

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Botanika

Studijní obor: N-BOTABR



Bc. Věra Vtípilová

Interakce roztočů a lišejníků na příkladu druhu *Cladonia norvegica*
Mites and lichens interactions on the example of *Cladonia norvegica*

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Jana Steinová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Jan Mourek, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení:

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

V Praze, 8.8. 2024

Věra Vtípilová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala všem svým blízkým, rodině a přátelům za jejich neskonalou podporu po čas mého studia. Zvláštní díky patří školitelce Janě za jemné vedení, nekonečnou trpělivost a za přesah jejích rad. Další velké díky věnuji konzultantovi Honzovi, který se mnou strávil hodiny nad roztoči, ukázal mi jejich krásu a přivedl mě tak na novou životní cestu. Nesmím opomenout ani spolužačku Hedu, se kterou jsem prošla dobrým i zlým během práce v laboratoři, zpracování dat i psaní této práce, byla mým častým zachráncem a laskavou oporou.

Děkuji všem kolegům lichenologům, kteří mi poskytli potřebné položky, konkrétně to byli: Rémi Boisvert, Håkon Holien, Lukáš Jánošík, Piret Lõhmus, Jiří Malíček, Bruce McCune, Zdeněk Palice, David Svoboda a Einar Timdal. Děkuji též Philippu Reslovi a Tobiasi Pflingstlovi za to, že se mě ujali během mé stáže v Grazu a poskytli mi potřebné rady. Děkuji také vedoucím genetických laboratoří za pomoc při práci zde v ČR, i v Rakousku (konkrétně Lence Flaškové a Sylvii Schäffer). Díky patří také Mikrobiologickému ústavu AV ČR, v. v. i. (Laboroři genetiky a metabolismu hub) za provedené analýzy. Děkuji Norským fondům za financování cest do zahraničí nutných pro sběr materiálu. A děkuji iniciativě AKTION (projekt č. 96p3: Studying lichen-mite interactions on the example of *Cladonia norvegica*), ze které byl finančně podpořen vznik této diplomové práce.

Abstrakt

Lišejník druhu *Cladonia norvegica* je známý charakteristickou produkcí nápadného červeného zbarvení, které dle názoru většiny autorů produkuje v reakci na okus roztoči. Na některých lokalitách, včetně středního Norska, odkud byl druh popsán, se vyskytuje bez těchto červených skvrn. Ve své diplomové práci jsem se věnovala tomuto lišejníku, roztočům s ním spjatým a jejich interakci.

V případě lišejníku byly provedeny chemické analýzy (TLC a identifikace červeného barviva pomocí HPLC) a fylogenetické analýzy (s použitím 42 vlastních sekvencí markerů ITS rDNA, mtSSU a EF-1 α). Dále jsem extrahovala roztoče žijící na tomto lišejníku a pomocí molekulárních analýz využívajících úsek D3 markeru 28S rRNA jsem určila nymfy způsobující červenou reakci lišejníku a porovnávala výsledky se spřátelenou laboratoří na Universitě Graz. Dospělce jsem určila pomocí morfologických znaků a společenstva roztočů jsem statisticky analyzovala metodou ANOVA a shlukovou analýzou Wardovou metodou. Dále jsem provedla potravně preferenční testy s nejčastěji se vyskytujícími druhy roztočů (*Carabodes areolatus* a *Carabodes marginatus*) na zkoumaných lišejnících, které jsem následně zpracovala pomocí GLMM analýzy.

Z výsledků fylogenetických analýz vyplynulo, že lišejníky dosud řazené do druhu *Cladonia norvegica* produkující červené barvivo tvoří samostatný, dosud nepopsaný druh (*Cladonia* sp. nov. „*rubrotincta*“), který spadá do skupiny Ochroleucae. Druh *C. norvegica* s. str. zahrnuje materiál morfologicky a chemicky podobný, avšak bez červeného zbarvení, a je dle výsledků molekulárních analýz polyfyletický.

Juvenilní stádia roztočů způsobující červené skvrny na lišejníku *Cladonia* „*rubrotincta*“ jsou *Carabodes areolatus*, *Carabodes labyrinthicus*, *Carabodes marginatus* a *Mycobates carli*. Dospělci těchto druhů jsou častými obyvateli lišejníků i dalších substrátů (mechů, pařezů, lesních půd atd.). Další nalezení roztoči na tomto lišejníku nepatří mezi obvyklé obyvatele lišejníků a zde se vyskytovali pravděpodobně pouze přechodně. Druh *Cladonia norvegica* a okolo se vyskytující druh *Cladonia coniocraea* obsahovaly mezi nejčastějšími roztoči stejné druhy rodu *Carabodes* jako *Cladonia* „*rubrotincta*“.

Na základě provedených potravně preferenčních testech s roztoči druhů *Carabodes areolatus* a *C. marginatus* lze říct, že kyselina rhodokladonová nemá na dané roztoče odpuzující vliv. Druh *C. marginatus* se zdál být naopak touto látkou atrahován. Dále byly pozorovány rozdíly v preferenci roztočů mezi zelenými částmi stélky *Cladonia* „*rubrotincta*“ a *Cladonia norvegica*, přičemž si roztoči druhu *Carabodes areolatus* vybírali převážně lišejník *Cladonia norvegica*, zatímco roztoči druhu *Carabodes marginatus* preferovali lišejník *Cladonia* „*rubrotincta*“.

Klíčová slova

lišejníky, roztoči, interakce, kyselina rhodokladonová, potravně preferenční testy, *Carabodes*, *Cladonia norvegica*

Abstract

The lichen species *Cladonia norvegica* is well known for its characteristic production of striking red spots, which, according to the opinion of most authors, is produced in response to mites grazing on the lichen. In some localities, including central Norway, where the species was described, it occurred without these red spots. In my thesis, I focused on this lichen, the mites associated with it, and their interaction.

Chemical analyses (TLC and identification of red pigment with HPLC) and phylogenetic analyses (using 42 own sequences of ITS rDNA, mtSSU and EF-1 α markers) were performed on the lichen material. Mites living on the lichen thalli were extracted, and the nymphs causing the red reaction were identified by molecular analysis based on the D3 28S segment of rRNA marker, and the results were compared with a laboratory at the University of Graz. Mite adults were determined morphologically and mite communities were statistically analyzed by ANOVA and cluster analysis using Ward's method. Food preference tests were performed with the most frequently occurring mite species (*Carabodes areolatus* and *Carabodes marginatus*) on the studied lichens, which were subsequently processed by GLMM analysis.

The results of phylogenetic analyses showed that the lichens with red spots, previously classified as *Cladonia norvegica*, form a separate, undescribed species (*Cladonia* sp. nov. "*rubrotincta*"), which belongs to the Ochroleucae group. The species *C. norvegica* s. str. is morphologically and chemically similar but without the red pigment. Based on my analyses, it appears to be polyphyletic.

The juvenile stages of mites causing red spots on the lichen *Cladonia "rubrotincta"* are *Carabodes areolatus*, *Carabodes labyrinthicus*, *Carabodes marginatus*, and *Mycobates carli*. Adults of these species are frequent inhabitants of lichens and other substrates (mosses, stumps, forest soils, etc.). Other mites found on this lichen were not common lichen inhabitants and were likely present only temporarily. The lichen species *Cladonia norvegica* and the surrounding species *Cladonia coniocraea* contained the same mite species of the genus *Carabodes* as *Cladonia "rubrotincta"*.

Based on food preference tests performed with the mites *Carabodes areolatus* and *C. marginatus*, it can be concluded that the rhodocladonic acid does not have a repellent effect on these mites. The species *Carabodes marginatus*, on the contrary, seemed to be attracted to this substance. Furthermore, differences in preference between *Cladonia "rubrotincta"* and *Cladonia norvegica* were observed. *Carabodes areolatus* selected lichen species *Cladonia norvegica*, while *Carabodes marginatus* preferred *Cladonia "rubrotincta"*.

Key words

lichens, mites, interactions, rhodocladonic acid, food preference tests, *Carabodes*, *Cladonia norvegica*

Obsah

1.	Úvod	1
1.1.	Interakce lišejníků a bezobratlých živočichů.....	1
1.2.	Interakce lišejníků a roztočů.....	2
1.3.	<i>Cladonia norvegica</i>	3
2.	Cíle práce	6
3.	Materiál a metody	7
3.1.	Lišejník.....	7
3.1.1.	Materiál.....	7
3.1.2.	TLC.....	8
3.1.3.	HPLC a LC-HRMS analýza.....	8
3.1.4.	Molekulární analýza.....	9
3.1.5.	Pozorování červených skvrn na stélce <i>Cladonia norvegica</i>	11
3.2.	Identifikace roztočů.....	12
3.2.1.	Materiál.....	12
3.2.2.	Molekulární analýza nymf.....	12
3.2.3.	Morfologické určování dospělců.....	14
3.2.4.	Vyhodnocení výsledků.....	14
3.3.	Potravně preferenční testy.....	15
3.3.1.	Materiál a příprava testu.....	15
3.3.2.	Založení a průběh testů.....	16
3.3.3.	Statistické zpracování výsledků.....	18
4.	Výsledky	20
4.1.	Lišejník.....	20
4.1.1.	TLC.....	20
4.1.2.	HPLC a LC-HRMS analýza.....	20
4.1.3.	Fylogenetické analýzy.....	21
4.1.4.	Pozorování červených skvrn na stélce <i>Cladonia norvegica</i>	24
4.2.	Identifikace roztočů.....	24
4.2.1.	Nymfy.....	24
4.2.2.	Dospělci.....	25
4.3.	Potravně preferenční testy.....	37
4.3.1.	Experiment SW (červené/zelené).....	37
4.3.2.	Experiment OT (Oslo/Trondheim).....	43
5.	Diskuse	48
5.1.	<i>Cladonia</i> sp. nov. „ <i>rubrotincta</i> “.....	48
5.2.	<i>Cladonia norvegica</i>	50
5.3.	Kyselina rhodokladonová.....	51
5.4.	Roztoči způsobující červenou reakci.....	52
5.5.	Dospělí roztoči žijící na vybraných lišejnících.....	53
5.6.	Potravní testy.....	56
5.7.	Interakce roztočů a lišejníků.....	57
6.	Závěr	58
7.	Seznam literatury	59
8.	Přílohy	68

1. Úvod

1.1. Interakce lišejníků a bezobratlých živočichů

Lišejníky jsou hojně využívány různými skupinami bezobratlých živočichů, pro které slouží zejména jako útočiště nebo zdroj potravy (Peake a James 1967; Gerson 1973; Asplund 2010). Menší druhy (např. želvušky, hlístice, roztoči a chvostoskoci) nacházejí v lišejnících primárně útočiště, zatímco větší druhy, jako jsou plži, brouci a larvy motýlů, je spíše konzumují (Asplund a Wardle 2017). Kromě ochrany zprostředkované stélkami lišejníků, kdy se bezobratlí schovávají uvnitř lišejníku, využívají bezobratlí také maskování pomocí lišejníkových fragmentů, a evolučně získané specifické zbarvení nebo tvar těla připomínající strukturu lišejníků (tzv. mimikry) (Gerson 1973; Nash 2008). Výzkumy ukazují, že bezobratlí preferují lupenité lišejníky před keříčkovitými a korovitými (Stubbs 1989; Fröberg et al. 2003).

Co se týče potravy, bezobratlí konzumují především svrchní kůru a fotobiontí vrstvu lišejníků (Coker 1967; Fröberg et al. 1993; Prinzing 1999; Meier et al. 2002; Asplund 2011), což může být vysvětleno rozdělením sekundárních metabolitů ve stélce (viz níže). Při spásání mohou bezobratlí pasivně přispívat k šíření lišejníkových propagulí prostřednictvím svých těl (Smith 1921; Seaward 1988; Nash 2008), ačkoli v některých (spíše vzácných) případech dochází i k aktivnímu přenosu díky maskování (Nash 2008).

Významnými skupinami bezobratlých živočichů interagujících s lišejníky jsou roztoči (Acari) (Seyd a Seaward 1984; Materna 2000), plži (Gastropoda) (Peake a James 1967; Asplund 2010), vířníci (Rotifera) (Stubbs 1989; Bielańska-Grajner et al. 2011), hlístice (Nematoda) (Siddiqi a Hawksworth 1982; Bokhorst et al. 2015), želvušky (Tardigrada) (Beasley 1978; Collins a Goudie 2020), prvoci (Protozoa) (Šatkauskienė 2014; Collins a Goudie 2020), chvostoskoci (Collembola) (Stubbs 1989; Messuti a Kun 2007) a hmyz (Insecta) (Seaward 1988) a to převážně pisivky (Psocoptera) (Henderson a Hackett 1986; Lücking a Bernecker-Lücking 2000), motýli (Lepidoptera) (Wessels a Wessels 1991; Nash 2008) a brouci (Coleoptera) (Gressitt a Sedlacek 1970; Wessels et al. 1979).

Mezi méně časté skupiny patří pavouci (Araneae) (Søchting a Gjelstrup 1985; Mukherjee et al. 2010) a z hmyzu třísněnky (Thysanoptera) (Monteiro 2002; Mound 2005), rovnokřídlí (Orthoptera) (Seaward 1988; Braun 2011), termity (Isoptera) (Kalshoven 1958; Jones a Gathorne-Hardy 1995), mravenci (Formicidae) (Bailey 1970; Lorentsson a Mattsson 1999), síťokřídlí (Neuroptera) (Skorepa a Sharp 1971) a snovatky (Embioptera) (Gerson 1973; Seaward 1988). Bez doložené interakce, avšak přítomné na lišejnících byly tyto skupiny: z hmyzu dvoukřídlí (Diptera) (Stubbs 1989; Fröberg et al. 2003), škvoři (Dermaptera) (Gerson 1973), jepice (Ephemeroptera) (Stubbs 1989), polokřídlí (Hemiptera) (Gerson 1973; Stubbs 1989) a pošvatky (Plecoptera) (Gerson 1973), a dále pak zástupci kroužkoců (Annelida) (Lücking a Bernecker-Lücking 2000) – konkrétně máloštetinatci (Oligochaeta) (Seaward 1988), korýšů (Crustacea) – konkrétně různonožci (Amphipoda) (Seaward 1988) a stejnonožci (Isopoda) (André 1979) a stonožkoců (Myriapoda) (Seaward 1988; Stubbs 1989). Přehled jednotlivých skupin a jejich interakce s lišejníky jsem více rozebírala ve své bakalářské práci (Vtípilová 2021).

Lišejníky vykazují různé obranné mechanismy proti spásání bezobratlými jako je např. účinná disperze do míst, kam se spásáči nedostanou (např. do korun stromů), nízká koncentrace základních prvků snižující kvalitu potravy, či vysoká koncentrace sekundárních metabolitů (Lawrey 1983).

Role sekundárních metabolitů v interakcích s bezobratlými živočichy je nejednoznačná; tyto látky plní řadu funkcí a některé z nich poskytují ochranu pouze specifickým druhům lišejníků, zatímco u jiných

druhů tento efekt nebyl pozorován (Seyd a Seaward 1984; Baur et al. 1994; Asplund et al. 2010). Dle studie Lawrey (1983) se v případě potravní preference bezobratlých jedná spíše o tzv. avoidanci (vyhýbání se) některým druhům lišejníků s odpuzujícími sekundárními metabolity. Asplund a Wardle (2013), Černajová a Svoboda (2014) a další prokázali ve svých studiích obranný účinek určitých sekundárních metabolitů vůči bezobratlým.

Sloučeniny, které mohou mít ochrannou anti-herbivorní funkci jsou pravděpodobně přítomné ve dřeni stélky lišejníku (např. kyselina vulpinová a pinastrová), zatímco sekundární metabolity vyskytující se především ve svrchní kůře a fotobiontí vrstvě (např. parietin a kyselina usnová) s vysokou pravděpodobností lišejník chrání proti slunečnímu záření (Gauslaa 2009; Solhaug a Gauslaa 2012; Le Pogam et al. 2016).

1.2. Interakce lišejníků a roztočů

Roztoči jsou častými obyvateli lišejníků. Seyd a Seaward (1984) uvádějí seznam druhů roztočů rozdělených do skupin dle jejich vazby na lišejníky (od specialistů známých převážně z lišejníků, po generalisty, kteří obývají celou řadu různých prostředí). Studie Root et al. (2007) prokázala preferenci epifytických lišejníků roztoči oproti holé kůře stromů. Nicméně interakcím roztočů a lišejníků se věnovaly především studie zabývající se vazbou společenstev roztočů na konkrétní druhy lišejníků (např. Stubbs 1989; Smrž a Kocourková 1999; Materna 2000; Wehner et al. 2016; Melekhina 2023).

Na lišejnících byly nalezeni zástupci roztočů ze skupin Oribatida, Prostigmata (=Actinedida), Mesostigmata (=Gamasida) a Astigmata (=Acaridida) (André 1979; Søchting a Gjelstrup 1985; Smrž a Kocourková 1999).

Ve své diplomové práci se věnuji téměř výhradně roztočům ze skupiny Oribatida (pancířníci), protože dle většiny studií (např. Søchting a Gjelstrup 1985; Stubbs 1989; Smrž a Kocourková 1999; Seyd a Seaward 1984) jsou nejčastější skupinou asociovanou s lišejníky (dle Root et al. (2007) dokonce jedinou pozorovanou).

Řád Oribatida obsahuje kromě výjimek (predátorů drobných bezobratlých; Seniczak et al. 2017 a Ramakrishnan a Neravathu 2019) saprofágy a fytofágy (Schneider et al. 2004). Schuster (1956) dělí fytofágy na mikrofytofágy, kteří konzumují především půdní mikroflóru (houbové hyfy a spory, řasy, části stélek lišejníků nebo např. pylová zrna rostlin) a makrofytofágy, kteří se živí rozkládajícími se rostlinnými pletivy. Luxton (1972) používá podobné dělení – na mikrofytofágy (zahrnující mykofágy, bakteriofágy a algofágy) a makrofytofágy (živící se vyššími rostlinami – listy i dřevem). Oproti tomu Krantz a Lindquist (1979) řadí roztoče živící se lišejníky mezi makrofytofágy. Třetí skupinou, která sdružuje roztoče využívající obě zmíněné strategie, jsou dle Schuster (1956) tzv. nespecialisté, dle Luxton (1972) a Hubert et al. (2001) nazývání panfytofágové. Luxton (1972) navíc přidává nepřilíš obvyklé potravní strategie pancířníků: zoofágy, nekrofágy a koprofágy. Sipel a Rutier-Dijkman (1993) používají odlišné rozdělení potravních strategií: fungivorní „grazers“ (konzumující houby), fungivorní „browsers“ (vybírající si konkrétní části hub dle schopnosti je trávit), herbo-fungivorní spásači, oportunističtí herbo-fungivorní spásači (kteří své stravovací návyky upravují dle dostupnosti potravy), herbivorní „browsers“ (schopni trávit pouze některé části rostlin), herbivorní „grazers“ (neselektující rostlinné části) a omnivoři (konzumující rostlinný, houbový i případně živočišný materiál). Vzhledem k tomu, že roztoči konzumují jak houbovou, tak řasovou složku lišejníků, řadili by se dle tohoto pojetí mezi herbo-fungivorní nebo oportunistické herbo-fungivorní spásače.

Na společenstva roztočů má vliv typ stélky lišejníku, přičemž zde platí stejný trend jako u ostatních bezobratlých, a to, že jsou preferovány lišejníky s lupenitou stélkou (Fröberg et al. 2003; Root et al. 2007). Rozdíly ve společenstvech roztočů byly zaznamenány i mezi jednotlivými druhy lišejníků (stejného typu stélky), jak je vidět např. ve studiích Seyd a Seaward (1984) a Fröberg et al. (2003). Největší množství jedinců roztočů bylo zaznamenáno z prostředí obsahující zároveň větší diverzitu lišejníků (Roos et al. 2022).

Méně prozkoumanou otázkou je vliv druhu stromů, na kterém lišejníky asociované s roztoči rostou. Tento vliv potvrzuje studie André (1979), ale naopak ve studii Smrž a Kocourková (1999) tento vliv nezaznamenali. Významný vliv na roztoče má ale určitě nadmořská výška, kdy tento faktor je pro některé druhy roztočů určující (Smrž a Kocourková 1999; Materna 2000). Naopak se zdá, že roční období na společenstva roztočů téměř žádný vliv nemá (André 1984). Možný vliv na společenstva roztočů by mohla mít expozice vzhledem ke světovým stranám. Na to poukazuje pouze jediná studie Søchting a Gjelstrup (1985), která se zabývala roztoči ze skupiny Prostigmata.

Několik studií potvrdilo využívání lišejníků roztoči jako potravu (např. Sowter 1971; Seyd a Seaward 1984; Meier et al. 2002). Roztoči ale využívají lišejníky především jako úkryt (Seyd a Seaward 1984; Stubbs 1989; Materna 2000; Wehner et al. 2016), nicméně lišejníky mají pravděpodobně roli i v rozmnožování roztočů, především pro kladení vajíček (Seyd a Seaward 1984). Tomuto tématu se však dosud nikdo dostatečně nevěnoval a jde tedy spíše jen o předpoklad vycházející z výskytu roztočů v různých vývojových stádiích (larvy, nymfy a dospělci) na lišejnících (Fröberg et al. 2003).

Na druhou stranu, roztoči mohou přinášet lišejníkům výhody, a to zejména pomáhat při jejich šíření (Meier et al. 2002). Naznačují tomu studie Smith (1921), Stubbs (1995) či Root et al. (2007), které zaznamenaly roztoče mající na povrchu těla části lišejníků (především sorédie). Studie Meier et al. (2002) dokonce uvádí životaschopnost askospor i buněk fotobionta ve fekálních peletech roztočů (tedy přežití po průchodu trávicím traktem roztočů).

Interakce lišejníků a roztočů mají význam i pro celý ekosystém, konkrétně pro cirkulaci minerálních prvků. Díky spásání roztoči se do oběhu vrací prvky, které lišejníky akumulují (např. vápník, měď, draslík, olovo) (Clair et al. 2002), což potvrdila např. studie Lawrey (1980), ve které byl potvrzen transport vápníku od lišejníků k roztočům. Jegede et al. (2023) ukázali silný pozitivní vliv pokryvu lišejníku *Alectoria nigricans* na půdní roztoče v kanadské tundře. Autoři diskutují, že pokud by vlivem antropogenních zásahů došlo k narušení společenstev lišejníků, došlo by zřejmě i k úbytku půdních roztočů, což by mohlo mít fatální vliv na celé arktické ekosystémy, neboť tyto roztoči jsou klíčovými dekompozitory organického materiálu.

1.3. *Cladonia norvegica*

Cladonia norvegica svými charakteristickými červenými skvrnami na stélce (Timdal 1989) představuje asi nejzajímavější a nejnápadnější příklad interakce lišejníků a roztočů. Červené zbarvení je pravděpodobně způsobeno kyselinou rhodokladonovou (známou též mj. z plodnic červenoplodých dutohlávek; Baker a Bullock 1969 a Stenroos 1989). Předpokládá se, že je produkována v reakci na napadení roztoči (dle Pino-Bodas et al. (2021) se jedná o roztoče druhu *Carabodes marginatus*). Dle různých autorů (např. Timdal 1989; Liška et al. 1999; Ahti et al. 2013) má kyselina rhodokladonová anti-herbivorní účinky a chrání tak lišejník před okusem roztoči.

Kyselina rhodokladonová (též nazývána mysaquinone; Spribille et al. 2011) dosud nebyla příliš zkoumaným sekundárním metabolitem lišejníků (Macías et al. 2007) a její účinky na živočichy (včetně

roztočů) zatím nebyly dostatečně studovány. Některé studie (např. Dayan a Romagni 2001; Macías et al. 2003) nicméně poukazují na její herbicidní a alelopatické vlastnosti, konkrétně způsobující malformace kořenů semenáčků a inhibici fotosystému II (PSII) v tylakoidech. Podle distribuce sekundárních metabolitů ve stélce lišejníků lze usuzovat, že barevné pigmenty vyskytující se v apothécích (a tedy i kyselina rodoklanová) mohou chránit reprodukční orgány lišejníků před UV zářením, bakteriemi, houbami a dalšími organismy (Le Pogam et al. 2016). Z tohoto pohledu je zajímavá přítomnost kyseliny rhodokladonové ve dřeni a hypotheciu (spodní vrstvě apothecia, pod hymeniem) u lišejníku *Mycoblastus sanguinarius* (Bohman-Lindgren 1973; Tønsberg 1992; Spribille et al. 2011), ačkoliv i zde se tato látka odkrývá právě při okusu (měkkýši) a poškození či řezu stélky (Spribille et al. 2011; Malíček et al. 2024), což je dáno právě přítomností tohoto pigmentu ve dřeni. Možné vysvětlení významu kyseliny rhodokladonové u tohoto lišejníku zatím ale žádná studie nenabízí.

Z evolučního hlediska dutohlávek je produkce kyseliny rhodokladonové významná. Monofyletická linie Erythrocarpae (Stenroos et al. 2019) sdružuje červenoplodé druhy rodu *Cladonia*, které jsou charakterizovány právě tvorbou kyseliny rhodokladonové v plodnicích. Naproti tomu druh *Cladonia norvegica* má světlé plodnice a červený pigment produkuje pouze (jako reakci na okus roztoči) na přizemních šupinách nebo na povrchu podéčí.

V minulosti převládal názor, že skupina *Cladonia* se světlými plodnicemi (tzv. Ochroleuceae) je výsledkem evoluční sekundární ztráty červeného pigmentu (Dahl 1952; Ahti 2000). Podle autorů poslední publikované fylogenetické studie dutohlávek, Stenroos et al. (2019), tomu tak však není. Vysvětlují to tím, že obě monofyletické linie (Erythrocarpae a Ochroleuceae) mají apomorfní znaky v podobě barvy plodnic (tedy barva plodnic je charakteristická pro všechny druhy v daných skupinách) a oba stavy jsou evolučními novinkami, které se vyskytly v evoluci dutohlávek právě jednou, a nenaznačují tak tomu, že by červenoplodé dutohlávky byly předkem dutohlávek se světlými plodnicemi. Nicméně schopnost produkce kyseliny rhodokladonové ve stélce (ačkoliv není přítomna v plodnicích), poukazuje na to, že geny kódující syntézu této látky jsou přítomny v genomu. Vyjasnění vyššího taxonomického zařazení druhu *Cladonia norvegica* by tak mohlo poskytnout nové poznatky o evolučních procesech vedoucích ke vzniku či ztrátě červeného pigmentu u dutohlávek.

Druh *Cladonia norvegica* byl popsán z oblasti Trøndelagu v Norsku bez červených skvrn (Tønsberg a Holien 1984). Tato forma byla zaznamenána i v Kanadě a USA (Tønsberg a Goward 1992; Schram et al. 2011), Chile a Argentině (Stenroos a Ahti 1990) a Japonsku (Stenroos a Ahti 1994). Hojnější je však forma s červenými skvrnami, která byla poprvé zmíněna ve studii Ruoss et al. (1987) z Rakouska a více ji popsal později Timdal (1989) z Norska, Finska, Švédska, Německa a Portugalska. Zaznamenána byla i v dalších evropských zemích – např. v Estonsku (Lõhmus a Lõhmus 2009) a Polsku (Szczepeńska et al. 2023) a také v Asii, konkrétně v Rusku (Kuznetsova a Dudov 2017).

V České republice byla nalezena forma se skvrnami (Liška et al. 1999; Malíček et al. 2011; Malíček 2022). Výskyt formy bez skvrn zatím udáván nebyl, což může být způsobeno nedostatkem pátrání po této formě či mohl být materiál bez skvrn mylně určován jako druh *Cladonia coniocraea*, vzhledem k jejich podobnosti. Dalším možným důvodem je, že v České republice se pro identifikaci *C. norvegica* často používá právě přítomnost červeného pigmentu jako hlavního rozlišovacího znaku, což může být zavádějící pro formu bez skvrn.

Odlišujícím znakem oproti dalším morfologicky podobným druhům dutohlávek jsou menší, jemně dělené přizemní šupiny (Tønsberg a Holien 1984). Nejspolehlivější je však chemické odlišení na základě přítomnosti kyseliny barbarové a 4-O-demetylbarbatové (oproti kyselině fumarprotocetrarové u morfologicky podobnému druhu *Cladonia coniocraea*). Ta může být prokázána pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC), ale také pomocí stélkové reakce, kdy *C. norvegica* nereaguje s lihovým roztokem

parafenyldiaminu (tzv. P- reakce) a pomocí UV záření, pod kterým reaguje slabě bíle (Tønsberg a Holien 1984; Schram et al. 2011).

Druh obvykle roste na rozkládajícím se dřevě a bázi stromů ve společenstvech dalších dutohlávek (Tønsberg a Holien 1984; Liška et al. 1999; Randlane et al. 2021). Charakteristický je výskyt na vlhkých stanovištích (v lesích) (Liška et al. 1999), typicky ve starých, pralesovitých lesích a příležitostně i v hospodářských porostech (především ve smrčinách). Tento boreo-montánní lišejník vykazuje mírně oceánickou tendenci (Malíček et al. 2021; Randlane et al. 2021; Szczepańska et al. 2023). V České republice byly zaznamenány nejbohatší populace na Šumavě, ale známy jsou i další lokality (Malíček et al. 2021). Ve střední Evropě je tento druh považován spíše za vzácný (Malíček et al. 2021; Randlane et al. 2021; Szczepańska et al. 2023).

Mimo výše uvedené informace je o druhu *Cladonia norvegica* a původu červených skvrn známo jen velmi málo. Stále není potvrzená identita červené látky (zda se opravdu jedná o kyselinu rhodokladonovou) a nejsou známy její funkce ve vztahu k roztočům. Další zásadní nezodpovězenou otázkou je důvod absence červených skvrn v určitých geografických oblastech. Jedním z možných vysvětlení je nepřítomnost nebo nízká aktivita roztočů v těchto oblastech (Stenroos a Ahti 1990). Doposud nebyly publikovány žádné sekvence DNA tohoto druhu, což zpochybňuje jeho status jako dobře vymezeného monofyletického taxonu a otevírá otázku zařazení mezi ostatní skupiny dutohlávek.

Cladonia norvegica ale přináší i spoustu otázek týkajících se právě interakce s roztoči. Konkrétní údaje o tom, které skupiny roztočů na tomto lišejníku žijí, zda jej skutečně konzumují, jak se předpokládá, a zda tato konzumace vyvolává červené zbarvení, zatím chybí. Není ani známo, zda roztoči tento lišejník využívají mimo potravu i pro rozmnožování, zda se jedná o potravní generalisty žijící a konzumující i jiné zdroje potravy či naopak o specialisty s úzkou vazbou na lišejníky (či dokonce pouze na tento druh).

2. Cíle práce

Cílem této diplomové práce je zodpovědět následující otázky:

1. Je *Cladonia norvegica* dobře definovaným a monofyletickým taxonem?
 - a. Do které skupiny dutohlávek patří (v pojetí dle Stenroos et al. 2019)?
 - b. Je červené barvivo ve stélce skutečně kyselina rhodokladonová (jak na základě TLC dat předpokládal Timdal 1989)?
2. Které druhy roztočů se vyskytují na tomto lišejníku, a které z nich způsobují červenou reakci na stélce?
 - a. Žijí tyto druhy roztočů i na jiných dutohlávkách na lokalitách vyskytujících se společně s *C. norvegica*?
 - b. Je absence červených skvrn na materiálu druhu *C. norvegica* ze středního Norska způsobená absencí (případně nízkou aktivitou) roztočů, které tyto skvrny v jiných oblastech Evropy způsobují?
 - c. Využívají roztoči lišejníky kromě potravy i pro rozmnožování, tedy probíhá ve stélkách lišejníků i ontogenetický vývoj roztočů?
3. Konzumují roztoči i červené části stélky, nebo se jim naopak vyhýbají? Fungují tedy červené skvrny jako obrana lišejníku proti spásání?
 - a. Preferují roztoči pro potravu lišejník *C. norvegica* s červenými skvrnami či čistě zelenou formu ze středního Norska?

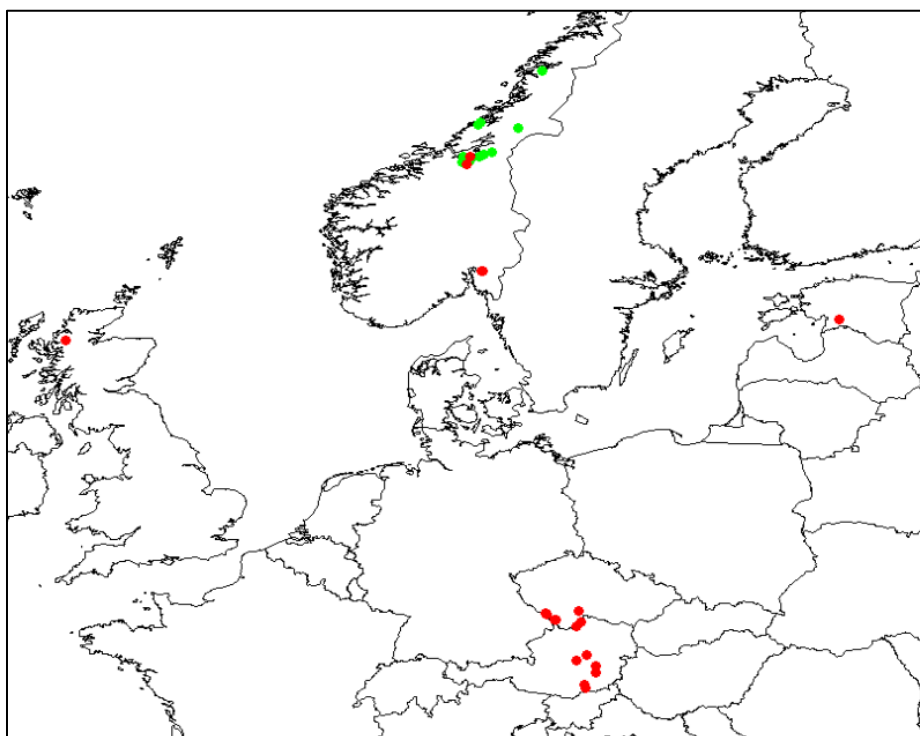
3. Materiál a metody

3.1. Lišejník

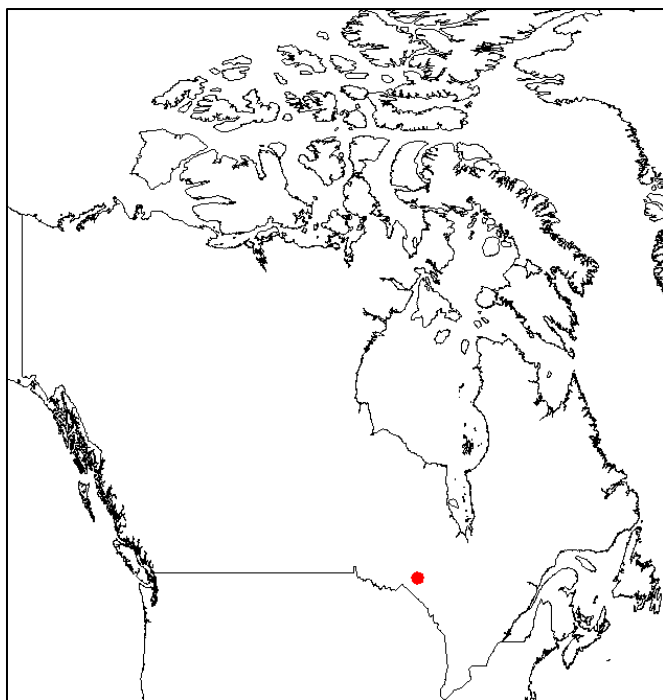
3.1.1. Materiál

Pro molekulární analýzy mykobiontů bylo použito celkem 42 vzorků *Cladonia norvegica*. Materiál zahrnoval oba morfotypy; bez červených skvrn, jak byl druh původně popsán (12 vzorků sesbíraných na různých lokalitách v Norsku, včetně typové lokality) a s červenými skvrnami (30 vzorků; z České republiky, Estonska, Kanady, Norska, Rakouska a Skotska) – viz Obr. 1 a Obr. 2. Na jedné lokalitě v Trøndelagu v Norsku byly sesbírány položky se skvrnami i bez skvrn, rostoucí do deseti metrů od sebe. Na všech lokalitách rostla *C. norvegica* na dřevu společně s mechorosty ve vlhkém prostředí (nejčastěji smíšeném, případně jehličnatém lese). Přehled položek, včetně přesných lokalit, data sběru, sběratele atd. je v Tab. A, Přílohy.

Sesbíraný materiál byl potvrzen pomocí metod využívajících chemismus, a to především reakce parafenylendiaminu (pro rozlišení *Cladonia norvegica* od *Cladonia coniocraea* v terénu; Ahti et al. 2013), pozitivní UV reakce (slabá modro-bílá reakce v kontrastu s negativní reakcí v případě *C. coniocraea*; Orange et al. 2001) a tenkovrstevné chromatografie (TLC) (viz níže).



Obr. 1: Evropské lokality použitého materiálu; zelenými puntíky označena forma bez skvrn, červenými forma se skvrnami na stélce; mapa byla vytvořena pomocí programu RStudio (R Core Team 2023) za použití balíčku RgoogleMaps (Loecher a Ropkins 2015)



Obr. 2: Oblast, ze které pocházejí kanadské sběry (dvě lokality ve vzdálenosti 2,4 km od sebe); mapa byla vytvořena pomocí programu RStudio (R Core Team 2023) za použití balíčku RgoogleMaps (Loecher a Ropkins 2015)

3.1.2. TLC

Pro TLC bylo vybráno 41 vzorků *Cladonia norvegica* z různých evropských i kanadských lokalit (viz Tab. A, Přílohy): jedenáct vzorků bez červených skvrn a 30 vzorků s červenými skvrnami. TLC bylo provedeno dle metodiky Orange et al. (2001). Jako standard byla zvolena *Cladonia symphycarpa* obsahující kyselinu norstiktovou a atranorin. Pro extrakci sekundárních metabolitů bylo použito jedno podécium z každého vzorku lišejníku, případně, pokud podécium ve vzorku nebylo přítomno, byly použity šupiny (to se týkalo vzorků označených N13A, N30, N31, N32, N43, N4. a N25). Celkem 29 vzorků bylo analyzováno třemi rozpouštědlovými systémy (A, B' a C), u zbývajících dvanácti vzorků byly použity pouze dva systémy (A a C).

3.1.3. HPLC a LC-HRMS analýza

Pro potvrzení identity červeného barviva byla provedena vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC a kapalinová chromatografie spojená s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií LC-HRMS. Bylo využito tří herbářových položek *Cladonia norvegica* (B1= ZP32349, B2= 2057 Jiří Malíček a B3= 3128 Jiří Malíček). Jako standard pro kyselinu rhodokladonovou byly použity plodnice druhu *Cladonia bellidiflora* (B5= 988 Jana Steinová), které tuto látku obsahují. Ze sušené stélky lišejníků byly pomocí žiletky vypreparovány pouze červené části stélky a ty byly ve zkumavkách poslány do Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i. do Laboratoře genetiky a metabolismu hub, kde byla provedena extrakce, HPLC a LC-HRMS analýza.

3.1.3.1. Extrakce

Rehydratované vzorky lišejníků byly extrahovány pomocí 500 µl dichlormethanu (přes noc, ve tmě). Vzorky byly centrifugovány a supernatant následně odpařen do sucha na vakuové odparce za sníženého tlaku. Získaný extrakt byl naředěn v methanolu (0,1 ml) a použit dále pro další analýzy.

3.1.3.2. HPLC

HPLC bylo provedeno s použitím systému vybaveného řídicí jednotkou 600E, autosamplerem 717 a duálním UV detektorem 2487 (Waters, Milford, MA, USA) dle metodiky blíže popsané v práci Flieger et al. (2016), s drobnými úpravami: byla použita kolona Gemini 5 µm C18 (250 × 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) s předkolonou. Mobilní fáze se skládala z H₂O/MeOH + 1 % TFA. Gradientová eluce začínala na 30 % MeOH (0 min) a lineárně narůstala na 100 % MeOH během 20 minut, při průtokové rychlosti 1,0 ml/min. UV detekce byla prováděna při vlnových délkách 290 nm a 440 nm.

3.1.3.3. LC-HRMS

K separaci extraktu (5 µl) byl použit LC systém Agilent Infinity II s kolonou Poroshell 120 EC-C18 (2,7 µm, 3x100 mm) a předkolonou stejného typu, zahřátý na 40 °C, a s gradientní metodou nastavenou na průtok 0,4 ml/min.

Metoda se skládala z:

1. izokratické fáze (0–0,5 min, 10 % acetonitrilu (B) a 90 % vody s přidavkem 0,1% kyseliny mravenčí)
2. gradientní fáze (0,5–5 min, gradient od 10 % B do 100 % B)
3. závěrečné fáze (5–15 min, kde byly počáteční podmínky (10 % B) obnoveny izokratickou elucí se 100 % B (10 min)).

Před injekcí dalšího vzorku byla kolona ponechána k vyrovnání na výchozích podmínkách po dobu 5 minut. Iontový zdroj pracoval v režimu negativní ionizace.

Byl použit hmotnostní spektrometr Agilent 6546, qTOF a analýza dat proběhla v softwaru Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0.

3.1.4. Molekulární analýza

3.1.4.1. Extrakce DNA

DNA byla extrahována ze 42 vzorků *Cladonia norvegica* pomocí standardního CTAB protokolu Cubero et al. (1999) s následujícími optimalizacemi: rozdrčení materiálu pomocí wolframových kuliček, prodloužení zmrazení (-20 °C) po přidání isopropanolu na 30 minut a extra čištění 96% ethanolem. Pro izolaci DNA bylo vždy použito jediné podécium.

3.1.4.2. PCR

Celkem byly amplifikovány tři molekulární markery pro mykobionta:

1. ITS rDNA pomocí primerů ITS1F (Gardes a Bruns 1993) a ITS4 (White et al. 1990),
2. malá mitochondriální podjednotka (mtSSU) pomocí primerů mrSSU1 a mrSSU3R (Zoller et al. 1999) a
3. elongační faktor 1α (EF-1α) pomocí primerů CLEF-3F a CLEF-3R (Yahr et al. 2006).

Pro všechny PCR reakce byla použita reakční směs v objemu 20 µl reakční směsi, obsahující:

- 14,4 µl dd H₂O
- 4 µl pufr MyTaq (Bioline, UK)
- 0,2 µl forward primer
- 0,2 µl reverse primer
- 0,2 µl polymeráza MyTaq (Bioline, UK)
- 1 µl extrahovaná DNA

Pro amplifikaci fragmentů ITS a EF-1α byly nastaveny tyto podmínky PCR:

1. iniciační fáze 95 °C po dobu 1 minuty
2. 35 cyklů:
 - denaturace (95 °C, 30 sekund)
 - annealing (54 °C, 30 sekund)
 - elongace (72 °C, 30 sekund)
3. závěrečná elongace 72 °C po dobu 3 minut.

Pro amplifikaci fragmentu mtSSU byl použit tento program PCR:

1. iniciační fáze 95 °C po dobu 1 minuty
2. 35 cyklů:
 - denaturace (95 °C, 30 sekund)
 - annealing (60 °C, 30 sekund)
 - elongace (72 °C, 30 sekund)
3. závěrečná elongace 72 °C po dobu 3 minut.

Kontrola přítomnosti a kvality PCR produktu byla zjišťována pomocí elektroforézy s použitím 1% TAE agarózového gelu a značením ethidiumbromidem.

3.1.4.3. *Přečištění a sekvenace*

Přečištění PCR produktu bylo provedeno pomocí paramagnetických kuliček SPRI AMPure XP paramagnetic beads (Beckman Coulter, USA) dle protokolu výrobce a koncentrace přečištěného PCR produktu byla změřena na přístroji NanoDrop 1000. Sekvenace proběhla v MacroGen Europe (Amsterdam, the Netherlands) se stejnými primery, které byly použity pro PCR amplifikaci.

3.1.4.4. *Zpracování sekvencí a tvorba alignmentu*

Sekvence byly prvotně zpracovány v programu SeqAssem (Hepperle 2004) a alignment byl vytvořen v programu MEGA11 (Tamura et al. 2021). Alignment obsahoval 42 vlastních sekvencí a byl doplněn o čtyři sekvenace *Cladonia norvegica* a čtyři sekvenace *Cladonia bacilliformis* získaných v rámci projektu OLICH, které dodal prof. Einar Timdal (Natural History Museum, Oslo). Dále byly přidány vybrané sekvenace z GenBanku (NCBI) (Sayers et al. 2022). Jednalo se o jednu sekvenci *C. norvegica*, osm zástupců dutohlávek ze skupiny Ochroleucae, 14 zástupců ze skupiny Erythrocarpae, a dále o outgroup obsahující 18 sekvencí hnědoplodých dutohlávek. Finální konkatenovaný alignment obsahoval celkem 91 sekvencí a 2091 znaků.

3.1.4.5. *Fylogenetické analýzy*

V programu MAFFT v7 (Katoh a Standley 2013) bylo provedeno rozdělení alignmentu na jednotlivé partitions kvůli různé rychlosti evoluce částí vybraných markerů. Substituční modely pro následující fylogenetické analýzy byly vypočteny zvlášť pro část ITS1, ITS2 a 5,8 S rDNA a pro markery EF a mtSSU (Tab. 1). Modely byly určeny podle jModelTestu v CIPRES (Miller et al. 2015).

Tab. 1: Délka a vybraný substituční model jednotlivých částí finálního alignmentu

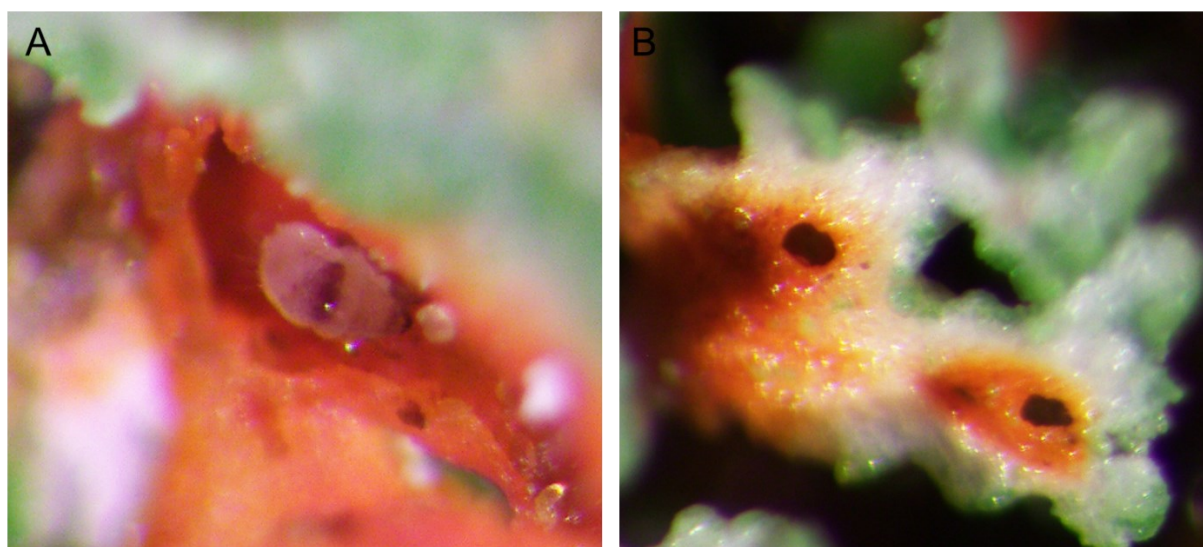
Marker	ITS			mtSSU	EF
	ITS1	5,8 S	ITS2		
Délka alignmentu	333	158	154	822	624
Substituční model	TIM2ef+G	JC	K80+G	HKY+I	TrNef+G

Fylogenetický strom byl nalezen metodou Bayesovy inference v programu Mr. Bayes v3.2.7a (Ronquist et al. 2012). Nejprve byly získány fylogenetické stromy pro jednotlivé markery, a protože jejich topologie byly shodné, byl vytvořen konkatenovaný strom se všemi markery. Pro statistickou podporu jednotlivých větví byl vytvořen fylogenetický strom metodou maximum likelihood v programu RAxML v8.2.10 (Stamatakis 2014). Fylogenetické stromy byly prvotně upraveny v programu FigTree v1.4.4 (Rambaut 2018). Ve výsledném fylogenetickém stromu byly kromě posteriorních pravděpodobností zobrazeny bootstrap hodnoty získané z maximum likelihood analýzy. Strom byl nakonec graficky upraven v programu Adobe Illustrator.

3.1.5. Pozorování červených skvrn na stélce *Cladonia norvegica*

Na dvanácti čerstvých položkách *C. norvegica* z různých evropských lokalit (ze čtyř českých lokalit, pěti norských, dvou rakouských a jedné skotské) byla provedena jednoduchá analýza červených skvrn. Bylo náhodně zvoleno deset červených skvrn na každé položce, které byly otevřeny pinzetou s ostrým hrotem a bylo zaznamenáno, zda se jednalo o pouhý pigment, dutou komůrku, komůrku obsahující nymfu roztoče či komůrku obsahující pobytové znaky (fekální pelety nebo dírký od spásání) – viz Obr 3. Výsledky byly zpracovány do koláčového grafu v programu Microsoft Excel.

Nalezené nymfy byly uchovány v čistém ethanolu pro molekulárně genetické analýzy (viz kapitulu 3.2.1. níže).



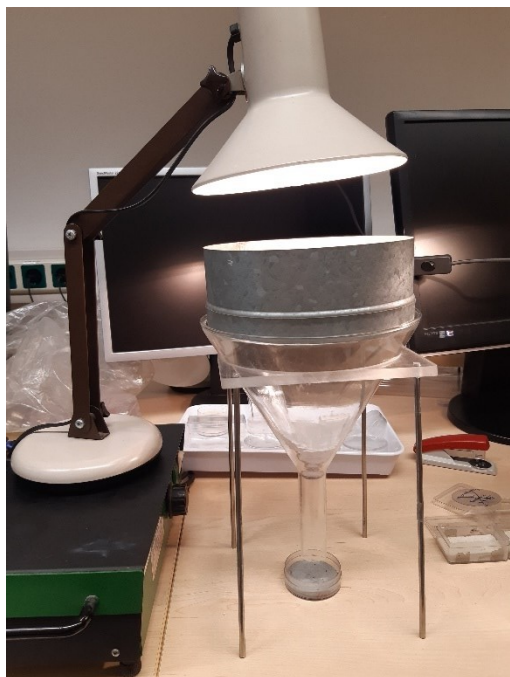
Obr. 3: Na obrázku A juvenilní stádium roztoče sedící v otevřené komůrce, na obrázku B duté komůrky s dírkami jakožto pobytovými znaky roztočů

3.2. Identifikace roztočů

3.2.1. Materiál

Sesbírané lišejníky byly uchovány v plastových uzavíratelných sáčcích při teplotě cca 4°C. Do týdne od sběru byli extrahováni roztoči. Nymfy (celkem 28 nymf z 15 různých evropských lokalit) byly manuálně extrahovány z komůrek ve stélkách lišejníku (viz výše). Ve všech případech se jednalo o nymfy pancířníků (Oribatida). Následně byla provedena hromadná extrakce dospělců a volně se pohybujících nymf pomocí Berlese-Tullgrenova extraktoru (Tullgren 1918) (Obr. 4). Do extraktoru byly použity lišejníky včetně substrátu, na kterém rostly. Extrahování roztoči byli uchováni v čistém ethanolu a později určeni dle klíče Weigmann (2006). Ke každé položce *Cladonia norvegica* byla sesbírána a dále zpracována kontrolní položka *C. coniocraea* rostoucí v těsné blízkosti *C. norvegica*.

Celkem bylo pomocí extraktoru zpracováno 28 položek (pět *Cladonia norvegica* z norského Trøndelagu bez skvrn + pět kontrolních *C. coniocraea*, dvě *C. norvegica* se skvrnami + dvě kontroly z Rakouska, dvě *C. norvegica* z Trøndelagu se skvrnami + jedna kontrola – druhá kontrola byla z lokality, kde rostla i *C. norvegica* bez skvrn, a šest *C. norvegica* z norského Vikenu se skvrnami + pět kontrol – na jedné lokalitě byly sesbírány dva vzorky z různých substrátů, což ale dále nebylo nijak zpracováno).



Obr. 4: Berlese-Tullgrenův extraktor (lišejníky jsou vloženy do síta, které stojí na nálevce, kvůli teplu vyzařovanému žárovkou se roztoči zavrtávají do substrátu a sítem propadávají do sběrné nádoby)

U objemově menších položek a položek s chybějící kontrolou (VV21, ZP 32349, JS1220 a DS 29.10.202) byla extrakce provedena pouze manuálně pomocí pinzety a štětečku. S těmito vzorky se dále nepracovalo ve statistické analýze.

3.2.2. Molekulární analýza nymf

Protože většina juvenilních stádií roztočů (s odlišnou morfologií od dospělců) nalezených na *Cladonia norvegica* není morfologicky popsána a neexistuje pro ně souborný určovací klíč, je morfologická identifikace těchto juvenilů nemožná. Proto bylo pro identifikaci nymf využito sekvenování DNA

a porovnání se sekvencemi dospělců. Celý proces DNA extrakce, PCR i samotné sekvenace byl proveden pod vedením Mag. Dr. Sylvia Schäffer v laboratoři v rakouském Štýrském Hradci na Universität Graz (Institut für Biologie) v rámci praktické stáže projektu AKTION.

3.2.2.1. *Extrakce DNA*

Extrakce DNA z nymf zahrnovala zahřátí vzorku ve 25 μ l 10% roztoku Chelex® 100 na 95 °C po dobu 20 minut a jeho následné zamrazení. Díky měkké povaze těl juvenilních roztočů nebylo zapotřebí manuální rozdrcení.

3.2.2.2. *PCR*

Byl využit fragment D3 jaderného genu 28S rRNA, který byl prokázán jako vhodný molekulární marker u roztočů skupiny Oribatida (Lehmitz a Decker 2017). Pro amplifikaci byly využity primery d3A a d3B (Litvaitis et al. 1994).

Všechny PCR reakce byly provedeny v objemu 10 μ l reakční směsi, obsahující:

- 4,35 μ l dd H₂O
- 1 μ l pufr BioThermRed (GenExpress)
- 0,5 μ l forward primer
- 0,5 μ l reverse primer
- 0,5 μ l dNTP
- 0,4 μ l polymeráza BioThermRed (GenExpress)
- 0,75 μ l 50 mmol MgCl₂ (VWR)
- 2 μ l extrahovaná DNA

Nastaveny byly tyto podmínky pro PCR:

1. iniciační fáze 94 °C po dobu 3 minut
2. 40 cyklů:
 - denaturace (94 °C, 30 sekund)
 - annealing (prvních 18 cyklů 48 °C, 30 sekund a zbylých 22 cyklů 50 °C, 30 sekund)
 - elongace (72 °C, 1 minuta)
3. závěrečná elongace 72 °C po dobu 7 minut.

Výsledný PCR produkt byl podroben kontrole pomocí elektroforézy za použití 2% agarózového gelu a značení látkou peqGREEN. Vzorky byly obarveny bromfenolovou modří. Výsledný gel byl pozorován pod UV zářením v Transilluminator.

3.2.2.3. *Přečištění a sekvenace*

PCR produkty byly přečištěny od zbylých dNTP a primerů enzymem ExoSAP-IT™ (dle postupu výrobce Affymetrix): použití 1,5 μ l dd H₂O a 0,75 μ l enzymu na vzorek a zahřání v termocykleru na 37 °C po dobu 45 minut následované 80 °C po dobu 15 minut pro zneaktivnění enzymu.

Pro sekvenační reakci byla použita reakční směs:

- 1,6 μ l pufr BioThermRed (GenExpress)
- 0,25 μ l primer
- 0,3 μ l sekvenační terminátor BigDye (Applied Biosystems)
- 5,85 μ l dd H₂O
- 2 μ l přečištěný PCR produkt

Byly nachystány dvě reakční směsi s odlišnými primery, protože každý vzorek byl použit dvakrát – jednou s forward primerem a podruhé s reverse primerem (pro sekvenování z obou stran). Podmínky byly nastaveny takto:

Nastaveny byly tyto podmínky:

- 27 cyklů:
 - denaturace (94 °C, 20 sekund)
 - annealing (52 °C, 20 sekund)
 - elongace (60 °C, 45 sekund)

Následně bylo provedeno čištění pomocí BigDye XTerminator™ (Applied Biosystems) kitu. Sekvence byla provedena v sekvenátoru Applied Biosystems™ 3500xL Genetic Analyzer.

3.2.2.4. *Zpracování sekvencí*

Prvotní zpracování sekvencí bylo provedeno v programu SeqAssem (Hepperle 2004) a alignment byl vytvořen v programu MEGA11 (Tamura et al. 2021).

Protože sekvence potřebných roztočů nebyly nalezeny v databázi NCBI GenBank, byl pro identifikaci použit alignment obsahující nepublikované sekvence dospělých identifikovaných roztočů Mag. Dr. Sylvia Schäffer (Universität Graz).

3.2.3. Morfologické určování dospělců

Dospělci pancířníků byli naloženi do kyseliny mléčné pro prosvětlení (a lepší zobrazení druhových znaků), montováni do dočasných mikroskopických preparátů na podložním skličku s jamkou a následně určováni podle klíče Weigmann (2006).

3.2.4. Vyhodnocení výsledků

Prvotní analýzy a výstupy ve formě tabulek a grafů byly provedeny v programu Microsoft Excel.

Nejprve byl vytvořen seznam všech nalezených roztočů, včetně extrahovaných nedospělých stádií. V dalších analýzách jsem se věnovala již pouze nejpočetnějšímu řádu – pancířníci (Oribatida), a to pouze dospělcům (identifikace juvenilů nebyla možná, neboť pro ně neexistuje určovací literatura).

Tabulka obsahující nejčastěji nalézané druhy pancířníků obsahuje v případě celkového shrnutí jen ty druhy vyskytující se ve více než v 10 % všech vzorků. Tabulky pro jednotlivé formy lišejníků obsahují roztoče, kteří byli nalezeni ve více než 20 % vzorcích.

Do grafů zobrazujících výskyt jednotlivých druhů roztočů v daných vzorcích lišejníků nebyly použity ty druhy roztočů, které se vyskytovaly pouze v jednom vzorku po jednom jedinci.

Statistické analýzy byly provedeny v programu Jamovi (R Core Team 2021; The jamovi project 2022) za použití balíčků car (Fox a Weisberg 2020), factoextra (Kassambara a Mundt 2020), psych (Revelle 2019) a snowCluster (Seol 2022).

Byl proveden Shapiro-Wilkův test normality pro celkový počet jedinců a počet druhů roztočů v jednotlivých vzorcích lišejníků a Levenův test homogenity rozptylu. Dále byla provedena Welchova jednofaktorová ANOVA a zobrazeny grafy vyjadřující počet jedinců a počet druhů ve vzorcích rozdělené

dle lišejníků. Pro vizualizaci dat byly použity tzv. violin grafy (houslové grafy), kombinující krabicový graf „boxplot“ s hustotním grafem.

Podobnost společenstevch roztočů (tedy jednotlivých vzorků) byla zkoumána shlukovou analýzou Wardovou metodou s využitím Euklidovské vzdálenosti a zobrazena do dendrogramu.

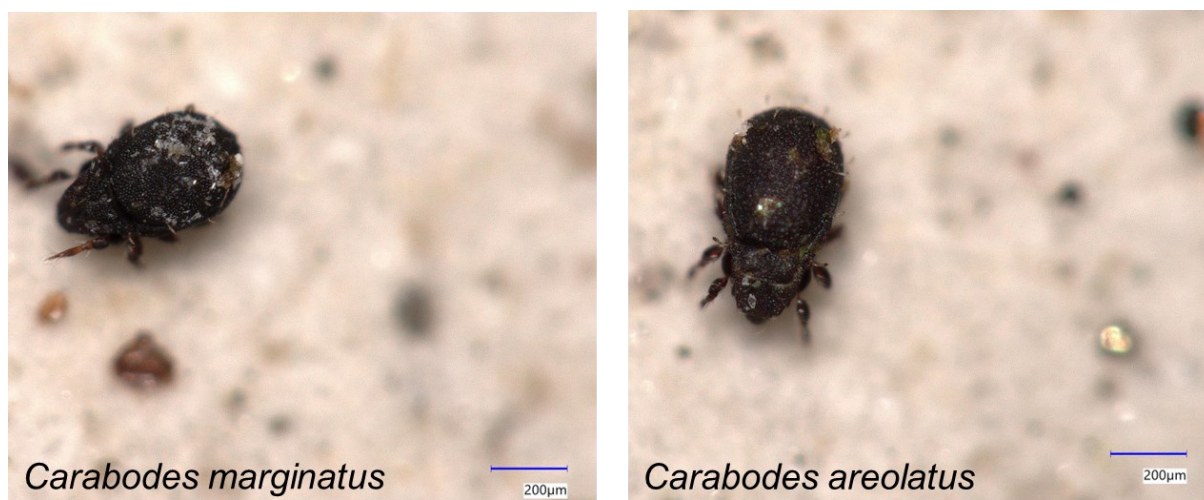
3.3. Potravně preferenční testy

3.3.1. Materiál a příprava testu

Potravně preferenční testy byly provedeny v rámci praktické stáže projektu AKTION ve Štýrském Hradci na Universität Graz pod vedením akarologa Dr. Tobiasse Pffingstla. Design experimentu byl inspirován studií Koukol et al. (2009) a potravně preferenčními testy s *Cladonia norvegica* provedenými v rámci diplomové práce Liebmann-Reindl (2024). Před zahájením testů byl na jeden týden spuštěn pilotní test pro nalezení vhodných podmínek (stanovení optimálního množství lišejníku, počtu roztočů, objemu průběžně přidávané vody atd.).

Celkem byly uskutečněny dva experimenty. Každý experiment byl proveden na dvou druzích roztočů – pancířníků *Carabodes areolatus* a *Carabodes marginatus* (Obr. 5). Tyto druhy byly vybrány, protože se jednalo o nejhojnější druhy vyskytující se na *Cladonia norvegica* v Rakousku (kde testy probíhaly). Pro každý druh roztoče bylo použito šest plastových boxů o průměru 2 cm (tedy vždy bylo šest opakování testu) a dva kontrolní boxy (Obr. 6) obsahující pouze jeden typ lišejníku. Použité kusy stélky lišejníků měly velikost cca 1 mm².

1. SW experiment – jednalo se o porovnání červených („spots“) vs. zelených částí („without spots“) stélky skvrnité formy *Cladonia norvegica* (použit byl materiál z rakouské lokality Schöckl – položka VV22).
2. OT experiment – obsahoval porovnání zelených částí stélky dvou forem *Cladonia norvegica* z Norska (jedním byl lišejník obsahující červené skvrny z okolí Osla – položka VV3, a druhým byla zelená forma z okolí Trondheimu – položka VV9).

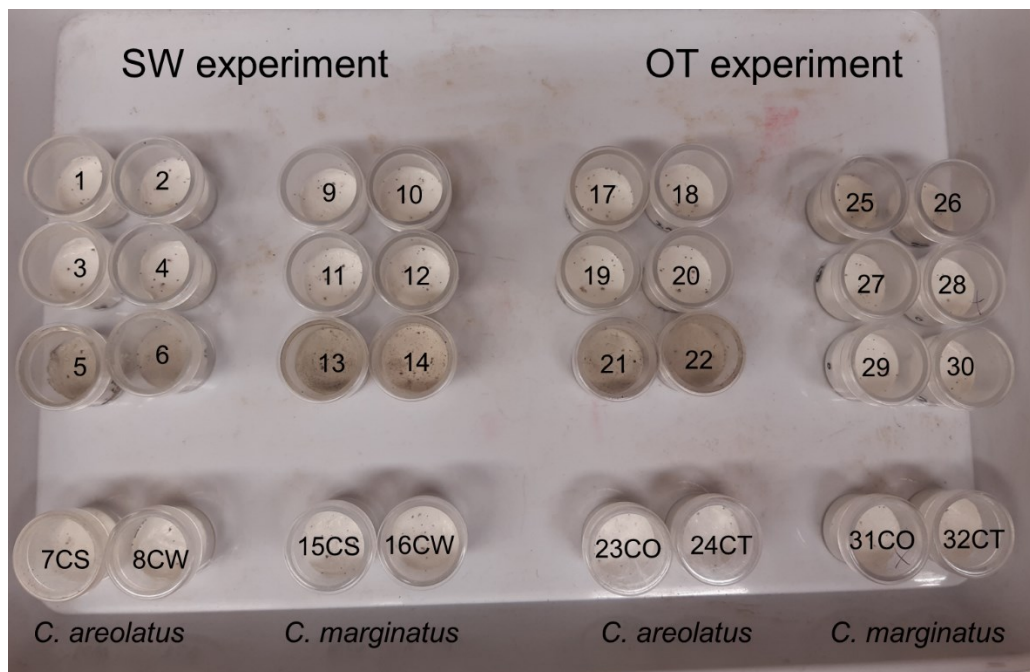


Obr. 5: Druhy roztočů vybrané pro potravně preferenční testy

Do každého boxu bylo vloženo celkem 15 jedinců roztočů extrahovaných pomocí Berlese-Tullgrenova extraktoru (Tullgren 1918) z *Cladonia norvegica* a *Cladonia coniocraea* z rakouského Schöckl (lokality odpovídá položce VV22 v Tab. A, Přílohy): v případě *Carabodes areolatus* bylo deset jedinců z extrakce

provedené 27. 10. 2023 a pět ze starší extrakce 29. 9. 2023, u *Carabodes marginatus* tomu bylo naopak – deset bylo ze starší extrakce a pět z novější. Extrahování roztoči byli pod stereomikroskopem určeni dle klíče Weigmann (2006). Pokusy byly zahájeny 30. 10. 2023: SW ve 12:30 a OT v 15:30 (označeno jako DEN 0).

Do plastových boxů byla pro udržení optimální vlhkosti použita sádra. Pro většinu testů byla namíchána čerstvá sádra, ale boxy č. 1, 2, 9, 10, 17, 18, 29 a 30 obsahovaly již použitou sádru, avšak ethanolem vydezinfikovanou. Boxy byly uchovávány ve tmě při pokojové teplotě.



Obr. 6: Přehled experimentů SW a OT s dvěma druhy roztočů (*Carabodes areolatus* a *Carabodes marginatus*), čísla jsou označeny jednotlivé boxy, spodní boxy označené C jsou kontrolní (S značí boxy pouze s červenými částmi lišejníku, W značí boxy pouze se zelenými částmi, O značí boxy s lišejníkem z okolí Osla a T značí boxy s lišejníkem z okolí Trondheimu)

3.3.2. Založení a průběh testů

3.3.2.1. Pravidelné zaznamenávání

Ráno každý den, kromě víkendů, proběhlo počítání fekálních pelet; z celkového průběhu 14 dní, tedy došlo k deseti počítání. Ranní počítání probíhalo obvykle v rozmezí 9:30–12:00. Do záznamové tabulky byl rozdělen počet fekálních pelet na ty, které byly přímo na lišejníku, a na ty, které byly v jeho okolí.

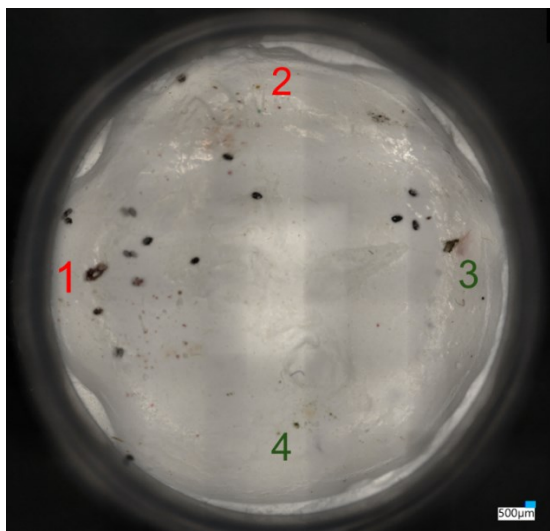
Dále bylo prováděno počítání roztočů, kteří se vyskytovali na jednotlivých kusech lišejníků. Toto počítání probíhalo ráno s počítáním pelet, a navíc během šesti dnů odpoledne – v čase 15:00–17:30.

Při každém počítání byla vizuálně zkontrolována vlhkost sádry a v případě potřeby přidáno 3–5 kapek kohoutkové vody.

3.3.2.2. Zásahy do experimentu

V DEN 2 byly vyměněny plesnivějící kusy lišejníků.

V DEN 3 14:00 (po ranním počítání) byly přidány stélky lišejníků do každého boxu – roztoči tak měli na výběr ze čtyř kusů lišejníků (dva typy lišejníku po dvou kusech – viz Obr. 7).



Obr. 7: Pohled na box, ve kterém jsou červeně (1, 2) označeny červené části stélky lišejníku a zeleně (3, 4) označeny zelené části lišejníku

Protože oba červené kusy lišejníku v boxu 25 byly v DEN 4 (při počítání) zkonsumované, byly doplněny novými stélkami, aby nemusel být experiment ukončen předčasně. Pelety okolo byly ponechány a dále počítány, pelety na povrchu však byly odebrány spolu s lišejníkem a počítány opět od nuly.

V DEN 7 byly vyměněny lišejníky, které plesnivěly nebo nebyly z neznámých důvodů vůbec konzumovány (a to pouze z těch původních – ne ty přidávané v DEN 3) – viz Tab. 2. Jedinou výjimkou byl nový kus z Trøndelagu v boxu 17, který byl navíc přidán, protože byl již plně zkonsumován.

Tab. 2: Přehled vyměněných lišejníků; X označuje výměnu, S červené části lišejníku *Cladonia norvegica*, W zelené části lišejníku, boxy označené CS jsou kontrolní boxy obsahující pouze červené kusy stélky, boxy označené CW jsou kontrolní boxy se zelenými kusy stélky, O lišejníky z okolí Osla, T lišejníky z okolí Trondheimu, boxy označené CO jsou kontrolní boxy obsahující pouze skvrnitý lišejník z okolí Osla, boxy označené CT jsou kontrolní boxy s čistě zeleným lišejníkem z okolí Trondheimu

Experiment SW				Experiment OT			
Druh roztoče	Číslo boxu	S	W	Druh roztoče	Číslo boxu	O	T
<i>Carabodes areolatus</i>	1	X	X	<i>Carabodes areolatus</i>	17	X	X
<i>Carabodes areolatus</i>	2	X	X	<i>Carabodes areolatus</i>	18		
<i>Carabodes areolatus</i>	3	X	X	<i>Carabodes areolatus</i>	19	X	X
<i>Carabodes areolatus</i>	4	X	X	<i>Carabodes areolatus</i>	20	X	X
<i>Carabodes areolatus</i>	5	X	X	<i>Carabodes areolatus</i>	21	X	X
<i>Carabodes areolatus</i>	6	X	X	<i>Carabodes areolatus</i>	22	X	X
<i>Carabodes areolatus</i>	7CS	X		<i>Carabodes areolatus</i>	23CO	X	
<i>Carabodes areolatus</i>	8CW		X	<i>Carabodes areolatus</i>	24CT		X
<i>Carabodes marginatus</i>	9			<i>Carabodes marginatus</i>	25		
<i>Carabodes marginatus</i>	10			<i>Carabodes marginatus</i>	26		X
<i>Carabodes marginatus</i>	11	X		<i>Carabodes marginatus</i>	27	X	X
<i>Carabodes marginatus</i>	12			<i>Carabodes marginatus</i>	28		X
<i>Carabodes marginatus</i>	13		X	<i>Carabodes marginatus</i>	29		
<i>Carabodes marginatus</i>	14		X	<i>Carabodes marginatus</i>	30		X
<i>Carabodes marginatus</i>	15CS			<i>Carabodes marginatus</i>	31CO	X	
<i>Carabodes marginatus</i>	16CW		X	<i>Carabodes marginatus</i>	32CT		

K výměně mrtvých roztočů za živé (aby počet živých byl stále celkem 15) došlo (po ranním počítání) v DEN 2, DEN 4 a DEN 7 (viz Tab. 3).

Tab. 3: Přehled vyměněných roztočů rodu *Carabodes* v jednotlivé dny experimentu, CS jsou kontrolní boxy obsahující pouze červené kusy stélky *Cladonia norvegica*, boxy označené CW jsou kontrolní boxy se zelenými kusy stélky, boxy označené CO jsou kontrolní boxy obsahující pouze skvrnitý lišejník z okolí Osla, boxy označené CT jsou kontrolní boxy s čistě zeleným lišejníkem z okolí Trondheimu

Experiment SW					Experiment OT				
Druh roztoče	Číslo boxu	DEN 2	DEN 4	DEN 7	Druh roztoče	Číslo boxu	DEN 2	DEN 4	DEN 7
<i>C. areolatus</i>	1	1			<i>C. areolatus</i>	17			1
<i>C. areolatus</i>	2				<i>C. areolatus</i>	18		1	2
<i>C. areolatus</i>	3	6		1	<i>C. areolatus</i>	19	2		
<i>C. areolatus</i>	4	1			<i>C. areolatus</i>	20	2	2	3
<i>C. areolatus</i>	5	3		1	<i>C. areolatus</i>	21	2		1
<i>C. areolatus</i>	6	3			<i>C. areolatus</i>	22	4	1	1
<i>C. areolatus</i>	7CS	2		1	<i>C. areolatus</i>	23CO	1		1
<i>C. areolatus</i>	8CW	2			<i>C. areolatus</i>	24CT	2		
<i>C. marginatus</i>	9			1	<i>C. marginatus</i>	25	5	1	2
<i>C. marginatus</i>	10	3	1	2	<i>C. marginatus</i>	26	5	6	3
<i>C. marginatus</i>	11		3	1	<i>C. marginatus</i>	27	1		4
<i>C. marginatus</i>	12	2	1		<i>C. marginatus</i>	28	5	1	6
<i>C. marginatus</i>	13		1	1	<i>C. marginatus</i>	29	2	5	
<i>C. marginatus</i>	14	1		2	<i>C. marginatus</i>	30	4	4	2
<i>C. marginatus</i>	15CS	1	2	1	<i>C. marginatus</i>	31CO	1		2
<i>C. marginatus</i>	16CW	2	2	4	<i>C. marginatus</i>	32CT		1	2

Kompletní přehled experimentů se zaznamenanými počty fekálních pelet a jedinců roztočů je v Tab. C a Tab. D, Přílohy.

3.3.2.3. Ukončení experimentu

V DEN 8 většina původních lišejníků začínala porůstat mikroskopickými houbami (ale roztoči na nich byli přesto přítomni a dále lišejníky konzumovali). V DEN 10 bylo již počítání fekálních pelet ztíženo všudypřítomnou plísní a kousky sádry. I přes kontaminaci houbami se ale v některých boxech roztoči krmili na lišejnících. Experiment tedy zatím nebyl ukončen. V DEN 14 se kvůli porostu mikroskopickými houbami již nedalo téměř vůbec počítat, experiment byl tedy uzavřen (tj. 13. 11. 2023).

3.3.3. Statistické zpracování výsledků

Pro statistické analýzy byla tabulka obsahující záznam průběhu testů zjednodušena. Fekální pelety nalezené přímo na lišejníku byly sečteny s fekálními pelety, které byly v jeho těsné blízkosti. Sečteny byly také pelety i roztoči na obou kusech lišejníku téhož typu (v případě SW experimentu byly sečteny počty jednak na červených kusech lišejníku a také na zelených kusech lišejníku, v případě OT experimentu byly sečteny zvlášť počty pro červeně skvrnitou formu lišejníku z okolí Osla a poté počty pro zelenou formu z okolí Trondheimu). V analýzách se nepočítalo s kontrolními boxy. Každý experiment tedy obsahoval dvanáct boxů (šest opakování pro každý druh roztoče).

Pro prvotní analýzu v programu Microsoft Excel byly pro sledování fekálních pelet vybrány nejvyšší zaznamenané hodnoty ze všech měření, protože v případě, že byl zkonzumován celý kus lišejníku, živili se roztoči vlastními pelety a jejich počet se tedy snižoval. Pro analýzu počtu jedinců roztočů byl zvolen součet jedinců vyskytujících se za celou dobu experimentů na obou kusech téhož typu lišejníku.

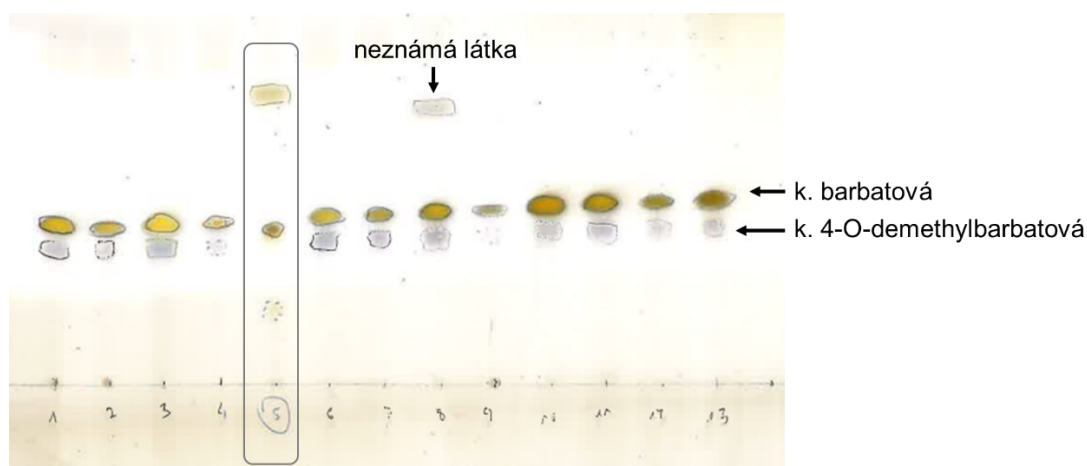
Dle práce Koukol et al. (2009), ve které proběhly potravně preferenční testy pancířníků pro různé druhy mikroskopických saprotrofních půdních hub, byla pro zpracování dat zvolena analýza GLMM – Zobecněných lineárních modelů se smíšenými efekty. Fixními efekty byly druhy roztočů, část/typ lišejníku a časový úsek. Náhodné efekty reprezentovaly variabilitu mezi jednotlivými opakováními – mezi jednotlivými boxy. Bylo použito Poissonovo rozdělení pravděpodobnosti. Tato analýza byla díky signifikanci efektů následována post-hoc testy s použitím Bonferroniho korekce p-hodnot pro detailní srovnání jednotlivých skupin. Výsledky byly graficky zobrazeny do rozptylových a sloupcových grafů. Analýzy včetně grafů byly provedeny v programu Jamovi (R Core Team 2021; The jamovi project 2022) za použití balíčku GAMLj (Gallucci 2019).

4. Výsledky

4.1. Lišejník

4.1.1. TLC

Výsledky tenkovrstevné chromatografie ukázaly, že oba morfotypy *Cladonia norvegica* (s červenými skvrnami a bez nich) obsahují stejné sekundární metabolity – kyselinu barbatovou a 4-O-demethylbarbatovou (viz Obr. 8 a Obr. A–D, Přílohy). Kyselina rhodokladonová, jejíž přítomnost tyto dvě formy odlišuje, metodou TLC není příliš dobře zobrazitelná (téměř nevzlíná) a tvoří pouze světle růžovou skvrnu v místě nanesení na desku.



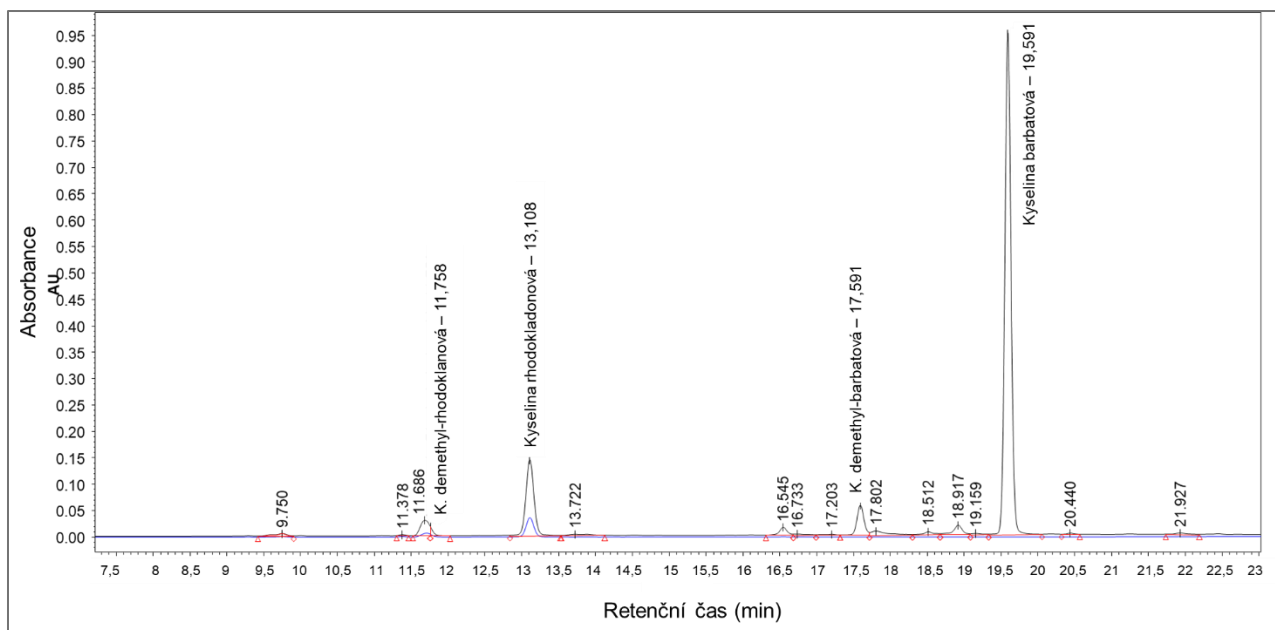
Obr. 8: TLC (systém A) dvanácti položek *Cladonia norvegica* z různých lokalit (ČR, Estonsko, Kanada, Rakousko, jedenáct je položek s červenými skvrnami a vzorek č. 13 je položka bez skvrn z Norska), vzorek č. 5 označuje standard (*Cladonia symphycarpa*)

4.1.2. HPLC a LC-HRMS analýza

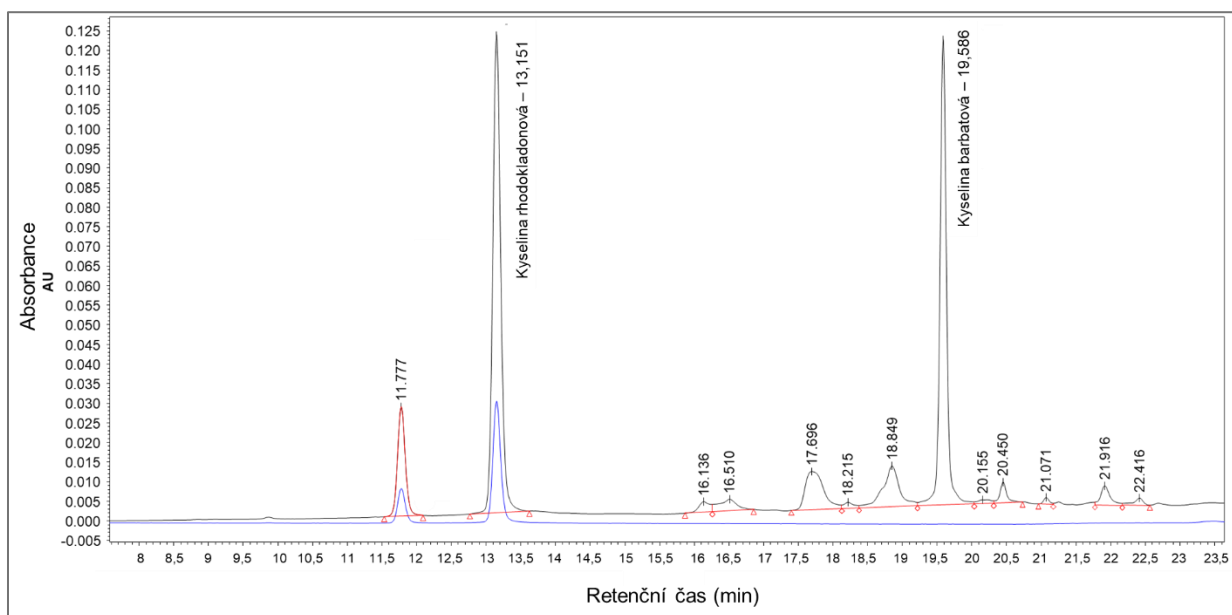
HPLC a následná LC-HRMS analýza prokázala přítomnost čtyř sekundárních metabolitů ve třech analyzovaných stélkách *Cladonia norvegica* s červenými skvrnami: kyseliny rhodokladonové, demethyl-rhodokladonové, barbatové a demethyl-barbatové, přičemž ve všech třech vzorcích dominovala kyselina barbatová. Dobře je to patrné na srovnání retenčních časů daných látek u standardu a vzorku *C. norvegica* (Obr. 9 a Obr. 10), naměřené molekulové hmotnosti jednotlivých látek, které vyšly téměř stejně jako teoretické molekulové hmotnosti (Tab. 4) a UV spektrech jednotlivých látek (Obr. E a Obr. F, Přílohy).

Tab. 4: Přehled látek obsažených v *Cladonia norvegica* (v červených částech stélky) včetně vzorce, retenčního času, teoretické a naměřené molekulové hmotnosti M (drobné rozdíly v molekulové hmotnosti jsou dané přítomností vodíku v molekule u teoretické, který byl po ionizaci v hmotnostním spektrometru odstraněn)

Název	Vzorec	Rt (min)	Teoretická M	Naměřená M
Kyselina rhodokladonová	$C_{15}H_{10}O_8$	13,1	318,03757	317,0298
K. demethyl-rhodokladonová	$C_{14}H_8O_8$	11,8	304,02192	303,0156
Kyselina barbatová	$C_{19}H_{20}O_7$	19,6	360,120905	359,1138
K. demethyl-barbatová	$C_{18}H_{18}O_7$	17,6	346,105255	345,0976



Obr. 9: HPLC analýza vzorku B1 (*Cladonia norvegica*), černě značený UV signál 290 nm, modře UV signál 440 nm)



Obr. 10: HPLC analýza standardu B5 (*Cladonia bellidiflora* pro určení kyseliny rhodoklanonové); černě značený UV signál 290 nm, modře UV signál 440 nm)

4.1.3. Fylogenetické analýzy

Konkatenovaný alignment (dlouhý 2091 nukleotidů) obsahoval celkem 91 sekvencí, ze kterých bylo 42 sekvencí mých vlastních. Podařilo se získat 42 sekvencí markeru ITS rDNA (30 sekvencí skvrnitě formy a dvanáct sekvencí formy zelené), 37 sekvencí markeru mtSSU (z toho 25 skvrnitě formy a dvanáct formy zelené) a 39 sekvencí markeru EF-1 α (28 skvrnitě formy a jedenáct formy zelené). Vlastní získané sekvence studovaného lišejníku pocházely z položek z České republiky, Estonska, Kanady, Norska, Rakouska a Skotska.

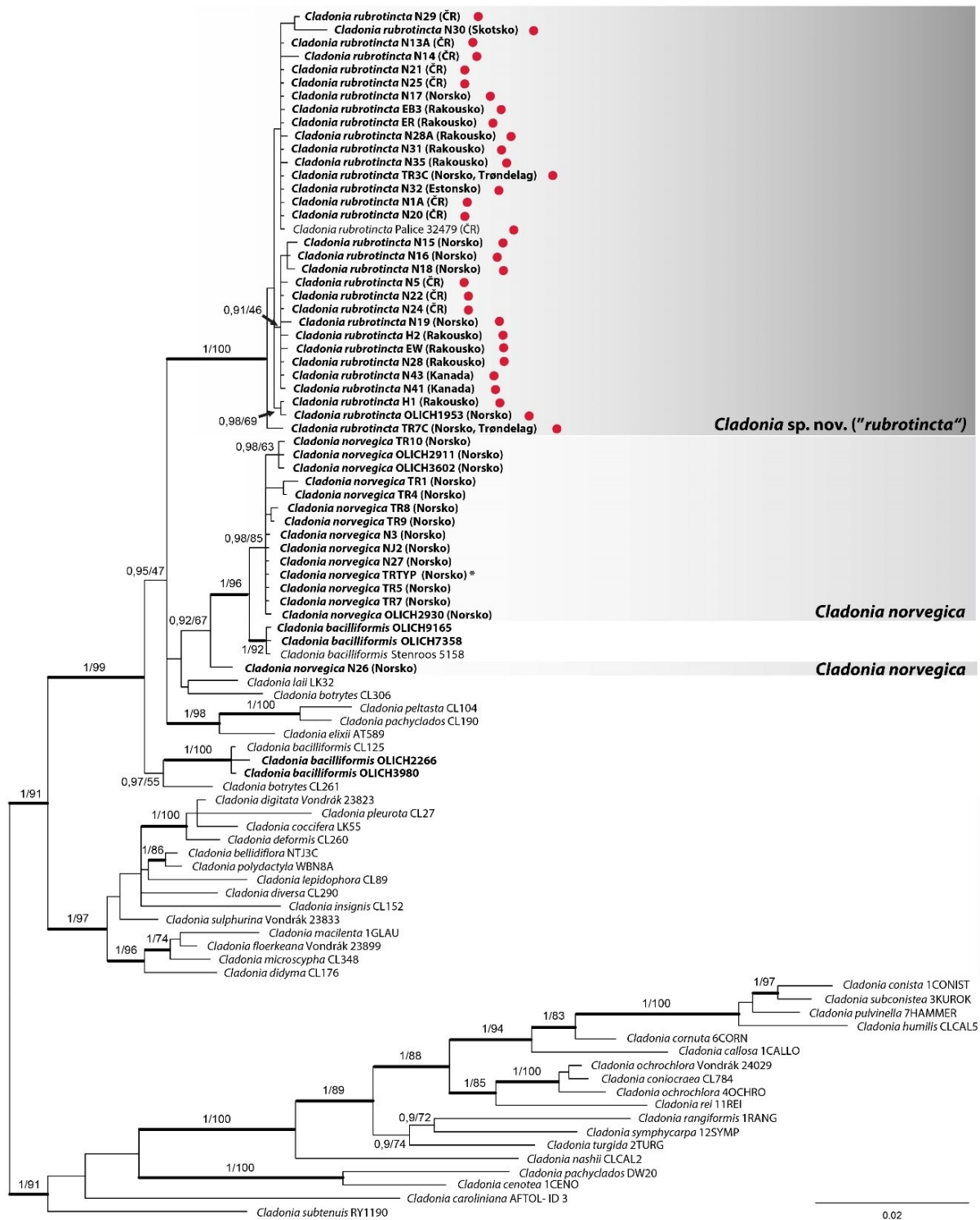
Z výsledku fylogenetických analýz (Obr. 12) vyplynulo, že sekvence pocházející z položek s červenými skvrnami (včetně položek ze středního Norska z Trøndelagu, odkud byla známá zatím pouze forma bez skvrn) tvoří podpořenou monofyletickou linii odlišenou od zástupců bez červených skvrn. Tato linie tvoří samostatný druh, který bude v textu dále označován jako *Cladonia „rubrotincta“* a formálně bude popsán v připravovaném manuskriptu.

Zástupci *Cladonia norvegica* bez červených skvrn naopak neutvořili monofyletickou linii (zástupce N26 utvořil samostatnou linii). Většina zástupců zelené formy *C. norvegica* (včetně položky z typové lokality označené ve stromu hvězdičkou) vytvořil podpořenou linii sesterskou k taktéž podpořenému cladu obsahujícímu tři sekvence druhu *Cladonia bacilliformis*. Společně tyto dva clady tvoří silně podpořenou linii. Druh *C. bacilliformis* je polyfytetickým, jelikož další tři jeho zástupci *C. bacilliformis* vytvořily samostatnou vzdálenější podpořenou linii.

Všechny výše zmíněné lišejníky spadají do skupiny Ochroleucae (dutohlávky se světlými plodnicemi, Obr. 11).



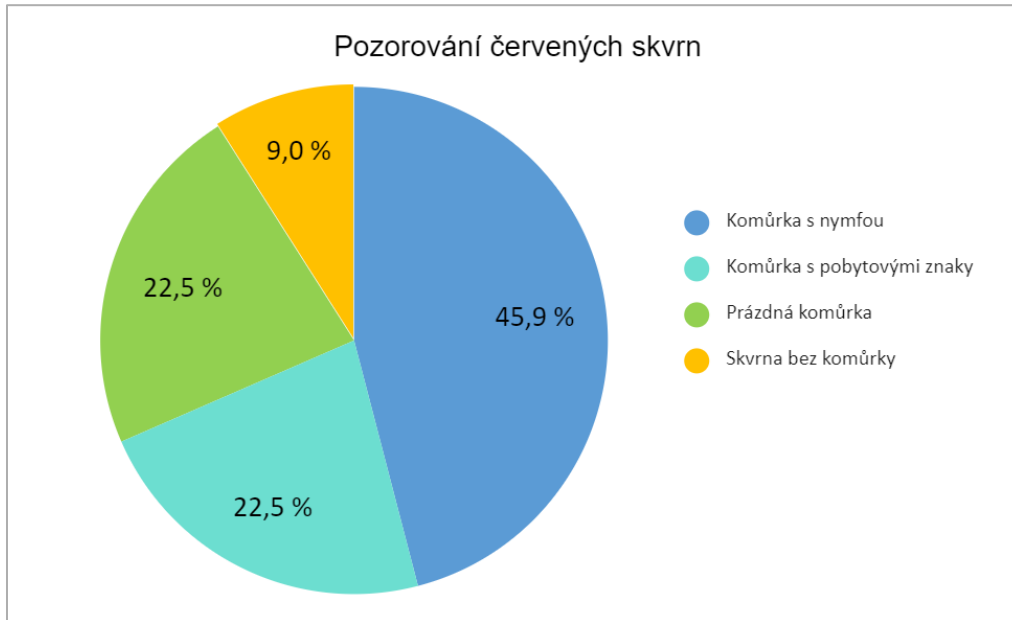
Obr. 11: Světlá plodnice *Cladonia „rubrotincta“* (herbářová položka z Rakouska 16204 Jiří Malíček)



Obr. 12: BI fylogenetický strom; podpora jednotlivých větví je vyjádřena MrBayes posteriorními pravděpodobnostmi (pp)/bootstrapy z maximum likelihood analýzy z konkaténovaného datasetu (ITS rDNA, mtSSU, EF-1 α); zobrazeny jsou hodnoty pp nad 0,9 s odpovídajícími bootstrapy; tučně jsou zdůrazněny větve s pp=1; tučně zvýrazněná jména taxonů odpovídají nově získaným dosud nepublikovaným sekvencím; červenými tečkami jsou označeny lišejníky obsahující červené skvrny na stélce; hvězdičkou je označen vzorek z typové lokality druhu *Cladonia norvegica*

4.1.4. Pozorování červených skvrn na stélce *Cladonia norvegica*

Výsledky pozorování červených skvrn na stélkách ukázaly (Obr. 13), že většina červených skvrn souvisela s výskytem roztočů (jednalo se o komůrky obsahující nymfy a/nebo pobytové znaky roztočů) či se jednalo o duté komůrky bez pobytových znaků, ve kterých se ale nymfy mohly vyvíjet – celkem se jednalo o 90,9 % případů. Ve zbylých 9 % byl pouze zaznamenán červený pigment ve stélce, bez jakékoliv známky využití roztoči.



Obr. 13: Shrnutí pozorování červených skvrn

4.2. Identifikace roztočů

4.2.1. Nymfy

Z celkového počtu 28 nymf, ze kterých byla izolována DNA, bylo získáno pouze osm kvalitních sekvencí. To bylo pravděpodobně způsobeno skladováním sebraných lišejníků, kdy bylo dbáno na zachování dostatečné vlhkosti, aby bylo posléze možné extrahovat dospělé roztoče. Je možné, že tak došlo ke znehodnocení nymf uvnitř stélky.

Získané sekvence nymf vykazovaly 100 % shodu se sekvencemi dospělců těchto druhů: *Carabodes marginatus* a *Mycobates carli* (Tab. 5). *Carabodes marginatus* byl potvrzen ze tří lokalit (ze dvou norských lokalit z okolí Osla a z české lokality z Žofínského pralesu). Celkem pět nymf *Mycobates carli* bylo potvrzeno ze tří lokalit (ze dvou rakouských položek se osekvenovaly nymfy ze dvou různých komůrek na každé položce) včetně jedné ze dvou nově objevených lokalit *Cladonia „rubrotincta“* v oblasti Trøndelagu v Norsku.

Tab. 5: Výsledky molekulární identifikace nymf extrahovaných z červených částí stélky skvrnitě *Cladonia „rubrotincta“*

ID	Z lišejníku	Druh	Lokalita
N28a	VV19	<i>Mycobates carli</i>	Rakousko, Steiermark, Weinebene
N28b	VV19	<i>Mycobates carli</i>	Rakousko, Steiermark, Weinebene
N28Aa	VV20	<i>Mycobates carli</i>	Rakousko, Steiermark, Weinebene
N28Ab	VV20	<i>Mycobates carli</i>	Rakousko, Steiermark, Weinebene
TR7ČFb	VV15	<i>Mycobates carli</i>	Norsko, Trøndelag, Løkkstad
vv4-1g	VV4	<i>Carabodes marginatus</i>	Norsko, Viken, Enebakk, Nordre Vinholtjern
vv3-1c	VV2	<i>Carabodes marginatus</i>	Norsko, Viken, Enebakk, Fjell
vv13-1c	DS 29.10.2022	<i>Carabodes marginatus</i>	Česká republika

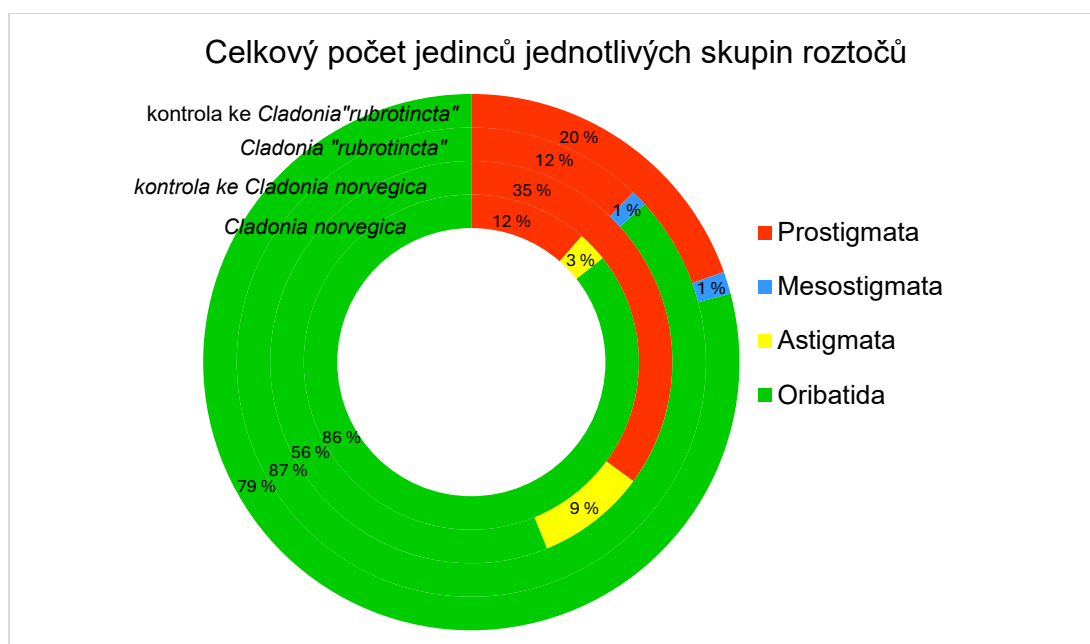
4.2.2. Dospělci

Celkem bylo na 14 studovaných položkách (včetně těch manuálně extrahovaných z ČR a Skotska) *Cladonia „rubrotincta“* s červenými skvrnami nalezeno 51 druhů roztočů ze skupiny Oribatida. Dále byla zaznamenána přítomnost roztočů ze skupin Prostigmata a Mesostigmata, kteří nebyli dále určováni. Pět položek čistě zeleného lišejníku druhu *Cladonia norvegica* ze středního Norska obsahovalo celkem 19 druhů roztočů ze skupiny Oribatida a roztoče ze skupin Prostigmata a Astigmata, získaných celkem z pěti vzorků. Seznam všech nalezených roztočů je k nahlédnutí v Tab. B, Přílohy.

Z celkového počtu 28 položek (obsahujících roztoče ze skvrnitě *Cladonia „rubrotincta“*, bezskvrnné *C. norvegica* a z k ní sesbíraných kontrolních vzorků) výrazně převyšovali počtem jedinců roztoči ze skupiny Oribatida (83 %), následovali zástupci Prostigmata (16 %) a nejméně bylo roztočů náležejících do skupin Mesostigmata a Astigmata (po 1 %). Viz přehled níže (Tab. 6 a Obr. 14).

Tab. 6: Celkový počet nalezených roztočů

Roztoči	Prostigmata	Astigmata	Mesostigmata	Oribatida
Celkový součet jedinců	219	10	14	1150



Obr. 14: Přehled celkového počtu jedinců dle jednotlivých skupin roztočů a lišejníků, na kterých byly roztoči nalezeny (kontrolou byly lišejníky druhu *Cladonia coniocraea*).

Po provedení testu normality (Tab. 7) se ukázalo, že počet druhů roztočů vykazuje statisticky normální rozdělení hodnot. V případě celkového počtu jedinců naopak vyšla odchylka od normálního rozdělení signifikantně (p -hodnota $< 0,001$), což by mohlo poukazovat na agregovanou distribuci roztočů napříč vzorky lišejníků (tedy, že jednotlivé vzorky obsahují velmi odlišné počty roztočů).

Tab. 7: Shapiro-Wilkův test normality

	W	p
Počet druhů	0.949	0.190
Počet jedinců	0.830	< .001

Test homogenity rozptylu (Tab. 8) vyšel nesignifikantně (p -hodnota 0,920 pro počet druhů a 0,997 pro počet jedinců), což naznačuje, že rozptyly hodnot jsou stejné napříč skupinami (jednotlivými lišejníky).

Tab. 8: Levenův test homogenity rozptylu

	F	df1	df2	p
Počet druhů	0.08415	2	25	0.920
Počet jedinců	0.00320	2	25	0.997

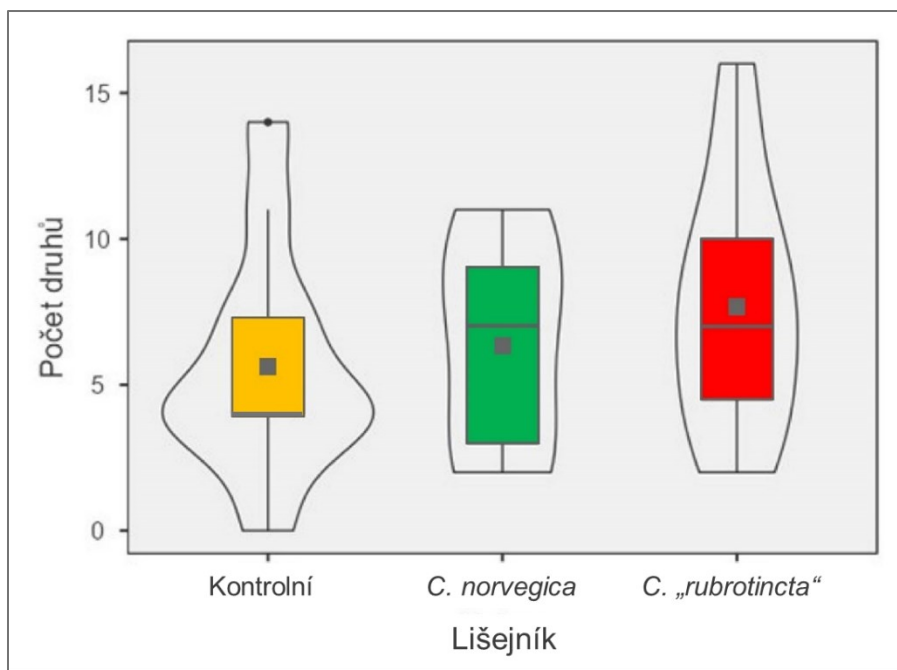
Protože p -hodnoty analýzy ANOVA (Tab. 9) pro počet druhů a počet jedinců také vyšly nesignifikantně (0,521 a 0,722), lze vyvodit, že rozdíly mezi průměry jednotlivých skupin nejsou statisticky významné a skvrnitá *Cladonia „rubrotincta“*, bezskvrnná *C. norvegica* a kontrolní *C. coniocraea* se téměř neliší v počtu druhů, ani v počtu jedinců roztočů.

Tab. 9: Welchova jednofaktorová ANOVA

	F	df1	df2	p
Počet druhů	0.690	2	11.5	0.521
Počet jedinců	0.335	2	10.9	0.722

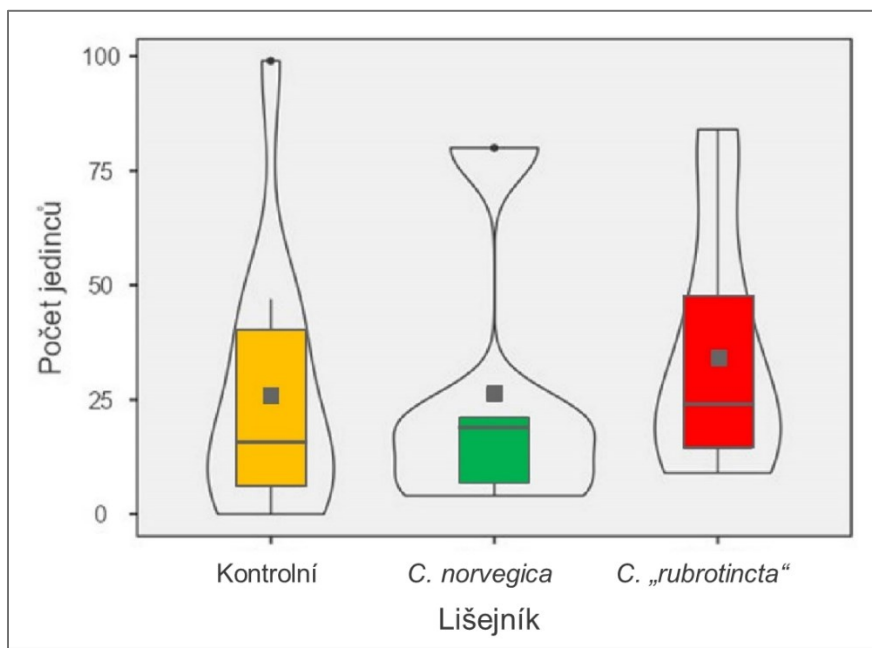
Z grafů níže (Obr. 15 a Obr. 16) je patrné, že průměr počtu druhů roztočů i průměr jedinců se na jednotlivých lišejnících příliš neliší.

Počet druhů na vzorek dosahuje nejvyšších hodnot v případě *Cladonia „rubrotincta“*. Čistě zelená *C. norvegica* vykazuje nejmenší variabilitu v počtu druhů (což naznačuje koncentrace hodnot kolem mediánu). Kontrolní lišejníky ukazují větší variabilitu v počtu druhů a širší rozložení hustotního grafu naznačuje velké množství vzorků s menším počtem druhů.



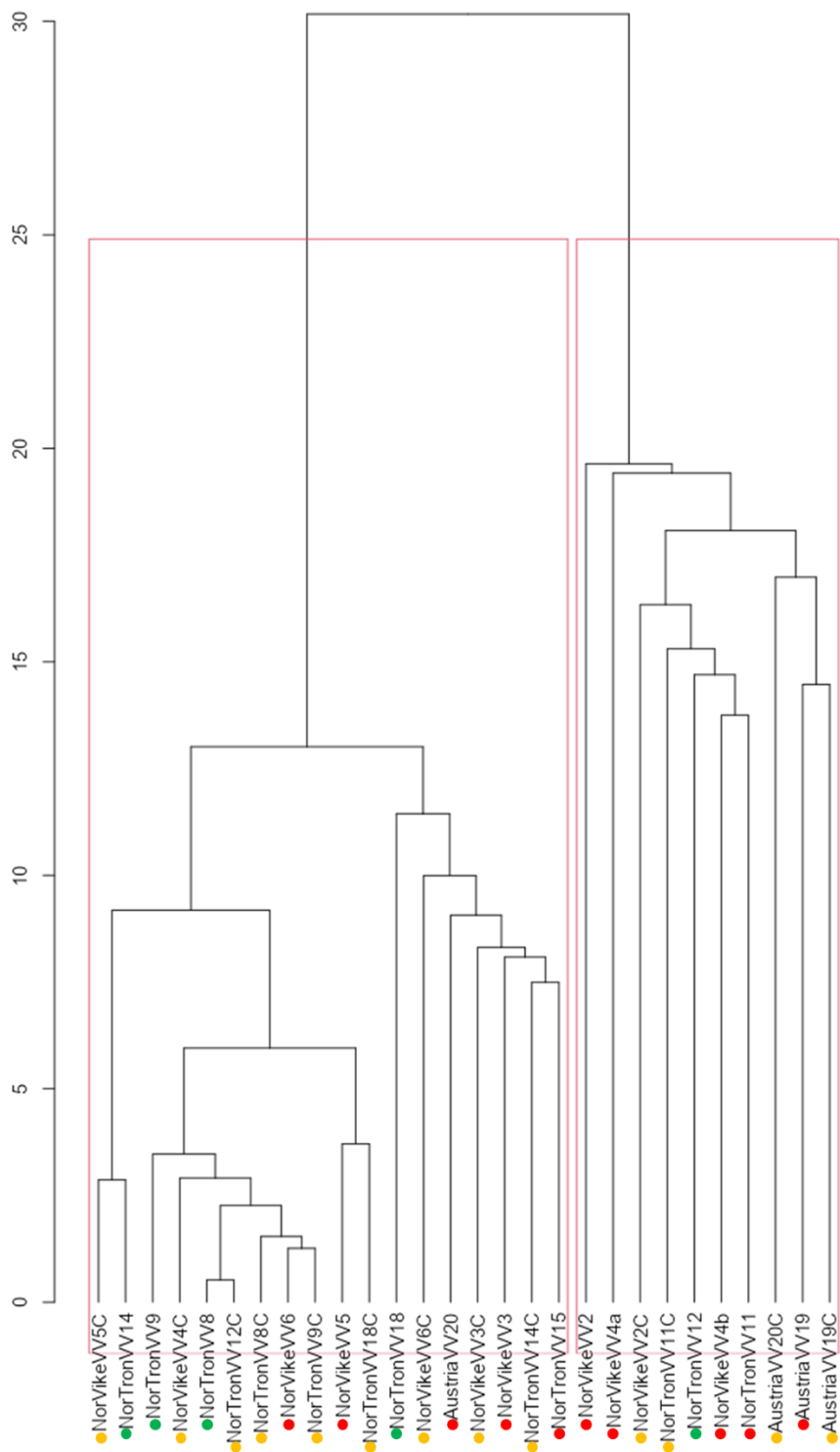
Obr. 15: Graf znázorňující počet druhů pancířníků ve vzorcích rozdělených podle druhu lišejníku rodu *Cladonia* (černý čtvereček označuje průměr, tlustá vodorovná čára medián)

Počet jedinců u skvrnitě *Cladonia* „*rubrotincta*“ ukazuje poměrně rovnoměrné rozložení dat s více vzorky obsahující malý počet jedinců. Bezeskvrnná *C. norvegica* též obsahovala více vzorků s menším počtem jedinců, zároveň ale také několik vzorků s velkým počtem roztočů. Také kontrolní lišejníky obsahovaly spíše menší počet jedinců, ačkoliv i zde byly vzorky obsahující větší množství roztočů. Dokonce právě u kontrolního lišejníku byl nalezen vzorek s nejvyšším zaznamenaným počtem roztočů vůbec (maximum 99 jedinců) a také naopak s nejmenším (jeden vzorek neobsahoval žádné roztoče ze skupiny Oribatida).



Obr. 16: Graf znázorňující počet jedinců pancířníků ve vzorcích rozdělených podle druhu lišejníku rodu *Cladonia* (černý čtvereček označuje průměr, tlustá čára medián)

Podobnost společenstev roztočů v jednotlivých vzorcích lišejníků je zobrazena na dendrogramu ze shlukové analýzy níže (Obr. 17). Ačkoliv se vzorky rozdělují do dvou skupin, není zde patrný žádný výrazný trend. Ve druhé skupině převažují vzorky skvrnitě *Cladonia* “*rubrotincta*“ a je zde pouze jeden vzorek čistě zelené *C. norvegica*. Zároveň jsou si podobné tři ze čtyř rakouských vzorků. Různé lokality jsou, nicméně, stejně jako jednotlivé lišejníky, rozptýleny a neukazují tedy na žádnou podobnost. Některé vzorky se svými kontrolami se však sdružují (VV19 a VV19C, VV3 a VV3C, VV8 a VV8C, VV9 a VV9C), což poukazuje na podobná společenstva roztočů na těchto lokalitách na různých lišejnících. Protože ale většina vzorků se svými kontrolami nevykazuje podobnost, lze říci, že se složení roztočů na lišejnících *C. “rubrotincta”* a *C. norvegica* liší od kontrolních lišejníků (*C. coniocraea*) sbíraných na stejných lokalitách. A protože se dle analýzy uvedené výše neliší v počtech, rozdíly jsou patrné spíše v druzích, které na jednotlivých lišejnících žijí, ačkoliv nejběžnější roztoči se obvykle vyskytují na všech lišejnících (rozdíly jsou tedy spíše v druzích méně zastoupených). To lze vidět i na grafech níže (Obr. 19, 20 a 21).



Obr. 17: Dendrogram shlukové analýzy (Wardovou metódou s využitím Euklidovské vzdálenosti a shlukovacím kritériem 20) zobrazujúci podobnosti jednotlivých vzorků; červenými tečkami označena skvrnitá *Cladonia* „*rubrotincta*“, zelenými bezeskvorná *C. norvegica* a oranžovými kontrolní vzorky (*C. coniocraea*); zkratka „NorVike“ poukazuje na norské lokality ve Vikenu, „NorTron“ norské lokality v Trøndelagu a „Austria“ rakouské lokality; pokud je na konci ID vzorku „C“ ukazuje to na kontrolní vzorek ke vzorku se stejným číslem v ID

Nejčastěji zaznamenanými druhy roztočů byly druhy *Carabodes labyrinthicus*, *Carabodes areolatus*, *Carabodes marginatus* (Obr. 18) a v menší míře i *Carabodes subarticus* a *Neobrachychthonius marginatus magnus*. Níže v Tab. 10 jsou vypsány ty druhy roztočů, které byly přítomny ve více než 10 % vzorků.

Tab. 10: Nejčastější roztoči na všech vzorcích

Celkem	
Druh roztoče	Frekvence
<i>Carabodes labyrinthicus</i>	86 %
<i>Carabodes areolatus</i>	75 %
<i>Carabodes marginatus</i>	64 %
<i>Carabodes subarticus</i>	32 %
<i>Neobrachychthonius marginatus magnus</i>	29 %
<i>Melanozetes mollicomus</i>	18 %
<i>Phthiracarus</i> sp.	18 %
<i>Tectocepheus velatus velatus</i>	18 %
<i>Tectocepheus velatus sensu lato</i>	11 %
<i>Zygoribatula exilis</i>	14 %
<i>Lagenobates lagenulus</i>	14 %
<i>Suctobelba regia</i>	14 %
<i>Suctobelbella arcana</i>	14 %
<i>Caleremaeus</i> sp.	11 %
<i>Hermannia gibba</i>	11 %
<i>Chamobates cuspidatus</i>	11 %
<i>Eueremaeus</i> cf. <i>valkanovi</i>	11 %
<i>Ceratoppia bipilis</i>	11 %
<i>Oribatula tibialis</i>	11 %



Obr. 18: Nejhojnější nalezené druhy dospělých roztočů; zvětšení 100x (autor: Ladislav Miko a Věra Vtípilová)

Dále uvádím tabulky (Tab. 11, 12 a 13) nejčastěji nalézaných roztočů na jednotlivých druzích lišejníků. Zajímavé jsou rozdíly v četnosti roztočů rodu *Carabodes*, přičemž červeně skvrnitá *Cladonia "rubrotincta"* obsahovala častěji druhy *Carabodes labyrinthicus* a *Carabodes areolatus* než *Carabodes marginatus*, ačkoliv právě nymfy tohoto druhu byly identifikovány jako ty vyskytující se v červených komůrkách lišejníku. Další zajímavostí je absence druhu *Mycobates carli* mezi nejčastějšími druhy roztočů, přestože i tento druh byl nalezen mezi nymfami extrahovanými z červených částí stélky lišejníku.

Norská čistě zelená *Cladonia norvegica* obsahovala ve všech případech roztoče druhu *Carabodes labyrinthicus*, v menší míře potom *Carabodes marginatus* a 60 % vzorků obsahovalo také *Carabodes areolatus* a *Carabodes subarticus*.

Kontrolní vzorky obsahovaly nejčastěji druh *Carabodes labyrinthicus*, následovaný *Carabodes areolatus* a *Carabodes marginatus*. *Carabodes subarticus* byl v kontrolních vzorcích zastoupen méně než v lišejnících *Cladonia "rubrotincta"* a *Cladonia norvegica*.

Tab. 11: Nejhojnější roztoči na *Cladonia „rubrotincta“*

Cladonia „rubrotincta“	
Druh roztoče	Frekvence
<i>Carabodes labyrinthicus</i>	90 %
<i>Carabodes areolatus</i>	90 %
<i>Carabodes marginatus</i>	60 %
<i>Neobrachychthonius marginatus magnus</i>	50 %
<i>Carabodes subarticus</i>	30 %

Tab. 12: Nejhojnější roztoči na *Cladonia norvegica*

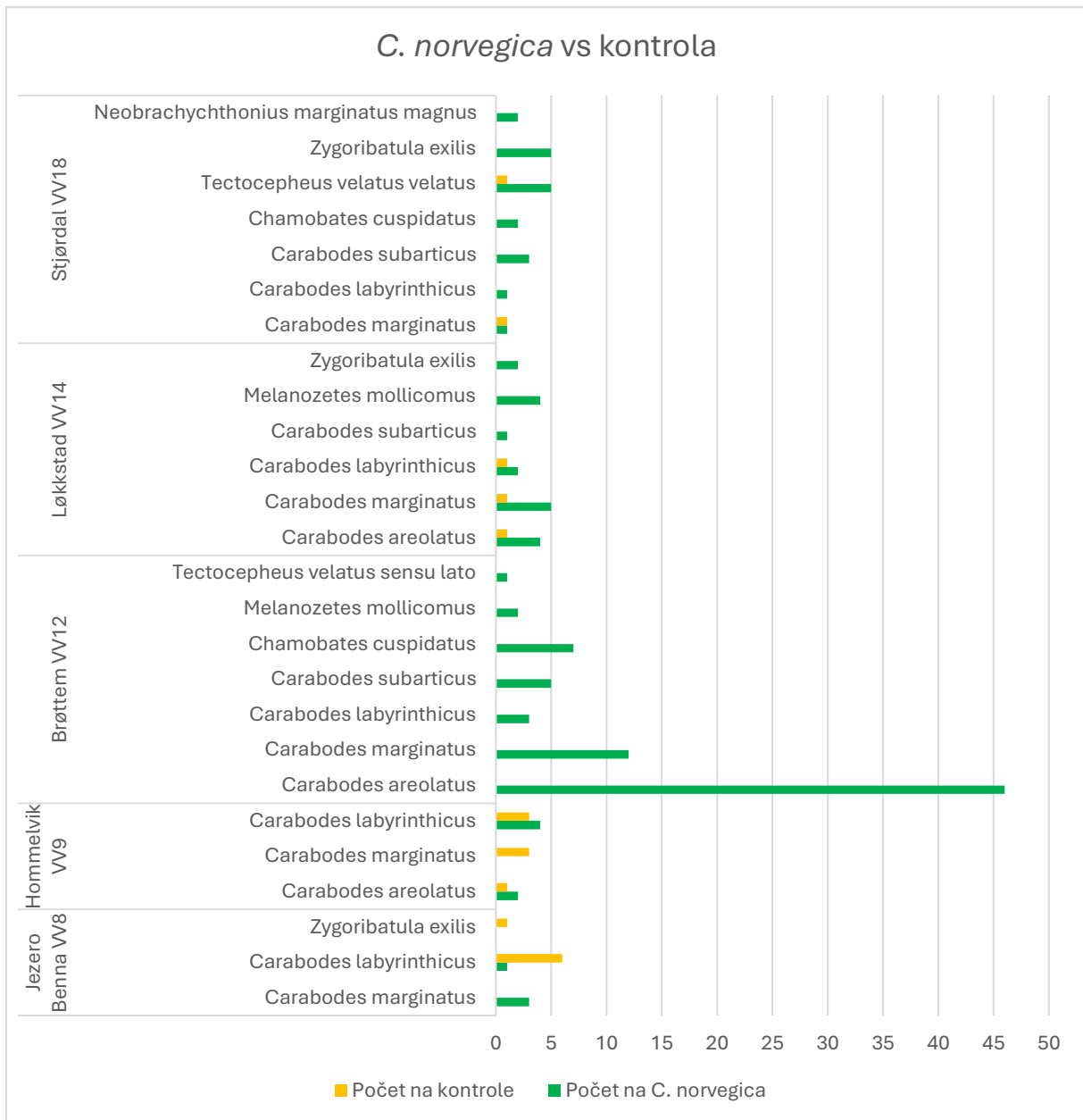
Cladonia norvegica	
Druh roztoče	Frekvence
<i>Carabodes labyrinthicus</i>	100 %
<i>Carabodes marginatus</i>	80 %
<i>Carabodes areolatus</i>	60 %
<i>Carabodes subarticus</i>	60 %
<i>Zygoribatula exilis</i>	40 %
<i>Melanozetes mollicomus</i>	40 %
<i>Chamobates cuspidatus</i>	40 %

Tab. 13: Nejhojnější roztoči na kontrolních lišejnicích *Cladonia coniocraea*

Kontrola	
Druh roztoče	Frekvence
<i>Carabodes labyrinthicus</i>	77 %
<i>Carabodes areolatus</i>	69 %
<i>Carabodes marginatus</i>	62 %
<i>Carabodes subarticus</i>	23 %
<i>Tectocephus velatus velatus</i>	23 %

Pro úplný přehled nalezených druhů přikládám níže grafy (Obr. 19, 20 a 21) znázorňující nalezené druhy roztočů na jednotlivých vzorcích s informací o lokalitě a porovnáním s kontrolními vzorky (sbíranými na stejných místech jako *Cladonia „rubrotincta“* a *C. norvegica*).

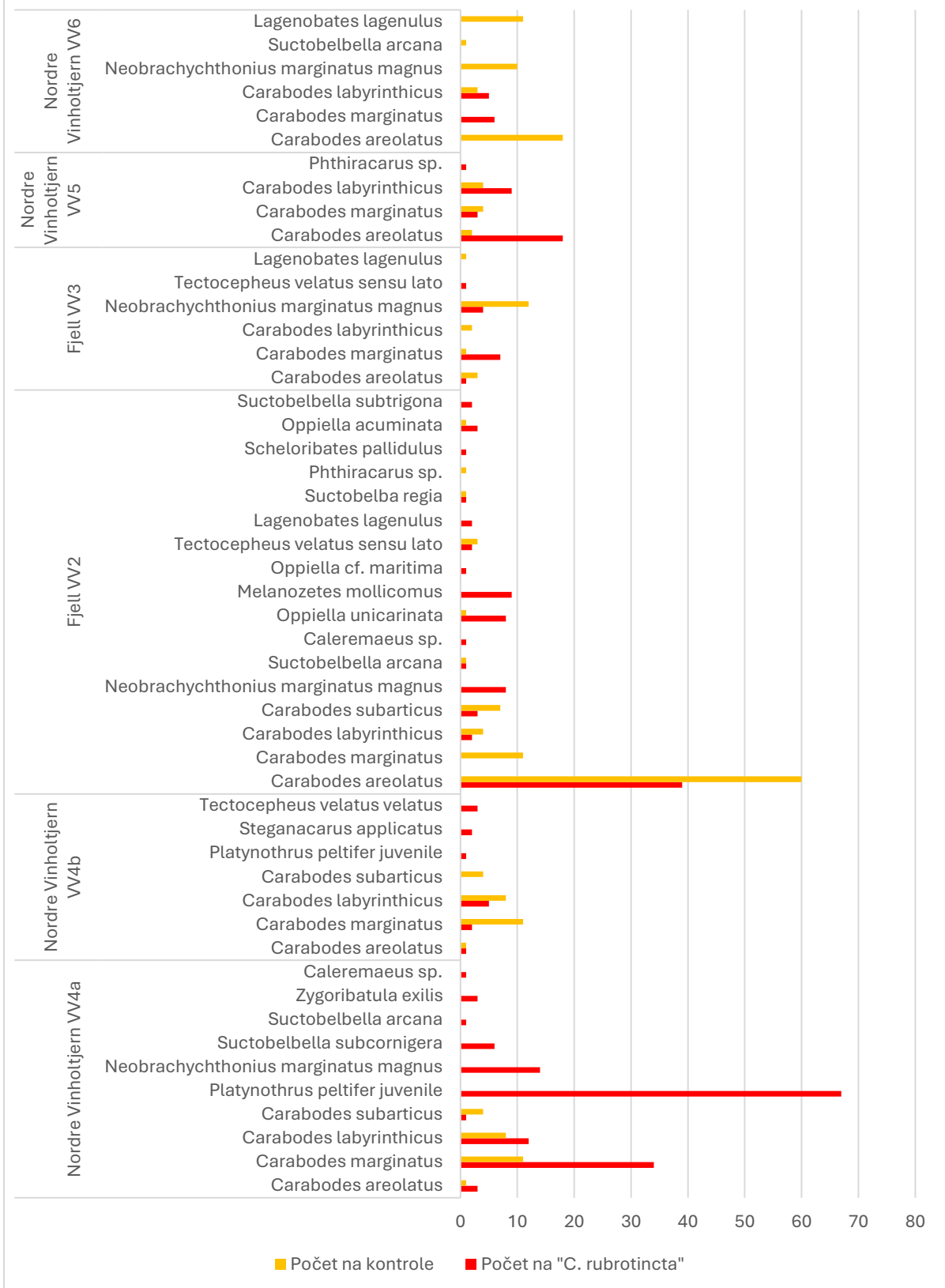
Na grafu níže (Obr. 19) je patrné, že druh *Cladonia norvegica* hostil více jedinců i druhů roztočů než kontrolní druh *C. coniocraea*. Kontrolní vzorek VV12 dokonce neobsahoval žádné dospělé pancířníky.



Obr. 19: Roztoči nalezení na čistě zelené *Cladonia norvegica* a kontrolní *Cladonia coniocraea* z oblasti Trøndelagu

Na grafech se skvrnitou *Cladonia "rubrotincta"* (Obr. 20 a 21) je vidět různorodost jednotlivých vzorků. Některé kontrolní vzorky dokonce obsahují více druhů či jedinců roztočů než *C. "rubrotincta"*, přesto ale většina vzorků *C. "rubrotincta"* převyšovala kontrolní vzorky v počtu druhů roztočů.

Cladonia "rubrotincta" vs kontrola (Norsko Viken - Enebakk)

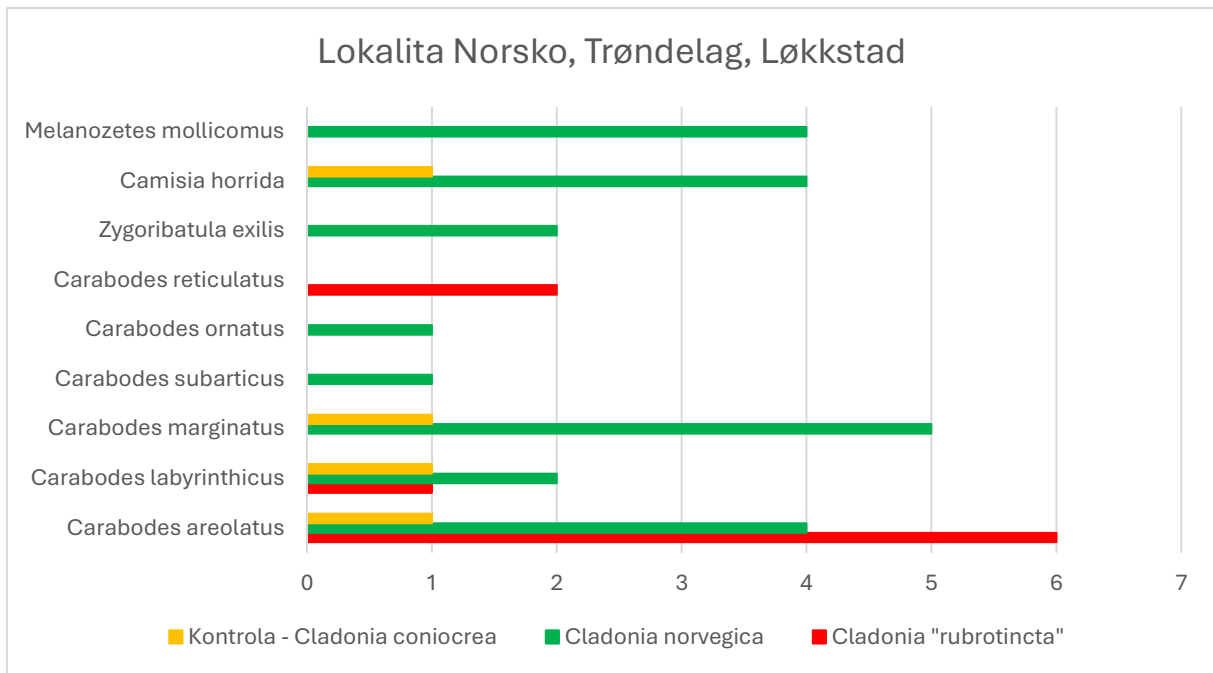


Obr. 20: Roztoči nalezení na skvrnitě *Cladonia „rubrotincta“* a kontrolní *Cladonia coniocraea* z oblasti Vikenu



Obr. 21: Roztoči nalezení na skvrnitě *Cladonia „rubrotincta“* a kontrolní *Cladonia coniocraea* z Rakouska a norského Trøndelagu

Obr. 22 ukazuje porovnání nalezených roztočů na jednotlivých lišejnících na téže lokalitě v Trøndelagu. Na všech třech lišejnících se vyskytoval *Carabodes labyrinthicus* a *Carabodes areolatus*, celkem překvapivě na skvrnitě *Cladonia „rubrotincta“* chyběl *Carabodes marginatus* (i *Carabodes subarticus*, který chyběl i v kontrolních vzorcích). Na této lokalitě vykazovala největší diverzitu roztočů bezeskrvná *Cladonia norvegica*, na které byl nalezen navíc *Carabodes ornatus* a *Zygoribatula exilis*. Na lišejníku *Cladonia „rubrotincta“* však byl nalezen *Carabodes reticulatus*, který v žádném dalším vzorku nebyl.



Obr. 22: Nalezené druhy roztoců na studovaných družích na jedné lokalitě

Do statistického zhodnocení nebyly použity české vzorky (důvody viz metodika), přesto bych zde ráda uvedla seznam roztoců, kteří byli na českých vzorcích *Cladonia* “*rubrotincta*“ nalezeni.

Z těch častějších (dle Tab. 10) se jednalo o *Carabodes areolatus*, *Carabodes labyrinthicus*, *Carabodes marginatus*, *Carabodes subarticus*, *Caleremaeus* sp. a *Phthiracarus* sp. Z těch méně častých byly zastoupeny druhy *Carabodes ornatus*, *Eniochthonius minutissimus*, *Euphthiracars cribrarius*, *Anachipteria deficiens*, *Chamobates borealis*, *Parachipteria willmanni* a *Liacarus coracinus*.

Za zmínku stojí také jediný vzorek ze Skotska, který jsem měla možnost studovat (a který také nemohl být použit pro statistickou analýzu). Zajímavostí je absence běžných druhů roztoců rodu *Carabodes* nalezených na vzorcích pocházejících z ostatních evropských lokalit. Na tomto skotském vzorku se našli jedinci druhu *Carabodes willmanni* (Obr. 23) a lze tak předpokládat, že právě ti zde způsobují červenou reakci lišejníku.



Obr. 23: *Carabodes willmanni*; zvětšení 100x (autor: Ladislav Miko a Věra Vtípilová)

4.3. Potravně preferenční testy

4.3.1. Experiment SW (červené/zelené)

V experimentu SW byly roztočům nabízeny různé části stélky lišejníku *Cladonia „rubrotincta“*. Cílem bylo zjistit, zda si jako potravu vybírají roztoči spíše červené části nebo ty zelené. První zorientování ve výsledcích zobrazuje Tab. 14. Na první pohled je patrné, že roztoči druhu *Carabodes areolatus* zanechávaly významně méně fekálních pelet než roztoči druhu *Carabodes marginatus*. Více konzumovali na lišejnících v boxech 1 a 2. Ani v kontrolních boxech u tohoto druhu nebylo zaznamenáno významné spásání. U roztočů druhu *C. marginatus* byla konzumace lišejníků značná, avšak v kontrolním boxu (16CW) neprobíhalo spásání vůbec. Počet roztočů na jednotlivých částech lišejníku se ukázal být neprůkazný, co se týče spásání (viz rozdíly mezi počtem fekálních pelet a počtem roztočů v jednotlivých boxech v Tab. 14), a proto byl pro další analýzy použit pouze počet fekálních pelet.

Tab. 14: Souhrnné výsledky potravně preferenčních testů experimentu SW, porovnání v preferenci na základě fekálních pelet a počtu roztočů vyskytujících se na daném kusu stélky lišejníku; barevně jsou označeny preferované části v jednotlivých opakováních (boxech), CS označuje kontrolní boxy s červenými částmi lišejníku a CW kontrolní boxy s pouze zelenými částmi lišejníku

Experiment SW			Experiment SW		
Fekální pelety - maximum			Roztoči - součet		
ID box	červené	zelené	ID box	červené	zelené
<i>Carabodes areolatus</i>			<i>Carabodes areolatus</i>		
1	29	7	1	7	2
2	3	67	2	3	1
3	2	1	3	3	0
4	1	1	4	2	1
5	1	1	5	1	0
6	3	0	6	2	0
7CS	1	0	7CS	0	0
8CW	0	3	8CW	0	1
<i>Carabodes marginatus</i>			<i>Carabodes marginatus</i>		
9	241	72	9	96	29
10	168	117	10	47	37
11	7	57	11	7	12
12	39	58	12	22	12
13	210	1	13	46	1
14	116	41	14	37	10
15CS	174	0	15CS	64	0
16CW	0	0	16CW	0	4

Výsledek GLMM analýzy (jak blíže ukazují Tab. 15–19) ukázal na signifikanci jednotlivých fixních efektů (druh roztoče – mite, část lišejníku – lichen, časové období – day) a vztahů mezi nimi. Na základě tohoto zjištění mohly být provedeny post-hoc testy.

Tab. 15: Informace k modelu GLMM

Info	Value	Comment
Model Type	Poisson	Model for count data
Call	glm	pellets ~ 1 + mite + lichen + day + mite:lichen + (0 + mite box)
Link function	log	Coefficients are in the log(y) scale
Distribution	Poisson	Model for count data
LogLikel.	-1810.7	Unconditional Log-Likelihood
-2*LogLikel.	3621.3	Unconditional absolute deviance
Deviance	2941.5	Conditional relative deviance
R-squared	NaN	Marginal
R-squared	NaN	Conditional
AIC	3637.3	Less is better
BIC	3665.2	Less is better
Residual DF	232.0	
Chi-squared/DF	13.0	Overdispersion indicator
Converged	no	
Optimizer	bobyqa, Nelder_Mead, nloptwrap	

Omnibusový test fixních efektů (Tab. 16) ukázal signifikanci (p hodnoty < 0,05) všech fixních efektů i interakce mezi druhy roztočů a částmi lišejníku.

Tab. 16: Omnibusový test fixních efektů

	χ^2	df	p
mite	21.7	1.00	< .001
lichen	16.3	1.00	< .001
day	2766.6	1.00	< .001
mite * lichen	317.4	1.00	< .001

Z odhadů parametrů fixních efektů (Tab. 17) lze vyvodit, že počet fekálních pelet u druhu *Carabodes marginatus* je signifikantně vyšší než u druhu *Carabodes areolatus* (p hodnota > 0,05). Dále se potvrzuje, že celkový počet fekálních pelet se signifikantně zvyšuje každým dalším dnem experimentu. Interakce mezi druhy roztočů a částmi lišejníku je též signifikantní, což poukazuje na rozdíl ve výběru lišejníkových částí mezi dvěma druhy roztočů.

Tab. 17: Odhady parametrů fixních efektů

Names	Effect	Estimate	SE	exp(B)	95% Exp(B) Confidence Interval		z	p
					Lower	Upper		
(Intercept)	(Intercept)	1.301	0.41333	3.672	1.633	8.255	3.15	0.002
mite1	marginatus - areolatus	3.845	0.82636	46.776	9.260	236.278	4.65	< .001
lichen1	Without - Spots	0.221	0.05473	1.247	1.120	1.389	4.04	< .001
day	day	0.197	0.00375	1.218	1.209	1.227	52.60	< .001
mite1 * lichen1	marginatus - areolatus * Without - Spots	-1.950	0.10947	0.142	0.115	0.176	- 17.82	< .001

Analýza náhodných efektů (Tab. 18) prokázala značnou variabilitu v počtu fekálních pelet v jednotlivých boxech u roztoče druhu *Carabodes areolatus*. U druhu *C. marginatus* tato variabilita nebyla tak značná.

Tab. 18: Náhodné komponenty

Groups	Name	SD	Variance	ICC
box	mite areolatus	1.904	3.625	
	mite marginatus	0.557	0.311	
Residuals		1.000	1.000	.

Byla zjištěna pozitivní korelace mezi náhodnými efekty (Tab. 19) pro oba druhy roztočů.

Tab. 19: Korelace náhodných parametrů

Groups	Param.1	Param.2	Corr.
box	mite areolatus	mite marginatus	0.739

Následné post-hoc testy (Tab. 20–22) ukázaly, že má smysl porovnávat konzumaci červených a zelených částí lišejníku *Cladonia „rubrotincta“* u jednotlivých druhů roztočů. Zároveň je zde i zřejmý rozdíl v produkci fekálních pelet mezi roztoči *Carabodes areolatus* a *Carabodes marginatus*.

Post-hoc test pro porovnání jednotlivých druhů roztočů (Tab. 20) ukázal signifikantní rozdíl (p hodnota < 0,05).

Tab. 20: Post-hoc test pro druhy roztočů (*Carabodes areolatus* a *C. marginatus*)

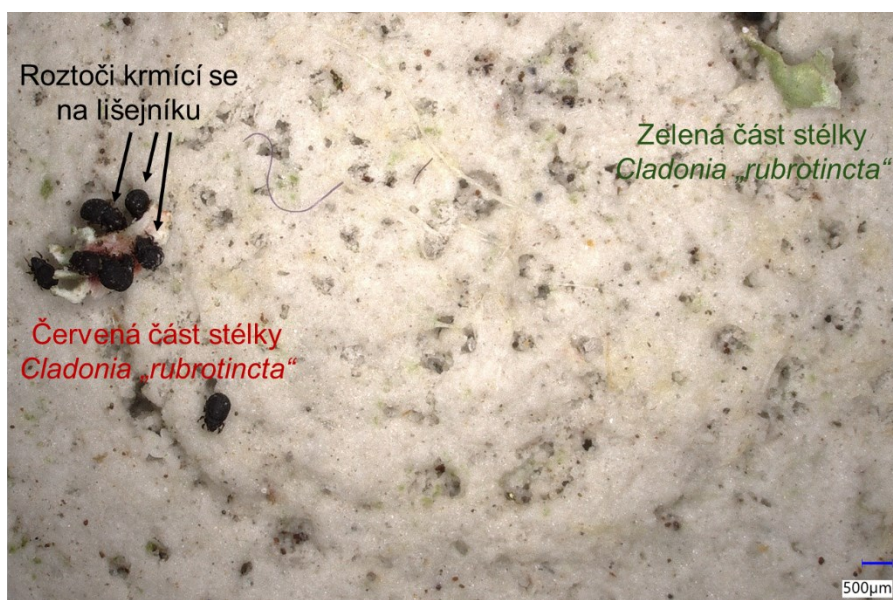
Comparison		exp(B)	SE	z	pbonferroni
mite	mite				
areolatus	- marginatus	0.0214	0.0177	-4.65	< .001

Post-hoc test pro porovnání jednotlivých částí lišejníku (Tab. 21) ukázal, že počet fekálních pelet na červených částech stélky se signifikantně ($p < 0,05$) lišil oproti počtu fekálních pelet na zelených částech.

Tab. 21: Post-hoc test pro části lišejníku (červené a zelené)

Comparison					
lichen	lichen	exp(B)	SE	z	P _{bonferroni}
Spots	- Without	0.802	0.0439	-4.04	< .001

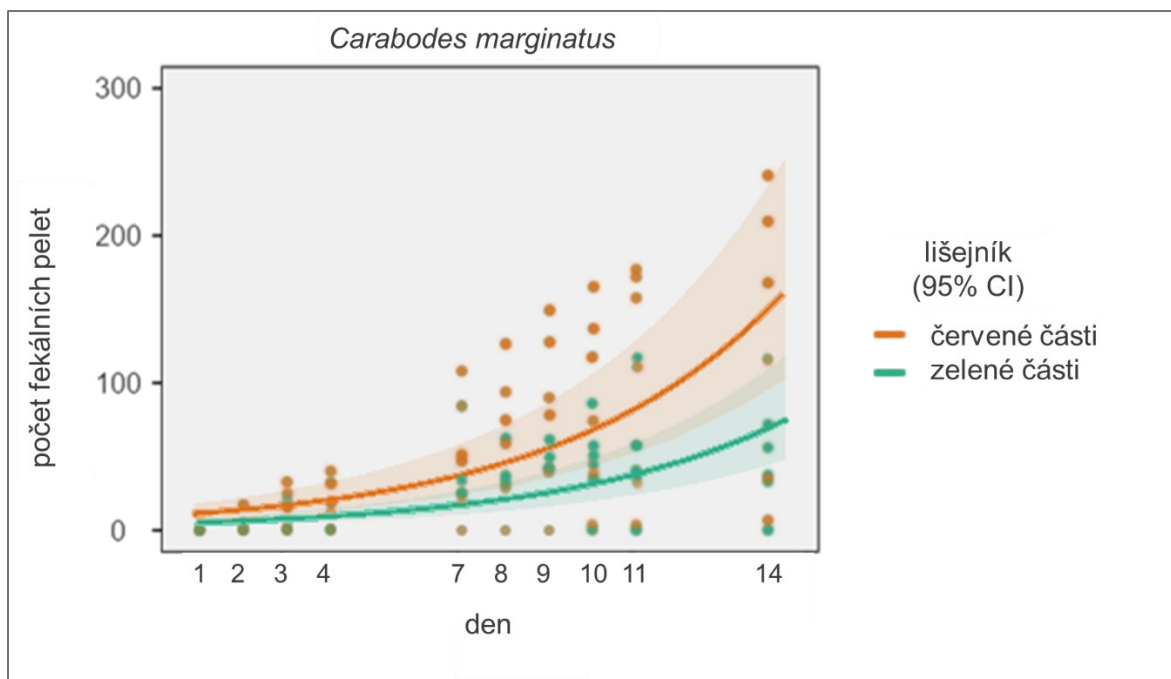
Mezi všemi interakcemi kombinací roztočů a částí lišejníků v rámci post-hoc testu (Tab. 22) vyšly signifikantní rozdíly ($p < 0,05$). *Carabodes areolatus* vykazoval preferenci zelených částí lišejníku, avšak jeho konzumace byla obecně nižší než u *Carabodes marginatus*. V případě druhu *C. marginatus* byla zaznamenána větší míra spásání a preference červených částí lišejníku (Obr. 24). Tyto výsledky jsou patrné v grafech níže (Obr. 25–27).



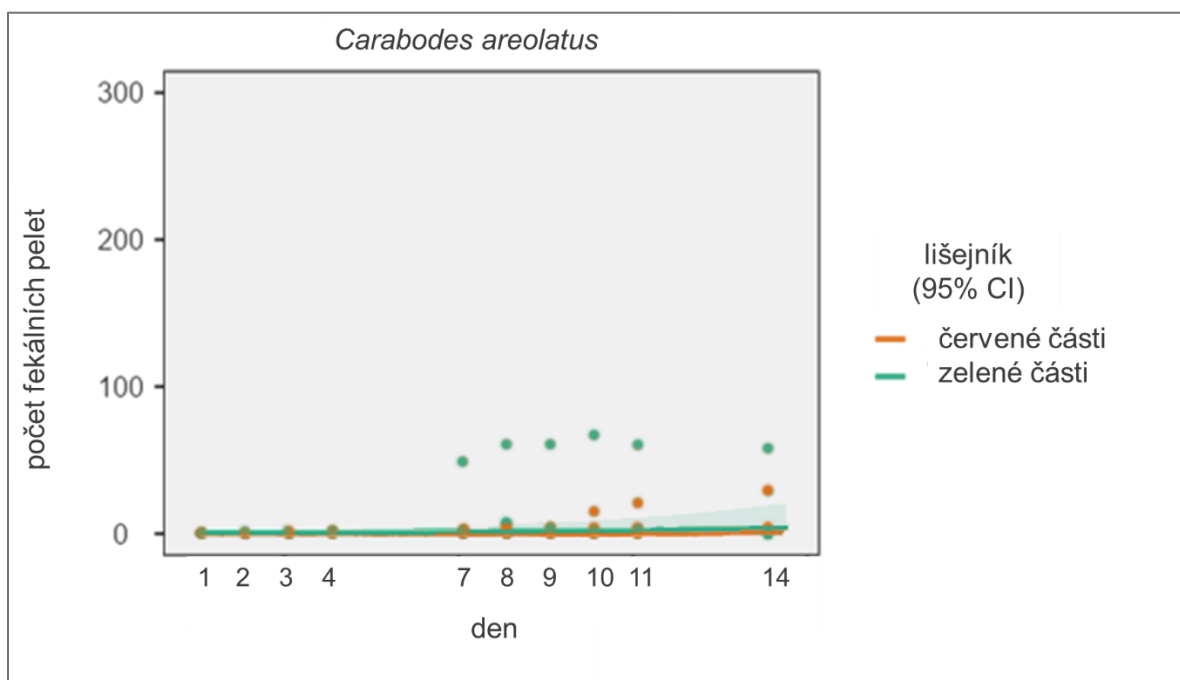
Obr. 24: *Carabodes marginatus* spásající červené části lišejníku *Cladonia „rubrotincta“*, zelená část stélky napravo netknutá

Tab. 22: Post-hoc test pro interakci mezi roztoči a částmi lišejníku

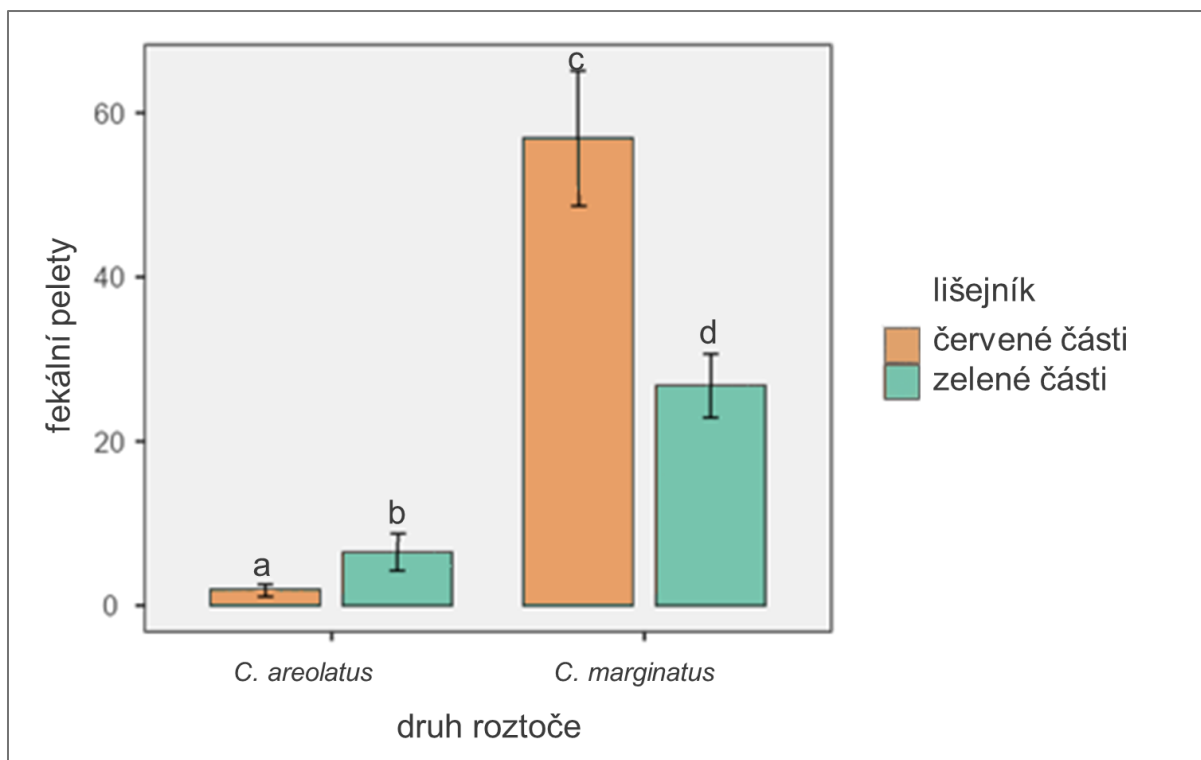
Comparison							
mite	lichen	mite	lichen	exp(B)	SE	z	P _{bonferroni}
areolatus	Spots	- areolatus	Without	0.30238	0.03181	-11.37	< .001
areolatus	Spots	- marginatus	Spots	0.00806	0.00669	-5.81	< .001
areolatus	Spots	- marginatus	Without	0.01714	0.01423	-4.90	< .001
areolatus	Without	- marginatus	Without	0.05668	0.04685	-3.47	0.003
marginatus	Spots	- areolatus	Without	37.50217	30.98730	4.39	< .001
marginatus	Spots	- marginatus	Without	2.12575	0.06428	24.94	< .001



Obr. 25: Rozptylový graf (s linií trendu) počtu fekálních pelet *Carabodes marginatus* v průběhu experimentu



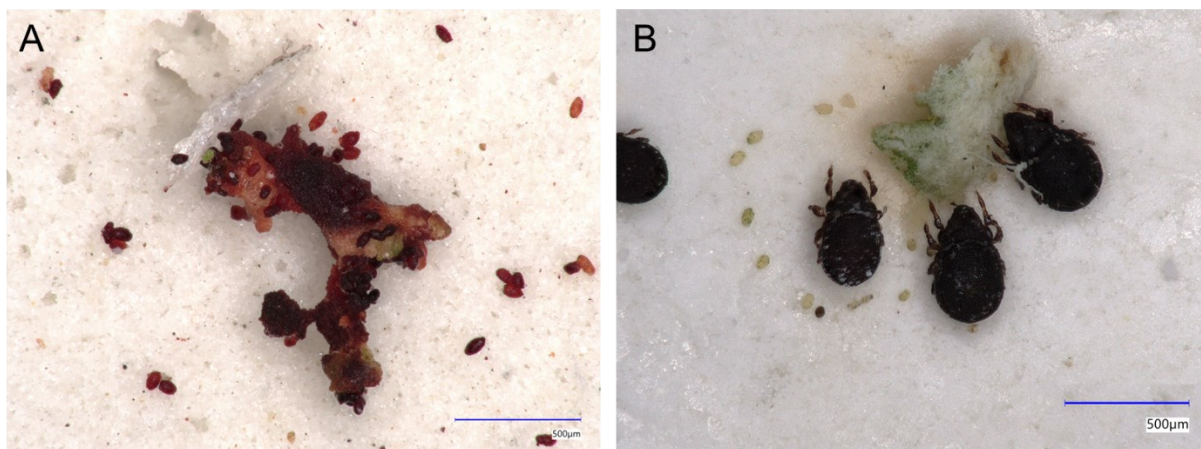
Obr. 26: Rozptylový graf (s linií trendu) počtu fekálních pelet *Carabodes areolatus* v průběhu experimentu



Obr. 27: Graf znázorňující celkový průměr (ze všech pozorování tj. boxů za všechny dny experimentu) fekálních pelet na různých částech lišejníku *Cladonia „rubrotincta“* u jednotlivých druhů roztočů rodu *Carabodes*, písmena (a, b, c, d) představují skupiny, mezi kterými byl nalezen statisticky signifikantní rozdíl ($p < 0.05$) na základě post-hoc testu (provedeném po GLMM analýze), chybové úsečky ukazují standardní odchylky

Výše uvedené analýzy (a jejich grafické znázornění) ukázaly na signifikantní rozdíly mezi všemi skupinami. To znamená, že ačkoliv *Carabodes areolatus* konzumoval lišejníky podstatně méně než *C. marginatus*, dají se mezi sebou výsledky spásání stélek lišejníků oběma druhy porovnávat. Roztoči druhu *C. areolatus* preferovali jako svoji potravu zelené části lišejníku *Cladonia „rubrotincta“* zatímco roztoči druhu *Carabodes marginatus* preferovali části červené. Roztoči v tomto případě tedy nevykazovali stejné potravní preference.

Pozorování ukázalo, že fekální pelety roztočů byly zbarveny podle části, kterou roztoči konzumovali. Byly pozorovány pelety bílé (průhledné), zelené a červené (viz Obr. 28).



Obr. 28: Na obrázku A je vidět zčásti zkonsumovaný kus červené stélky lišejníku *Cladonia „rubrotincta“* a na něm a v jeho okolí červené fekální pelety roztočů, na obrázku B je konzumovaná zelená část lišejníku *Cladonia „rubrotincta“* se zelenými fekálními pelety (a roztoči druhu *Carabodes marginatus*)

4.3.2. Experiment OT (Oslo/Trondheim)

Experiment OT měl za cíl zjistit, zda existují preference mezi zelenými částmi stélky formy s červenými skvrnami (tedy druhu *Cladonia „rubroincta“*) sebranými v jižním Norsku nedaleko Osla a stélkami čistě zelené formy (tedy *Cladonia norvegica*) sebranými v okolí Trondheimu. Stejně jako u prvního experimentu je v tabulce zjednodušených výsledků (Tab. 23) patrné, že roztoči druhu *Carabodes areolatus* spásali lišejníky velmi málo, kromě boxů 17 a 27. Zástupci druhu *Carabodes marginatus* vykazovali větší aktivitu, kromě boxu 20 (což může být vysvětleno vyšším nárůstem houbových patogenů v tomto boxu daných pravděpodobně přemokřením sádry – musely být měněny oba typy lišejníků, což v žádném jiném boxu u *Carabodes marginatus* nenastalo). Z výsledků opět vyplynulo, že počet spařených roztočů na jednotlivých lišejnících neodpovídá počtům fekálních pelet, který je pro určení konzumace více přesný, a proto byly v dalších analýzách použity pouze počty fekálních pelet.

Tab. 23: Souhrnné výsledky potravně preferenčních testů experimentu OT, porovnání v preferenci na základě fekálních pelet a počtu roztočů vyskytujících se na daném kusu stélky lišejníku; barevně jsou označeny preferované části v jednotlivých opakováních (boxech), CO označuje kontrolní boxy s lišejníkem *Cladonia „rubroincta“* z okolí Osla a CT kontrolní boxy s lišejníkem *Cladonia norvegica* z okolí Trondheimu

Experiment OT			Experiment OT		
Fekální pelety - maximum			Roztoči - součet		
ID box	Oslo	Trondheim	ID box	Oslo	Trondheim
<i>Carabodes areolatus</i>			<i>Carabodes areolatus</i>		
17	45	137	17	1	11
18	14	10	18	1	3
19	0	2	19	0	0
20	1	1	20	0	1
21	2	0	21	1	0
22	1	1	22	1	1
23CO	1	0	23CO	3	0
24CT	0	7	24CT	0	2
<i>Carabodes marginatus</i>			<i>Carabodes marginatus</i>		
25	169	65	25	30	9
26	99	16	26	16	6
27	0	2	27	2	1
28	27	24	28	3	10
29	100	122	29	39	27
30	169	168	30	24	29
31CO	28	0	31CO	9	0
32CT	0	125	32CT	0	41

GLMM analýza (Tab. 24–28) ukázala signifikanci jednotlivých fixních efektů (druh roztoče – mite, druh lišejníku – lichen, časové období – day) a vztahů mezi nimi. Toto zjištění umožnilo provedení následných post-hoc testů.

Tab. 24: Informace k modelu GLMM

Info	Value	Comment
Model Type	Poisson	Model for count data
Call	glm	pellets ~ 1 + mite + lichen + day + mite:lichen + (0 + mite box)
Link function	log	Coefficients are in the log(y) scale
Distribution	Poisson	Model for count data
LogLikel.	-1654.7	Unconditional Log-Likelihood
-2*LogLikel.	3309.5	Unconditional absolute deviance
Deviance	2590.6	Conditional relative deviance
R-squared	NaN	Marginal
R-squared	NaN	Conditional
AIC	3325.4	Less is better
BIC	3353.3	Less is better
Residual DF	232.0	
Chi-squared/DF	10.4	Overdispersion indicator
Converged	no	
Optimizer	bobyqa, Nelder_Mead, nloptwrap	

Fixní efekty druh roztoče a den experimentu vyšly signifikantně (p hodnoty $< 0,05$) na základě Omnibusového testu fixních efektů (Tab. 25). Druh lišejníku sám o sobě signifikantní nebyl (p hodnota $> 0,05$), ale v interakci s druhem roztoče byl jejich společný vliv již signifikantní. Z toho vyplývá, že každý druh lišejníku byl preferován jiným druhem roztoče.

Tab. 25: Omnibusový test fixních efektů

	χ^2	df	p
mite	5.763	1.00	0.016
lichen	0.692	1.00	0.405
day	2214.596	1.00	$< .001$
mite * lichen	415.087	1.00	$< .001$

Odhady parametrů fixních efektů (Tab. 26) opět ukázaly, že počet fekálních pelet u druhu *Carabodes marginatus* je signifikantně (p hodnota $< 0,05$) vyšší než u druhu *Carabodes areolatus*. Stejně jako v experimentu SW se potvrdilo i zde, že celkový počet fekálních pelet se signifikantně zvyšuje každým dalším dnem experimentu. Signifikantní je také interakce mezi druhy roztočů a druhy lišejníků, což bylo dále sledováno post-hoc testy.

Tab. 26: Odhady parametrů fixních efektů

Names	Effect	Estimate	SE	exp(B)	95% Exp(B) Confidence Interval		z	p
					Lower	Upper		
(Intercept)	(Intercept)	1.4076	0.52353	4.086	1.464	11.401	2.689	0.007
mite1	marginatus - areolatus	2.5131	1.04687	12.343	1.586	96.055	2.401	0.016
lichen1	C.norvegica – C.rubrotincta	0.0303	0.03641	1.031	0.960	1.107	0.832	0.405
day	day	0.1655	0.00352	1.180	1.172	1.188	47.059	< .001
mite1 * lichen1	marginatus - areolatus * C.norvegica - C.rubrotincta	-1.4835	0.07281	0.227	0.197	0.262	- 20.374	< .001

Analýza náhodných efektů (Tab. 27) ukázala značnou variabilitu v počtu fekálních pelet v jednotlivých boxech u obou druhů roztočů.

Tab. 27: Náhodné komponenty

Groups	Name	SD	Variance	ICC
box	miteareolatus	1.87	3.49	
	mitemarginatus	1.73	2.99	
Residuals		1.00	1.00	.

Korelace mezi náhodnými efekty (Tab. 28) pro oba druhy roztočů v rámci jednotlivých boxů vyšla velmi slabě pozitivně (korelace kolem 0) a není tak příliš směrodatná.

Tab. 28: Korelace náhodných parametrů

Groups	Param.1	Param.2	Corr.
box	miteareolatus	mitemarginatus	0.0216

Post-hoc testy (Tab. 29–31) ukázaly rozdíly v konzumaci jednotlivých druhů lišejníků dvěma druhy roztočů.

Post-hoc test pro porovnání jednotlivých druhů roztočů (Tab. 29) ukázal signifikantní rozdíl ($p < 0,05$) v celkovém počtu fekálních pelet mezi jednotlivými druhy roztočů.

Tab. 29: Post-hoc test pro druhy roztočů (*Carabodes areolatus* a *C. marginatus*)

Comparison		exp(B)	SE	z	Pbonferroni
mite	mite				
areolatus	- marginatus	0.0810	0.0848	-2.40	0.016

Post-hoc test pro porovnání jednotlivých částí lišejníku (Tab. 30) potvrdil nesignifikanci (p hodnota $> 0,05$) a pro statisticky průkazný výsledek je proto nutné porovnávat druhy lišejníků zvlášť pro jednotlivé druhy roztočů

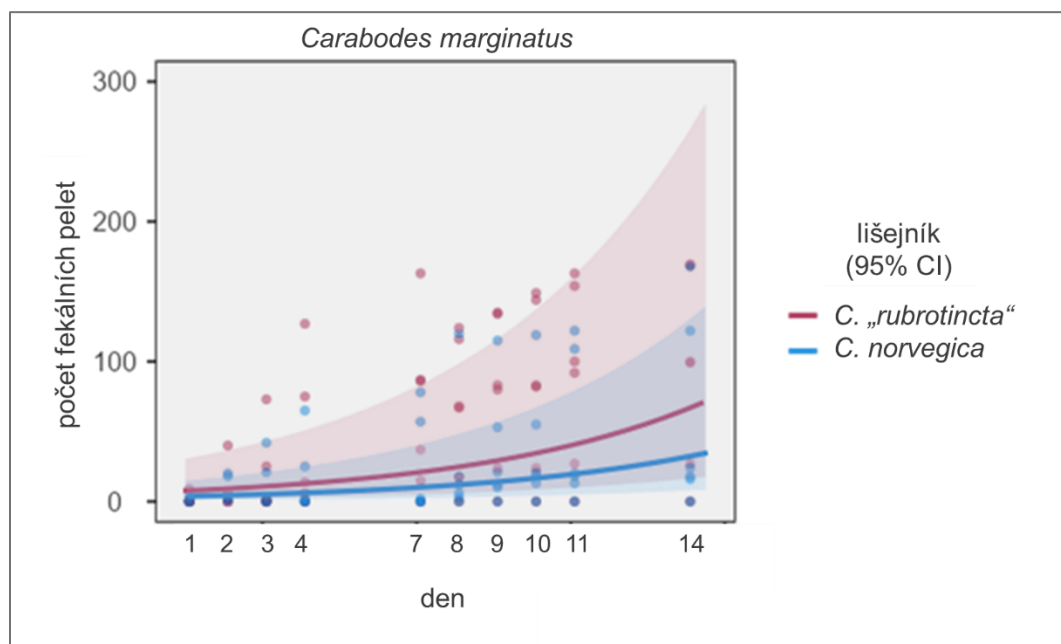
Tab. 30: Post-hoc test pro jednotlivé druhy lišejníků (*Cladonia „rubrotincta“* a *Cladonia norvegica*)

Comparison		exp(B)	SE	z	P _{bonferroni}
lichen	lichen				
C.rubrotincta	- C.norvegica	0.970	0.0353	-0.832	0.405

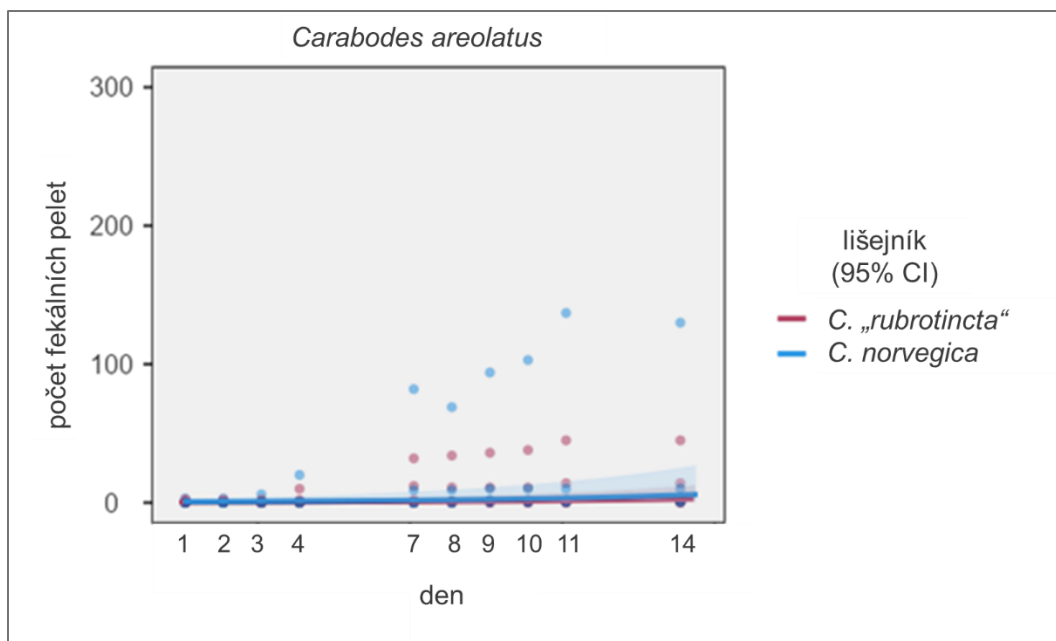
V rámci post-hoc testu porovnávacího jednotlivé interakce (Tab. 31) vyšly signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) mezi druhy lišejníků pro jednotlivé roztoče. *Carabodes areolatus* preferoval druh *Cladonia norvegica*, zatímco *Carabodes marginatus* si vybíral spíše druh *Cladonia „rubrotincta“*. Tyto výsledky jsou graficky zpracované níže v rozptylových grafech (Obr. 29 a 30) a sloupcovém grafu (Obr. 31).

Tab. 31: Post-hoc test pro interakci mezi roztoči a druhy lišejníků

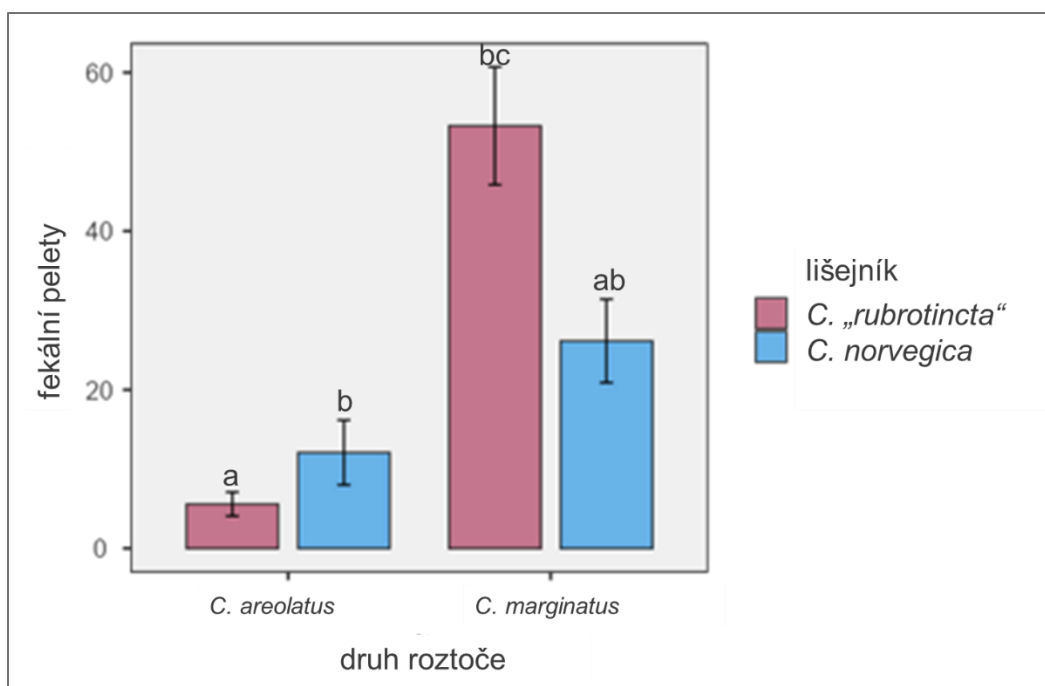
Comparison		mite	lichen	exp(B)	SE	z	P _{bonferroni}
mite	lichen						
areolatus	C.rubrotincta - areolatus	C.norvegica	0.4621	0.0305	-11.70	< .001	
areolatus	C.rubrotincta - marginatus	C.rubrotincta	0.0386	0.0404	-3.11	0.011	
areolatus	C.rubrotincta - marginatus	C.norvegica	0.0786	0.0824	-2.43	0.091	
areolatus	C.norvegica - marginatus	C.norvegica	0.1701	0.1781	-1.69	0.544	
marginatus	C.rubrotincta - areolatus	C.norvegica	11.9748	12.5381	2.37	0.106	
marginatus	C.rubrotincta - marginatus	C.norvegica	2.0370	0.0628	23.09	< .001	



Obr. 29: Rozptylový graf (s linií trendu) počtu fekálních pelet *Carabodes marginatus* v průběhu experimentu



Obr. 30: Rozptylový graf (s linií trendu) počtu fekálních pelet *Carabodes areolatus* v průběhu experimentu



Obr. 31: Graf znázorňující celkový průměr (ze všech pozorování tj. boxů za všechny dny experimentu) fekálních pelet na různých druzích lišejníků u jednotlivých druhů roztočů; stejná písmena (a, b, bc, ab) představují skupiny, které nejsou mezi sebou signifikantně odlišné ($p > 0.05$) a skupiny s různými písmeny ukazují na signifikantní odlišení mezi nimi ($p < 0.05$), jedinou výjimkou jsou skupiny „bc“ a „ab“, které jsou vůči sobě signifikantní, a to na základě post-hoc testu (provedeném po GLMM analýze), chybové úsečky ukazují standardní odchylky

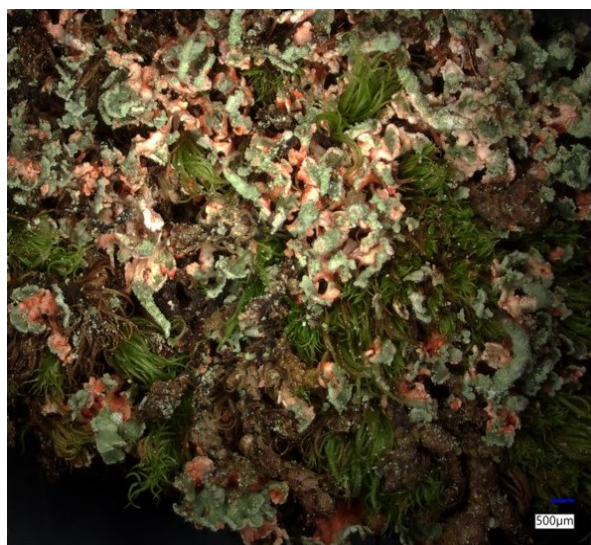
Grafy výše zobrazující výsledky provedených analýz ukazují na signifikantní rozdíly mezi konzumací dvou druhů lišejníků jednotlivými druhy roztočů. Roztoči druhu *Carabodes areolatus* konzumovali lišejníky mnohem méně a vybírali si především druh *Cladonia norvegica*. *Carabodes marginatus* naopak více konzumovali lišejník druhu *Cladonia „rubrotincta“*. Ani v případě toho experimentu, roztoči nevykazovali stejné potravní preference.

5. Diskuse

5.1. *Cladonia* sp. nov. „*rubrotincta*“

Výsledky fylogenetických analýz ukázaly, že forma druhu *Cladonia norvegica* produkující červené barvivo tvoří nový monofyletický druh charakteristický především právě tvorbou červených skvrn na stélce (Obr. 32). Tento druh bude popsán v připravovaném vědeckém článku jako *Cladonia rubrotincta* (ve spolupráci s prof. Einarem Timdalem a Dr. Philippem Reslem, kteří poskytli část materiálu pro molekulární studii a na tématu spolupracují).

Lišejník *Cladonia* „*rubrotincta*“ patří mezi dutohlávky se světlými plodnicemi (clade Ochroleucae dle práce Stenroos et al. 2019), ačkoliv má zachovanou schopnost tvorby kyseliny rhodokladonové (jako příbuzné červenoplodé dutohlávky Erythrocarpae) mimo plodnice (více o této látce a její evoluci níže v kapitole 5.3. Kyselina rhodokladonová).



Obr. 32: *Cladonia* „*rubrotincta*“

Tento druh je morfologicky podobný druhu *Cladonia coniocraea*, ale má výrazně menší přízemní šupiny, které jsou navíc jemně dělené. Podécia tohoto druhu nejsou kornatá, jsou úzká, krátká a často různě deformovaná (což bývá kromě červeného zbarvení nejvýraznějším morfologickým znakem). Na podéciích a přízemních šupinách se vyskytují červené skvrny. Bývá hojně sorediózní, avšak nalezeny byly i položky, které naopak měly soredií velmi málo (Obr. 33).



Obr. 33: Vlevo nesorediózní *Cladonia* „*rubrotincta*“, vpravo naopak hojně sorediózní

Není známo, zda se tento druh vyskytuje i bez červených skvrn na stélce. Pokud taková forma existuje, je ve střední Evropě pravděpodobně přehlížena a zaměňována za podobný běžný druh *Cladonia coniocraea* (především v případě nevyužití chemických metod). Na druhou stranu je přítomnost červených skvrn indikátorem toho, že se jedná o druh *C. „rubrotincta*“. Jediný známý příklad lišejníku, který také červené skvrny na stélce může tvořit, je *Cladonia bacilliformis* (Timdal 1989), která se však

liší přítomností kyseliny usnové a dá se tedy jednoduše odlišit chemicky i morfologicky (díky kyselině usnové má žlutavé zbarvení na rozdíl od zelenavé *C. „rubrotincta“* a má menší, silnější a méně sorediózní poděcia; Tønsberg a Holien 1984). Tato dutohlávka se řadí také do cladu Ochroleucae. U tohoto druhu je však výskyt červených skvrn výjimečný (Einar Timdal, osobní sdělení). Zajímavé je, že jedna z linií tohoto polyfyletického druhu tvoří sesterskou linii ke *Cladonia norvegica* s. str.

Kromě kyseliny rhodokladonové obsahuje tento lišejník kyselinu barbatovou a 4-0-demethylbarbatovou (podle výsledků TLC) a kyselinu demethylrhodokladonovou (potvrzenou HPLC). Lišejník lze díky těmto sekundárním metabolitům rozpoznat od morfologicky podobných dutohlávek pomocí stélkové reakce, přičemž nereaguje s lihovým roztokem parafenylendiaminu (tzv. P- reakce) a také pomocí UV záření, pod kterým reaguje slabě bíle. Stejně chemické složení však vykazuje *Cladonia norvegica* s. str., což pravděpodobně v minulosti vedlo k zahrnutí formy s červenými skvrnami do tohoto druhu.

Tento druh byl potvrzen pomocí molekulárních analýz z České republiky (Novohradské hory, Šumava, Třeboňsko), Estonska (Pärnu County), Kanady (Ontario), Norska (Trøndelag, Viken), Rakouska (Štýrsko) a Skotska (Kimlochewe). Forma s červenými skvrnami byla v minulosti uváděna pod jménem *Cladonia norvegica* mimo výše uvedených zemí i z Finska, Německa, Polska (Szczepeńska et al. 2023), Portugalska (Timdal 1989), Ruska (Kuznetsova a Dudov 2017) či Švédska (Timdal 1989).

Cladonia „rubrotincta“ byla zaznamenána v nadmořské výšce od 40 m n. m. do 1645 m n. m. Vyžaduje vlhké lesy, především ty jehličnaté a smíšené (Liška et al. 1999; Løhmus a Løhmus 2009; Malíček et al. 2011). V Polsku je známá především ze starých listnatých lesů (Szczepeńska et al. 2023). Často se nachází v blízkosti vodních biotopů (především u lesních potoků, či v blízkosti jezer a rybníků). Roste především na rozkládajícím se dřevě, padlých kmenech, pařezech a na bázi živých jehličnanů (např. *Picea abies* a *Picea sylvestris*) či na břízách (Liška et al. 1999; Løhmus a Løhmus 2009; Kuznetsova a Dudov 2017; Szczepeńska et al. 2023), ojedinelý je nález na borce olše (Malíček 2022) a na mechatém balvanu (Malíček et al. 2011). Mechorosty této dutohlávce pravděpodobně zajišťují optimální mikroklima, a proto v jejich blízkosti *C. „rubrotincta“* roste velmi často (Obr. 34). Obvykle se vyskytuje společně s dalšími druhy dutohlávek, jako je např. *C. coniocraea*, či *C. cenotea*.

Pro lepší poznání tohoto druhu by bylo vhodné zjistit pomocí molekulárních analýz, které fotobionti se v tomto lišejníku vyskytují, zda druhy rodu *Asterochloris*, jako je tomu (až na vzácné výjimky; Pino-Bodas et al. 2023) i u ostatních dutohlávek (Pino-Bodas a Stenroos 2021). Otázkou zůstává, kolik druhů fotobiontů je s tímto druhem lišejníku spjato a zda se neliší napříč geografickými oblastmi, ve kterých se *Cladonia „rubrotincta“* vyskytuje.

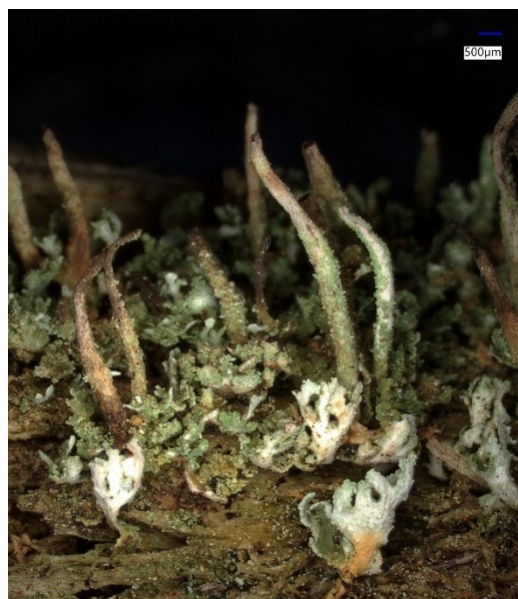


Obr. 34: *Cladonia „rubrotincta“* nalezena rostoucí na mechorostech

5.2. *Cladonia norvegica*

Objasněním taxonomie *Cladonia norvegica* a nalezením nového druhu dutohlávky charakteristického tvorbou červených skvrn se vysvětlila absence těchto skvrn v centrálním Norsku (kromě dvou nově nalezených výjimek, které ale náleží druhu *Cladonia „rubroincta“*), odkud byl druh popsán. Druh *C. norvegica*, na kterém červené skvrny nalezeny vůbec nebyly (Obr. 35), tedy nemá schopnost produkovat kyselinu rhodokladonovou.

Druh *Cladonia norvegica* na základě fylogenetických analýz patří mezi dutohlávky se světlými plodnicemi (clade Ochroleucae) a jeví se být polyfyletický (položka N26 nespadá do stejné linie jako ostatní položky *C. norvegica*). Pro přesnější objasnění jeho taxonomie by bylo vhodné doplnit molekulární analýzy z dalších geografických oblastí, jelikož v této diplomové práci byl využit pouze materiál ze středního a severního Norska.



Obr. 35: *Cladonia norvegica*

Morfologicky se tento druh též podobá druhu *Cladonia coniocraea*. Jsou pro něj charakteristické drobně jemně dělené přízemní šupiny a povrch podécia je jemně sorediózní. Vzhledem k tomu, že na základě TLC se druh *C. norvegica* liší od výše zmíněných druhů přítomností kyseliny barbatové a 4-0-demethylbarbatové, může být pro jeho identifikaci využito stélkové reakce (P- reakce), či UV záření, pod kterým reaguje slabě bíle (Tønsberg a Holien 1984; Schram et al. 2011), stejně jako v případě *C. „rubroincta“*. Ve srovnání s *C. „rubroincta“* má vyšší podécia bez deformací a nebyly zaznamenány případy, které by měly červené skvrny na stélce.

Tento lišejník byl na základě molekulárních analýz potvrzen z oblasti Trøndelagu a oblasti Nordlandu v Norsku. Pro toto potvrzení byla použita i položka sebraná na typové lokalitě v Trøndelagu (Tønsberg a Holien 1984). Dále byl tento druh (respektive forma druhu *Cladonia norvegica* bez červených skvrn) v minulosti zaznamenán v Chile a Argentíně (Stenroos a Ahti 1990), Japonsku (Stenroos a Ahti 1994) a Kanadě a USA (Tønsberg a Goward 1992; Schram et al. 2011). Další nálezy lišejníku pod názvem *Cladonia norvegica* neměly specifikovanou přítomnost/absenci červených skvrn a nelze tedy říct, zda se nejednalo o nový druh *C. „rubroincta“* či *C. norvegica* s. str. Druh *C. norvegica* navíc také mohl být pro svou podobnost s některými jinými dutohlávkami chybně určován a jeho rozšíření může být větší.

Ekologie druhu *Cladonia norvegica* je velmi podobná ekologii druhu *Cladonia „rubroincta“*. Nadmořská výška výskytu se pohybuje od hladiny moře po 1300 m n.m., nejčastěji je však udávána kolem 200 m n.m. Tento druh byl také ve většině případů nalezen v blízkosti vodních toků či jezer. Typickým stanovištěm je vlhký smrkový les mírného pásu (Tønsberg a Holien 1984; Tønsberg a Goward 1992). Netypickým nalezištěm byly pískovce v průmyslově narušené krajině s okolním porostem tvořeným stromy *Populus tremuloides*, *Pinus resinosa* a *Betula papyrifera* (Schram et al. 2011). Substrátem bývá stejně jako u *C. „rubroincta“* tlející dřevo, pařezy, spadlé kmeny stromů. Též ale často roste na bázích živých jehličnanů (např. *Abies sachalinensis* dle Stenroos a Ahti 1994, *Picea abies*, *Pinus sylvestris* dle Tønsberg a Holien 1984, *Pinus contorta* dle Tønsberg a Goward 1992) a *Betula* spp. dle Tønsberg a Holien (1984). Druh byl zaznamenán často rostoucí společně s dutohlávkami *C. coniocraea* a *C. cenotea* (Tønsberg a Holien 1984).

Ani u tohoto druhu lišejníku zatím není znám fotobiont. Zda se bude jednat o jeden druh či více druhů, kdy bude jejich přítomnost závislá na geografii či jiných podmínkách a zda budou druhy fotobiontů lišejníků *Cladonia „rubroincta“* a *Cladonia norvegica* totožní, zůstává nezodpovězeno a žádá si další studium.

5.3. Kyselina rhodokladonová

HPLC a LC-HRMS analýza potvrdily, že červený pigment ve stélce lišejníku *Cladonia „rubroincta“* je opravdu kyselina rhodokladonová známá z plodnic červenoplodých dutohlávek (Baker a Bullock 1969; Stenroos 1989) či také z dřene lišejníku *Mycoblastus sanguinarius* (Bohman-Lindgren 1973; Tønsberg 1992; Spribille et al. 2011).

V minulosti byly v odborné literatuře diskutovány různé teorie o evoluci červeného zbarvení plodnic u dutohlávek (Dahl 1952; Timdal 1989; Ahti 2000; Stenroos et al. 2019). Někteří autoři (Dahl 1952; Ahti 2000) se domnívali, že skupina dutohlávek se světlými plodnicemi (Ochroleucae) se vyvinula z červenoplodých dutohlávek (Erythrocarpae) ztrátou červeného pigmentu. Tuto teorii v minulosti zpochybnili ve své fylogenetické studii Stenroos et al. (2019) na základě existence monofyletických linií Ochroleucae a Erythrocarpae s apomorfními znaky barvy plodnic. Vzhledem k tomu, že do cladu Ochroleucae patří právě i *Cladonia „rubroincta“* i *Cladonia bacilliformis*, které obě mají schopnost tvorby kyseliny rhodokladonové (ač pouze na stélce a v případě druhého uvedeného druhu pouze příležitostně), je pravděpodobné, že tato skupina dutohlávek vznikla redukcí kyseliny rhodokladonové v plodnicích ze společného předka Ochroleucae a Erythrocarpae, jak navrhoval i Timdal (1989).

Jak ukázaly potravně preferenční testy, tato látka neodpuzuje roztoče, spíše naopak jsou části stélky obsahující tuto kyselinu dospělými roztoči preferovány. Je možné, že tato látka pomáhá roztočům lišejník efektivněji trávit či souběžně zvyšuje obsah užitečných prvků pro roztoče. Pro úplné zavrnutí teorie, že kyselina rhodokladonová roztoče odpuzuje by bylo třeba provést funkční testy i na juvenilních roztočích a sledovat též, jaký vliv na roztoče má tato látka po jejím zkonsumování.

Atrakce roztočů červenou barvou této látky není příliš pravděpodobná. Roztoči barevně nevidí (respektive nevidí vůbec, někteří pancířníci mají jednoduché ocelli, které však umožňují pouze rozeznávat světlo a tmu; Walter a Proctor 1999) a jediný způsob, jak by mohli červené části stélky nalézt by bylo vylučování těkavých látek lišejníkem v těchto místech. Pravděpodobnější teorií se zdá být reakce lišejníku tvorbou červených skvrn na přítomnost roztočů. Možnou variantou je ovšem i schopnost lišejníku tvořit červenou látku po celé stélce, která je ale běžně inhibována. Okus roztoči by mohl tuto inhibici narušit a stélka by tak v místě okusu zčervenala. Této teorii však oponuje fakt, že přímo nebyla pozorována reakce na okus během potravně preferenčních testů ani po jejich skončení – celkem trvalo pozorování tři týdny (a to ani u potravně preferenčních testů provedených ve spřátelené laboratoři v Grazu v rámci diplomové práce Liebmann-Reindl 2024), což by však mohlo být v reálných přírodních podmínkách odlišné. Lišejník by však mohl reagovat na sekret juvenilních roztočů, který je produkován notogastrálními žlázami, které u dospělců mizí (Weigmann 2006). Reakce by mohla být také způsobena například odpovědí na změnu pH, která může být způsobena fekálními pelety juvenilů vyvíjejících se ve stélce lišejníku. Stejnou reakci by tak mohly vyvolávat i bakterie a viry, což může vysvětlovat situace, kdy byly na lišejníku nalezeny červené skvrny, které neobsahovaly žádné pobytové znaky roztočů a nebyly duté. Naopak nalezené prázdné komůrky bez pobytových znaků spíše naznačují tvorbu hálek (tedy že naklazení vajíčka roztočem indukuje tvorbu hálek na stélce lišejníku), kterou okus roztoči může způsobovat, jak uvádí ve své review Gerson (1973). Je však také možné, že prázdné komůrky

obsahovaly otvory, kterými se nymfy prokousaly ven, či že lišejníky znovu dorostly v místech okusu (což by mohlo vysvětlit i neduté červené skvrny), jak naznačuje ve své práci Liebmann-Reindl (2024).

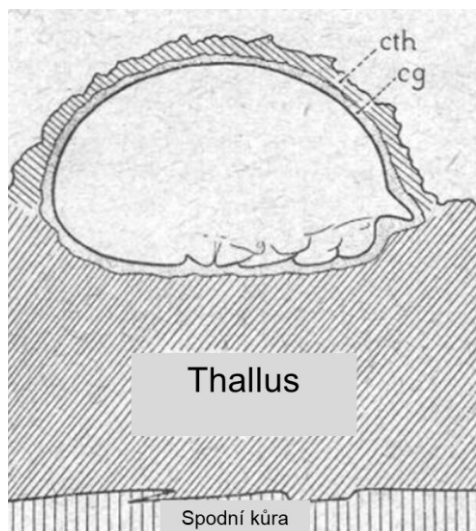
Pro objasnění této červené reakce by bylo vhodné provést pozorování okusu dospělci a nymfami v delším časovém horizontu s čerstvými lišejníky, ideálně v nasimulovaných podmínkách připomínajících přirozené prostředí, ve kterém *Cladonia „rubrotincta“* roste.

5.4. Roztoči způsobující červenou reakci

Pozorování červených skvrn ukázalo výraznou asociaci s přítomností roztočů. Na dvanácti položkách (dohromady 120 červených skvrn) bylo 46 % dutých komůrek obsahujících juvenilního roztoče, 22,5 % komůrek s pobytovými znaky roztočů, 22,5 % prázdných komůrek a 9 % skvrn bez dutiny. Podobného výsledku dosáhla i Liebmann-Reindl (2024) při zkoumání 205 červených skvrn, z nichž 19 % obsahovalo komůrku s roztočem, 11 % komůrku s pobytovými znaky, 61 % prázdných komůrek a 9 % skvrn bez dutiny.

Zároveň se Liebmann-Reindl (2024) zaměřila také na podécia a zjistila, že ačkoliv je podécium z vnější strany zelené, uvnitř, nachází-li se juvenilní roztoč, je již červené. Tedy zbarvení se projevuje zevnitř směrem ven, což by nasvědčovalo teorii, že červená reakce je opravdu reakcí na roztoče. K potvrzení endofágnosti juvenilních stádií přispěl její experiment s odchováním jedince, při kterém byl juvenil nechán ve zvláštní krabičce s lišejníkem, kdy do lišejníku zalezl a vylezl jako dospělec.

Přítomnost pancířníků v lišejnících pozoroval také Grandjean (1950), který popsal na povrchu „šedého“ lišejníku hrbolky, ve kterých se nacházela vajíčka roztoče pancířníka *Camisia segnis* (Obr. 36). Svým pozorováním tak zjistil, že tento roztoč klade vajíčka do lišejníku, z nichž se později líhnou juvenilní stádia, která se živí stélkou lišejníků.



Obr. 36: Vajíčko s vyvíjející se prelarvou roztoče *Camisia segnis* nakladené do stélky lišejníku; cth a cg označují vrstvy lišejníku chránící vajíčko (Grandjean 1950)

Byly identifikovány nymfy roztočů způsobující červenou reakci lišejníku *Cladonia „rubrotincta“*. Jednalo se o druhy *Carabodes marginatus* a *Mycobates carli*. V diplomové práci Liebmann-Reindl (2024) byly tyto druhy také nalezeny, a navíc byly též pomocí molekulárních analýz identifikovány nymfy roztočů *Carabodes areaolatus* a *Carabodes labyrinthicus*.

Vzhledem k tomu, že v minulosti (Bellido 1978; 1990) byla pozorována juvenilní stádia roztoče příbuzného druhu *Carabodes willmanni* žijících endofágně na dutohlávce, není nalezení endofágních juvenilů dalších druhů rodu *Carabodes* příliš překvapivé. Na základě těchto informací se dá předpokládat, že nalezený *C. willmanni* na skotské položce pravděpodobně též způsoboval červenou reakci lišejníku (i vzhledem k absenci dospělců jiných druhů rodu *Carabodes* na tomto vzorku).

Poměrně překvapivá je úzká vazba na lišejník u druhu *Mycobates carli*, vzhledem k tomu, že u celého rodu *Mycobates* zatím žádní endofágní roztoči v lišejnících nebyli zaznamenáni. Nicméně druh *M. carli* je známým obyvatelem lišejníků (a mechů) (Materna 2000; Weigmann 2006). A další druh tohoto rodu – *Mycobates parmeliae* je též řazen mezi roztoče se silnou vazbou na lišejníky (ačkoliv je znám i z jiných biotopů) (Seyd a Seaward 1984).

Pro úplný přehled roztočů vyvíjejících se v červených částech stélky *Cladonia „rubrotincta“* navrhuji provést sekvenaci dalších juvenilních roztočů nalezených v komůrkách, a to především ze skotských položek lišejníků (pro případné potvrzení *Carabodes willmanni* jako endofága).

5.5. Dospělí roztoči žijící na vybraných lišejnících

Mezi extrahovanými roztoči silně dominovali roztoči ze skupiny Oribatida, tedy pancířníci (83 % všech roztočů). Zhruba 16 % všech extrahovaných roztočů bylo ze skupiny Prostigmata (sametkovci) a vyskytovali se na všech druzích zkoumaných lišejníků (*Cladonia „rubrotincta“*, *Cladonia norvegica* i na kontrolních *Cladonia coniocraea*). Roztoči ze skupiny Mesostigmata (čmelíkovci) byli málo zastoupeni, a to pouze na druhu *C. „rubrotincta“* (ze vzorků z Rakouska a Norska – z oblasti Trøndelagu i Vikenu). Poslední nalezenou skupinou byla Astigmata, zákožkovci, kteří byli nalezeni pouze na norských lokalitách v oblasti Trøndelagu (na druhu *C. norvegica* a kontrolních lišejnících). Na základě celkového porovnání lze říci, že na druzích *C. „rubrotincta“* a *C. norvegica* bylo nalezeno více pancířníků než na kontrolních položkách.

Oribatida jsou na lišejnících obvykle nejhojnější (Smrž a Kocourková 1999). Avšak i skupiny Astigmata, Mesostigmata a Prostigmata byly v minulosti nalezeny na lišejnících (např: André 1979; Smrž a Kocourková 1999; André 1986; Bokhorst et al. 2015). Søchting a Gjelstrup (1985) zjistili, že ze zbývajících skupin (mimo Oribatida) byl nejčastěji zastoupený řád Prostigmata. Zajímavá je přítomnost zástupců Mesostigmata, kteří se lišejníky neživí. Vzhledem k tomu, že jsou predátory ostatních roztočů (zejména juvenilních stádií pancířníků) (Schneider a Maraun 2009), je důvodem jejich výskytu na lišejnících pravděpodobně právě predace pancířníků.

Na 14 vzorcích *Cladonia „rubrotincta“* bylo nalezeno celkem 51 druhů roztočů ze skupiny Oribatida. Na pěti vzorcích *C. norvegica* bylo nalezeno celkem 19 druhů pancířníků. Pro porovnání; Liebmann-Reindl (2024) našla v rámci své práce celkem 16 druhů na lišejníku *C. „rubrotincta“* (kterou má své práci pod názvem *Cladonia norvegica*) z pěti rakouských lokalit. To poukazuje na to, že s množstvím zkoumaných vzorků vzrůstá též i množství nalezených druhů. Rozdíly v počtech jedinců i druhů roztočů mezi jednotlivými lišejníky ve statistické analýze v rámci této práce nevyšly průkazně. Pro porovnání těchto počtů by bylo zapotřebí mít od každého druhu lišejníku stejný počet zkoumaných lokalit. Nicméně porovnání jednotlivých vzorků je problematické, neboť se roztoči často vyskytují agregovaně (Skubała 2002; Walter a Proctor 1999), jak se ukázalo i ve shlukové analýze.

Na všech zkoumaných lišejnících v rámci této práce dominovaly druhy *Carabodes labyrinthicus*, *Carabodes areolatus*, *Carabodes marginatus* a *Carabodes subarticus*. Na *Cladonia „rubrotincta“* převyšoval frekvencí *Carabodes labyrinthicus*, dále pak *Carabodes areolatus* a nejméně *Carabodes*

marginatus, přitom to byl druh, jehož juvenilní stádia obývala červené komůrky. V malé míře zde byli i roztoči druhu *Carabodes subarticus*. Liebmann-Reindl (2024) našla tytéž druhy roztočů kromě *Carabodes subarticus*, avšak proporčně jinak zastoupené (od nejhojnějšího *Carabodes areolatus*, *Carabodes marginatus* a *Carabodes labyrinthicus*).

Cladonia norvegica obsahovala roztoče v pořadí od nejhojnějšího: *Carabodes labyrinthicus*, v menší míře potom *Carabodes marginatus* a následně *Carabodes areolatus* a stejně tak *Carabodes subarticus*. Kontrolní vzorky také obsahovaly nejčastěji druh *C. labyrinthicus*, následovaný *C. areolatus* a poté *C. marginatus*. *Carabodes subarticus* byl v kontrolních vzorcích zastoupen méně než v lišejnících *Cladonia* „*rubrotincta*“ a *Cladonia norvegica*.

Z porovnání společenstev roztočů žijících na těchto lišejnících, je vidět, že i na lišejníku *Cladonia norvegica* žijí roztoči asociovaní s červenými skvrnkami na lišejníku druhu *C. „rubrotincta“*. Zda tyto roztoči využívají pro své nymfy také lišejník *C. norvegica* není kvůli nedostatku pozorování zřejmé. Pro zodpovězení této otázky by bylo potřeba důkladně nařezat tento lišejník a pod lupou hledat známky roztočů či jejich pobytové znaky uvnitř stélek lišejníků.

Roztoči rodu *Carabodes* byli v minulosti na lišejnících již nalezeni, a to konkrétně *C. marginatus* a *C. subarticus* na terikolních lišejnících (včetně dutohlávek), *C. labyrinthicus* v epifytických lišejnících (Melekhina 2023) a *C. areolatus* dokonce ve velkých počtech na lišejníku rodu *Cladonia*, jak uvádí v review Seyd a Seaward (1984). Hågvar (2018) označil roztoče *Carabodes willmanni* a *C. subarticus* jako krmící se lišejníky rodu *Cladonia*. I dle Materna (2000) se řadí roztoči rodu *Carabodes* mezi ty se silnou vazbou na lišejníky, on konkrétně udává tyto druhy: *C. areolatus*, *C. femoralis*, *C. labyrinthicus*, *C. marginatus* a *C. rugosior*. Druhy *C. femoralis* a *C. rugosior* přitom nebyly vůbec v rámci této diplomové práce nalezeny.

Seyd a Seaward (1984), kteří vytvořili dělení roztočů do tří skupin (A, B a C) dle jejich vazby na lišejníky, zařadili roztoče *Carabodes labyrinthicus* a *C. willmanni* do skupiny B (tedy využívající lišejníky jako úkryt a zdroj potravy, ale žijící a živící se i na jiných rostlinách, ačkoliv přiznávají, že jeho larvy a nymfy jsou na lišejnících závislé), *C. areolatus* a *C. marginatus* do skupiny C (příležitostně se vyskytující na lišejnících, běžné v jiných substrátech). *C. subarticus* v této studii není zařazen. Naopak je zde navíc *Carabodes minusculus*, který spadá do skupiny B, kvůli preferenci lišejníků před jinými substráty a jeho hojnými nálezy na lišejnících rodu *Cladonia* v Německu, Velké Británii a Skandinávských zemích.

Liebmann-Reindl (2024) navrhuje opravu kategorizace výše zmíněných druhů roztočů dle nových poznatků, ke které se také přikláním. *Carabodes areolatus* a *C. marginatus* by měli být též zařazeni do skupiny B vzhledem k jejich využívání lišejníků pro vývin juvenilních stádií.

Žádný z nalezených roztočů rodu *Carabodes* však nelze zařadit do skupiny A (striktně vázaných na lišejníky) vzhledem k biotopům, na kterých byli nalezeni. *C. areolatus* využívá jako stanoviště kromě lišejníků často mechorosty, pařezy stromů a suché lesní půdy. *C. marginatus* obývá také mechy, pařezy stromů a lesní a vřesovištní půdy. *C. labyrinthicus* osidluje kromě mechů a lesních půd také kyselé půdy s různým stupněm vlhkosti a kůru stromů (Weigmann 2006).

Za zmínku stojí nízká početnost i frekvence dospělců druhu *Mycobates carli* (Obr. 37) na lišejníku *Cladonia „rubrotincta“*, přestože juvenilové tohoto druhu byli nalezeni právě v červených komůrkách. Dokonce byla identifikována nymfa tohoto druhu na položce z norského Trøndelagu, kde dospělci tohoto druhu úplně chyběli. Na rakouských lokalitách byl též tento druh zastoupen ne příliš hojně; na jedné položce úplně chyběl, ale vyskytoval se v kontrolním lišejníku sbíraným těsně vedle. Na druhé položce převyšovali svou četností dospělci tohoto druhu na kontrolním lišejníku (17:10). K podobnému

zjištění došla i Liebmann-Reindl (2024) ve své práci, kdy našla dospělce *M. carli* pouze na jedné z pěti lokalit (a to v počtu 15 jedinců, čímž nemohl konkurovat množstvím nalezených dospělců rodu *Carabodes*), ačkoliv na základě sekvenací převyšoval množstvím roztoče rodu *Carabodes* (šest nymf z celkem jedenácti osekvenovaných jedinců). Tento jev nelze jasně vysvětlit. Bylo by překvapivé, kdyby roztoči využívali pro vývoj nedospělých stádií lišejníků *C. „rubrotincta“* a v dospělosti se stěhovali na okolní lišejníky (např. právě na druhy *Cladonia coniocraea* či další druhy dutohlávek), které by preferovali jako potravu. Pro vyjasnění této teorie by bylo vhodné osekvenovat více juvenilů z červených komůrek pro lepší představu zastoupení jednotlivých druhů roztočů a potravně preferenční testy zkoumající rozdíly ve výběru druhů lišejníků provedené právě s roztočem *M. carli*.



Obr. 37: *Mycobates carli*

Dalším nalezeným roztočem, který byl svou frekvencí poměrně častý (i když ne příliš zastoupený početně) a dokonce se vyskytoval na všech zkoumaných druzích lišejníků, byl *Neobrachychthonius marginatus magnus*. Tento druh z lišejníků není známý a jeho typickým prostředím jsou spíše kyselé lesní půdy (Weigmann 2006), je tedy pravděpodobné, že na lišejnících se vyskytoval spíše přechodně či byl extrahován ze substrátu, na kterém lišejníky rostly.

Mezi dalšími častými roztoči na *Cladonia „rubrotincta“* byly druhy *Caleremaeus* sp., *Eueremaeus* cf. *valkanovi*, *Melanozetes mollicomus*, *Phthiracarus* sp., *Schelorbates pallidulus*, *Suctobelba regia*, *Suctobelbella arcana*, a *Tectocepheus velatus velatus*. Tyto druhy nejsou na lišejnících běžné, vyskytují se převážně v lesních půdách a v mechových polštářích (Weigmann 2006). V případě druhu *Tectocepheus velatus velatus* jsou běžným stanovištěm travnaté horské až vysokohorské plochy (Weigmann 2006), ale byl též zaznamenán na dutohlávkách *Cladonia arbuscula*, *Cladonia rangiferina* a *Cladonia stellaris* (Melekhina 2023). Liebmann-Reindl (2024) našla mezi častými extrahovanými roztoči druhy *Caleremaeus lignophilus*, *Hermannia gibba* a navíc pak *Liacarus coracinus*, *Mesoplophora pulchra* a *Odontocepheus elongatus*. Ani tyto druhy primárně lišejníky neobývají a jsou typické pro lesní půdy (Weigmann 2006). Pravděpodobně se přes lišejník stěhují na vhodnější substrát.

Na lišejnících druhu *Cladonia norvegica* byli častými zástupci roztoči druhů *Chamobates cuspidatus* (známý také z lesních půd), *Melanozetes mollicomus* (známý z lesních půd, mechů, rašeliniští a vřesoviští) a *Zygoribatula exilis* (obývající především mechy) (Weigmann 2006), ale též nalézaným na lišejnících (Smrž a Kocourková 1999; Materna 2000; Weigmann 2006; Wehner et al. 2016).

5.6. Potravní testy

Výsledky potravně preferenčních testů ukázaly, že roztoči druhu *Carabodes marginatus* preferují červené části lišejníku *Cladonia „rubrotincta“*, ačkoliv konzumují i části zelené. To by mohlo poukazovat na to, že kyselina rhodokladonová ve skutečnosti roztočům při konzumaci přináší určité výhody (jak bylo již zmíněno výše v kapitole 5.3. Kyselina rhodokladonová) nebo dospělci pozitivně reagovali na sekreční produkt nymfy v komůrce. Druh *Carabodes areolatus* naopak preferoval zelené části stélky, ačkoliv byl pozorován i okus červených částí stélky. Tento druh konzumoval lišejníky jen velmi málo. Možným vysvětlením je jeho větší citlivost na vlhkost a další podmínky prostředí. Jelikož největší nárůst fekálních pelet byl pozorován v boxech, které obsahovaly starší sádru, je možné, že testy ovlivnilo použití sádry nové, která těmto roztočům neposkytovala vhodné podmínky. Jiným vysvětlením může být větší proporce roztočů čerstvě extrahovaných (oproti *Carabodes marginatus*, kdy bylo použito více roztočů ze starší extrakce). Je možné, že roztoči, kteří byli déle chováni mimo lišejník, se na nové podmínky boxu se sádrou adaptovali, a během experimentů tak lépe prosperovali. Zároveň, protože byli po delší čas bez potravy, měli při zahájení testu větší potřebu konzumace. Pro přesnější výsledky by bylo potřeba potravní testy s druhem *Carabodes areolatus* zopakovat a nechat roztoče před testy déle bez potravy. Navrhují též provést testy s dalšími druhy roztočů vyvíjejícími se v červených komůrkách jako je *Carabodes labyrinthicus* a *Mycobates carli*. Užitečné by bylo též provést tyto testy s juvenilními roztoči, což se ale vzhledem k životnímu cyklu těchto druhů zdá být nemožné (nymfy a larvy po extrakci ze stélek rychle hynou).

Carabodes marginatus v druhém experimentu preferoval (byť ne příliš výrazně) druh *Cladonia „rubrotincta“* před druhem *Cladonia norvegica*. Toto zjištění je zajímavé vzhledem k tomu, že složení sekundárních metabolitů zelených částí obou druhů je dle TLC totožné. Možným vysvětlením může být vybírání si potravy na základě struktury stélky (Reutimann a Scheidegger 1987). Dalším důvodem by mohl být obsah živin lišejníků, na které poukazují u měkkýšů Baur et al. (1994), kteří zjistili preferenci lišejníků, které umožňují juvenilům nejrychlejší růst (což nebyly vždy ty s nejnižším obsahem sekundárních metabolitů).

Zjištění, že *Carabodes areolatus* si v tomto experimentu opět vybíral především odlišný lišejník (tedy v tomto případě *Cladonia norvegica*), může být opět vysvětleno nespolehlivostí experimentu způsobenou nízkou konzumací tímto druhem roztočů pravděpodobně v reakci na nevhodnou sádru, která tomuto druhu nevyhovovala. Zopakování experimentu (a použití dalších druhů roztočů) by pomohlo pochopit atraktivitu těchto dvou druhů lišejníků pro spásáče.

Liebmann-Reindl (2024) zkoušela potravně preferenční testy s roztoči druhů *Carabodes marginatus*, *Carabodes areolatus* a *Carabodes labyrinthicus*. Těmto roztočům nabízela různé druhy dutohlávek – *Cladonia „rubrotincta“* (kterou má své práci pod názvem *Cladonia norvegica*), *Cladonia furcata* a *Cladonia coniocraea*. Všechny tři druhy roztočů preferovali jako potravu druh *Cladonia „rubrotincta“*. *Carabodes marginatus* se ukázal být druhem nejvíce produkujícím fekální pelety (tedy pravděpodobně i nejvíce konzumujícím), což by odpovídalo i mnou získaným výsledkům potravních testů.

Další potravně preferenční testy, které by zahrnovaly roztoče rodu *Carabodes* a lišejník *Cladonia „rubrotincta“* či *Cladonia norvegica* nebyly nikým provedeny.

Výsledkem pozorování potravně preferenčních testů byla absence výběru vrstvy stélky dospělými jedinci roztočů. Ve studii Meier et al. (2002) se ukázalo, že se roztoči vyhýbají spodní kůře lišejníku *Xanthoria parietina*, což by mohlo být dáno různým rozmístěním sekundárních metabolitů v rámci stélky lišejníků (Asplund 2011). Během potravních testů v rámci této práce však nebylo pozorováno, že by se roztoči jakékoliv části stélky vyhýbali, což by poukazovalo na nepřítomnost či nespecifické

umístění odrazujících sekundárních metabolitů, či to může být vysvětleno odlišnou strukturou stélky (např. spodní kůra šupin dutohlávek může být pro roztoče lépe požitelná). Zároveň bylo pozorováno, že fekální pelety roztočů měly odlišnou barvu dle konzumovaných částí (jak pozoroval i Meier et al. 2002); červenou barvu měly v případě konzumace červených částí *Cladonia „rubrotincta“*, zelenou barvu zřejmě v případě konzumace fotobiontí vrstvy zelených částí téhož lišejníku a bílou v případě konzumace dřeni. Červená barva fekálních pelet poukazuje na to, že kyselina rhodokladonová pravděpodobně vydrží průchod trávicím traktem pancířníků.

5.7. Interakce roztočů a lišejníků

Povaha interakce roztočů využívající lišejníky pro vývoj svých juvenilních stádií s lišejníky reagujícími červeným zbarvením je nejasná. Mohlo by se jednat o mutualismus, vzhledem k tomu, že lišejník pro odpuzení roztočů zřejmě nevyužívá efektivní sekundární metabolity. Roztoči by tak mohli zprostředkovávat lišejníku šíření rozptylem lišejníkových fragmentů při stěhování se na jiný substrát (jak pozorovali na různých lišejnících a roztočích např. Smith 1921; Stubbs 1995; Root et al. 2007). To by mohlo být zvláště výhodné u roztoče *Mycobates carli*, který se dle výše zmíněných pozorování pravděpodobně stěhuje po naklazení vajíček na jiné druhy dutohlávek (odlišené habitaty juvenilních stádií a dospělců pancířníků komentovali také Maraun a Scheu 2000; Seniczak et al. 2018).

Vzhledem k tomu, že roztoči lišejníku způsobují deformace, což je patrné především na drobných poděciích, je dalším možným vysvětlením této interakce také parazitismus. Je možné, že se lišejník brání okusu tvorbou kyseliny rhodokladonové, na kterou se ale roztoči mohli adaptovat. Další možností je také imunitní reakce lišejníku, který kyselinou rhodokladonovou chrání poškozené části stélky např. proti bakteriím a dalším mikroorganismům (jako bylo ukázáno na různých sekundárních metabolitech lišejníků – např. na atranorinu, kyselině, gyroforové, physodové, usnové, parietinu; Ranković et al. 2008, kyselině fumarprotocetrarové, lekanorové, protocetrarové a stictové; Ranković a Mišić 2008). Pro potvrzení této teorie by bylo vhodné věnovat se účinkům kyseliny rhodokladonové v plodnicích červenoplodých dutohlávek a objasnit, jak na tuto kyselinu reagují i jiné druhy roztočů a další organismy.

Neutrálnější typy symbióz jako je komensalismus (tedy, že roztoči by z této interakce výhodně těžili a lišejníku by naopak nepřinášeli nic užitečného, ani mu neškodili) jsou také možné vzhledem k tomu, že v rámci této práce nebylo pozorováno, že by roztoči svým spásáním způsobovali lišejníku velké škody (jako naopak pozoroval Sowter (1971) na lišejníku, který se kvůli okusu ani nedal identifikovat). Tuto teorii by podporovalo, pokud by roztoči nepomáhali lišejníku šířením (na což tato práce nebyla zaměřena). Pro zodpovězení otázky týkající se povahy interakce roztočů s lišejníkem druhu *Cladonia „rubrotincta“* by bylo zapotřebí provést studii zkoumající možné šíření a viabilitu lišejníkových fragmentů roztoči (inspirovanou např. studií na toto téma Meier et al. 2002).

Je možné, že co se týče vývinu juvenilních stádií, jsou daní roztoči na lišejnících opravdu závislí. Bylo by vhodné pokusit se najít juvenilní stadia ve stélkách dalších druhů lišejníků (tedy zkusit stélky nařezat a hledat v nich larvy a nymfy). Extrakce roztočů v tomto není dostačující, neboť se zdá, že juvenilové roztočů vyvíjejících se v komůrkách lišejníku nejsou schopny bez lišejníku déle přežít (po manuální extrakci rychle hynou a nebyli mezi extrahovanými roztoči nalezeni).

Tato diplomová práce vnesla prvotní vhléd do problematiky této interakce a otevřela tak další otázky a oblasti bádání, které by si zasloužily pozornost. Lišejník druhu *Cladonia „rubrotincta“* je pro to ideálním modelovým organismem, neboť je jeho reakce na přítomnost juvenilních stádií roztočů pancířníků viditelná.

6. Závěr

Tato práce se zabývala interakcí lišejníků a roztočů. Na všechny vytyčené otázky týkající se této interakce na konkrétních druzích lišejníků se podařilo odpovědět. Byly provedeny chemické, molekulární a fylogenetické analýzy studovaných lišejníků, molekulární analýzy roztočů, dále proběhlo morfologické určování roztočů a potravně preferenční testy s roztoči.

Červené barvivo produkované na stélce lišejníku bylo potvrzeno jako kyselina rhodokladonová. Lišejníky obsahující tuto látku spadají do monofyletické linie v rámci Ochroleucae, která byla objevena na základě fylogenetických analýz (pomocí markerů ITS rDNA, mtSSU a EF-1 α). Tato linie tvoří nový druh, který bude popsán jako *Cladonia* sp. nov. „*rubrotincta*“ v připravovaném článku. Stejně jako příbuzný druh *Cladonia norvegica* i tento lišejník obsahuje kyseliny barbatovou a 4-O-demethylbarbatovou, podle kterých je možné tyto dva druhy odlišit od ostatních morfologicky podobných dutohlávek. *C. norvegica* se zdá být na základě fylogenetických analýz taxonem polyfyletickým.

Za červené skvrny na lišejníku *Cladonia „rubrotincta“* jsou zodpovědní roztoči druhů *Carabodes areolatus*, *Carabodes labyrinthicus*, *Carabodes marginatus* a *Mycobates carli*. Tito roztoči se vyvíjejí uvnitř stélky lišejníku v červených komůrkách. Nejedná se o specialisty, ale o roztoče často nalézané na lišejnících i na dalších substrátech (např. mechorostech, pařezech či v lesní půdě). Roztoči nalezení na druzích *Cladonia „rubrotincta“* a *Cladonia norvegica* se druhově příliš nelišili v závislosti na druhu lišejníku. Absence červených skvrn v případě druhu *Cladonia norvegica* tedy není způsobena absencí roztočů. Na zkoumaných lišejnících jsem našla další druhy rodu *Carabodes*, ale také další roztoči ze skupin Astigmata, Mesostigmata, Prostigmata a především Oribatida, kteří ale nemají úzké vztahy k lišejníkům a vyskytují se typicky na jiných substrátech.

Potravně preferenční testy s roztoči druhů *Carabodes areolatus* a *Carabodes marginatus* ukázaly, že roztoči se kyselině rhodokladonové nevyhýbají, a ta tedy nemá vůči těmto druhům efektivní ochrannou funkci. Ukázaly se rozdíly v potravní preferenci roztočů mezi *Cladonia „rubrotincta“* a *Cladonia norvegica*; odlišné trendy byly pozorovány u různých druhů roztočů. Vzhledem k tomu, že roztoči druhu *Carabodes areolatus* během experimentů stélky téměř nekonzumovali (možná kvůli jejich větší citlivosti na podmínky prostředí), je však tento rozdíl v preferenci druhu lišejníku spíše nesměrodatný a vyžaduje si další studium.

Tato diplomová práce poskytla cenné poznatky v oblasti interakce roztočů a lišejníků. Vzhledem k tomu, že je lišejník druhu *Cladonia „rubrotincta“* díky viditelné červené reakci na přítomnost juvenilních stádií roztočů vhodným modelovým organismem pro studium těchto interakcí, zasloužil by si další studium. Bylo by užitečné odpovědět na otázky týkající se funkce kyseliny rhodokladonové, která by mohla být zkoumána přímo na juvenilních roztočích. Také by bylo zajímavé osekvenovat více nymf z červených komůrek lišejníku druhu *C. „rubrotincta“*. Dále by bylo vhodné v budoucnu zopakovat potravně preferenční testy, a to i s dalšími druhy roztočů (i lišejníků). Nezodpovězenou otázkou také zůstává, zda se nalezené druhy roztočů vyvíjejí uvnitř stélky i u jiných druhů lišejníků. Zodpovězení této otázky by mohlo vnést nový pohled na celou interakci roztočů a lišejníků a přinést tak zásadní poznatky do ekologie společenstev těchto organismů.

7. Seznam literatury

AHTI T., 2000. Cladoniaceae. Flora Neotropica Monograph 78. Organization for Flora Neotropica and New York Botanical Garden.

AHTI T., S. STENROS a R. MOBERG, 2013. Nordic lichen flora, Volume 5 Cladoniaceae. 5. vydání. Svenska Botaniska Föreningen. ISBN 978-91-85221-29-5.

ANDRÉ H. M., 1979. Notes on the ecology of corticolous epiphyte dwellers. 1. The mite fauna of fruticose lichens. *Recent Advances in Acarology*. **1**, 551–557.

ANDRÉ H. M., 1984. Notes on the ecology of corticolous epiphyte dwellers. 3. Oribatida. *Acarologia*. **25**(4), 385–396.

ANDRÉ H. M., 1986. Notes on the ecology of corticolous epiphyte dwellers. 4. Actinedida (especially Tydeidae) and Gamasida (especially Phytoseiidae). *Acarologia*. **27**(2), 107–115. ISSN 0044-586X, 2107-7207.

ASPLUND J., 2010. Lichen-gastropod interactions: Chemical defence and ecological consequences of lichenivory. Department of Ecology and Natural Resource Management. Norwegian University of Life Sciences. ISBN 978-82-575-0914-9.

ASPLUND J., 2011. Snails avoid the medulla of *Lobaria pulmonaria* and *L. scrobiculata* due to presence of secondary compounds. *Fungal Ecology*. **4**(5), 356–358. ISSN 1754-5048.

ASPLUND J., K. A. SOLHAUG a Y. GAUSLAA, 2010. Optimal defense: snails avoid reproductive parts of the lichen *Lobaria scrobiculata* due to internal defense allocation. *Ecology*. **91**(10), 3100–3105. ISSN 1939-9170.

ASPLUND J. a D. A. WARDLE, 2013. The impact of secondary compounds and functional characteristics on lichen palatability and decomposition. *Journal of Ecology*. **101**(3), 689–700. ISSN 1365-2745.

ASPLUND J. a D. A. WARDLE, 2017. How lichens impact on terrestrial community and ecosystem properties. *Biological Reviews*. **92**(3), 1720–1738. ISSN 1469-185X.

BAILEY R. H., 1970. Animals and the dispersal of soredia from *Lecanora conizaeoides* NYL. *Ex cumb.* *The Lichenologist*. **4**(3), 256–256. ISSN 0024-2829.

BAKER P. M. a E. BULLOCK, 1969. Structure of rhodocladonic acid. *Canadian Journal of Chemistry*. **47**(14), 2733–2734. ISSN 0008-4042.

BAUR A., B. BAUR a L. FRÖBERG, 1994. Herbivory on calcicolous lichens: different food preferences and growth rates in two co-existing land snails. *Oecologia*. **98**(3), 313–319. ISSN 1432-1939.

BEASLEY C. W., 1978. The Tardigrades of Oklahoma. *The American Midland Naturalist*. **99**(1), 128–141. ISSN 0003-0031.

BELLIDO A., 1978. Postembryonic development of *Carabodes willmanni* Bernini 1975, (Acari, Oribatei). *Acarologia*. **20**(3), 419–432. ISSN 0044-586X.

BELLIDO A., 1990. Caractéristiques biodémographiques d'un acarien oribate (*Carabodes willmanni*) des pelouses xérophiles. *Canadian Journal of Zoology*. **68**(10), 2221–2229. ISSN 0008-4301.

- BIELAŃSKA-GRAJNER I., J. EJSMONT-KARABIN a N. YAKOVENKO, 2011. Bdelloidea (Rotifera) from the Tatra National Park, with some species newly found in Poland. *Fragmenta Faunistica*. **54**(2), 103–111. ISSN 0015-9301.
- BOHMAN-LINDGREN G., 1973. Identity of a pigment isolated from *Mycoblastus sanguinarius* with rhodocladonic acid. *Phytochemistry*. **12**, 937.
- BOKHORST S., J. ASPLUND, P. KARDOL a D. A. WARDLE, 2015. Lichen physiological traits and growth forms affect communities of associated invertebrates. *Ecology*. **96**(9), 2394–2407. ISSN 1939-9170.
- BRAUN H., 2011. The Little lichen dragon—an extraordinary katydid from the Ecuadorian Andes (Orthoptera, Tettigoniidae, Phaneropterinae, Dysoniini). *Zootaxa*. **3032**(1), 33–39. ISSN 1175-5334.
- CLAIR S. B. St., L. L. St. CLAIR, D. J. WEBER, N. F. MANGELSON a D. L. EGGETT, 2002. Element accumulation patterns in foliose and fruticose lichens from rock and bark substrates in Arizona. *The Bryologist*. **105**(3), 415–421. ISSN 0007-2745, 1938-4378.
- COKER P. D., 1967. Damage to lichens by gastropods. *The Lichenologist*. **3**(3), 428. ISSN 0024-2829.
- COLLINS M. a I. GOUDIE, 2020. The tardigrade and associated micrometazoa of the textured lungwort lichen, *Lobaria scrobiculata*, in eastern Newfoundland, Canada. *Journal of Agriculture & Life Sciences*. **7**(2), 7–13. ISSN 2375-4222, 2375-4214.
- CUBERO O. F., A. CRESPO, J. FATEHI a P. D. BRIDGE, 1999. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. *Plant Systematics and Evolution*. **216**(3), 243–249. ISSN 1615-6110.
- ČERNAJOVÁ I. a D. SVOBODA, 2014. Lichen compounds of common epiphytic Parmeliaceae species deter gastropods both in laboratory and in Central European temperate forests. *Fungal Ecology*. **11**, 8–16. ISSN 1754-5048.
- DAHL E., 1952. On the use of lichen chemistry in lichen systematics. *Rev. Bryol. Lichénol.* **21**, 119–134.
- DAYAN F. E. a J. G. ROMAGNI, 2001. Lichens as a potential source of pesticides. *Pesticide Outlook*. **12**(6), 229–232. ISSN 1465-8933.
- FLIEGER M., H. BANDOUCHOVA, J. CERNY, M. CHUDÍČKOVÁ, M. KOLARIK, V. KOVACOVA, N. MARTÍNKOVÁ, P. NOVÁK, O. ŠEBESTA, E. STODŮLKOVÁ a J. PIKULA, 2016. Vitamin B2 as a virulence factor in *Pseudogymnoascus destructans* skin infection. *Scientific Reports*. **6**(1), 33200. ISSN 2045-2322.
- FOX J. a S. WEISBERG, 2020. car: Companion to Applied Regression. [R package]. <https://cran.r-project.org/package=car>.
- FRÖBERG L., A. BAUR a B. BAUR, 1993. Differential herbivore damage to calcicolous lichens by snails. *The Lichenologist*. **25**(1), 83–95. ISSN 0024-2829.
- FRÖBERG L., T. SOLHØY, A. BAUR a B. BAUR, 2003. Lichen specificity of Oribatid mites (Acari; Oribatida) on limestone walls in the Great Alvar of Öland, Sweden. *Entomologisk tidskrift*. **124**(3), 177–182. ISSN 0013-886X.
- GALLUCCI M., 2019. GAMLj: General analyses for linear models. [jamovi module]. <https://gamlj.github.io/>.

- GARDES M. a T. D. BRUNS, 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*. **2**(2), 113–118. ISSN 1365-294X.
- GAUSLAA Y., 2009. Ecological functions of lichen compounds. *Rundgespräche der Kommission für Ökologie*. **36**, 95–108. ISSN 0938-5851.
- GERSON U., 1973. Lichen-arthropod associations. *The Lichenologist*. **5**(5–6), 434–443. ISSN 0024-2829.
- GRANDJEAN F., 1950. Observations éthologiques sur *Camisia segnis* (Herm.) et *Platynothrus peltifer* (Koch) (Acariens). *Bulletin du Muséum national d'histoire naturelle*. **22**(2), 224–231.
- GRESSITT J. L. a J. SEDLACEK, 1970. Papuan weevil genus *Gymnopholus*: second supplement with studies in epizoic symbiosis. *Pacific Insects*. **12**(4), 753–762.
- HÅGVAR S., 2018. Ecological spotlights on mites (Acari) in Norwegian Conifer forests: A Review. *Pests Control and Acarology*. IntechOpen. ISBN 978-1-83880-603-3.
- HENDERSON A. a D. J. HACKETT, 1986. Lichen and algal camouflage and dispersal in the psocid nymph *Trichadenotecnum fasciatum*. *The Lichenologist*. **18**(2), 199–200. ISSN 0024-2829.
- HEPPERLE D., 2004. SeqAssem(C). A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualisation tool for molecular sequences. http://www.sequentix.de/software_seqassem.php.
- HUBERT J., M. ŽILOVÁ a S. PEKÁR, 2001. Feeding preferences and gut contents of three panphytophagous oribatid mites (Acari: Oribatida). *European Journal of Soil Biology*. **37**(3), 197–208. ISSN 1164-5563.
- JEGEDE O. O., K. M. STANDEN, S. SICILIANO, E. G. LAMB a K. J. STEWART, 2023. Rocks, lichens, and woody litter influenced the soil invertebrate density in upland tundra heath. *PLOS ONE*. **18**(5), e0282068. ISSN 1932-6203.
- JONES D. T. a F. GATHORNE-HARDY, 1995. Foraging activity of the processional termite *Hospitalitermes hospitalis* (Termitidae: Nasutitermitinae) in the rain forest of Brunei, north-west Borneo. *Insectes Sociaux*. **42**(4), 359–369. ISSN 1420-9098.
- KALSHOVEN L. G. E., 1958. Observations on the black termites, *Hospitalitermes* Spp., of Java and Sumatra. *Insectes Sociaux*. **5**(1), 9–30. ISSN 1420-9098.
- KASSAMBARA A. a F. MUNDT, 2020. factoextra: Extract and visualize the results of multivariate data analyses. [R package]. <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>.
- KATOH K. a D. M. STANDLEY, 2013. MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*. **30**(4), 772–780. ISSN 0737-4038.
- KOUKOL O., J. MOUREK, Z. JANOVSÝ a K. ČERNÁ, 2009. Do oribatid mites (Acari: Oribatida) show a higher preference for ubiquitous vs. specialized saprotrophic fungi from pine litter? *Soil Biology and Biochemistry*. **41**(6), 1124–1131. ISSN 0038-0717.
- KRANTZ G. W. a E. E. LINDQUIST, 1979. Evolution of phytophagous mites (Acari). *Annual Review of Entomology*. **24**(1), 121–158. ISSN 0066-4170.
- KUZNETSOVA E. S. a S. V. DUDOV, 2017. New records of lichens from the Zeysky Nature Reserve (Amur Region, Russia). *Folia Cryptogamica Estonica*. **54**, 51–58. ISSN 1736-7786.

- LAWREY J. D., 1980. Calcium accumulation by lichens and transfer to lichen herbivores. *Mycologia*. **72**(3), 586–594. ISSN 0027-5514.
- LAWREY J. D., 1983. Lichen herbivore preference: a test of two hypotheses. *American Journal of Botany*. **70**(8), 1188–1194. ISSN 1537-2197.
- LE POGAM P., B. LEGOUIN, A. GEAIRON, H. ROGNIAUX, F. LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, W. OBERMAYER, J. BOUSTIE a A.-C. LE LAMER, 2016. Spatial mapping of lichen specialized metabolites using LDI-MSI: chemical ecology issues for *Ophioparma ventosa*. *Scientific Reports*. **6**(1), 37807. ISSN 2045-2322.
- LEHMITZ R. a P. DECKER, 2017. The nuclear 28S gene fragment D3 as species marker in oribatid mites (Acari, Oribatida) from German peatlands. *Experimental and Applied Acarology*. **71**(3), 259–276. ISSN 1572-9702.
- LIEBMANN-REINDL M., 2024. Biologie, Ökologie und Entwicklung der mit der Flechte *Cladonia norvegica* assoziierten Hornmilben. Karl-Franzens-Universität Graz, Institut für Biologie. Masterarbeit, Betreuer Pfingstl Tobias, Zweitbetreuer Resl, Philipp.
- LIŠKA J., Z. PALICE a Š. BAYEROVÁ, 1999. *Cladonia luteoalba* a *C. norvegica* - nové dutohlávky pro ČR. *Bryonora*. **23**, 4–7. ISSN 0862-8904.
- LITVAITIS M. K., G. NUNN, W. K. THOMAS a T. D. KOCHER, 1994. A molecular approach for the identification of meiofaunal turbellarians (Platyhelminthes, Turbellaria). *Marine Biology*. **120**(3), 437–442. ISSN 1432-1793.
- LOECHER M. a K. ROPKINS, 2015. RgoogleMaps and loa: Unleashing R graphics power on map tiles. *Journal of Statistical Software*. **63**(4), 1–18.
- LÖHMUS P. a A. LÖHMUS, 2009. The importance of representative inventories for lichen conservation assessments: the case of *Cladonia norvegica* and *C. parasitica*. *The Lichenologist*. **41**(1), 61–67. ISSN 1096-1135, 0024-2829.
- LORENTSSON S. a J.-E. MATTSSON, 1999. New reports of soredia dispersed by ants, *Formica cunicularia*. *The Lichenologist*. **31**(2), 204–207. ISSN 0024-2829.
- LÜCKING R. a A. BERNECKER-LÜCKING, 2000. Lichen feeders and lichenicolous fungi: Do they affect dispersal and diversity in tropical foliicolous lichen communities? *Ecotropica*. **6**, 23–41.
- LUXTON M., 1972. Studies on the oribatid mites of a Danish beech wood soil. 1. Nutritional biology. *Pedobiologia*. **12**(6), 434–463.
- MACÍAS F. A., J. C. G. GALINDO a J. M. G. MOLINILLO, 2003. Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals. CRC Press. ISBN 978-0-203-49278-9.
- MACÍAS F. A., J. M. G. MOLINILLO, R. M. VARELA a J. C. G. GALINDO, 2007. Allelopathy - a natural alternative for weed control. *Pest Management Science*. **63**(4), 327–348. ISSN 1526-4998.
- MALÍČEK J., 2022. Lišejníky přírodní rezervace Getsemanka v Brdech. *Bryonora*. **69**(6), 19–29. ISSN 0862-8904.
- MALÍČEK J., F. BOUDA, J. KOCOURKOVÁ, Z. PALICE a O. PEKSA, 2011. Zajímavé nálezy vzácných a přehlížených dutohlávek v České republice. *Bryonora*. **48**, 34–50.
- MALÍČEK J., Z. PALICE, F. BOUDA, K. KNUDSEN, J. ŠOUN, J. VONDRÁK a P. NOVOTNÝ, 2024. houboplodka krvavějící | Dalib.cz. Atlas českých lišejníků. - dalib.cz.

MALÍČEK J., Z. PALICE, K. KNUDSEN, J. ŠOUN, J. VONDRÁK a P. NOVOTNÝ, 2021. dutohlávka červenající | Dalib.cz. Atlas českých lišejníků. - dalib.cz.

MARAUN M. a S. SCHEU, 2000. The structure of oribatid mite communities (Acari, Oribatida): patterns, mechanisms and implications for future research. *Ecography*. **23**(3), 374–382. ISSN 1600-0587.

MATERNA J., 2000. Oribatid communities (Acari: Oribatida) inhabiting saxicolous mosses and lichens in the Krkonoše Mts. (Czech Republic). *Pedobiologia*. **44**(1), 40–62. ISSN 0031-4056.

MEIER F. A., S. SCHERRER a R. HONEGGER, 2002. Faecal pellets of lichenivorous mites contain viable cells of the lichen-forming ascomycete *Xanthoria parietina* and its green algal photobiont, *Trebouxia arboricola*. *Biological Journal of the Linnean Society*. **76**(2), 259–268. ISSN 0024-4066, 1095-8312.

MELEKHINA E. N., 2023. Lichen-associated Oribatid mites in the Taiga zone of Northeast European Russia: taxonomical composition and geographical distribution of species. *Diversity*. **15**(5), 599. ISSN 1424-2818.

MESSUTI M. I. a M. KUN, 2007. The occurrence of *Pachytullbergia scabra* (Collembola: Pachytullbergiidae) on *Pseudocyphellaria granulata* (lichenized Ascomycota). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*. **66**(1–2), 177–179. ISSN 0373-5680.

MILLER M. A., T. SCHWARTZ, B. E. PICKETT, S. HE, E. B. KLEM, R. H. SCHEUERMANN, M. PASSAROTTI, S. KAUFMAN a M. A. O'LEARY, 2015. A RESTful API for Access to Phylogenetic Tools via the CIPRES Science Gateway. *Evolutionary Bioinformatics*. **11**, EBO.S21501. ISSN 1176-9343.

MONTEIRO R. Ch., 2002. The Thysanoptera fauna of Brazil. Thrips and Tospoviruses: proceedings of the 7th international symposium on Thysanoptera. 325–240.

MOUND L. A., 2005. Thysanoptera: diversity and interactions. *Annual Review of Entomology*. **50**(1), 247–269. ISSN 0066-4170, 1545-4487.

MUKHERJEE A., B. WILSKE, R. A. NAVARRO, A. DIPPENAAR-SCHOEMAN a L. G. UNDERHILL, 2010. Association of spiders and lichen on Robben Island, South Africa: a case report. *Journal of Threatened Taxa*. **2**(4), 815–819. ISSN 0974-7907.

NASH III T. H., 2008. *Lichen Biology*. 2. vydání. Cambridge University Press. ISBN 978-0-511-41407-7.

ORANGE A., P. W. JAMES a F. J. WHITE, 2001. *Microchemical methods for the identification of lichens*. 2. vydání. London: British Lichen Society. ISBN 978-0-9540418-9-2.

PEAKE J. F. a P. W. JAMES, 1967. Lichens and mollusca. *The Lichenologist*. **3**, 425–428. ISSN 0024-2829.

PINO-BODAS R., M. BLÁZQUEZ, A. DE LOS RÍOS a S. PÉREZ-ORTEGA, 2023. *Myrmecia*, not *Asterochloris*, is the main photobiont of *Cladonia suburgida* (Cladoniaceae, Lecanoromycetes). *Journal of fungi*. **9**(12), 1160. ISSN 2309-608X.

PINO-BODAS R., N. SANDERSON, P. CANNON, A. APTROOT, B. COPPINS, A. ORANGE a J. SIMKIN, 2021. Lecanorales: Cladoniaceae including the genera *Cladonia*, *Pilophorus* and *Pycnothelia*. *Revisions of British and Irish Lichens*, British Lichen Society, Royal Botanic Gardens, Kew. **19**, 1–45. ISSN 2634-7768.

- PINO-BODAS R. a S. STENROOS, 2021. Global biodiversity patterns of the photobionts associated with the genus *Cladonia* (Lecanorales, Ascomycota). *Microbial ecology*. **82**(1), 173–187. ISSN 1432-184X.
- PRINZING A. J., 1999. Wind-acclimated thallus morphogenesis in a lichen (*Evernia prunastri*, Parmeliaceae) probably favored by grazing disturbances. *American Journal of Botany*. **86**(2), 173–183. ISSN 1537-2197.
- R CORE TEAM, 2021. R: A Language and environment for statistical computing. Version 4.1 [Computer software]. <https://cran.r-project.org>.
- R CORE TEAM, 2023. R: A Language and environment for statistical computing. 2023. R foundation for statistical computing. <https://www.R-project.org/>.
- RAMAKRISHNAN N. a R. NERAVATHU, 2019. Oribatid mites as potential predators of the root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Acarological Studies*. **1**(2), 123–128. ISSN 2667-5684.
- RAMBAUT A., 2018. Figtree ver 1.4.4. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.
- RANDLANE T., I. JÜRIADO, P. DEGTJARENKO a A. SAAG, 2021. New assessment of least concern lichens in the Red list of Estonia: are common species still common? *Folia Cryptogamica Estonica*. **58**, 199–212. ISSN 1736-7786.
- RANKOVIĆ B. a M. MIŠIĆ, 2008. The antimicrobial activity of the lichen substances of the lichens *Cladonia furcata*, *Ochrolechia androgyna*, *Parmelia caperata* and *Parmelia conspersa*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. **22**(4), 1013–1016. ISSN 1310-2818.
- RANKOVIĆ B., M. MIŠIĆ a S. SUKDOLAK, 2008. The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Physcia aipolia*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes*. *World journal of microbiology and biotechnology*. **24**(7), 1239–1242. ISSN 1573-0972.
- REUTIMANN P. a Ch. SCHEIDEGGER, 1987. Importance of lichen secondary products in food choice of two oribatid mites (Acari) in an alpine meadow ecosystem. *Journal of Chemical Ecology*. **13**(2), 363–369. ISSN 1573-1561.
- REVELLE W., 2019. psych: Procedures for psychological, psychometric, and personality research. [R package]. <https://cran.r-project.org/package=psych>.
- RONQUIST F., M. TESLENKO, P. Van DER MARK, D. L. AYRES, A. DARLING, S. HÖHNA, B. LARGET, L. LIU, M. A. SUCHARD a J. P. HUELSENBECK, 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*. **61**(3), 539–542. ISSN 1063-5157.
- ROOS R. E., T.BIRKEMOE, S. BOKHORST, D. A. WARDLE a J. ASPLUND, 2022. The importance of foundation species identity: A field experiment with lichens and their associated micro-arthropod communities. *Basic and Applied Ecology*. **62**, 45–60. ISSN 1439-1791.
- ROOT H. T., G. G. MCGEE a R. A. NORTON, 2007. Arboreal mite communities on epiphytic lichens of the Adirondack Mountains of New York. *Northeastern Naturalist*. **14**(3), 425–438. ISSN 1092-6194, 1938-5307.
- RUOSS Von E., H. MAYRHOFER a W. PONGRATZ, 1987. Eine Rentier- und eine Becherflechte neu für die Steiermark. *Mitt. naturwiss. Ver. Steiermark*. **117**, 105–110.

SAYERS E. W., M. CAVANAUGH, K. CLARK, K. D. PRUITT, C. L. SCHOCH, S. T. SHERRY a I. KARSCH-MIZRACHI, 2022. GenBank. Nucleic Acids Research. **50**(D1), D161–D164. ISSN 1362-4962.

SEAWARD M. R. D., 1988. Contribution of lichens to ecosystem. CRC Handbook of Lichenology. 2. vydání. CRC Press. 107–129. ISBN 0-8493-3582-5.

SENICZAK A., S. SENICZAK, M. SŁOWIKOWSKA a Z. PALUSZAK, 2017. The effect of different diet on life history parameters and growth of *Oppia denticulata* (Acari: Oribatida: Oppiidae). Systematic and Applied Acarology. **22**(5), 749–758. ISSN 1326-1971, 2056-6069.

SENICZAK S., R. GRACZYK, A. SENICZAK, K. FALEŃCZYK-KOZIRÓG, S. KACZMAREK a T. MARQUARDT, 2018. Microhabitat preferences of Oribatida and Mesostigmata (Acari) inhabiting lowland beech forest in Poland and the trophic interactions between these mites. European Journal of Soil Biology. **87**, 25–32. ISSN 1164-5563.

SEOL H., 2022. snowCluster: Cluster analysis. [jamovi module].
<https://github.com/hyunsooseol/snowCluster>.

SEYD E. L. a M. R. D. SEAWARD, 1984. The association of oribatid mites with lichens. Zoological Journal of the Linnean Society. **80**(4), 369–420. ISSN 0024-4082.

SCHNEIDER K., C. RENKER, S. SCHEU a M. MARAUN, 2004. Feeding biology of oribatid mites: a minireview. Phytophaga. **14**, 247–256. ISSN 0393 - 8131.

SCHNEIDER K. a M. MARAUN, 2009. Top-down control of soil microarthropods – Evidence from a laboratory experiment. Soil Biology and Biochemistry. **41**(1), 170–175. ISSN 0038-0717.

SCHRAM L. J., R. T. MCMULLIN a M. ANAND, 2011. *Cladonia norvegica* Tønsberg & Holien (Cladoniaceae), a new lichen record for Ontario. Evansia. **30**(2), 69–71. ISSN 0747-9859.

SCHUSTER R., 1956. Der Anteil der Oribatiden an den Zersetzungsvorgängen im Boden. Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere. **45**(1), 1–33. ISSN 0372-9389.

SIDDIQI M. R. a D. L. HAWKSWORTH, 1982. Nematodes associated with galls on *Cladonia glauca*, including two new species. The Lichenologist. **14**(2), 175–184. ISSN 0024-2829.

SIEPEL H. a E. M. RUTIER-DIJKMAN, 1993. Feeding guilds of Oribatid mites based on their carbohydrase activities. Soil Biology and Biochemistry. **25**(11), 1491–1497. ISSN 0038-0717/93.

SKOREPA A. C. a A. J. SHARP, 1971. Lichens in „packets" of lacewing larvae (Chrysopidae). The Bryologist. **74**(3), 363–364. ISSN 0007-2745, 1938-4378.

SKUBAŁA P., 2002. Development of oribatid mite communities (Acari, Oribatida) on a mine dump. Acarid phylogeny and evolution: Adaptation in mites and ticks. Kluwer Academic Publishes. 209–215. ISBN 978-90-481-5950-5.

SMITH A. L., 1921. Lichens. University Press. 148–268.

SMRŽ J. a J. KOCOURKOVÁ, 1999. Mite communities of two epiphytic lichen species (*Hypogymnia physodes* and *Parmelia sulcata*) in the Czech Republic. Pedobiologia. **43**(5), 385–390. ISSN 0031-4056.

SØCHTING U. a P. GJELSTRUP, 1985. Lichen communities and the associated fauna on a rocky sea shore on Bornholm in the Baltic. Ecography. **8**(1), 66–75. ISSN 0906-7590, 1600-0587.

SOLHAUG K. A. a Y. GAUSLAA, 2012. Secondary lichen compounds as protection against excess solar radiation and herbivores. Springer, Progress in Botany. **73**, 283–304. ISBN 978-3-642-22746-2.

SOWTER F. A., 1971. Mites (Acari) and lichens. The Lichenologist. **5**(1–2), 176–176. ISSN 0024-2829, 1096-1135.

SPRIBILLE T., B. KLUG a H. MAYRHOFER, 2011. A phylogenetic analysis of the boreal lichen *Mycoblastus sanguinarius* (Mycoblastaceae, lichenized Ascomycota) reveals cryptic clades correlated with fatty acid profiles. Molecular Phylogenetics and Evolution. **59**(3), 603–614. ISSN 1055-7903.

STAMATAKIS A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics. **30**(9), 1312–1313. ISSN 1367-4803.

STENROOS S., 1989. Taxonomy of the *Cladonia coccifera* group. 2. Annales Botanici Fennici. **26**(3), 307–317. ISSN 0003-3847.

STENROOS S. a T. AHTI, 1990. The lichen family Cladoniaceae in Tierra del Fuego: problematic or otherwise noteworthy taxa. Annales Botanici Fennici. **27**(4), 317–327. ISSN 0003-3847.

STENROOS S. a T. AHTI, 1994. A synopsis of the Japanese taxa of *Cladonia* section *Cocciferae*. The Journal of the Hattori Botanical Laboratory. **75**, 305–318.

STENROOS S., R. PINO-BODAS, J. HYVÖNEN, H. T. LUMBSCH a T. AHTI, 2019. Phylogeny of the family Cladoniaceae (Lecanoromycetes, Ascomycota) based on sequences of multiple loci. Cladistics. **35**(4), 351–384. ISSN 1096-0031.

STUBBS C. S., 1989. Patterns of distribution and abundance of corticolous lichens and their invertebrate associates on *Quercus rubra* in Maine. The Bryologist. **92**(4), 453–460. ISSN 0007-2745.

STUBBS C. S., 1995. Dispersal of soredia by the oribatid mite, *Humerobates arborea*. Mycologia. **87**(4), 454–458. ISSN 0027-5514.

SZCZEPAŃSKA K., D. KUBIAK, E. OSSOWSKA, M. KUKWA, J. JASKÓLSKA, A. KOWALEWSKA, U. SCHIEFELBEIN, A. BOHDAN, A. KEPEL, M. SĘKTAS, R. SZYMCZYK, M. HACHUŁKA, K. RUTKOWSKI, M. SMOCZYK, A. ZALEWSKA, A. PIEGDOŃ a E. ROMANOW-PEKAL, 2023. Materiały do rozmieszczenia porostów i grzybów naporostowych Polski, 3. Wiadomości Botaniczne. **67**, 1–33. ISSN 2543-6503.

ŠATKAUSKIENĖ I., 2014. Microfauna of lichen (*Xanthoria parietina*) in Lithuania: diversity patterns in polluted and non-polluted sites. Baltic Forestry. **18**, 255–265. ISSN 2029-9230.

TAMURA K., G. STECHER a S. KUMAR, 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis Version 11. Molecular Biology and Evolution. **38**(7), 3022–3027. ISSN 1537-1719.

THE JAMOVI PROJECT, 2022. jamovi (Version 2.3) [Computer Software]. <https://www.jamovi.org>.

TIMDAL E., 1989. The production of rhodocladonic acid in *Cladonia bacilliformis* and *C. norvegica* triggered by the presence of a lichenicolous mite. Graphis Scripta. **2**, 125–127.

TØNSBERG T., 1992. The sorediate and isidiate, corticolous, crustose lichens in Norway. Sommerfeltia. **14**(1), 1–336.

TØNSBERG T. a H. HOLIEN, 1984. *Cladonia* (sect. *Cocciferae*) *norvegica*, a new lichen species. Nordic Journal of Botany. **4**(1), 79–82. ISSN 1756-1051.

TØNSBERG T. a T. GOWARD, 1992. *Cladonia norvegica* new to North America. *Evansia*. **9**(2), 56–58.

TULLGREN A., 1918. Zur Morphologie und Systematik der Hemipteren I. *Entomologisk tidskrift / Entomologiska föreningen i Stockholm*. **1918**, 113–133. ISSN 0013-886X.

VTÍPILOVÁ V., 2021. Interakce lišejníků a bezobratlých živočichů s důrazem na roztoče. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky. Bakalářská práce, vedoucí Steinová, Jana.

WALTER D. E. a H. C. PROCTOR, 1999. *Mites: Ecology, evolution and behaviour*. UNSW Press. ISBN 0-86840-529-9.

WEHNER K., R. A. NORTON, N. BLÜTHGEN a M. HEETHOFF, 2016. Specialization of oribatid mites to forest microhabitats – the enigmatic role of litter. *Ecosphere*. **7**(3). ISSN 2150-8925.

WEIGMANN G., 2006. Hornmilben (Oribatida). *Die Tierwelt Deutschlands und der angrenzenden Meeresteile*, 76 Teil. ISBN 978-3-937783-18-5.

WESSELS D. C. J., L. A. WESSELS a W. H. HOLZAPFEL, 1979. Preliminary report on lichen-feeding Coleoptera occurring on *Teloschistes capensis* in the Namib Desert, South West Africa. *The Bryologist*. **82**(2), 270–273. ISSN 0007-2745, 1938-4378.

WESSELS D. C. J. a L.-A. WESSELS, 1991. Erosion of biogenically weathered Clarens sandstone by lichenophagous bagworm larvae (Lepidoptera; Pyschidae). *The Lichenologist*. **23**(3), 283–291. ISSN 0024-2829.

WHITE T., T. BRUNS, S. LEE, J. TAYLOR, M. INNIS, D. GELFAND a J. SNINSKY, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press. 315–322.

YAHR R., R. VILGALYS a P. T. DEPRIEST, 2006. Geographic variation in algal partners of *Cladonia subtenuis* (Cladoniaceae) highlights the dynamic nature of a lichen symbiosis. *New Phytologist*. **171**(4), 847–860. ISSN 1469-8137.

ZOLLER S., Ch. SCHEIDEGGER a Ch. SPERISEN, 1999. PCR primers for the amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of lichen-forming Ascomycetes. *The Lichenologist*. **31**(5), 511–516. ISSN 0024-2829.

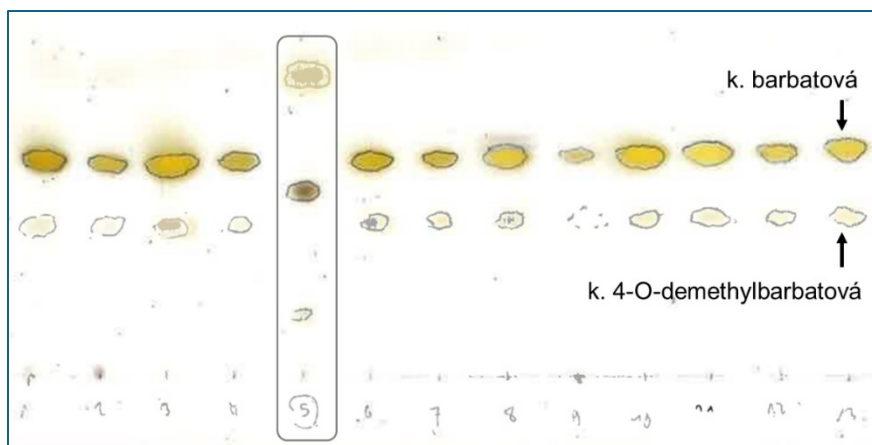
8. Přílohy

Tab. A: Přehled položek lišejníků použitých pro molekulární analýzy, chemické analýzy a extrakci roztočů; červeně označené ID znamená formu druhu *Cladonia norvegica* s červenými skvrnami a zeleně označené ID formu bez červených skvrn, "TLC 23" je označení pro první TLC provedené v srpnu 2023 zdokumentované na Obr. B–D, Přílohy, "TLC 24" je z března 2024 zdokumentované na Obr. 8 a Obr. A, Přílohy, "Č." značí číslo vzorku na deskách TLC; čísla, která nejsou v této tabulce dohledatelná označovala lišejníky, které se ukázaly být jinými druhy dutohlávek, případně s nimi bylo TLC zopakováno kvůli prvotnímu nepřesnému výsledku

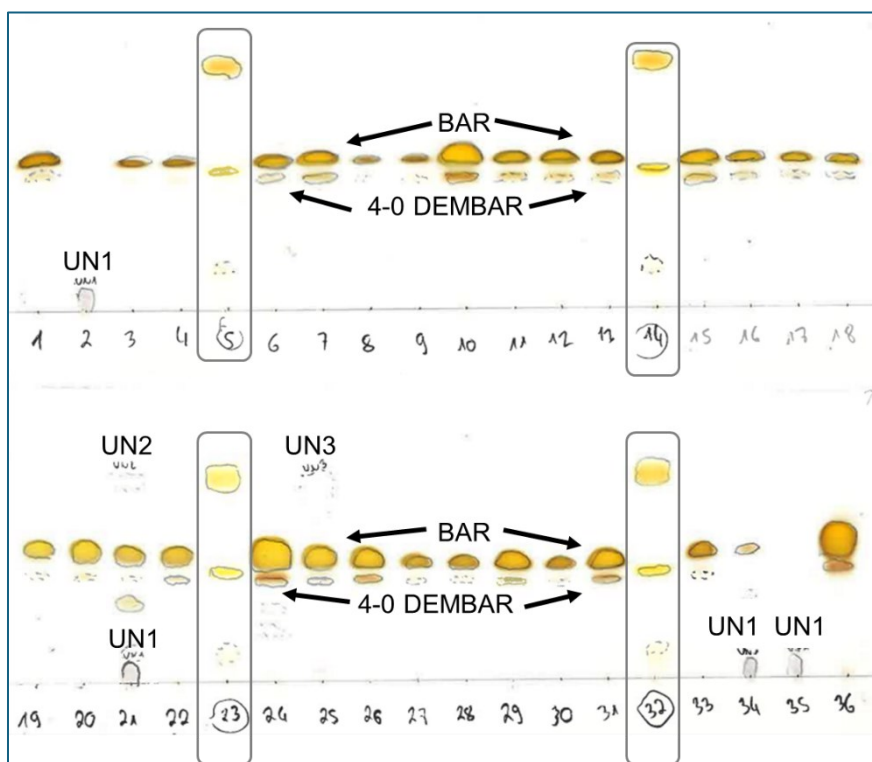
ID položky	DNA ID	Lokalita	GPS koordináty	Sběratel	Datum sběru	TLC	Č.
ZP 32349	N1	ČR, Šumava, Černý Kříž, Volary	48.8604167N, 13.8665833E	Zdeněk Palice	30.12.2021	24	1
JS 1005	N3	Norsko, Trøndelag, ca. 3 km SV od Snåsa	64.2516500N, 12.4266728E	Jana Steinová	26.08.2021	23	24
DS 29.10.2022	N13A	ČR, Novohradské hory, Žofínský prales	48.6659N, 14.700661E	David Svoboda	29.10.2022	24	2
JS 1220	N14	ČR, Šumava, ca. 500m SZ od sutě u bývalé Halkovy chaty	49.0789300N, 13.5068644E	Jana Steinová	24.09.2022	23	27
VV1	N5	ČR, Třeboňsko, Nítovice	49.1620000N, 14.8080000E	Věra Vtípilová	24.08.2022	23	21
VV2	N15	Norsko, Viken, Enebakk, Fjell	59.7942000N, 10.9801222E	Věra Vtípilová, Jana Steinová, Einar Timdal	13.10.2022	23	28
VV3	N16	Norsko, Viken, Enebakk, Fjell	59.7939028N, 10.9795586E	Věra Vtípilová, Jana Steinová, Einar Timdal	13.10.2022	23	29
VV4	N17	Norsko, Viken, Enebakk, Nordre Vinholtjern	59.7883636N, 11.0083983E	Věra Vtípilová, Jana Steinová, Einar Timdal	13.10.2022	23	30
VV5	N18	Norsko, Viken, Enebakk, Nordre Vinholtjern	59.7874078N, 11.0097097E	Věra Vtípilová, Jana Steinová, Einar Timdal	13.10.2022	23	31
VV6	N19	Norsko, Viken, Enebakk, Nordre Vinholtjern	59.7841117N, 11.0150167E	Věra Vtípilová, Jana Steinová, Einar Timdal	13.10.2022	23	33
ZP 33812	N20	ČR, Třeboňsko, NPR Žofinka	48.8152778N, 14.8793056E	Zdeněk Palice	21.06.2022	23	34
ZP 33807	N21	ČR, Třeboňsko, NPR Žofinka	48.8152778N, 14.8793056E	Zdeněk Palice	21.06.2022	23	17
ZP 33582	N22	ČR, Šumava, Horská Kvilda	49.0554167N, 13.5434722E	Zdeněk Palice	24.05.2022	23	18
JS 1221	N24	ČR, Šumava, Mrtvý luh	48.8701072N, 13.8663342E	Jana Steinová	25.09.2022	23	26
JS 1219	N25	ČR, Šumava, ca. 300m S od sutě u bývalé Halkovy chaty	49.0788075N, 13.5101569E	Jana Steinová	24.09.2022	23	22
JS 1066	N26	Norsko, Trøndelag, Snåase - Snåsa	64.2532011N, 12.4351175E	Jana Steinová	26.08.2021	23	25
TRH-L-16331	NJ2	Norsko, Trøndelag, Flatanger, Lisstøelva nature reserve	64.3694N, 10.8797E	Jana Steinová	08.09.2015		
H2	H2	Rakousko, Steiermark, Landl, Hieflau	47.58564N, 14.70632E	Philipp Resl	24.08.2022	23	19
H1	H1	Rakousko, Steiermark, Landl, Hieflau	47.5862575N, 14.7061034E	Philipp Resl	24.08.2022	23	16
EW	EW	Rakousko, Steiermark, Bad Schwanberg - Oberfresen	46.7430118N, 15.0796671E	Philipp Resl	18.05.2022	23	20
EB3	EB3	Rakousko, Steiermark, Kindberg - Eiwegg Sattel	47.4203889N, 15.4519589E	Philipp Resl	25.09.2022	23	15
ER	ER	Rakousko, Steiermark, Bad Schwanberg - Oberfresen	46.7430118N, 15.0796671E	Philipp Resl	18.05.2022	23	13
VV7	N27	Norsko, Trøndelag, Stjørdal, Forradalen	63.4947000N, 11.4065000E	Håkon Holien	12.09.2023	23	36
VV8	TRTYP	Norsko, Trøndelag, S od jezera Benna	63.1956250N, 10.2522131E	Věra Vtípilová, Jana Steinová	19.06.2023	23	12
VV9	TR1	Norsko, Trøndelag, Hommelvik	63.3704686N, 10.9076597E	Věra Vtípilová, Jana Steinová	19.06.2023	24	13
VV11	TR3C	Norsko, Trøndelag, Lundamo, Sokna	63.1340769N, 10.3951781E	Věra Vtípilová, Jana Steinová	19.06.2023	23	3
VV12	TR4	Norsko, Trøndelag, Brøttum	63.2498975N, 10.5165189E	Věra Vtípilová, Jana Steinová	20.06.2023	23	4
VV13	TR5	Norsko, Trøndelag, Brøttum	63.2563533N, 10.5376736E	Věra Vtípilová, Jana Steinová	20.06.2023	23	6
VV14	TR7	Norsko, Trøndelag, Løkkstad	63.3578400N, 10.5588967E	Věra Vtípilová, Jana Steinová	20.06.2023	23	7
VV15	TR7C	Norsko, Trøndelag, Løkkstad	63.3578400N, 10.5588967E	Věra Vtípilová, Jana Steinová	20.06.2023	23	8
VV16	TR8	Norsko, Trøndelag, Granåsen	63.3774669N, 10.2885589E	Věra Vtípilová, Jana Steinová	21.06.2023	23	9
VV17	TR9	Norsko, Trøndelag, Granåsen	63.3775617N, 10.2872650E	Věra Vtípilová, Jana Steinová	21.06.2023	23	10
VV18	TR10	Norsko, Trøndelag, Stjørdal, Hegra	63.4454231N, 11.0915864E	Věra Vtípilová, Jana Steinová	21.06.2023	23	11
VV19	N28	Rakousko, Steiermark, Weinebene	46.8417563N, 15.0206204E	Věra Vtípilová, Philipp Resl, Jana Steinová	09.08.2023	24	3
VV20	N28A	Rakousko, Steiermark, Weinebene	46.8411546N, 15.0221733E	Věra Vtípilová, Philipp Resl, Jana Steinová	09.08.2023	24	4
ZP 35719	N29	ČR, Šumava, Černý Kříž	48.8596389N, 13.8826389E	Zdeněk Palice	03.06.2023	24	6
VV21	N30	Skotsko, Kimlochewe	57.60406N, 5.29230W	Lukáš Janošik	22.09.2023	24	7
VV22	N31	Rakousko, Steiermark, Sankt Radegund bei Graz, Schöcklkreuz	47.2059017N, 15.4819816E	Věra Vtípilová	26.10.2023	24	8
VV23	N32	Estónsko, Pärnu County	58.286081N, 25.016297E	Piret Lõhmus	23.10.2023	24	9
16204	N35	Rakousko, Steiermark, Ybbstaler Alpen, Grosser Urwald	47.77689N, 15.09471E	Jiří Malíček	02.08.2023	24	10
3A4-S3-BA	N41	Kanada, Ontario, Thunder Bay District	48.650935N, 86.305119W	Rémi Boisvert	14.07.2021	24	11
3C4-S1-BA	N43	Kanada, Ontario, Thunder Bay District	48.661116N, 86.273823W	Rémi Boisvert	19.07.2021	24	12

Tab. C: Spočítané fekální pelety během potravních experimentů SW (červené "S" vs zelené části "W" stélky formy *Cladonia norvegica* s červenými skvrnami) a OT ("O" zelené části stélky formy *C. norvegica* s červenými skvrnami z okolí Oslo vs "T" části stélky formy *C. norvegica* bez červených skvrn z okolí Trondheimu); "C. areo" značí *Carabodes areolatus* a "C. marg" značí *Carabodes marginatus*, „C“ u ID boxů označuje kontrolní boxy

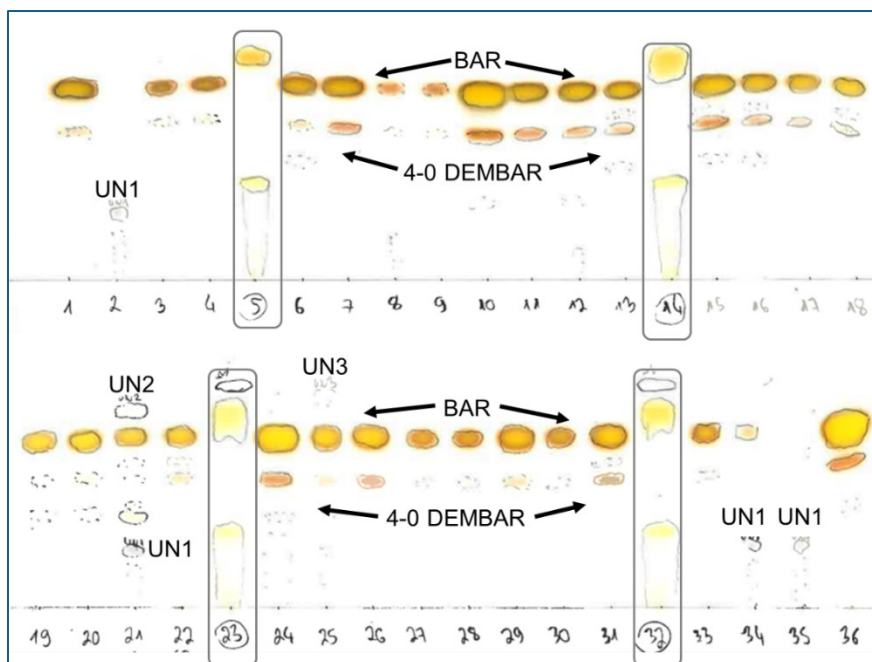
Experiment/ druh	Číslo boxu	Fekální pelety																																			
		DEN 1		DEN 2		DEN 3		DEN 4		DEN 7		DEN 8		DEN 9		DEN 10		DEN 11		DEN 14																	
		S/O	W/T	S/O	W/T	S/O	W/T	1S/O	2S/O	1W/T	2W/T	1S/O	2S/O	1W/T	2W/T	1S/O	2S/O	1W/T	2W/T	1S/O	2S/O	1W/T	2W/T														
SW/C.areo	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5													
SW/C.areo	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	58												
SW/C.areo	3	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
SW/C.areo	4	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
SW/C.areo	5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
SW/C.areo	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
SW/C.areo	7CS	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
SW/C.areo	8CW	0	3	0	2	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
SW/C.marg	9	11	0	16	3	24	20	32	0	19	0	41	6	16	9	56	19	17	18	70	20	27	22	115	22	30	20	150	27	38	20	186	55	52	20		
SW/C.marg	10	0	0	5	0	16	2	18	0	12	0	75	10	45	39	79	15	28	34	105	23	31	31	91	27	43	43	128	30	65	52	138	30	67	50		
SW/C.marg	11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
SW/C.marg	12	3	0	18	2	33	3	33	0	12	0	19	0	33	0	21	7	31	0	26	13	43	0	23	14	45	0	16	17	58	0	16	19	56	0		
SW/C.marg	13	0	0	6	1	16	1	38	2	1	0	47	61	0	0	49	78	0	61	88	0	61	88	0	76	89	0	68	104	0	68	142	0	0	0		
SW/C.marg	14	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	24	27	0	26	26	33	0	38	32	46	0	41	36	38	0	34	36	75	0	37	41	75	0	33		
SW/C.marg	15CS	0	0	6	0	12	0	20	0	0	0	24	12	0	0	33	26	0	0	44	34	0	0	54	35	0	0	88	29	0	0	0	0	0	0	0	
SW/C.marg	16CW	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TO/C.areo	17	0	3	0	3	0	6	0	0	1	10	0	32	49	33	0	34	46	23	0	36	60	34	0	38	64	39	0	45	98	39	0	44	30	0	0	
TO/C.areo	18	2	0	0	0	0	0	1	10	0	1	12	0	9	0	11	0	9	0	11	0	10	0	11	0	10	0	14	0	10	0	14	0	10	0	10	0
TO/C.areo	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TO/C.areo	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TO/C.areo	21	2	0	2	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TO/C.areo	22	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TO/C.areo	23CO	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TO/C.areo	24CT	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TO/C.marg	25	9	4	40	20	73	42	55	72	65	0	82	81	57	0	38	78	18	0	46	88	21	0	43	106	21	0	45	109	18	0	57	112	18	0	0	
TO/C.marg	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	14	0	0	44	23	3	0	55	28	4	6	54	28	7	6	58	34	7	6	65	34	7	9	0	0
TO/C.marg	27	0	2	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TO/C.marg	28	0	0	0	0	0	2	0	6	0	0	15	0	0	0	17	0	6	0	24	0	12	0	24	0	15	4	27	0	16	4	27	0	18	0	6	
TO/C.marg	29	0	0	7	18	25	21	75	0	25	0	82	4	54	24	53	15	54	66	42	38	56	59	22	61	54	65	22	78	54	68	22	78	54	68	0	0
TO/C.marg	30	0	0	2	0	0	0	14	0	0	0	31	56	0	0	38	86	12	0	60	75	21	32	69	75	23	32	77	86	72	37	83	86	121	47	0	
TO/C.marg	31CO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TO/C.marg	32CT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



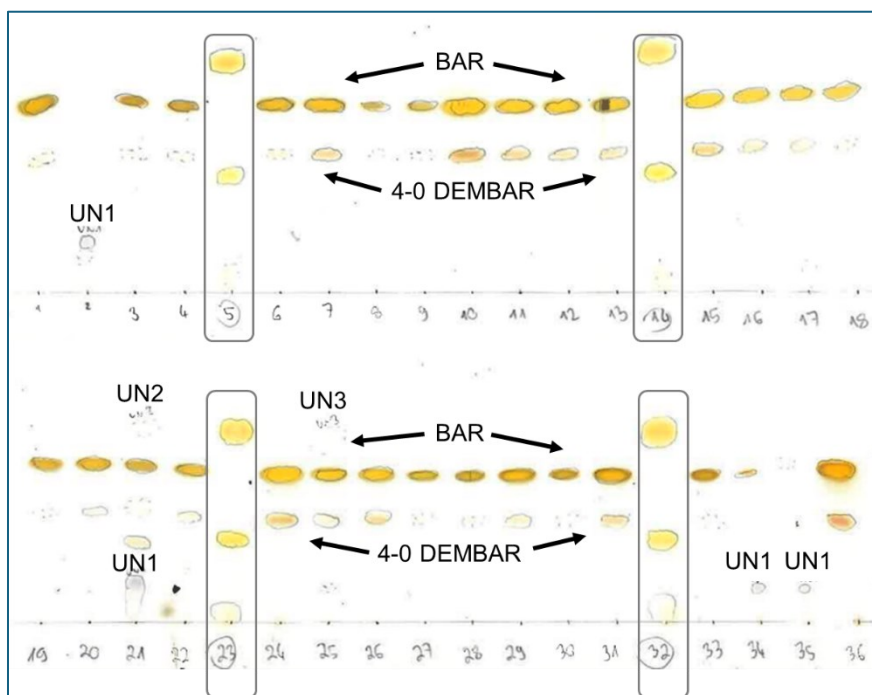
Obr. A: TLC 24 (z března 2024) – systém C; rámečkem je označený standard



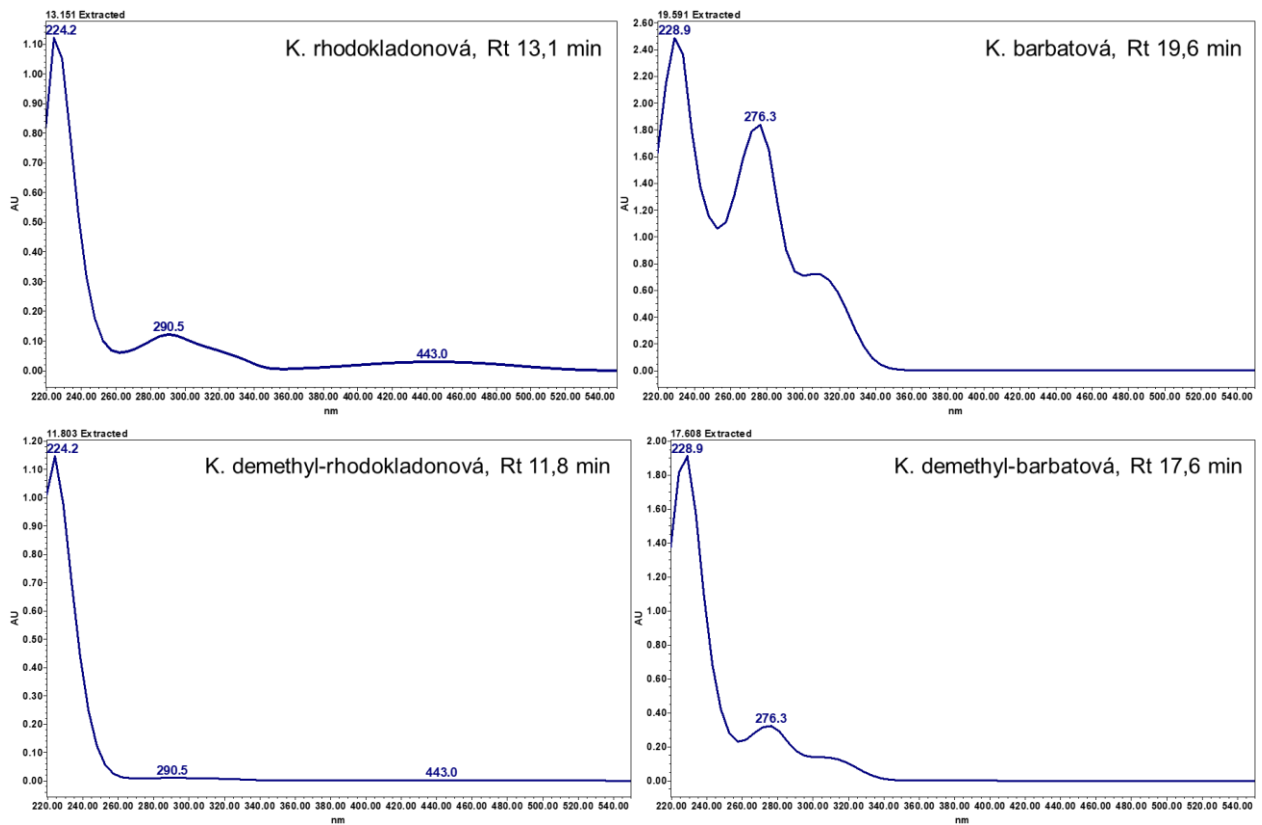
Obr. B: TLC 23 (ze srpna 2023) – systém A; rámečkem je označený standard, BAR značí kyselinu barbatovou, 4-0 DEMBAR kyselinu 4-0-demethylbarbatovou, UN označuje neznámé látky



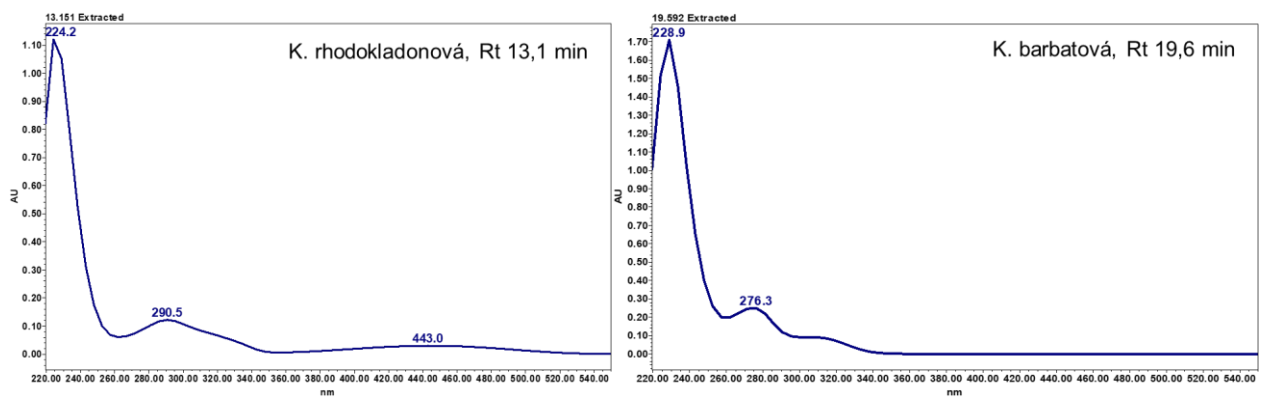
Obr. C: TLC 23 (ze srpna 2023) – systém B'; rámečkem je označený standard, BAR značí kyselinu barbatovou, 4-0 DEMBAR kyselinu 4-0-demethylbarbatovou, UN označuje neznámé látky



Obr. D: TLC 23 (ze srpna 2023) – systém C; rámečkem je označený standard, BAR značí kyselinu barbatovou, 4-0 DEMBAR kyselinu 4-0-demethylbarbatovou, UN označuje neznámé látky



Obr. E: UV spektra individuálních látek detekovaných ve vzorku B1 červené stélky lišejníku *Cladonia „rubrotincta“*



Obr. F: UV spektra individuálních látek detekovaných ve vzorku B5 červené plodnice *Cladonia bellidiflora*