Baltské moře je příliš mladé a lišejníky jsou dlouhověké a pomalu rostoucí organismy. Na pobřeží Baltského moře se tedy nemusely ještě dostat. *H. maura* jako dominantní lišejník na většině mořských pobřeží se pravděpodobně velmi efektivně rozmnožuje a nemá mnoho kompetitorů, proto obsadil i většinu Baltu. Naopak lišejníky z oblastí s nejvyšší salinitou, které vykazují silnou kryptickou diverzitu mykobiontů i fotobiontů, zde měly dostatek času usídlit se a specializovat.

6. Závěr

Studované lišejníky z čeledi Verrucariaceae, sesbírané z litorálu Baltského a Severního moře, byly identifikovány pomocí ITS a 18S rDNA. Bylo nalezeno celkem devět linií mykobiontů: tři z rodu *Hydropunctaria*, přičemž nejčastějším mykobiontem je *H. maura*, tři linie lišejníku *Verrucaria ditmarsica*, který se ukázal jako polyfyletický, *V. ceuthocarpa* a dvě linie, které nebyly molekulárně nikdy popsány a neshodují se příliš s ničím z GenBanku. Fotobiontů bylo také nalezeno devět, sedm linií bylo možné zařadit do rodu a dvě z nich přímo do druhu. Nejčastějším rodem fotobiontů je *Pseudendoclonium*, druh *P. submarinum*. Pro lišejníky *H. aractina* a *H. oceanica* je zde molekulárně poprvé popsán jejich fotobiont jako *P. submarinum*. Řasa *Urospora* sp. je zde teprve podruhé zaznamenána v asociaci s houbou a poprvé s lišejníkem *V. ceuthocarpa*. Tento lišejník má pravděpodobně dva fotobionty, jeden z rodu *Urospora* a druhý z rodu *Pseudendoclonium*. Každá z linií *V. ditmarsica* má jiného fotobionta/fotobionty, všechny však patří do rodu *Pseudendoclonium*. Dvě linie fotobiontů nebyly dosud nikdy molekulárně popsány a sekvenčně jsou jen málo podobné jiným druhům z GenBanku.

Pomocí metabarcodingu bylo získáno mnoho linií volně žijících řas z okolí lišejníků, z nichž některé byly objeveny jako fotobionti lišejníků a některé byly zcela neznámé. Porovnání fotobiontů s volně žijícími symbiotickými řasami ukázalo, že mykobiont si nevybírání vždy nejčastější řasu z okolí. Vztahy mezi symbionty ukázaly silnou selektivitu, zejména u lišejníků *H. maura* a *V. ditmarsica* 1. Ostatní lišejníky nebyly nalezeny v takovém počtu, aby se mohla zcela projevit jejich selektivita, jisté preference však značí.

Ve studovaných oblastech Baltského a Severního moře se pohybuje obsah soli ve vodě od cca 5 do 35 PSU. Na tomto gradientu salinity byla pozorovaná změna v druhové bohatosti mykobiontů a fotobiontů. V oblastech s nejnižší salinitou byla pozorována jen nízká druhová diverzita, zatímco v oblastech s vyšší koncentrací soli byla daleko vyšší. Bylo zjištěno, že stejně jako u jiných makroorganismů, s rostoucí salinitou roste i druhová diverzita lišejníků.

Lišejníky litorální zóny z čeledi Verrucariaceae představují velmi zajímavou skupinu lišejníků s často skrytou diverzitou. Hostí celou řadu zajímavých symbiotických řas, které nejsou známy z jiných lišejníků a mohou být tak velikým přínosem pro pochopení podstaty lišejníkové symbiomy a vztahů mezi symbionty. Tyto lišejníky a jejich ulvophytní fotobionti zcela jistě představují ještě hodně neprobádanou oblast v rámci lichenologie. Jejich potenciál je obrovský a neměly by tak zůstat opomenuty.

7. Zdroje

- Acosta A, Ercole S, Stanisci A, Pillar VDP, Blasi C. 2007. Coastal vegetation zonation and dune morphology in some Mediterranean ecosystems. *J. Coast. Res.* 23(6):1518–24
- Ahmadjian V. 1993. The Lichen Photobiont: What Can It Tell Us about Lichen Systematics? *Bryologist.* 96(3):310
- Ahmadjian V. 1995. Lichens are more important than you think. *Bioscience.* 45(3):124–124
- Ali A, Kriefall NG, Emery LE, Kenkel CD, Matz M V., Davies SW. 2019. Recruit symbiosis establishment and Symbiodiniaceae composition influenced by adult corals and reef sediment. *Coral Reefs.* 38(3):405–15
- Bálint M, Schmidt PA, Sharma R, Thines M, Schmitt I. 2014. An Illumina metabarcoding pipeline for fungi. *Ecol. Evol.* 4(13):2642–53
- Banchi E, Stankovic D, Fernández-Mendoza F, Gionechetti F, Pallavicini A, Muggia L. 2018. ITS2 metabarcoding analysis complements lichen mycobiome diversity data. *Mycol. Prog.* 17(9):1049–66
- Bastian M, Heymann S, Jacomy M. 2009. Gephi: An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks Visualization and Exploration of Large Graphs. *Proc. Int. AAAI Conf. web Soc. media.* 361–62
- Beck A, Kasalicky T, Rambold G. 2002. Myco-photobiontal selection in a Mediterranean cryptogam community with *Fulgensia fulgida*. *New Phytol.* 153(2):317–26
- Belnap J, Büdel B, Lange OL. 2001. Biological Soil Crusts: Characteristics and Distribution. In *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management. Ecological Studies*, Vol. 150, eds. J Belnap, OL Lange, pp. 3–30. Springer Berlin Heidelberg
- Bergstrom L, Tatarenkov A, Johannesson K, Jonsson RB, Kautsky L. 2005. Genetic and morphological identification of *Fucus radicans* sp. nov. (Fucales, Phaeophyceae) in the brackish Baltic Sea. *J. Phycol.* 41(5):1025–38
- Bischoff HW, Bold HC. 1963. *Phycological Studies IV. Some Soil Algae from Enchanted Rock and Related Algal Species.* Univ. Texas Publ. 6318
- Bjelland T, Grube M, Hoem S, Jorgensen SL, Daae FL, et al. 2011. Microbial metacommunities in the lichen-rock habitat. *Environ. Microbiol. Rep.* 3(4):434–42
- Blaha J, Baloch E, Grube M. 2006. High photobiont diversity associated with the euryoecious lichen-forming ascomycete *Lecanora rupicola* (Lecanoraceae, Ascomycota). *Biol. J. Linn. Soc.* 88(2):283–93
- Boch S, Prati D, Werth S, Rüetschi J, Fischer M. 2011. Lichen Endozoochory by Snails. *PLoS One.* 6(4):e18770
- Boratyn GM, Camacho C, Cooper PS, Coulouris G, Fong A, et al. 2013. BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Res.* 41(W1):W29–33
- Büdel B. 2011. Cyanobacteria: Habitats and Species. In *Plant Desiccation Tolerance*, pp. 11–21. Berlin: Springer Berlin Heidelberg

- Cardós JLH, Prieto M, Jylhä M, Aragón G, Molina MC, et al. 2019. A case study on the re-establishment of the cyanolichen symbiosis: where do the compatible photobionts come from? *Ann. Bot.* 124(3):379–88
- Carpenter E, Foster RA. 2002. *Cyanobacteria in Symbiosis*. Dordrecht: Springer Netherlands
- Castresana J. 2000. Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17(4):540–52
- Černajová I, Schiefelbein U, Škaloud P. 2022. Lichens from the littoral zone host diverse Ulvophyceean photobionts. *J. Phycol.* 58(2):267–80
- Christmas NAM, Allen R, Hollingsworth AL, Taylor JD, Cunliffe M. 2021. Complex photobiont diversity in the marine lichen *Lichina pygmaea*. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom.* 101(4):667–74
- Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. 2016. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 44(D1):D67–72
- Cox TE, Philippoff J, Baumgartner E, Zabin CJ, Smith CM. 2013. Spatial and temporal variation in rocky intertidal communities along the main Hawaiian Islands. *Pacific Sci.* 67(1):23–45
- Cubero OF, Crespo A, Fatehi J, Bridge PD. 1999. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. *Plant Syst. Evol.* 216(3–4):243–49
- Dal Grande F, Beck A, Cornejo C, Singh G, Cheenacharoen S, et al. 2014. Molecular phylogeny and symbiotic selectivity of the green algal genus *Dictyochloropsis* s.l. (Trebouxiophyceae): A polyphyletic and widespread group forming photobiont-mediated guilds in the lichen family Lobariaceae. *New Phytol.* 202(2):455–70
- Dal Grande F, Rolshausen G, Divakar PK, Crespo A, Otte J, et al. 2018. Environment and host identity structure communities of green algal symbionts in lichens. *New Phytol.* 217(1):277–89
- Darienko T, Pröschold T. 2017. Toward a monograph of non-marine Ulvophyceae using an integrative approach (Molecular phylogeny and systematics of terrestrial Ulvophyceae II.). *Phytotaxa.* 324(1):1–41
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods.* 9(8):772–772
- Deiner K, Bik HM, Mächler E, Seymour M, Lacoursière-Roussel A, et al. 2017. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Mol. Ecol.* 26(21):5872–95
- Delmail D, Grube M, Parrot D, Cook-Moreau J, Boustie J, et al. 2013. Halotolerance in Lichens: Symbiotic Coalition Against Salt Stress. In *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*, Vol. 9781461447, pp. 115–48. New York, NY: Springer New York
- Dobson FS. 2014. *A Field Key to Coastal and Seashore Lichens*. New Malden, UK: Frank S. Dobson
- Edgar RC. 2016. UCHIME2: improved chimera prediction for amplicon sequencing. *bioRxiv.* 074252

- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 27(16):2194–2200
- Elmgren R, Hill C. 1997. Ecosystem function at low biodiversity – the Baltic example. In *Marine Biodiversity*, pp. 319–36. Cambridge University Press
- Elshobary ME, Osman MEH, Abushady AM, Piercey-Normore MD. 2015. Comparison of Lichen-Forming Cyanobacterial and Green Algal Photobionts with Free-Living Algae. *Cryptogam. Algal*. 36(1):81–100
- Fernández-Mendoza F, Fleischhacker A, Kopun T, Grube M, Muggia L. 2017. ITS1 metabarcoding highlights low specificity of lichen mycobiomes at a local scale. *Mol. Ecol*. 26(18):4811–30
- Fiorentino J. 2008. First Record of *Pyrenocollema Halodytes* (Nyl.) R. Harris (Pyrenulales: Pyrenulaceae) from the Maltese Islands (Central Mediterranean). *Cent. Mediterr. Nat*. 4(4):213–19
- Fish JD, Fish S. 1989. Lichenes. In *A Student's Guide to the Seashore*, pp. 66–70. Dordrecht: Springer Netherlands
- Fletcher A. 1973a. The Ecology of Maritime (Supralittoral) Lichens on some Rocky Shores of Anglesey. *Lichenol*. 5(5–6):401–22
- Fletcher A. 1973b. The Ecology of Marine (Littoral) Lichens on some Rocky shores of Anglesey. *Lichenol*. 5(5–6):368–400
- Françoise LD, Holger T, Marie-Laurence A, David D, Joël B. 2014. *Oxidative Stress Regulation in Lichens and Its Relevance for Survival in Coastal Habitats*, Vol. 71. Amsterdam: Elsevier
- Frey B, Bühler L, Schmutz S, Zumsteg A, Furrer G. 2013. Molecular characterization of phototrophic microorganisms in the forefield of a receding glacier in the Swiss Alps. *Environ. Res. Lett*. 8(1):015033
- Galloway DJ. 2008. Lichen biogeography. In *Lichen Biology*, pp. 315–35. Cambridge University Press
- Gardes M, Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol*. 2(2):113–18
- Garty J, Delarea J. 1988. Evidence of liberation of lichen ascospores in clusters and reports on contact between free-living algal cells and germinating lichen ascospores under natural conditions. *Can. J. Bot*. 66(11):2171–77
- Gasulla F, Guéra A, De Los Riós A, Pérez-Ortega S. 2019. Differential responses to salt concentrations of lichen photobiont strains isolated from lichens occurring in different littoral zones. *Plant Fungal Syst*. 64(2):149–62
- Geburzi JC, Heuer N, Homberger L, Kabus J, Moesges Z, et al. 2021. A marginal habitat, but not a sink: Ecological genetics reveal a diversification hotspot for marine invertebrates in the brackish Baltic Sea. *bioRxiv*. 2021.06.06.447071
- Gendron RP. 1977. Habitat Selection and Migratory Behaviour of the Intertidal Gastropod *Littorina littorea* (L.). *J. Anim. Ecol*. 46(1):79–92

- Gilbert O. 2001. The Lichen Flora of Coastal Saline Lagoons in England. *Lichenol.* 33(5):409–17
- Gilbert OL, Giavarini VJ. 1997. The Lichen Vegetation of Acid Watercourses in England. *Lichenol.* 29(04):347
- Green TGA, Nash TH, Lange OL. 2008. Physiological ecology of carbon dioxide exchange. *Lichen Biol. Second Ed.* 152–81
- Grube M, Berg G. 2009. Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis. *Fungal Biol. Rev.* 23(3):72–85
- Gueidan C, Roux C, Lutzoni F. 2007. Using a multigene phylogenetic analysis to assess generic delineation and character evolution in *Verrucariaceae* (*Verrucariales*, *Ascomycota*). *Mycol. Res.* 111(10):1145–68
- Gueidan C, Savić S, Thüs H, Roux C, Keller C, et al. 2009. Generic classification of the *Verrucariaceae* (*Ascomycota*) based on molecular and morphological evidence: Recent progress and remaining challenges. *Taxon.* 58(1):184–208
- Gueidan C, Thüs H, Pérez-ortega S. 2011. Phylogenetic position of the brown algae-associated lichenized fungus *Verrucaria tavaresiae* (*Verrucariaceae*). *Bryologist.* 114(3):563–69
- Guiry MD, Guiry GM. 2022. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>
- Hawksworth DL. 1980. Lichens of the South Devon Coastal Schists. *F. Stud.* 5:195–227
- Hawksworth DL. 2000. Freshwater and marine lichen-forming fungi. *Fungal Divers.* 5:1–7
- Hawksworth DL, Grube M. 2020. Lichens redefined as complex ecosystems. *New Phytol.* 227(5):1281–83
- Hedenås H, Blomberg P, Ericson L. 2007. Significance of old aspen (*Populus tremula*) trees for the occurrence of lichen photobionts. *Biol. Conserv.* 135(3):380–87
- Helms G. 2003. Taxonomy and symbiosis in associations of *Physciaceae* and *Trebouxia*. *Univ. Göttingen (Doctoral thesis)*. 1–156
- Helms G, Friedl T, Rambold G, Mayrhofer H. 2001. Identification of photobionts from the lichen family *Physciaceae* using algal-specific ITS rDNA sequencing. *Lichenologist.* 33(1):73–86
- Hepperle D. 2004. SeqAssem©. A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Win32-Version. <http://www.sequentix.de>
- Higgins NF, Connan S, Stengel DB. 2015. Factors influencing the distribution of coastal lichens *Hydropunctaria maura* and *Wahlenbergiella mucosa*. *Mar. Ecol.* 36(4):1400–1414
- Honegger R. 2009. Lichen-Forming Fungi and Their Photobionts. In *The Mycota*, ed. H Deising, pp. 307–33. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Janssen F, Schrum C, Backhaus JO. 1999. A climatological data set of temperature and salinity for the Baltic Sea and the North Sea. *Dtsch. Hydrogr. Zeitschrift.* 51(S9):5–245

- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.* 20(4):1160–66
- Kautsky L, Kautsky N. 2000. The Baltic Sea, including Bothnian Sea and Bothnian Bay. In *Seas at the Millennium - an Environmental Evaluation - Volume 1*, ed. C Sheppard, pp. 121–33. Amsterdam: Elsevier
- Kohlmeyer J, Hawksworth DL, Volkmann-Kohlmeyer B. 2004. Observations on two marine and maritime “borderline” lichens: *Mastodia tessellata* and *Collembosidium pelvetiae*. *Mycol. Prog.* 3(1):51–56
- Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B. 1988. *Halographis* (Opegraphales), a new endolithic lichenoid from corals and snails. *Can. J. Bot.* 66(6):1138–41
- Kostamo K, Korpelainen H, Olsson S. 2012. Comparative study on the population genetics of the red alga *Furcellaria lumbricalis* occupying different salinity conditions. *Mar. Biol.* 159(3):561–71
- Kováčik L, Pereira AB. 2001. Green alga *Prasiola crispa* and its lichenized form *Mastodia tessellata* in Antarctic environment: General aspects. *Nov. Hedwigia, Beihefte.* 123:465–78
- Kranner I, Beckett R, Hochman A, Nash TH. 2008. Desiccation-tolerance in lichens: A review. *Bryologist.* 111(4):576–93
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33(7):1870–74
- Kuzoff RK, Sweere JA, Soltis DE, Soltis PS, Zimmer EA. 1998. The phylogenetic potential of entire 26S rDNA sequences in plants. *Mol. Biol. Evol.* 15(3):251–63
- Lamb IM. 1973. Further observations on *Verrucaria serpuloides* M. Lamb, the only known permanently submerged marine lichen. *Harvard Univ. Herb.* 6(6):1–5
- Lubchenco J. 1980. Algal Zonation in the New England Rocky Intertidal Community: An Experimental Analysis. *Ecology.* 61(2):333–44
- Lücking R, Lawrey JD, Sikaroodi M, Gillevet PM, Chaves JL, et al. 2009. Do lichens domesticate photobionts like farmers domesticate crops? Evidence from a previously unrecognized lineage of filamentous cyanobacteria. *Am. J. Bot.* 96(8):1409–18
- Lutz S, Anesio AM, Edwards A, Benning LG. 2015. Microbial diversity on Icelandic glaciers and ice caps. *Front. Microbiol.* 6:307
- Mahé F, Rognes T, Quince C, de Vargas C, Dunthorn M. 2015. Swarm v2: highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ.* 3:e1420
- Marcías ML, Deregibus D, Saravia LA, Campana GL, Quartino ML. 2017. Life between tides: Spatial and temporal variations of an intertidal macroalgal community at Potter Peninsula, South Shetland Islands, Antarctica. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 187:193–203
- Mark K, Laanisto L, Bueno CG, Niinemets Ü, Keller C, Scheidegger C. 2020. Contrasting co-occurrence patterns of photobiont and cystobasidiomycete yeast associated with common epiphytic lichen species. *New Phytol.* 227(5):1362–75

- Mitchell G, Wilson PJ, Manseau M, Redquest B, Patterson BR, Rutledge LY. 2022. DNA metabarcoding of faecal pellets reveals high consumption of yew (*Taxus* spp.) by caribou (*Rangifer tarandus*) in a lichen-poor environment. *Facets*. 7:701–17
- Molins A, Moya P, Muggia L, Barreno E. 2021. Thallus Growth Stage and Geographic Origin Shape Microalgal Diversity in *Ramalina farinacea* Lichen Holobionts. *J. Phycol.* 57(3):975–87
- 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(6):220
- Moya P, Molins A, Chiva S, Bastida J, Barreno E. 2020. Symbiotic microalgal diversity within lichenicolous lichens and crustose hosts on Iberian Peninsula gypsum biocrusts. *Sci. Rep.* 10(1):1–14
- Muggia L, Vančurová L, Škaloud P, Peksa O, Wedin M, Grube M. 2013. The symbiotic playground of lichen thalli - a highly flexible photobiont association in rock-inhabiting lichens. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85(2):313–23
- Nelsen Matthew P, Gargas Andrea. 2008. Dissociation and horizontal transmission of codispersing lichen symbionts in the genus *Lepraria* (Lecanorales: Stereocaulaceae). *New Phytol.* 177(1):264–75
- Nokes LF, Haelewaters D, Pfister DH. 2020. Exploration of Marine Lichenized Fungi as Bioindicators of Coastal Ocean Pollution in the Boston Harbor Islands National Recreation Area. *Rhodora*. 122(992):251–73
- Nolan MJ, Cribb TH. 2005. The Use and Implications of Ribosomal DNA Sequencing for the Discrimination of Digenean Species. In *Advances in Parasitology*, Vol. 60, pp. 101–63. Amsterdam: Elsevier
- Ojaveer H, Jaanus A, MacKenzie BR, Martin G, Olenin S, et al. 2010. Status of Biodiversity in the Baltic Sea. *PLoS One*. 5(9):e12467
- Oksanen I, Lohtander K, Paulsrud P, Rikkinen J. 2002. A molecular approach to cyanobacterial diversity in a rock-pool community involving gelatinous lichens and free-living Nostoc colonies. *Ann. Bot. Fenn.* 39(2):93–99
- Olofsson M, Hagan JG, Karlson B, Gamfeldt L. 2020. Large seasonal and spatial variation in nano- and microphytoplankton diversity along a Baltic Sea—North Sea salinity gradient. *Sci. Rep.* 10(1):1–12
- Orange A. 2012. Semi-cryptic marine species of *Hydropunctaria* (Verrucariaceae, lichenized Ascomycota) from north-west Europe. *Lichenol.* 44(3):299–320
- Orange A. 2013. *British and Other Pyrenocarpous Lichens*. National Museum of Wales
- Ortega S. 1987. Habitat segregation and temporal variation in some tropical intertidal populations. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 113(3):247–65
- Ortiz-Álvarez R, De Los Ríos A, Fernández-Mendoza F, Torralba-Burrial A, Pérez-Ortega S. 2015. Ecological specialization of two photobiont-specific maritime cyanolichen species of the genus *Lichina*. *PLoS One*. 10(7):1–23
- Osyczka P, Lenart-Boroń A, Boroń P, Rola K. 2021. Lichen-forming fungi in postindustrial habitats involve alternative photobionts. *Mycologia*. 113(1):43–55

- Paavola M, Olenin S, Leppäkoski E. 2005. Are invasive species most successful in habitats of low native species richness across European brackish water seas? *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 64(4):738–50
- Parra OO, Redon J. 1977. Aislamiento de *Heterococcus caespitosus* Vischer ficobionte de *Verrucaria maura* Wahlenb. *Bol. Soc. Biol. Concepción.* 51(1):219–24
- Parrot D, Antony-Babu S, Intertaglia L, Grube M, Tomasi S, Suzuki MT. 2015. Littoral lichens as a novel source of potentially bioactive Actinobacteria. *Sci. Rep.* 5(1):15839
- 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(1):1–7
- 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 Microbiol. Ecol.* 98(2):1–17
- Peksa O, Škaloud P. 2011. Do photobionts influence the ecology of lichens? A case study of environmental preferences in symbiotic green alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae). *Mol. Ecol.* 20(18):3936–48
- Pereyra RT, Bergström L, Kautsky L, Johannesson K. 2009. Rapid speciation in a newly opened postglacial marine environment, the Baltic Sea. *BMC Evol. Biol.* 9(1):1–9
- Pérez-Ortega S, Miller KA, De Los Ríos A. 2018. Challenging the lichen concept: *Turgidosculum ulvae* (Verrucariaceae) represents an independent photobiont shift to a multicellular blade-like alga. *Lichenol.* 50(3):341–56
- Pérez-Ortega S, Ríos A de los, Crespo A, Sancho LG. 2010. Symbiotic lifestyle and phylogenetic relationships of the bionts of *Mastodia tessellata* (Ascomycota, incertae sedis). *Am. J. Bot.* 97(5):738–52
- Peters AF, Moe RL. 2001. DNA Sequences Confirm that *Petroderma maculiforme* (Phaeophyceae) is the Brown Algal Phycobiont of the Marine Lichen *Verrucaria tavaresiae* (Verrucariales, Ascomycota) from Central California. *Bull. Calif. Lichen Soc.* 8(2):41–43
- Piercey-Normore MD, Deduke C. 2011. Fungal farmers or algal escorts: Lichen adaptation from the algal perspective. *Mol. Ecol.* 20(18):3708–10
- Piercey-Normore MD, DePriest PT. 2001. Algal switching among lichen symbioses. *Am. J. Bot.* 88(8):1490–98
- Pino-Bodas R, Stenroos S. 2021. Global Biodiversity Patterns of the Photobionts Associated with the Genus *Cladonia* (Lecanorales, Ascomycota). *Microb. Ecol.* 82(1):173–87
- Quigley KM, Bay LK, Willis BL. 2017. Temperature and water quality-related patterns in sediment-associated *Symbiodinium* communities impact symbiont uptake and fitness of juveniles in the genus *Acropora*. *Front. Mar. Sci.* 4:401
- R Core Team. 2022. R: A Language and Environment for Statistical Computing. <http://www.r-project.org/>
- Rambold G, Friedl T, Beck A. 1998. Photobionts in Lichens: Possible Indicators of Phylogenetic Relationships? *Bryologist.* 101(3):392–97

- Ramkaer K. 1978. The influence of salinity on the establishment phase of rocky shore lichens. *Bot. Tidsskr.* 72(2–3):119–23
- Rastogi RP, Richa, Sinha RP, Singh SP, Häder DP. 2010. Photoprotective compounds from marine organisms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37(6):537–58
- Rikkinen J. 1995. What's behind the Pretty Colours: A Study on the Photobiology of Lichens. *Bryobrothera, Finnish Bryol. Soc.* 4:1–239
- Rikkinen J. 2003. Ecological and evolutionary role of photobiont-mediated guilds in lichens. *Symbiosis.* 34(2):99–110
- Rikkinen J, Oksanen I, Lohtander K. 2002. Lichen Guilds Share Related Cyanobacterial Symbionts. *Science (80-)*. 297(5580):357–357
- Rippin M, Borchhardt N, Williams L, Colesie C, Jung P, et al. 2018. Genus richness of microalgae and Cyanobacteria in biological soil crusts from Svalbard and Livingston Island: morphological versus molecular approaches. *Polar Biol.* 41(5):909–23
- Robinson IS. 1983. A tidal flushing model of the Fleet-an English tidal lagoon. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 16(6):669–88
- Rojas-Jimenez K, Rieck A, Wurzbacher C, Jürgens K, Labrenz M, Grossart H-P. 2019. A Salinity Threshold Separating Fungal Communities in the Baltic Sea. *Front. Microbiol.* 10:680
- Rolshausen G, Dal Grande F, Sadowska-Deś AD, Otte J, Schmitt I. 2018. Quantifying the climatic niche of symbiont partners in a lichen symbiosis indicates mutualist-mediated niche expansions. *Ecography (Cop.)*. 41(8):1380–92
- Rolshausen G, Hallman U, Grande FD, Otte J, Knudsen K, Schmitt I. 2020. Expanding the mutualistic niche: parallel symbiont turnover along climatic gradients. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 287:20192311
- Romeike J, Friedl T, Helms G, Ott S. 2002. Genetic diversity of algal and fungal partners in four species of *Umbilicaria* (lichenized ascomycetes) along a transect of the Antarctic Peninsula. *Mol. Biol. Evol.* 19(8):1209–17
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, et al. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Syst. Biol.* 61(3):539–42
- Rouf AJMA, Ambak MA, Shamsudin L, Phang SM, Ho SC. 2008. Temporal changes in the periphytic algal communities in a drowned tropical forest reservoir in Malaysia: Lake Kenyir. *Lakes Reserv. Res. Manag.* 13(4):271–87
- Ruppert KM, Kline RJ, Rahman MS. 2019. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Glob. Ecol. Conserv.* 17:e00547
- Sanders WB. 2014. Complete life cycle of the lichen fungus *Calopadia puiggarii* (Pilocarpaceae, Ascomycetes) documented in situ: Propagule dispersal, establishment of symbiosis, thallus development, and formation of sexual and asexual reproductive structures. *Am. J. Bot.* 101(11):1836–48
- Sanders WB, Masumoto H. 2021. Lichen algae: the photosynthetic partners in lichen symbioses. *Lichenol.* 53(5):347–93

- Sanders WB, Moe RL, Ascaso C. 2004. The intertidal marine lichen formed by the pyrenomycete fungus *Verrucaria tavaresiae* (Ascomycotina) and the brown alga *Petroderma maculiforme* (Phaeophyceae): Thallus organization and symbiont interaction. *Am. J. Bot.* 91(4):511–22
- Sanders WB, Moe RL, Ascaso C. 2005. Ultrastructural study of the brown alga *Petroderma maculiforme* (Phaeophyceae) in the free-living state and in lichen symbiosis with the intertidal marine fungus *Verrucaria tavaresiae* (Ascomycotina). *Eur. J. Phycol.* 40(4):353–61
- Schubert H, Feuerpfeil P, Marquardt R, Telesh I, Skarlato S. 2011. Macroalgal diversity along the Baltic Sea salinity gradient challenges Remane's species-minimum concept. *Mar. Pollut. Bull.* 62(9):1948–1956
- Scott GD. 1967. Studies of The Lichen Symbiosis: 3. the Water Relations of Lichens on Granite Kopjes in Central Africa. *Lichenol.* 3(3):368–85
- Seaward MRD. 2008. Environmental role of lichens. In *Lichen Biology*, pp. 274–98. Cambridge University Press
- Sheard JW. 1968. The Zonation of Lichens on Three Rocky Shores of Inishowen, Co. Donegal. *Proc. R. Ir. Acad. B.* 66(8):101–12
- Sigurbjörnsdóttir MA, Heidmarsson S, Jónsdóttir AR, Vilhelmsson O. 2014. Novel bacteria associated with Arctic seashore lichens have potential roles in nutrient scavenging. *Can. J. Microbiol.* 60(5):307–17
- Škaloud P, Rindi F. 2013. Ecological differentiation of cryptic species within an asexual protist morphospecies: A case study of filamentous green alga *Klebsormidium* (Streptophyta). *J. Eukaryot. Microbiol.* 60(4):350–62
- Škaloud P, Rindi F, Boedeker C, Leliaert F. 2018. *Freshwater Flora of Central Europe, Vol 13: Chlorophyta: Ulvophyceae*. Berlin: Springer Spektrum
- 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
- Slocum RD, Ahmadjian V, Hildreth KC. 1980. Zoosporogenesis in *Trebouxia gelatinosa*: Ultrastructure Potential for Zoospore Release and Implications for the Lichen Association. *Lichenol.* 12(2):173–87
- Smith CW, Aptroot A, Coppins BJ, Fletcher A, Gilbert OL, et al. 2009. *The Lichens of Great Britain and Ireland*. London: British Lichen Society
- Sonina A V, Androsova VI. 2020. Coastal Lichens. In *Handbook of Halophytes*, pp. 1–22. Cham: Springer International Publishing
- Spribille T, Tuovinen V, Resl P, Vanderpool D, Wolinski H, et al. 2016. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science.* 353(6298):488–92
- Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* 30(9):1312–13
- Starr R. C., Zeikus J. A. 1993. UTEX — The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin. *J. Phycol.* 29(s2):1–106

- Steinová J, Holien H, Košuthová A, Škaloud P. 2022. An Exception to the Rule? Could Photobiont Identity Be a Better Predictor of Lichen Phenotype than Mycobiont Identity? *J. Fungi*. 8(3):275
- Telesh I, Schubert H, Skarlato S. 2013. Life in the salinity gradient: Discovering mechanisms behind a new biodiversity pattern. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 135:317–27
- Thüs H, Aptroot A, Seaward MRD. 2014. 15. Freshwater lichens. In *Freshwater Fungi*, pp. 333–58. Berlin: De Gruyter
- Thüs H, Muggia L, Pérez-Ortega S, Favero-Longo SE, Joneson S, et al. 2011. Revisiting photobiont diversity in the lichen family Verrucariaceae (Ascomycota). *Eur. J. Phycol.* 46(4):399–415
- Topstad L, Guidetti R, Majaneva M, Ekrem T. 2021. Multi-marker dna metabarcoding reflects tardigrade diversity in different habitats. *Genome*. 64(3):217–31
- Tschermak-Woess E. 1989. The algal partner. In *CRC Handbook of Lichenology, Volume I*, ed. M Galun, pp. 39–92. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.
- Vančurová L, Kalníková V, Peksa O, Škvorová Z, Malíček J, et al. 2020. Symbiosis between river and dry lands: Phycobiont dynamics on river gravel bars. *Algal Res.* 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(14):3016–33
- Větrovský T, Morais D, Kohout P, Lepinay C, Algora C, et al. 2020. GlobalFungi, a global database of fungal occurrences from high-throughput-sequencing metabarcoding studies. *Sci. Data.* 7(1):228
- Voytsekhovich A, Beck A. 2016. Lichen photobionts of the rocky outcrops of Karadag massif (Crimean Peninsula). *Symbiosis*. 68(1–3):9–24
- Watanabe S, Nakano T, Deguchi H. 1997. Photobionts isolated from maritime lichens. *J. Mar. Biotechnol.* 5(2–3):103–12
- Watson EB, Byrne R. 2009. Abundance and diversity of tidal marsh plants along the salinity gradient of the San Francisco Estuary: Implications for global change ecology. *Plant Ecol.* 205(1):113–28
- West JA, McBride DL. 1999. Long-term and diurnal carpospore discharge patterns in the Ceramiaceae Rhodomelaceae and Delesseriaceae (Rhodophyta). In *Sixteenth International Seaweed Symposium*, Vols. 398–399, pp. 101–13. Dordrecht: Springer Netherlands
- West NJ, Parrot D, Fayet C, Grube M, Tomasi S, Suzuki MT. 2018. Marine cyanolichens from different littoral zones are associated with distinct bacterial communities. *PeerJ*. 2018(7):1–29
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In *PCR Protocols*, pp. 315–22. Amsterdam: Elsevier

- Wirtz N, Lumbsch HT, Green TGA, Türk R, Pintado A, et al. 2003. Lichen fungi have low cyanobiont selectivity in maritime Antarctica. *New Phytol.* 160(1):177–83
- Wolseley PA, James PW, Coppins BJ, Purvis OW. 1996. Lichens of Skomer Island, West Wales. *Lichenologist.* 28(6):543–70
- Yahr R, Vilgays R, DePriest PT. 2004. Strong fungal specificity and selectivity for algal symbionts in Florida scrub *Cladonia* lichens. *Mol. Ecol.* 13(11):3367–78
- Zúñiga C, Leiva D, Carú M, Orlando J. 2017. Substrates of *Peltigera* Lichens as a Potential Source of Cyanobionts. *Microb. Ecol.* 74(3):561–69

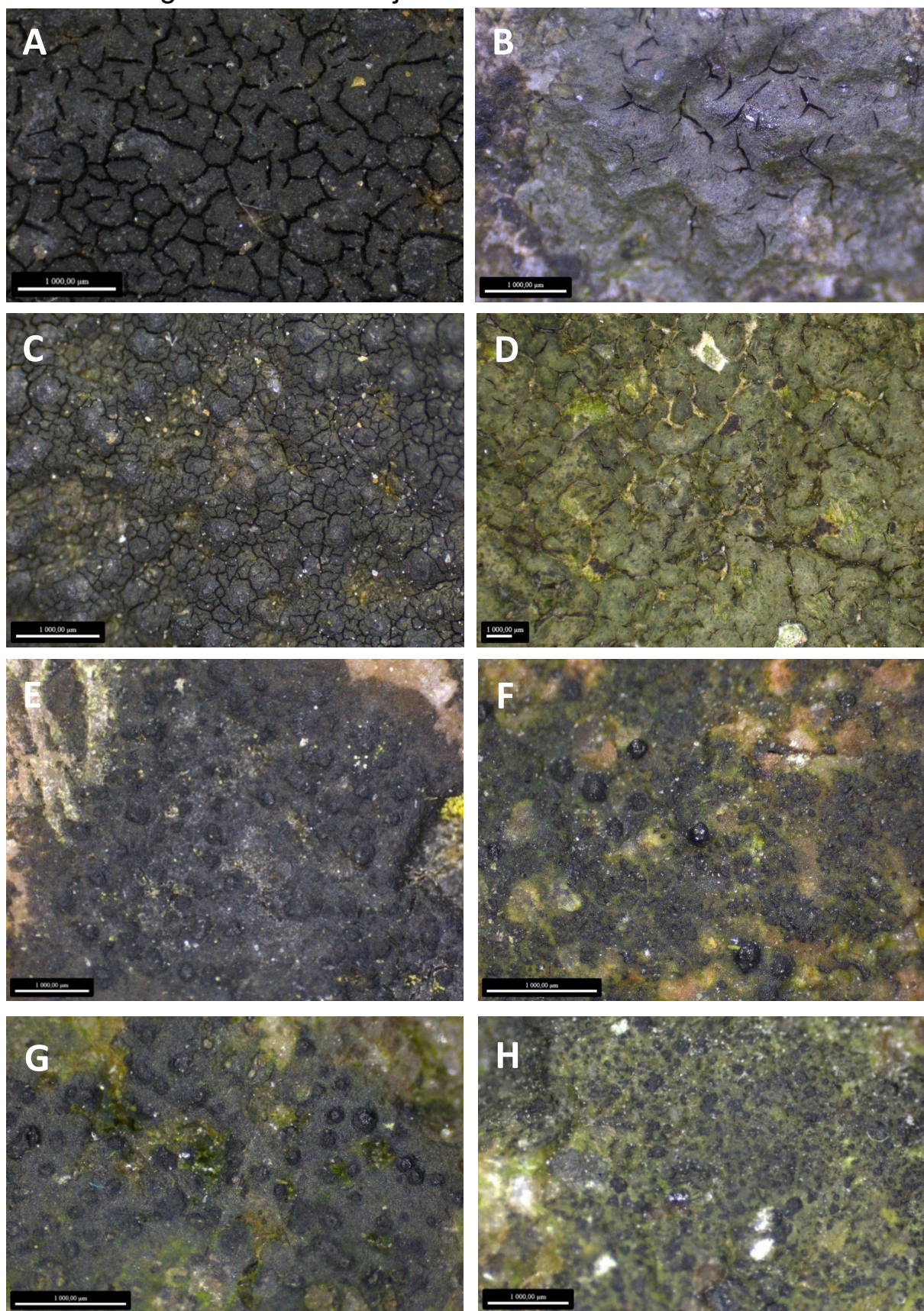
8. Přílohy

8.1 Lokality metabarcodingu



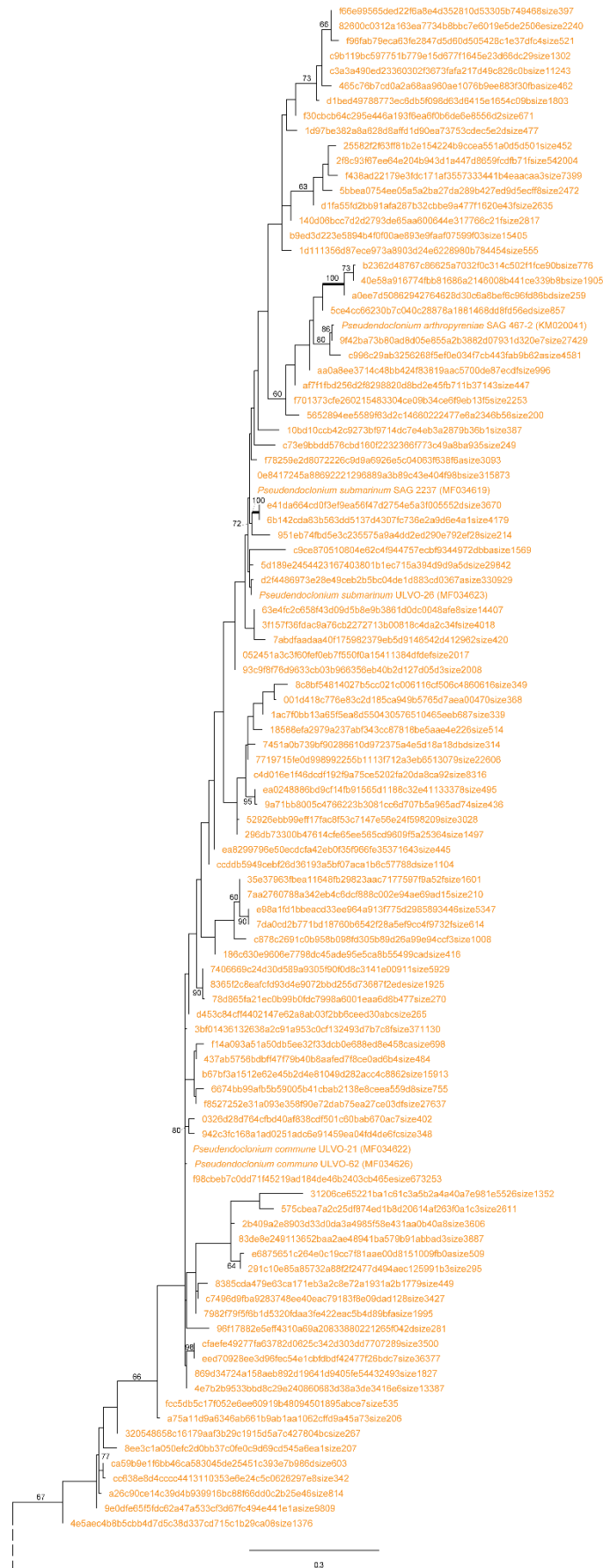
A – Bornholm, Nexø (1); B – Bornholm, Balka (2); C – Švédsko, Kullaberg, Ransvik (7); D – Švédsko, Kullaberg (8); E – Švédsko, Laxvik (11); F – Švédsko, Barsebäckshamn (14 a 16).

8.2 Morfologie litorálních lišejníků

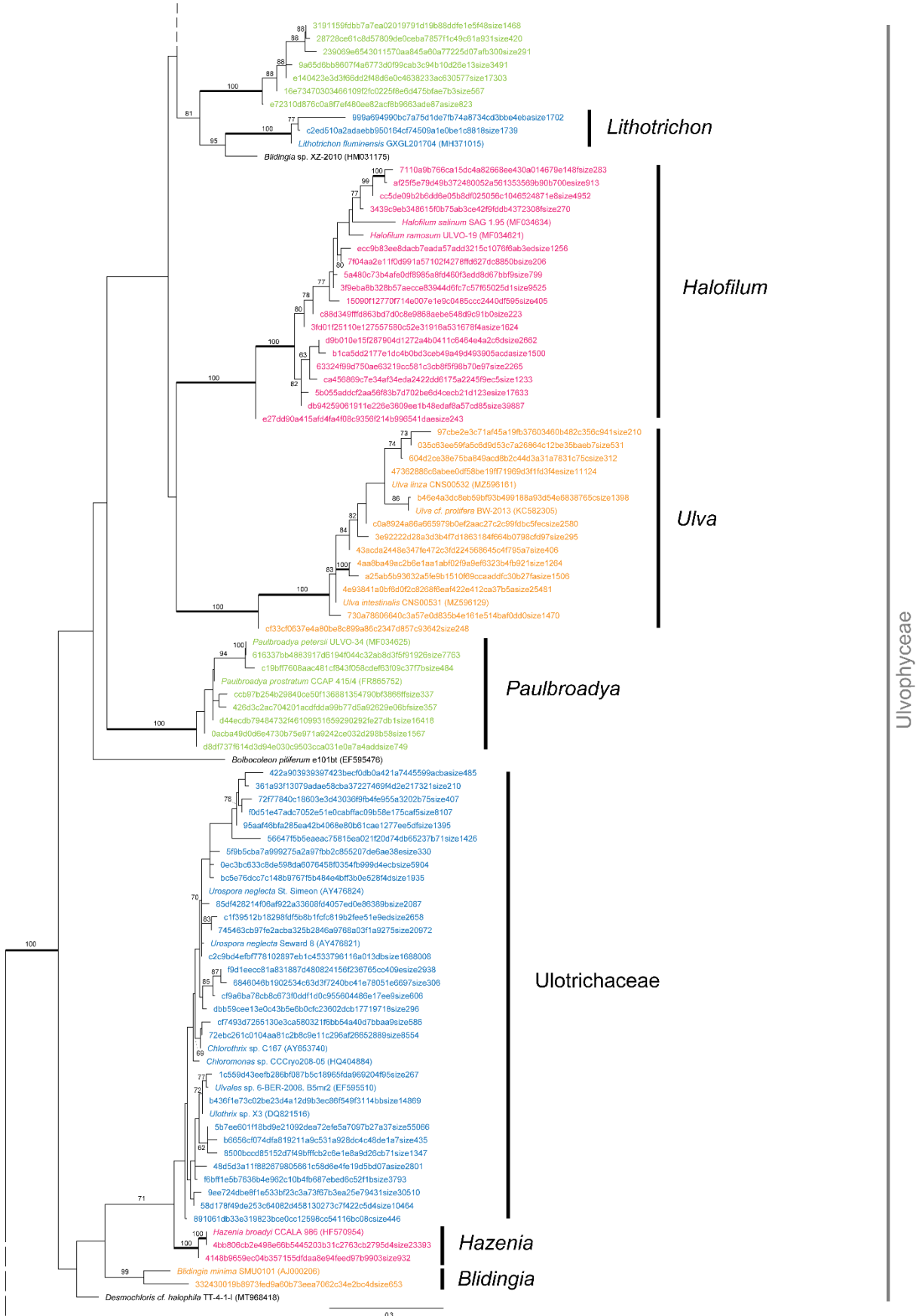


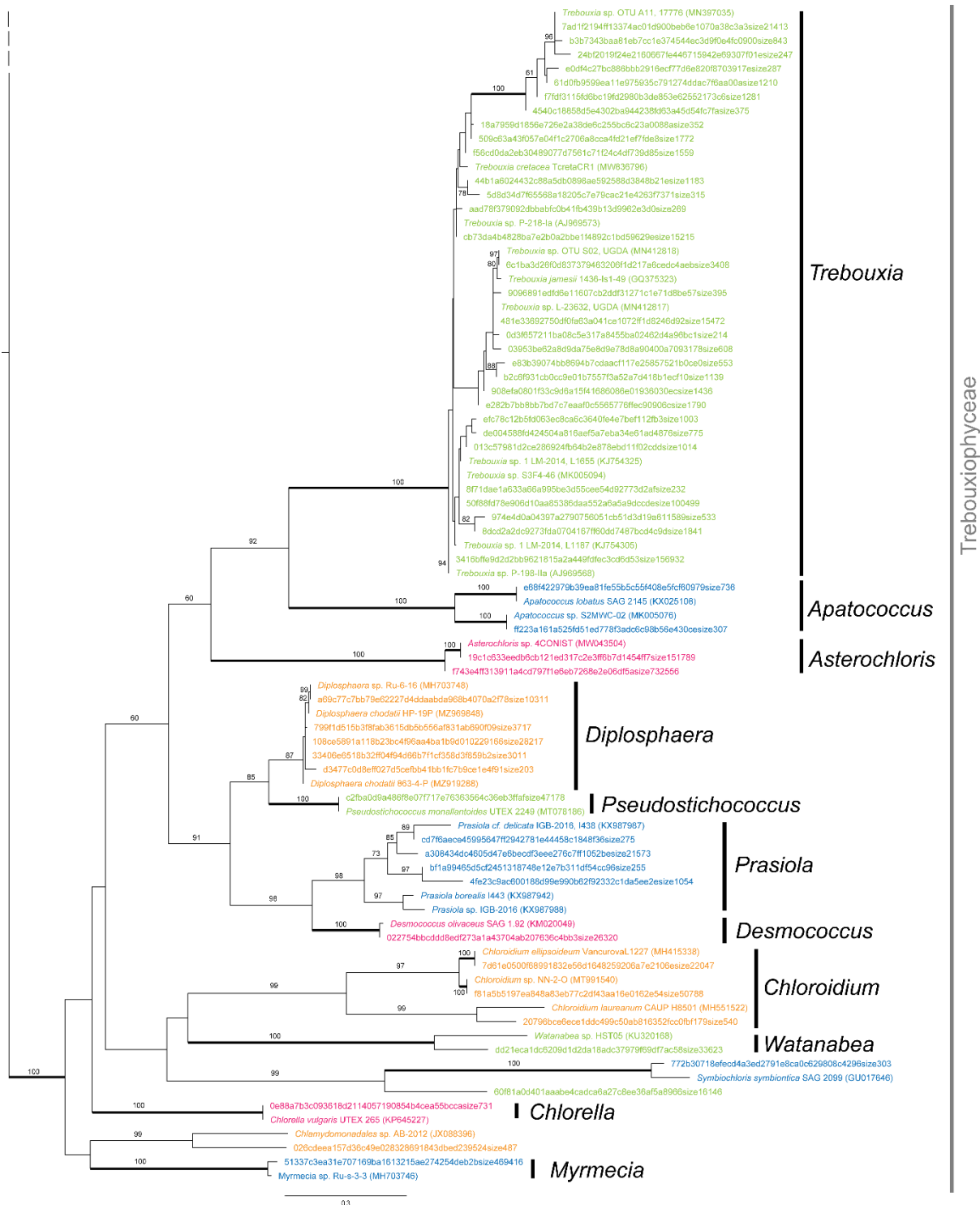
A – *H. maura* (112); B – *H. aractina* (91); C – *H. oceanica* (103); D – *V. ceuthocarpa* (16(2)); E – *V. ditmarsica*1 (29); F – *V. ditmarsica*2 (135); G – V1 (15); H – V2 (137); měřítko = 1000 µm.; foto: Ivana Černajová

8.3 Fylogenetický strom metabarcodových sekvencí



Pseudendoconium
(Ulvophyceae)





Fylogenetický strom třídy Ulvophyceae a Trebouxiophyceae získaný na základě ITS2 rDNA metabarcodingem pomocí metody Maximum Likelihood (ML). Hodnoty na větvích udávají statistickou podporu větvení: bootstrapy ML jsou uvedeny jen od hodnot >60, zvláště jsou větve s plnou podporou. U sekvencí z GenBanku jsou uvedeny kódy označující jednotlivé kmeny (pokud byly k dispozici) a v závorce je přístupové číslo z GenBanku. Barevné rozlišení linií je pro lepší orientaci.

8.4 Přehledová tabulka

Fialově jsou označeny položky v jejichž bezprostřední blízkosti byly odebírány vzorky pro metabarcoding; zeleně fotobionti, které se podařilo vykultivovat.

kód položky	stát	region	oblast	lokalita	GPS souřadnice	habitat; substrát	mykobiont	fotobiont	salinita	legit; datum
1	Dánsko	Bornholm	Nexo	Nexo	55°04'51.6"N 15°09'21.5"E	skalnaté pobřeží, kámen v bahně	<i>H. maura</i> , <i>H. aractina</i> (B1-2)	<i>P. submarinum</i>	1	Z. Škvorová, I. Jadrná 06.09.2020
2	Dánsko	Bornholm	Balka	Balka	55°02'32.6"N 15°06'57.2"E	mírně svažující se skalnaté pobřeží	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	Z. Škvorová, I. Jadrná 07.09.2020
3	Dánsko	Bornholm	Svaneke	Grisby	55°07'10.8"N 15°08'49.7"E	skalnaté pobřeží s travinami	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	Z. Škvorová, I. Jadrná 07.09.2020
4	Dánsko	Bornholm	Arsdale	Hammerknuden	55°17'41.9"N 14°46'44.3"E	skalnaté pobřeží	-	<i>P. submarinum</i>	1	Z. Škvorová, I. Jadrná 10.09.2020
5	Dánsko	Bornholm	Arsdale	Osand Bugt	55°17'29.0"N 14°46'40.1"E	u parkoviště; skalnaté výběžky v moři, kámen v dostřiku	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	Z. Škvorová, I. Jadrná 10.09.2020
6	Dánsko	Bornholm	Arsdale	Osand Bugt	55°17'29.0"N 14°46'40.1"E	u parkoviště; skalnaté výběžky v moři, kámen pod vodou	<i>H. maura</i>	<i>Pseudoclonium</i> sp. (P1)	1	Z. Škvorová, I. Jadrná 10.09.2020
7	Švédsko	Skåne	Höganäs	Kullaberg, Ransvik	56°17'27.9"N 12°28'34.7"E	skály na pláži; křemičitá hornina, černé pásmo	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	2	I. Černajová, J. Schmidtová, I. Jadrná, P. Škaloud 31.05.2021
8	Švédsko	Skåne	Höganäs	Kullaberg	56°17'58.6"N 12°28'58.0"E	útesy na malé kamenité pláži; křemičitá hornina, černé pásmo	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	2	I. Černajová, J. Schmidtová 31.05.2021

11	Švédsko	Halland	Halmstad	Laxvik, pláž	56°35'51.2"N 12°55'16.2"E	skalnatý výběžek do moře na písečné pláži; křemičitá hornina, černé pásmo	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	2	I. Černajová, J. Schmidtová, I. Jadrná, P. Škaloud 01.06.2021
12	Švédsko	Västra Götaland	Lysekil	Fiskebäck	57°38'59.5"N 11°50'42.3"E	skála severozápadně od pláže; křemičitá hornina	<i>H. maura</i>	<i>P. commune</i>	2	I. Černajová, J. Schmidtová, I. Jadrná, P. Škaloud 04.06.2021
13	Švédsko	Västra Götaland	Lysekil	Fiskebäck	57°38'59.5"N 11°50'42.3"E	skála severozápadně od pláže; křemičitá hornina	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	2	I. Černajová, J. Schmidtová, I. Jadrná, P. Škaloud 04.06.2021
14	Švédsko	Skåne	Kävlinge	Barsebäckshamn	55°45'11.2"N 12°54'08.6"E	balvany na pláži, blízko domy a přístav, kameny naproti lavičce, u ústí kanálu; žula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	2	J. Schmidtová M. Malý 06.11.2021
15	Švédsko	Skåne	Kävlinge	Barsebäckshamn	55°45'11.2"N 12°54'08.6"E	balvany na pláži, blízko domy a přístav, kameny naproti lavičce, u ústí kanálu; žula	<i>Verrucariaceae</i> <i>sp. (V1)</i>	<i>P. commune</i>	2	J. Schmidtová M. Malý 06.11.2021
16(1)	Švédsko	Skåne	Kävlinge	Barsebäckshamn	55°45'11.2"N 12°54'08.6"E	balvany na pláži, blízko domy a přístav, kameny naproti lavičce, u ústí kanálu; žula	<i>V. ditmarsica1</i>	<i>P. commune, P.</i> <i>commune + P.</i> <i>submarinum</i> <i>(16(1)-4)</i>	2	J. Schmidtová M. Malý 06.11.2021

16(2)	Švédsko	Skåne	Kävlinge	Barsebäckshamn	55°45'11.2"N 12°54'08.6"E	balvany na pláži, blízko domy a přístav, kameny naproti lavičce, u ústí kanálu; žula	<i>V. ceuthocarpa</i>	<i>Urospora</i> sp., <i>P. aff. arthrospyreniae</i>	2	J. Schmidtová M. Malý 06.11.2021
17	Švédsko	Skåne	Kävlinge	Barsebäckshamn	55°45'11.2"N 12°54'08.6"E	balvany na pláži, blízko domy a přístav, kameny naproti lavičce, u ústí kanálu; žula	<i>V. ceuthocarpa</i>	<i>Urospora</i> sp., <i>P. aff. arthrospyreniae</i>	2	J. Schmidtová M. Malý 06.11.2021
28	Německo	Mecklenburg-Vorpommern	Vorpommern-Rügen	ostrov Rügen, Lauterbach, Greifswalder Bodden, přírodní rezervace Goor-Muglitz, východní pobřeží Lauterbachu	54°20'26.4"N 13°31'33.1"E	písečná pláž s balvany, svislá stěna balvanu; žula	<i>V. ditmarsica1</i>	<i>P. commune</i>	1	U. Schiefelbein 11.04.2019
29	Německo	Mecklenburg-Vorpommern	Vorpommern-Rügen	ostrov Rügen, Lauterbach, Greifswalder Bodden, přírodní rezervace Goor-Muglitz, východní pobřeží Lauterbachu	54°20'26.4"N 13°31'33.1"E	písečná pláž s balvany, vodorovný povrch balvanu; žula	<i>V. ditmarsica1</i>	<i>P. commune</i>	1	U. Schiefelbein 11.04.2019
30	Německo	Mecklenburg-Vorpommern	Vorpommern-Rügen	ostrov Rügen, Lauterbach, Greifswalder Bodden, přírodní rezervace Goor-Muglitz, východní pobřeží Lauterbachu	54°20'26.3"N 13°31'23.8"E	písečná pláž s balvany, svislá stěna balvanu; žula	<i>V. ditmarsica1</i>	<i>P. submarinum</i> + <i>P. commune</i>	1	U. Schiefelbein 11.04.2019
31	Německo	Mecklenburg-Vorpommern	Vorpommern-Rügen	ostrov Rügen, Binz, východní pobřeží Binzu	54°23'55.1"N 13°37'32.9"E	písečná pláž s balvany, vodorovný povrch balvanu, horní hydrolitorál; žula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schiefelbein 11.04.2019

32	Německo	Mecklenburg-Vorpommern	Vorpommern-Rügen	ostrov Rügen, Lohme, pobřeží severně od Lohme	54°35'06.4"N 13°37'01.6"E	oblázková pláž s balvany, vodorovný povrch balvanu, horní hydrolitorál; žula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schiefelbein 11.04.2019
33	Německo	Mecklenburg-Vorpommern	Vorpommern-Rügen	ostrov Rügen, Lohme, pobřeží severně od Lohme	54°35'06.4"N 13°37'01.6"E	oblázková pláž s balvany, vodorovný povrch balvanu, dolní geolitorál; žula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schiefelbein 11.04.2019
34	Německo	Mecklenburg-Vorpommern	Vorpommern-Rügen	ostrov Rügen, Lohme, pobřeží severně od Lohme	54°35'06.4"N 13°37'01.6"E	oblázková pláž s balvany, vodorovný povrch balvanu, střední geolitorál; žula	<i>H. maura</i>	-	1	U. Schiefelbein 11.04.2019
37	Německo	Mecklenburg-Vorpommern	Vorpommern-Rügen	ostrov Rügen, pobřeží severně od Varnkewitz	54°40'54.4"N 13°22'08.8"E	oblázková pláž s balvany, vodorovný povrch balvanu, hranice mezi dolním a středním geolitorálem; žula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schiefelbein 11.04.2019
38	Německo	Mecklenburg-Vorpommern	Vorpommern-Rügen	ostrov Rügen, pobřeží severně od Varnkewitz	54°40'55.4"N 13°22'16.1"E	pláž s balvany, vodorovný povrch balvanu, hranice horního hydrolitorálu a spodního geolitorálu; žula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schiefelbein 11.04.2019

39	Německo	Mecklenburg-Vorpommern	Vorpommern-Rügen	ostrov Rügen, Lauterbach, Greifswalder Bodden, přírodní rezervace Goor-Muglitz, východní pobřeží Lauterbachu	54°20'26.7"N 13°31'28.4"E	písečná pláž s balvany, svislá stěna balvanu; žula	<i>V. ditmarsica1</i>	<i>P. commune</i>	1	U. Schiefelbein 11.04.2019
40	Nizozemsko	Groningen	Delfzijl	Termunten, hráz západně od Temunterzijl	53°18'13.8"N 07°01'10.2"E	mořská hráz; křemičitá hornina	<i>H. maura</i>	-	3	W. Linders 19.05.2019
41	Nizozemsko	Groningen	Delfzijl	Termunten, hráz západně od Temunterzijl	53°18'13.8"N 07°01'10.2"E	mořská hráz; křemičitá hornina	-	<i>P. submarinum</i>	3	W. Linders 19.05.2019
44	Finsko	Uusimaa	Helsinki	Helsinki, Hevossalmi, pobřeží na západ od silnice Lajaasalontie	60°09'36.3"N 25°02'46.9"E	mírně se svažující skalnaté pobřeží s balvany; křemičitá hornina	<i>H. maura</i>	-	1	U. Schiefelbein 11.06.2019
45	Finsko	Uusimaa	Helsinki	Helsinki, Hevossalmi, pobřeží na západ od silnice Lajaasalontie	60°09'33.9"N 25°02'43.9"E	mírně se svažující skalnaté pobřeží s balvany; rula	<i>H. maura</i>	-	1	U. Schiefelbein 11.06.2019
46	Finsko	jihozápadní Finsko	Pargas	ostrov Kyrklandet, východní pobřeží, severně od přístavu Retais-Pärnäs	60°09'59.1"N 21°41'29.5"E	mírně se svažující skalnaté pobřeží; rula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schiefelbein 12.06.2019
47	Finsko	jihozápadní Finsko	Pargas	ostrov Mossala, severní pobřeží, východně od přístavu Mossala-Iniö	60°17'19.8"N 21°26'23.1"E	mírně se svažující skalnaté pobřeží, nejnižší část skalnatá; žula	<i>H. maura</i>	-	1	U. Schiefelbein 13.06.2019

48	Finsko	jihozápadní Finsko	Pargas	ostrov Mossala, severní pobřeží, východně od přístavu Mossala-Iniö	60°17'19.8"N 21°26'23.1"E	mírně se svažující skalnaté podloží, ve vyšších částech pukliny s mechy; žula	<i>H. aractina</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schiefelbein 13.06.2019
49	Finsko	jihozápadní Finsko	Pargas	ostrov Lillandet, severní pobřeží, západně od přístavu Prosvik-Lillmälö	60°13'16.0"N 22°05'43.5"E	skalnaté pobřeží; žula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schiefelbein 12.06.2019
50	Finsko	jihozápadní Finsko	Kustavi	ostrov Mussalo, jižní pobřeží, kemp Mussalo	60°32'03.4"N 21°32'16.2"E	mírně se svažující skalnaté pobřeží; rula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schiefelbein 13.06.2019
51	Finsko	jihozápadní Finsko	Naantali	ostrůvek mezi Luonnonmaa a Naantali, západně od silnice	60°27'42.1"N 22°01'05.9"E	mírně se svažující skalnaté pobřeží; žula	<i>H. maura</i>	-	1	U. Schiefelbein 14.06.2019
53	Finsko	jihozápadní Finsko	Pargas	ostrov Jumo, severní pobřeží, východně od přístavu Heponiemi-Kannvik	60°26'19.1"N 21°23'37.9"E	mírně se svažující skalnaté pobřeží, kameny v zasolené pastvině; žula?	<i>H. maura</i>	-	1	U. Schiefelbein 13.06.2019
54	Finsko	Ålandy	Lemland	Herrö, východní pobřeží od Herrövägen	59°58'16.5"N 20°11'01.8"E	pláž s balvany; žula	<i>H. maura</i>	-	1	U. Schiefelbein 15.06.2019
55	Finsko	Ålandy	Lemland	Herrö, jižní mys, západně od Herröskatans fågeltorn	59°58'10.0"N 20°10'38.6"E	mírně se svažující skalnaté pobřeží; žula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schiefelbein 15.06.2019
57	Finsko	Ålandy	Saltvik	Hamnsundet, přístav	60°22'29.0"N 20°05'13.0"E	mírně se svažující skalnaté pobřeží; žula	<i>H. maura</i>	-	1	U. Schiefelbein 16.06.2019

59	Finsko	Ålandy	Lemland	ostrov Järsö, jihozápadní pobřeží, přístav západně od Langnäsvägen	60°00'41.5"N 19°59'07.8"E	přístavní zed'; žula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schiefelbein 16.06.2019
60	Švédsko	Stockholm	Norrtälje Municipality	Kapellskär, poloostrov severně od kempu	59°42'39.6"N 19°03'02.9"E	pláž s balvany; žula	<i>H. maura</i>	<i>Pseudoclonium</i> sp. (P3)	1	U. Schiefelbein 17.06.2019
64	Švédsko	Södermanland	Nyköping Municipality	Trosa, ostrov Obolandet, jižní pobřeží, kemp	58°52'16.2"N 17°34'35.3"E	mírně se svažující skalnaté pobřeží; rula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schiefelbein 19.06.2019
65	Švédsko	Södermanland	Nyköping Municipality	Näveksvarn, ostrov Skaret, jižně od Näveksvarn, západní pobřeží	58°37'26.0"N 16°47'32.6"E	mírně se svažující skalnaté pobřeží; rula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schiefelbein 20.06.2019
66	Švédsko	Södermanland	Nyköping Municipality	Näveksvarn, ostrov Skaret, jižně od Näveksvarn, jihovýchodní pobřeží	58°37'23.6"N 16°47'45.2"E	mírně se svažující skalnaté pobřeží; rula	<i>H. aractina</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schiefelbein 20.06.2019
67	Švédsko	Östergötland	Norrköping Municipality	Östra Husby, Skenäs, fjord Bråviken, východně od přístavu, Skenäsleden	58°37'43.0"N 16°35'42.7"E	mírně se svažující skalnaté pobřeží; rula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schiefelbein 21.06.2019
69	Švédsko	Östergötland	Valdemarsvik Municipality	Gryt, poloostrov Ekön, jihovýchodně od kempu	58°10'19.5"N 16°51'15.4"E	mírně se svažující skalnaté pobřeží; rula	<i>H. maura</i>	-	1	U. Schiefelbein 21.06.2019
70	Švédsko	Östergötland	Valdemarsvik Municipality	Gryt, poloostrov Ekön, jižně od kempu	58°10'16.3"N 16°50'55.4"E	mírně se svažující skalnaté pobřeží; rula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schiefelbein 21.06.2019
71	Švédsko	Kalmar	Västervik Municipality	Västervik, zátoka cca 10 km severozápadně od Västerviku	57°50'03.5"N 16°32'34.1"E	stinná kamenitá pláž; rula	<i>H. maura</i>	-	1	U. Schiefelbein 22.06.2019

72	Švédsko	Kalmar	Västervik Municipality	Västervik, poloostrov Judön, kemp Västervik, jihovýchodně od Västerviku	57°44'02.6"N 16°40'30.0"E	balvany ve slaných pastvinách; rula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schieffelbein 23.06.2019
73	Švédsko	Kalmar	Västervik Municipality	Björnhuvudsjärden, Slingsviken, cca 4,5 km severně od Blankaholmu	57°38'03.6"N 16°30'14.9"E	mírně se svažující skalnaté pobřeží, lokalita zastíněná rákosem; rula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schieffelbein 23.06.2019
75	Švédsko	Kalmar	Västervik Municipality	Västervik, Verkeback, severně od Gunnebo, Verkebacksviken	57°43'34.5"N 16°31'30.5"E	stará mořská zeď; žula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schieffelbein 23.06.2019
76	Švédsko	Kalmar	Borgholm Municipality	ostrov Öland, Byxelkrok, severně od Byxelkroku	57°20'17.8"N 17°00'52.3"E	vápencové podloží, pobřeží s balvany na vápencových deskách; rula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schieffelbein 24.06.2019
78	Švédsko	Kalmar	Borgholm Municipality	ostrov Öland, Trollskogen, východní pobřeží	57°21'23.6"N 17°07'28.5"E	kamennitá vápencová pláž; žula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schieffelbein 24.06.2019
79	Švédsko	Kalmar	Borgholm Municipality	ostrov Öland, Vikegård, východně od kempu	57°04'40.3"N 16°58'30.7"E	kamenná navážka; žula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schieffelbein 25.06.2019
80	Švédsko	Kalmar	Borgholm Municipality	ostrov Öland, Stora Rör, severně od přístavu	56°45'26.3"N 16°31'34.6"E	pláž s balvany; žula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schieffelbein 25.06.2019
81	Švédsko	Kalmar	Kalmar Municipality	Kalmar, ostrov Stensö, severozápadní pobřeží, západně od kempu	56°38'52.2"N 16°19'07.7"E	písečná pláž s jedním balvanem	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schieffelbein 25.06.2019
82	Německo	Mecklenburg-Vorpommern	Vorpommern-Rügen	ostrov Rügen, Jasmund, pobřeží Baltského moře, Hankenufer, cca 2 km na východ od Lohme	54°34'54.6"N 13°38'35.9"E	pláž s balvany; rula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schieffelbein 21.08.2019

83	Švédsko	Skåne	Skurup	Abbekås, pobřeží cca 1 km západně od Abbekåsu	55°23'13.4"N 13°34'30.5"E	pláž s balvany; rula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schiefelbein 06.09.2019
84	Švédsko	Skåne	Ystad	Svarte, pláž pod vesnicí	55°25'34.9"N 13°42'42.2"E	pláž s balvany; rula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schiefelbein 06.09.2019
87	Švédsko	Skåne	Simrishamn	Brantevik, pláž	55°30'56.5"N 14°20'54.1"E	pláž s balvany u ústí potoka	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schiefelbein 06.09.2019
88	Švédsko	Skåne	Kristianstad	Åhus, Yngsjö, pláž severně od Yngsjö	55°48'37.6"N 14°12'41.4"E	stabilizace pobřeží v ústí potoka	<i>Verrucariaceae</i> sp. (V1)	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schiefelbein 06.09.2019
90	Švédsko	Skåne	Kristianstad	Tosteberga, na západ od jachtařského přístavu	55°59'48.9"N 14°26'37.7"E	pláž s balvany; pazourek	-	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schiefelbein 06.09.2019
91	Švédsko	Blekinge	Ronneby	Kugebodda, poloostrov Lindö Udde jižně od Kugeboda	56°07'25.1"N 15°21'06.2"E	balvany v mělké vodě; křemičitá hornina	<i>H. aractina</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schiefelbein 06.09.2019
92	Švédsko	Blekinge	Karlskrona	Torhamn, Torhamns Udde jižně od Torhamnu	56°04'40.6"N 15°50'22.1"E	balvany v mělké vodě; rula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	1	U. Schiefelbein 06.09.2019
93	Švédsko	Skåne	Kävlinge	Barsebäckshamn	55°45'11.6"N 12°54'08.7"E	balvany na pláži; žula	<i>V. ceuthocarpa</i>	<i>Urospora</i> sp.	2	U. Schiefelbein 07.09.2019
95	Švédsko	Skåne	Höganäs	Mölle, Kullaberg, severní strana, severně od golfového hřiště	56°18'00.6"N 12°28'36.5"E	skalnaté pobřeží; pískovec	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	2	U. Schiefelbein 07.09.2019
96	Švédsko	Skåne	Höganäs	Mölle, Kullaberg, severní strana, severně od golfového hřiště	56°18'00.6"N 12°28'36.5"E	skalnaté pobřeží; pískovec	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	2	U. Schiefelbein 07.09.2019
97	Švédsko	Skåne	Höganäs	Mölle, Kullaberg, severní strana, severně od golfového hřiště	56°18'00.6"N 12°28'36.5"E	skalnaté pobřeží	<i>V. ditmarsica1</i>	<i>P. commune</i>	2	U. Schiefelbein 07.09.2019
98	Švédsko	Skåne	Höganäs	Mölle, Kullaberg, severní strana, severně od golfového hřiště	56°18'00.6"N 12°28'36.5"E	skalnaté pobřeží	<i>V. ditmarsica1</i>	<i>P. commune</i>	2	U. Schiefelbein 07.09.2019

99	Švédsko	Skåne	Höganäs	Mölle, Kullaberg, jižní strana, západně od Ransvik Havsveranda	56°17'27.7"N 12°28'28.1"E	skalnaté pobřeží; žula	<i>H. oceanica</i>	-	2	U. Schiefelbein 07.09.2019
101	Švédsko	Halland	Halmstad	Tylösand, pláž jižně od vesnice	56°38'31.3"N 12°44'05.8"E	balvany na pláži; rula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	2	U. Schiefelbein 07.09.2019
102	Švédsko	Halland	Falkenberg	Grimsholmen, pobřeží jižně od vesnice	56°50'23.7"N 12°33'14.5"E	skalní pobřeží; rula	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	2	U. Schiefelbein 08.09.2019
103	Švédsko	Halland	Falkenberg	Grimsholmen, pobřeží jižně od vesnice	56°50'23.7"N 12°33'14.5"E	skalní pobřeží; rula	<i>H. oceanica</i>	<i>P. submarinum</i>	2	U. Schiefelbein 08.09.2019
104	Švédsko	Halland	Varberg	Träslövsläge, pláž na jih od vesnice	57°02'52.0"N 12°16'41.8"E	pláž s balvany; pískovec	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	2	U. Schiefelbein 09.09.2019
106	Švédsko	Halland	Kungsbacka	Åsa, pobřeží na východ od vesnice	57°20'45.3"N 12°04'04.0"E	skalní pobřeží; rula	<i>H. maura</i>	-	2	U. Schiefelbein 09.09.2019
108	Švédsko	Västra Götaland	Göteborg	Hällsvik, pobřeží jižně od vesnice	57°42'01.0"N 11°44'11.3"E	skály v rákosovém pásmu; rula	<i>H. maura</i>	-	2	U. Schiefelbein 09.09.2019
110	Švédsko	Västra Götaland	Kungälv	Kärna, Överön, pobřeží západně od Överönu	57°47'33.1"N 11°43'51.4"E	pobřeží u solné louky; pískovec	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	2	U. Schiefelbein 09.09.2019
112	Švédsko	Västra Götaland	Kungälv	Tjuvkil, Kockholmen, západně od silnice 168 do Marstrandu	57°53'35.1"N 11°42'11.6"E	skalnaté pobřeží; svor	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	2	U. Schiefelbein 09.09.2019
116	Švédsko	Västra Götaland	Tjörn	ostrov Klädesholmen, pobřeží blízko tenisového kurtu	57°56'41.4"N 11°32'05.0"E	skalnaté pobřeží; rula	<i>V. ditmarsica1</i>	<i>P. commune</i>	2	U. Schiefelbein 10.09.2019
117	Švédsko	Västra Götaland	Tjörn	ostrov Tjörn, Skärhamn, pobřeží severně od Smedjebergetu	58°00'22.5"N 11°33'05.7"E	pobřeží u solné louky; rula	<i>V. ditmarsica1</i>	<i>P. commune</i>	2	U. Schiefelbein 10.09.2019
123	Švédsko	Västra Götaland	Kungälv	Kärna, Överön, pobřeží západně od Överönu	57°47'33.1"N 11°43'51.4"E	pobřeží u solné louky	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	2	U. Schiefelbein 09.09.2019

129	Německo	Schleswig-Holstein	Nordfriesland	Pellworm, Hooger Fähre, hráz západně od přístavu trajektu	54°29'55"N 8°35'43"E	pobřežní ochranná zeď, spodní okraj	<i>H. maura</i>	<i>P. submarinum</i>	3	U. Schiefelbein 19.10.2019
133	Německo	Schleswig-Holstein	Nordfriesland	Pellworm, hráz na sever od ulice Parlament	54°31'29.2"N 8°35'16.2"E	pobřežní ochranná zeď	<i>Verrucariaceae</i> sp. (133)	<i>Kornmaniaceae</i> sp. (133)	3	U. Schiefelbein 19.10.2019
134	Německo	Schleswig-Holstein	Nordfriesland	Hamburger Hallig, pobřežní ochranná zeď na západní straně	54°36'01"N 08°48'38.9"E	pobřežní ochranná zeď	<i>Verrucariaceae</i> sp. (V2)	<i>Kornmannia2</i>	3	U. Schiefelbein 20.10.2019
135	Německo	Schleswig-Holstein	Nordfriesland	Hamburger Hallig, pobřežní ochranná zeď na západní straně	54°36'01"N 08°48'38.9"E	pobřežní ochranná zeď	<i>V. ditmarsica2</i>	<i>Pseudoclonium</i> sp. (P2)	3	U. Schiefelbein 20.10.2019
137	Německo	Schleswig-Holstein	Nordfriesland	Hamburger Hallig, severní mys	54°36'13.7"N 08°48'31.5"E	pobřežní ochranná zeď	<i>Verrucariaceae</i> sp. (V2)	<i>Kornmannia2</i>	3	U. Schiefelbein 20.10.2019
138	Německo	Schleswig-Holstein	Nordfriesland	Hamburger Hallig, severní mys	54°36'13.7"N 08°48'31.5"E	pobřežní ochranná zeď	<i>V. ditmarsica2</i>	<i>Pseudoclonium</i> sp. (P2)	3	U. Schiefelbein 20.10.2019
140	Německo	Schleswig-Holstein	Dithmarschen	Friedrichskoog, Trischendamm	54°01'25.5"N 8°48'39.0"E	pobřežní ochranná zeď	<i>V. ditmarsica1</i>	<i>P. commune</i>	3	U. Schiefelbein 20.10.2019