

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
katedra botaniky

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie a geografie se zaměřením na vzdělávání



Gabriela Zvěřinová

Funkce sekundárních metabolitů u lišejníků **Functions of secondary metabolites of lichens**

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. David Svoboda, PhD.

Praha, 2014

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, 18. 8. 2014

.....

Gabriela Zvěřinová

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli, Davidu Svobodovi, za veškeré rady a připomínky při psaní této práce. Dále mé poděkování patří Josefu Haldovi za poskytnutí kopií mnoha článků z jeho databáze. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu při studiu a při psaní této práce.

Abstrakt

Bakalářská práce je literární rešerší problematiky sekundárních metabolitů lišejníků a jejich funkcí. Lišejníky produkují těchto látek velmi širokou škálu, přičemž většina z nich je specifická pouze pro lišejníky a u vyšších rostlin je nenacházíme. Kromě role těchto sloučenin v chemotaxonomii a systematice mají sekundární metabolity rozličné biologické funkce ve stélce lišejníků a mohou tak ovlivňovat jejich biotické i abiotické interakce s okolním prostředím. Mezi známé a často popisované funkce sekundárních metabolitů patří zejména antimikrobiální, alelopatické, antiherbivorní a antioxidační účinky, udržování homeostázy kovů a ochrana před zářením. Práce je zaměřena právě na tyto funkce a shrnuje současné poznatky v této oblasti.

Klíčová slova: lišejník, sekundární metabolity, alelopatie, antimikrobiální aktivita, herbivorie, antioxidační aktivita, fotoprotekce, homeostáza kovů, tolerance znečištění, literární rešerše

Abstract

This bachelor thesis is a review of available literature about lichen secondary metabolites and their functions. Lichens produce a great variety of these compounds; most of them are unique to the lichen symbiosis and are not found in higher plants. Besides the role of these compounds in chemotaxonomy and systematics, lichen secondary metabolites exhibit various biological functions and can affect biotic and abiotic interactions of lichens with their environment. Well-known and often described functions of lichen substances include especially antimicrobial, antiherbivory and antioxidant activity, allelopathy, metal homeostasis and photoprotection. This thesis is focused on these functions and summarizes current knowledge in this area.

Key words: lichen, secondary metabolites, allelopathy, antimicrobial activity, herbivory, antioxidant activity, photoprotection, metal homeostasis, pollution tolerance, literary review

Obsah

1. ÚVOD	9
2. SEKUNDÁRNÍ METABOLITY LIŠEJNÍKŮ	10
2.1. Detekce sekundárních metabolitů	12
2.1.1. Stélkové reakce a UV světlo	12
2.1.2. Mikrokrystalizační testy	13
2.1.3. Tenkovrstevná chromatografie (TLC)	13
2.1.4. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	13
3. BIOTICKÉ INTERAKCE LIŠEJNÍKŮ	15
3.1. Ochrana před herbivory	15
3.2. Antimikrobiální aktivita sekundárních metabolitů	18
3.3. Alelopatie	21
4. ABIOTICKÉ INTERAKCE LIŠEJNÍKŮ	23
4.1. Ochrana před zářením	23
4.2. Vliv sekundárních metabolitů na homeostázu kovů a toleranci znečištění	25
4.3. Antioxidační aktivita sekundárních metabolitů	27
5. ZÁVĚR	29
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	30

1. Úvod

Lišejníky jsou symbiotické organismy tvořené houbovým partnerem (mykobiont) a jedním či více fotosyntetickými partnery (fotobiont), kterými jsou nejčastěji zelená řasa či sinice (Nash 2008). Stejně jako vyšší rostliny, lišejníky produkují dvě hlavní skupiny metabolitů – metabolity primární (proteiny, aminokyseliny, polyoly, karotenoidy, polysacharidy a vitaminy) a sekundární (Stocker-Wörgötter 2008). Primární metabolity jsou na rozdíl od sekundárních intracelulární a mohou být produkovány houbou i řasou (resp. sinicí). Metabolity sekundární jsou vytvářeny výhradně houbovým symbiontem a jsou extracelulární (Elix & Stocker-Wörgötter 2008).

Mnoho autorů podporuje hypotézu, že sekundárních metabolity mají významnou roli v ekologii lišejníků (např. Rundel 1978; Huneck 1999; Gauslaa 2005; Molnár & Farkas 2010; Gazzano et al. 2013; Černajová & Svoboda 2014). Znamé funkce sekundárních metabolitů lišejníků jsou zejména antimikrobiální, alelopatické, antiherbivorní a antioxidační účinky, udržování homeostázy kovů a ochrana před zářením (Molnár & Farkas 2010).

Cílem této bakalářské práce je na základě dostupné literatury nejprve definovat sekundární metabolity lišejníků a popsat hlavní způsoby jejich detekce. Hlavní část práce je zaměřena na známé funkce sekundárních metabolitů a shrnuje současné poznatky v této oblasti.

2. Sekundární metabolity lišejníků

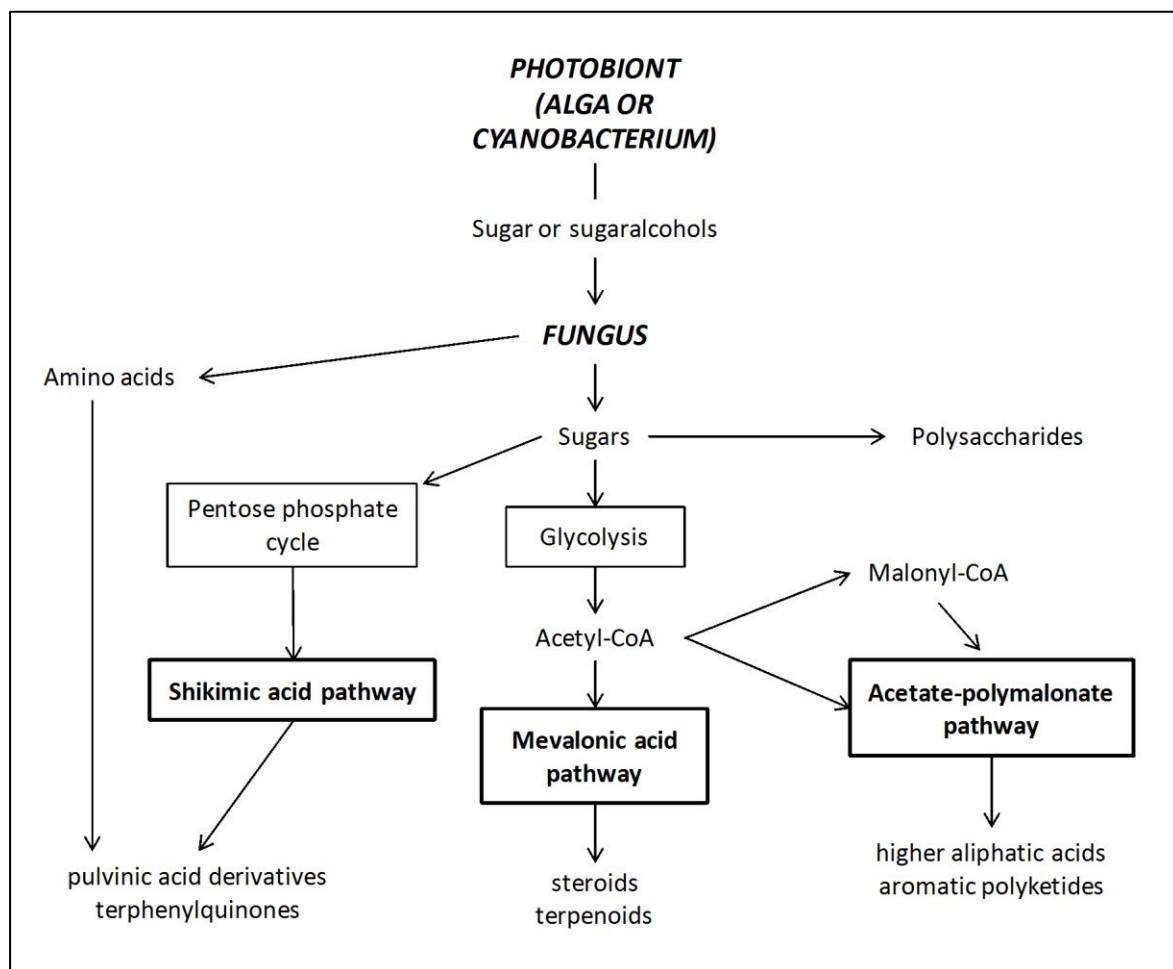
Lišejníky produkují velké množství sekundárních metabolitů (Rundel 1978; Orange et al. 2001; Białonska & Dayan 2005). Jak již bylo zmíněno v úvodu práce, sekundární metabolity jsou u lišejníků produkovány mykobiontem. Tím jsou v absolutní většině případů houby ze skupiny Ascomycota, méně často pak ze skupiny Basidiomycota (Huneck, 1999), případně jednotlivé případy i z ostatních skupin hub (Conti & Cecchetti 2001). U lišejníků se stopkovýtusnými houbami jako mykobiontem zatím nebyla tvorba sekundárních metabolitů prokázána (Lumbsch 1998).

Zatímco v roce 1996 bylo známo přibližně 700 lišejníkových sekundárních metabolitů (Huneck & Yoshimura 1996), v současné době je těchto látek známo více než 1050 (Stocker-Wörgötter 2008; Nguyen et al. 2013). Převážná většina z nich se vyskytuje pouze u lišejníků, jen malá část (cca 50-60) je známá i u hub nebo vyšších rostlin. Zpravidla se jedná o látky nerozpustné ve vodě, které mohou být ze stélky lišejníku extrahovány pouze organickými rozpouštědly (Elix & Stocker-Wörgötter 2008). Stélka lišejníku může obsahovat značné množství těchto látek – většinou mezi 0,1-5 % suché hmotnosti stélky, u některých druhů dokonce až 20 % (Molina et al. 2003).

Pro dlouhodobé přežití a růst lišejníku nejsou sekundární metabolity absolutně nezbytné (Bentley 1999), ale poskytují mu mnoho výhod (Molnár & Farkas 2010). Sloučeniny se vyskytují převážně extracelulárně a mohou být uloženy v různých částech stélky. Některé jsou nacházeny pouze ve svrchní kůře, která se nachází nad fotobiontem, a pravděpodobně tak chrání fotobionta před poškozením světlem či spásáním. U většiny lišejníků se sloučeniny nacházejí také pod fotobiontem, kde mohou mít například antibiotickou funkci či mohou sloužit jako antioxidanty. Chemická ochrana může být buď konstitutivní (geneticky předurčená) nebo induktivní (produkována jako reakce na signál z okolního prostředí), případně může vznikat kombinací obou uvedených typů (Nybakken & Julkunen-Tiitto 2006).

Možnost detekce sekundárních metabolitů lišejníků „napomohla rozvoji taxonomie mnoha známých druhů lišejníků – zvláště z rodů provazovka (*Usnea*), vousatec (*Bryoria*) a dutohlávka (*Cladonia*)“ (Malíček 2012). V taxonomii jsou sekundární metabolity běžně využívány již od konce 2. světové války (Culberson & Culberson 1994).

Rozlišují se tři základní biosyntetické dráhy syntézy sekundárních metabolitů: dráha kyseliny šikimové, dráha kyseliny mevalonové a acetyl-polymalonylová dráha (viz Obr. 1). První klasifikace lišejníkových látek, založená na známých strukturách a biosyntetických drahách, byla vytvořena Asahinou a Shibatou (1954). Většina sekundárních metabolitů je odvozena z acetyl-polymalonylové dráhy (viz Obr. 2). Nejčastějšími produkty této metabolické dráhy jsou aromatické látky, z nichž nejcharakterističtější jsou vytvořeny spojením dvou či tří orcinolů nebo β -orcinol-typů fenolických jednotek prostřednictvím esterických, etherických a C-C vazeb. Takto vzniká velká většina depsidů, depsidonů, dibenzofuranů, kyseliny usnové či jejích derivátů a depsonů. Zbylé aromatické sloučeniny této dráhy (chromony, xanthony a antrachinony) jsou pravděpodobně tvořeny cyklizací polyketidového řetězce a často jsou stejné či obdobné jako u hub nebo vyšších rostlin (Elix & Stocker-Wörgötter 2008).



Obr. 1: Zjednodušené schéma pravděpodobných drah vedoucích k hlavním skupinám lišejníkových sloučenin (převzato z Lumbsch, 1998)

1. Acetyl-polymalonyl pathway
 - 1.1 Secondary aliphatic acids, esters and related derivatives (45)
 - 1.2 Polyketide derived aromatic compounds
 - 1.2.1 Mononuclear phenolic compounds (19)
 - 1.2.2 Di- and tri-aryl derivatives of simple phenolic units
 - 1.2.2a Depsides, tridepsides and benzyl esters (185)
 - 1.2.2b Depsidones and diphenyl ethers (112)
 - 1.2.2c Depsones (6)
 - 1.2.2d Dibenzofurans, usnic acids and derivatives (23)
 - 1.2.3 Anthraquinones and biogenetically related xanthones (56)
 - 1.2.4 Chromones (13)
 - 1.2.5 Naphthaquinones (4)
 - 1.2.6 Xanthones (44)
2. Mevalonic acid pathway
 - 2.1 Di-, sester- and triterpenes (70)
 - 2.2 Steroids (41)
3. Shikimic acid pathway
 - 3.1 Terphenylquinones (2)
 - 3.2 Pulvinic acid derivatives (12)

Obr. 2: Hlavní skupiny sekundárních metabolitů lišejníků, v závorkách je uveden přibližný počet sloučenin (převzato z Elix & Stocker-Wörgötter, 2008)

2.1. Detekce sekundárních metabolitů

2.1.1. Stélkové reakce a UV světlo

Při použití této metody se na stélku nanáší nepatrné množství reagensů (nejčastěji roztok hydroxidu draselného, chlorové vápno či parafenylendiamin; Smith et al. 2009). Pokud je přítomna hledaná látka, činidlo způsobí barevnou změnu stélky (nejčastěji dochází ke změně na barvu červenou, žlutou a oranžovou). Nevýhodou této metody je, že reakce jsou nespecifické a tím pádem často nelze jednoznačně určit konkrétní látku obsaženou ve stélce. Navíc, je-li sekundární metabolit přítomen jen v malé koncentraci, může být reakce málo průkazná.

Některé sekundární metabolity je možné také identifikovat pomocí UV světla. V případě přítomnosti látky svítí stélka lišejníku bílým až modrým světlem (důkaz výskytu depsidů a depsidonů), popřípadě odstíny žluté, oranžové až červené značí přítomnost xanthonů (Orange et al. 2001).

2.1.2. Mikrokrystalizační testy

Na část stélky na podložním sklíčku se nanese kapka rozpouštědla (tím je nejčastěji aceton), které ze stélky vyextrahuje sekundární metabolity. K získanému extraktu se přidá mikrokrystalizační činidlo, následně se odpaří rozpouštědlo a dochází k rekrystalizaci látek (Asahina & Shibata 1954). Krystaly, které se vytvoří, jsou specifických tvarů a velikostí a jsou charakteristické pro jednotlivé látky a dají se dle klíčů určovat.

Tato metoda je v současnosti poměrně málo používána, jelikož byla zastíněna metodou chromatografie, která je citlivější a spolehlivější. Mikrokrystalizační testy jsou však finančně i časově méně náročné a jejich další výhodou je možnost rozlišení několika látek, které tenkovrstevná chromatografie neoddělí (Orange et al. 2001).

2.1.3. Tenkovrstevná chromatografie (TLC¹)

Sekundární metabolity se nejprve vyextrahují ze stélky pomocí acetonu. Získaný extrakt se nanáší na chromatografickou desku, která se ponoří do organických rozpouštědel. Ta poté spolu se sekundárními metabolity vzlínají chromatografickou deskou. Značky sekundárních metabolitů se na desce rozmisťují dle velikosti molekul, toto umístění je pro dané látky charakteristické a pomáhá při určování konkrétních látek (Orange et al. 2001).

Modifikací této metody je vysokoúčinná tenkovrstevná chromatografie (HPTLC²; Elix & Stocker-Wörgötter 2008). Ta poskytuje několik výhod oproti standardní TLC. Metoda HPTLC je citlivější a vyžaduje méně času a rozpouštědel, na druhou stranu je ovšem citlivější k vlhkosti vzduchu než TLC (Arup et al. 1993).

Metoda tenkovrstevné chromatografie je velmi efektivní a její používání není složité ani příliš finančně náročné a je v současnosti standardem na většině vědeckých pracovišť u nás i ve světě (Malíček 2012).

2.1.4. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC³)

HPLC je nejpřesnější z chromatografických technik. Pomocí této metody je možné dosáhnout separace a analýzy látek, které by byly obtížné (případně i nemožné) použitím jiných forem chromatografie (Lindsay 1992). Hlavními výhodami této metody je možnost

¹ TLC – z angl. Thin Layer Chromatography

² HPTLC – z angl. High Performance Thin Layer Chromatography

³ HPLC – z angl. High Performance Liquid Chromatography

určení koncentrace látek a detekce látek, které jsou zastoupeny jen v malých koncentracích. HPLC je velmi náročná na postup, jsou k ní potřeba standardy daných látek pro přesné určení a její nevýhodou je také její vysoká cena (Orange et al. 2001).

Prozatím není známo velké množství sloučenin, které jsou ve stélkách zastoupeny jen v malých koncentracích, což poskytuje HPLC velký potenciál do budoucnosti (Malíček 2012).

3. Biotické interakce lišejníků

3.1. Ochrana před herbivory

Lišejníky jsou spásány rozličnými herbivory, ze zástupců bezobratlých živočichů lze uvést například roztoče, slimáky, hlemýžďe či hmyz; z obratlovců spásají lišejníky sobi, případně karibu (Molnár & Farkas 2010). Ještě před pár desítkami let bylo mnoha autory uváděno, že herbivorie u lišejníků je poměrně vzácná a to pravděpodobně kvůli jejich nízké výživové hodnotě, specifickým strukturálním rysům a zejména kvůli produkci obranných sloučenin (Lawrey 1986; Rundel 1978). Po mnoha studiích herbivorie u lišejníků je však dnes známo, že jejich spásání není tak vzácné, jak bylo původně uváděno. Spásání lišejníků však není náhodné – sekundární metabolity hrají velkou roli v preferenci potravy herbivorů (Pöykkö & Hyvärinen 2003).

Možnost, že jsou lišejníky před herbivorií chráněny sekundárními metabolity poprvé vyslovil Zukal v roce 1895 (Molnár & Farkas 2010; Rundel 1978). Tato idea byla později podpořena průkaznými experimentálními důkazy (např. Lawrey 1983; Gauslaa et al. 2006; Asplund & Gauslaa 2007; Asplund et al. 2010a; Černajová & Svoboda 2014).

Asplund a Gauslaa (2007) experimentálně zjistili, že na herbivorii u lišejníků má vliv také velikost stélky, s níž souvisí i množství sekundárních metabolitů. Pro výzkum byly nasbírány různě velké stélky *Lobaria pulmonaria* z kmenu topolu osiky (*Populus tremula*). U těchto stélek byly kvantifikovány pomocí HPLC sekundární metabolity a seřazeny dle sestupné koncentrace. Byla nalezena významná pozitivní korelace mezi velikostí stélky a celkovou koncentrací sekundárních sloučenin. Nízký obsah sekundárních metabolitů v mladších rostlinách je často vysvětlován hypotézou rovnováhy mezi růstem a diferenciací, kdy je časné přidělování energie nedostatečné pro růst a zároveň produkci sekundárních metabolitů (Herms & Mattson 1992). Tato hypotéza by mohla být platná i pro lišejníky. Menší a mladší stélky, které obsahují méně obranných látek, by měly tím pádem být lépe přístupné herbivorům než větší stélky. Herbivorie tak může limitovat přežití mladých stélek v lokalitách bohatých na lišejníky-spásající měkkýše a tím snižovat reprodukční úspěch lišejníků (Asplund & Gauslaa 2007; Černajová & Svoboda 2014).

Asplund a Gauslaa testovali preference plže *Arion fuscus* na stélkách lišejníku *Nephroma arcticum*. Tento tripartitní lišejník obsahuje dva fotobionty – zelenou řasu

Coccomyxa sp. a sinici *Nostoc*. Stopy spásání plžem byly omezeny zejména na cefalodia s N-fixující sinicí *Nostoc*. Byla tedy vznesena hypotéza, že tato preference by mohla být vysvětlena rozdíly v obsahu sekundárních metabolitů na bázi uhlíku (CBSCs⁴) v částech lišejníku se sinicí vs. se zelenou řasou. Části lišejníku se zelenou řasou totiž obsahují více obranných sloučenin než samotná cefalodia se sinicí, která CBSCs neobsahují. V provedeném experimentu byly ze stélky lišejníku CBSCs vyextrahovány 100% acetonem a tato stélka spolu se stélkou kontrolní byla poté nabídnuta plži *Arion fuscus*. Spásající preference byla kvantifikována měřením plochy v programu ArcGIS. Zatímco na kontrolní stélce byla plžem preferována cefalodia s přilehlými houbovými tkáněmi, u stélky vymyté acetonem *Arion fuscus* nerozlišoval mezi cefalodii a ostatními částmi stélky. Experiment tedy potvrdil, že CBSCs v částech se zelenou řasou mají významnou roli v ochraně před herbivory (Asplund & Gauslaa 2010).

Podobný výzkum byl proveden v tomtéž roce s hlemýžděm *Cochlodina laminata* u lišejníku *Lobaria scrobiculata*. Před vymytím sekundárních sloučenin acetonem se hlemýžď vyhýbal reprodukčním částem (sorálům), které za normálních podmínek obsahují pětkrát více obranných sloučenin než somatické části lišejníku. Naopak po extrakci sekundárních metabolitů byly sorály při spásání preferovány, což dokazuje, že spásací vzorce u lišejníků jsou závislé na rozmístění ochranných látek (Asplund et al. 2010b). Preference stélek s vyextrahovanými sekundárními metabolity potvrzují i např. Gauslaa (2005) a Černajová & Svoboda (2014).

Sekundární metabolity však nemusí hrát jen roli odstrašujícího prostředku. Pro některé organismy může mít pozření těchto látek až fatální následky. Oba enantiomery kyseliny usnové [(+)- a (-)-] a kyselina vulpinová v potravě larev *Spodoptera littoralis* vyvolávají výrazné zpomalení růstu, prodloužení larválního stádia a u vysokého procenta i smrt. Podobné účinky nebyly nalezeny u kyseliny stiktové (Emmerich et al. 1993). Pöykkö a Hyvärinen (2003) uvádějí, že pokud stravu larev *Eilema* (Lepidoptera, Arctiidae) tvoří *Vulpicida pinastri* či *Hypogymnia physodes*, larvy nepřežijí. Zatímco *Xanthoria parietina* a *Melanelia exasperata* na jejich přežití takovýto vliv nemají.

Škodlivé účinky lišejníkových látek byly zaznamenány nejen u bezobratlých živočichů, ale i u obratlovců. Ve Wyomingu (USA) v oblasti Red Rim Wildlife Habitat Management Area (RRWHMA) byli v období února až března roku 2004 nacházeni losi,

⁴ CBSCs – z angl. Carbon Based Secondary Compounds

u nichž byla vyvinuta paréza (porucha hybnosti). Zvířata byla bdělá a vnímavá, ovšem neschopná vstát. Jejich stav následně provázela dehydratace, otupělost a nakonec losi buď zemřeli, či byli utraceni. Diagnostické testy vyloučily běžné infekční, zánětlivé, toxické a traumatické příčiny. Při histologii svalů postižených zvířat byla nalezena akutní degenerativní myopatie. V bachoru losů byl nalezen lišejník *Xanthoparmelia chlorochroa*, který se v oblasti vyskytuje poměrně hojně. Tento lišejník byl nasbírán a byli jím krmeni tři losi v zajetí. U dvou z nich se projevíly příznaky stejné, jako u losů z oblasti RRWHMA (ataxie, slabost, degenerativní myopatie...). K otravě zvířat došlo kvůli nedostatku běžné zimní potravy a losi tak byli nuceni konzumovat velké množství zmíněného lišejníku. Jako toxická dávka bylo stanoveno 1 % hmotnosti zvířete po dobu 5 dnů nebo 3,6 % hmotnosti v jedné dávce, přičemž toxickou látkou byla zřejmě kyselina usnová. Celková odhadovaná ztráta byla vyčíslena na 400-500 losů za dané období (Cook et al. 2007).

Dle Dailey et al. (2008) byla toxicita *Xanthoparmelia chlorochroa* u skotu a ovcí přičtena kyselině usnové již v roce 1939. Po výše zmíněné události ve Wyomingu, Dailey et al. testovali hypotézu, že kyselina usnová je bezprostřední příčinou smrti u zvířat otrávených lišejníky. Látku podávali domácím ovcím a byly pozorovány příznaky jako letargie, anorexie a náznaky indikující bolesti břicha. Posmrtně byla zjištěna degenerativní myopatie kosterního svalstva.

Vliv sekundárních metabolitů na spásání lišejníků norníkem rudým (*Myodes glareolus*) byl pozorován v experimentech Nybakkena et al. (2010). V prvním experimentu byly norníkům poskytnuty jako potrava dvojice stélek osmi testovaných lišejníků – jedna kontrolní s přirozeným obsahem sekundárních metabolitů a druhá stélka s vyextrahovanými sloučeninami acetonem (přičemž u každého druhu lišejníku byla extrakce metabolitů různě úspěšná). U *Cladonia stellaris* a *Lobaria pulmonaria* byla nalezena preference stélek s deficitem sekundárních sloučenin, u ostatních testovaných lišejníků tato preference nalezena nebyla. Pro druhý experiment byly stélky šesti lišejníků (pozn. dva z původních osmi byly vyřazeny kvůli nedostatku materiálu) rozemlety s vodou – opět jedna kontrolní a druhá s deficitem sekundárních sloučenin. V tomto experimentu byly norníky preferovány deficitní stélky lišejníků *Cladonia arbuscula*, *C. rangiferina*, *Platismatia glauca* a *Evernia prunastri*. Naopak konzumace *C. stellaris* byla snížena. Rozemletí stélek s vodou zabránilo norníkům konzumovat pouze části stélek s nižší koncentrací sekundárních sloučenin. Nicméně v prvním experimentu nebyla u většiny lišejníků nalezena preference mezi kontrolní a deficitní stélkou. Důvod, proč byly ve druhém experimentu preferovány deficitní stélky, není zcela objasněn.

3.2. Antimikrobiální aktivita sekundárních metabolitů

Ze široké škály sekundárních metabolitů, které lišejníky produkují, byla u mnohých objevena antimikrobiální aktivita (Lawrey 1986). Tyto sloučeniny tak mohou stélce lišejníku poskytovat ochranu před většinou přírodních patogenů (Molnár & Farkas 2010).

Lauterwein et al. zkoumali antimikrobiální aktivitu kyseliny usnové (z *Cladonia stellaris*) a kyseliny vulpinové (z *Letharia vulpina*) *in vitro*. Jak bylo již předem předpokládáno, kyselina usnová vykazala vyšší úroveň antimikrobiální aktivity (s malými rozdíly v účinnosti proti jednotlivým druhům) než kyselina vulpinová. Ani jedna z kyselin neinhibovala Gram-negativní tyčinkovité bakterie a houby v koncentracích $\leq 32 \mu\text{g/ml}$, ale obě byly aktivní vůči testovaným stafylokokům, enterokokům a anaerobním bakteriím (Lauterwein et al. 1995). Vysoká antimikrobiální aktivita kyseliny usnové (izolované z *Parmelia caperata*), srovnatelná se streptomycinem daným standardem, byla potvrzena například ve studii z roku 2008 (Ranković et al. 2008). Kyselina usnová inhibovala všechny testované bakterie [*Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitivní bakterie); *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (Gram-negativní bakterie)] a to ve velmi nízkých koncentracích. I v této studii byl pozorován antifungální efekt, ovšem ve srovnání s antibakteriální aktivitou musela být koncentrace kyseliny usnové vyšší (Ranković et al. 2008). K velmi podobným výsledkům dospěli i Tay et al. (2004) u kyseliny usnové izolované z *Ramalina farinacea*. Nejdůležitějším zjištěním těchto studií je fakt, že sloučeniny, které nejsou chemicky příbuzné jiným známým antibiotikům, vykazují antibakteriální aktivitu proti významným patogenům (jako např. *Staphylococcus aureus*) bez ohledu na rezistenci kmenu vůči methicillinu a mupirocinu (běžně používaná antibiotika).

Antimikrobiální aktivitu vykazují dále například kyseliny fumarprotocetrarová, lekanorová, protocetrarová a stiktová (získány z lišejníků *Cladonia furcata*, *Ochrolechia androgyna*, *Parmelia caperata* a *P. conspersa*). Aktivita těchto sekundárních metabolitů byla testována proti mnoha mikroorganismům (*Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Botrytis cinerea*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor mucedo*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium purpurescens*, *Penicillium verrucosum*, *Trichoderma harsianum*), z nichž některé způsobují choroby u lidí i u zvířat. Všechny zmíněné kyseliny inhibovaly testované mikroorganismy. Nejsilnější antibakteriální

aktivitu vykázala kyselina fumarprotocetrarová, která inhibovala veškeré testované bakterie. Antifungální aktivita byla největší u kyseliny lekanorové. Naopak nejslabší aktivita byla vykázána kyselinou stiktovou, která sice také inhibovala testované mikroorganismy, ale ve vyšších koncentracích (Ranković & Mišić 2008).

Ranković et al. (2006, 2007, 2009) testovali extrakty lišejníků *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *P. pertusa*, *P. sulcata*, *Hypogymnia physodes*, *Lasallia pustulata*, *Umbilicaria polyphylla*, *U. crustulosa* a *U. cylindrica* proti Gram-pozitivním a Gram-negativním bakteriím a houbovým organismům. Zkoumané bakterie byly k antimikrobiálním účinkům sekundárních metabolitů citlivější než houby, přičemž mezi bakteriemi jsou odolnější Gram-negativní. Ze tří typů extraktů, které byly zkoumány (vodné, acetonové a metanolové), byla zpravidla nejsilnější aktivita u metanolových. Oproti tomu u vodných extraktů nebyla antimikrobiální aktivita zjištěna žádná.

Akpinar et al. (2009) zkoumali vliv sekundárních metabolitů, které byly uvolněny ze stélky lišejníku do půdy, na půdní bakterie v přírodních podmínkách. Pro svůj výzkum vybrali tři lišejníky – *Peltigera rufescens*, *Peltigera neckeri* a *Cladonia rangiformis*. Ke každému ze studovaných lišejníků shromáždili 13 vzorků půdy:

- a) zóna 0 – kontrolní vzorek zpod stélky lišejníku,
- b) zóna 1 – 10 cm od stélky lišejníku severním, jižním, východním a západním směrem,
- c) zóna 2 – 30 cm od stélky lišejníku severním, jižním, východním a západním směrem,
- d) zóna 3 – 50 cm od stélky lišejníku severním, jižním, východním a západním směrem.

Následně v laboratorních podmínkách vytvořili roztoky půdy s destilovanou vodou k determinaci kolonií půdních bakterií. Vytvořenými roztoky inseminovali Petriho misky, které byly inkubovány po dobu 24 hodin při teplotě 36°C. Po inkubaci byly spočítány morfologicky rozlišné kolonie bakterií. Dle jejich výsledků je inhibiční účinek na půdní bakterie proměnlivý v závislosti na obsahu sekundárních metabolitů, případně jejich množství a rozmanitosti. *Peltigera rufescens*, která neobsahuje žádné sekundární metabolity, nevykázala žádnou inhibici půdních bakterií (viz Obr. 3). Nejsilnější inhibiční efekt byl nalezen u *Cladonia rangiformis*, která ze studovaných druhů obsahovala sekundárních metabolitů nejvíce (viz Obr. 4).

Table 4. Bacteria colony amounts in soil of around *Peltigera rufescens*

Species of bacteria	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Burkholderia gladioli</i>	<i>Corynebacterium bovis</i>	Total amounts of colony
Control	2	263	10	275
Zone 1	4	273	10	287
Zone 2	3	273	12	288
Zone 3	2	268	8	278

Obr. 3: Počty bakteriálních kolonií v půdě v okolí *Peltigera rufescens* (převzato z Akpinar, Ozturk & Sinirtas, 2009)

Table 2. Bacteria colony amounts in soil of around *Cladonia rangiformis*

Species of bacteria	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Burkholderia gladioli</i>	<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Aerococcus</i> sp.	Total amounts of colony
Control	–	34	8	1	43
Zone 1	1	52	16	–	69
Zone 2	1	86	14	4	105
Zone 3	6	84	27	–	117

Obr. 4: Počty bakteriálních kolonií v půdě v okolí *Cladonia rangiformis* (převzato z Akpinar, Ozturk & Sinirtas, 2009)

Antimikrobiální účinky sekundárních metabolitů potvrzují i studie mnoha dalších autorů, např.: Land & Lundström 1998; Lawrey 2000; Türk et al. 2003; Halama & Van Haluwin 2004; Schmeda-Hirschmann et al. 2008; Paudel et al. 2008; Ranković et al. 2010.

Vzhledem k tomu, že se u mnoha mikroorganismů vyvinula rezistence k člověkem používaným antibiotikům, je třeba, aby byly vyhledávány nové zdroje antimikrobiálních látek pro farmaceutický průmysl. Výsledky všech výše jmenovaných studií dokazují, že mnoho sekundárních metabolitů lišejníků má požadované vlastnosti a mohly by být potencionálně využity při léčbě různých onemocnění, způsobených mikroorganismy.

3.3. Alelopatie

Dle definice stanovené *International Allelopathy Society* slovo alelopatie „označuje jakýkoli proces zahrnující sekundární metabolity produkované rostlinami, řasami, bakteriemi či houbami, které mají vliv na vývoj přírodních a zemědělských systémů“ (*International Allelopathy Society* [online]). Pomocí alelopatických sekundárních metabolitů mohou lišejníky ovlivňovat vývoj a růst okolních lišejníků, mechů, cévnatých rostlin i mikroorganismů (Rundel 1978). Alelopatické sloučeniny jsou uvolňovány do prostředí a mohou ovlivňovat životně důležité procesy (např. fotosyntézu, respiraci, transpiraci atd.) okolních organismů (Macías et al. 2007).

Již několik desítek let je znám negativní účinek alelopatických sloučenin lišejníků na růst vyšších rostlin. *Peltigera canina* je schopna vyvinout inhibiční vliv na klíčení semen a růst sazenic různých druhů trav, přičemž se zdá, že druhy trav obývající stejné habitaty jako *P. canina* jsou obzvláště citlivé (Pyatt 1967). *Cladonia stellaris* a *C. rangiferina*, běžné druhy lišejníků v boreálních lesích, měly alelopatický efekt na růst sazenic borovice Banksovy (*Pinus banksiana*) a smrku sivého (*Picea glauca*; Fisher 1979). Lišejníkové sloučeniny izolované z *Lethariella canariensis* vykazaly alelopatickou aktivitu vůči semenům běžných zahradních rostlin a inhibovaly proces klíčení u zelí, hlávkového salátu, paprik a rajčat (Marante et al. 2003).

Lawrey (1977a) uvádí, že o-methylované kyseliny squamatová a evernová inhibují klíčení spor u mechů *Funaria hygrometrica*, *Ceratodon purpureus* a *Mnium cuspidatum*. Inhibici klíčení spor u mechů uvádí i u acetonových extraktů lišejníků rodu *Cladonia* (Lawrey 1977b).

Dle výsledků výše uvedených studií je zřejmé, že lišejníky využívají své sekundární metabolity v kompetici s ostatními organismy. Může však také docházet ke kompetici mezi samotnými lišejníky. Pokud k takovéto interakci mezi lišejníky dochází, pak se jedná o kompetici zejména o životní prostor a světlo a i v tomto procesu hrají svou roli sekundární metabolity (Armstrong & Welch 2007). Pentecost (1980) uvádí možné výsledky této kompetice mezi lišejníky:

1. druh A přeroste druh B,
2. druh A roste epifyticky na druhu B,
3. na kontaktním místě neroste ani jeden z druhů („stav příměří“).

Whiton a Lawrey (1982) se věnovali studiu vlivu lišejníkových kyselin (vulpinové, evernové a stiktové) na klíčení askospor lišejníku *Cladonia cristatella* a houby *Sordaria fimicola* při různém pH (4-7). U *C. cristatella* bylo klíčení spor inhibováno pouze kyselinou vulpinovou (zejména při pH 7), u kyseliny evernové a kyseliny stiktové nebyl žádný významný vliv na klíčení spor zaznamenán. Spory *S. fimicola* byly inhibovány kyselinou vulpinovou (při všech pH) a evernovou. Stupeň případné inhibice klíčení spor byl vždy znatelnější u *Sordaria* než u *Cladonia*. Výzkumu vlivu lišejníkových kyselin na klíčení spor mechu *Funaria hygrometrica* při různém pH se zabývali například také Gardner a Mueller (1981). Zatímco u většiny testovaných kyselin se inhibice klíčení spor snižovala při zvyšujícím se pH, u kyseliny usnové se inhibice klíčení a růstu spor zvyšovala se zvyšujícím se pH.

Nicméně alelopatické sekundární metabolity nemusí ovlivňovat jen interakce s okolními organismy. Dle nedávno publikované studie mohou některé z těchto sekundárních metabolitů mít fytotoxické alelopatické účinky na fotobionta. Testovanými metabolity byly atranorin, chloroatranorin a kyseliny usnová, fumarprotocetrarová, protocetrarová, physodalicová, physodová a evernová. Aplikace všech těchto metabolitů v nejvyšší testované dávce snížila růst buněk fotobionta. Na základě vybraných fyziologických parametrů se však zdá, že alelopatické mechanismy se liší v závislosti na chemických vlastnostech daného metabolitu. Většina z testovaných sekundárních metabolitů působí jako alelochemikálie, které mohou potencionálně ovládat buněčné dělení řasového partnera uvnitř stélky a mohou tedy hrát klíčovou roli v udržování rovnováhy mezi symbionty ve stélce lišejníku (Lokajová et al. 2014).

4. Abiotické interakce lišejníků

4.1. Ochrana před zářením

Vzhledem k tomu, že jsou řasoví symbionti citliví k vysokým dávkám slunečního záření, využívají lišejníky různé strategie k jejich ochraně (Molnár & Farkas 2010). V roce 1951 Ertl zjistil, že kortikální lišejníkové sloučeniny zvyšují neprůsvitnost svrchní kůry a tím snižují množství záření, které dosahuje k řasové vrstvě. Pigmenty prokazatelně chránící lišejník před zářením (např. parietin, kyselina usnová, kyselina vulpinová) absorbují většinu dopadajícího světla a tím regulují množství slunečního záření, které dopadá na řasovou vrstvu. Tato redukce dopadajícího záření je ku prospěchu například zelené řase *Trebouxia*. Ta je jedním z nejčastějších fotobiontů a nejlépe roste za relativně nízkého osvětlení (Rundel 1978).

Kromě ochrany před zářením obecně mohou některé sekundární metabolity ochraňovat lišejník také před nadbytečným UV zářením (Rundel 1978). Tyto metabolity často krystalizují na povrchu hyf a jsou tak první obrannou linií před UV. Rozdíly v produkci těchto přírodních UV štítů záleží na podmínkách prostředí, ve kterých lišejník roste (Nguyen et al. 2013).

UV záření můžeme rozdělit na UV-C (170-280 nm), UV-B (280-315 nm) a UV-A (315-400 nm). UV-C a převážná většina UV-B na zemský povrch nedopadá, jelikož je záření těchto vlnových délek filtrováno ozónovou vrstvou ve stratosféře. Na povrch Země tedy proniká část UV-B a UV-A, proti jejichž škodlivým účinkům si organismy vyvinuly ochranné mechanismy (Nguyen et al. 2013). UV-B záření inhibuje fotosyntézu a poškozuje DNA. Některé sekundární metabolity (atranorin, glycin, kyselina pinastrinová, kyselina pulvinová, kyselina rhizocarpová, kyselina usnová, kyselina vulpinová, parietin) mají silné schopnosti absorbovat UV a mohou tak fungovat jako filtry pro nadměrné UV-B záření (Rundel 1978; Nybakken & Julkunen-Tiitto 2006). UV-B záření je také zřejmě nezbytné pro syntézu UV-B-absorbujících pigmentů (Nybakken et al. 2004; Nybakken & Julkunen-Tiitto 2006).

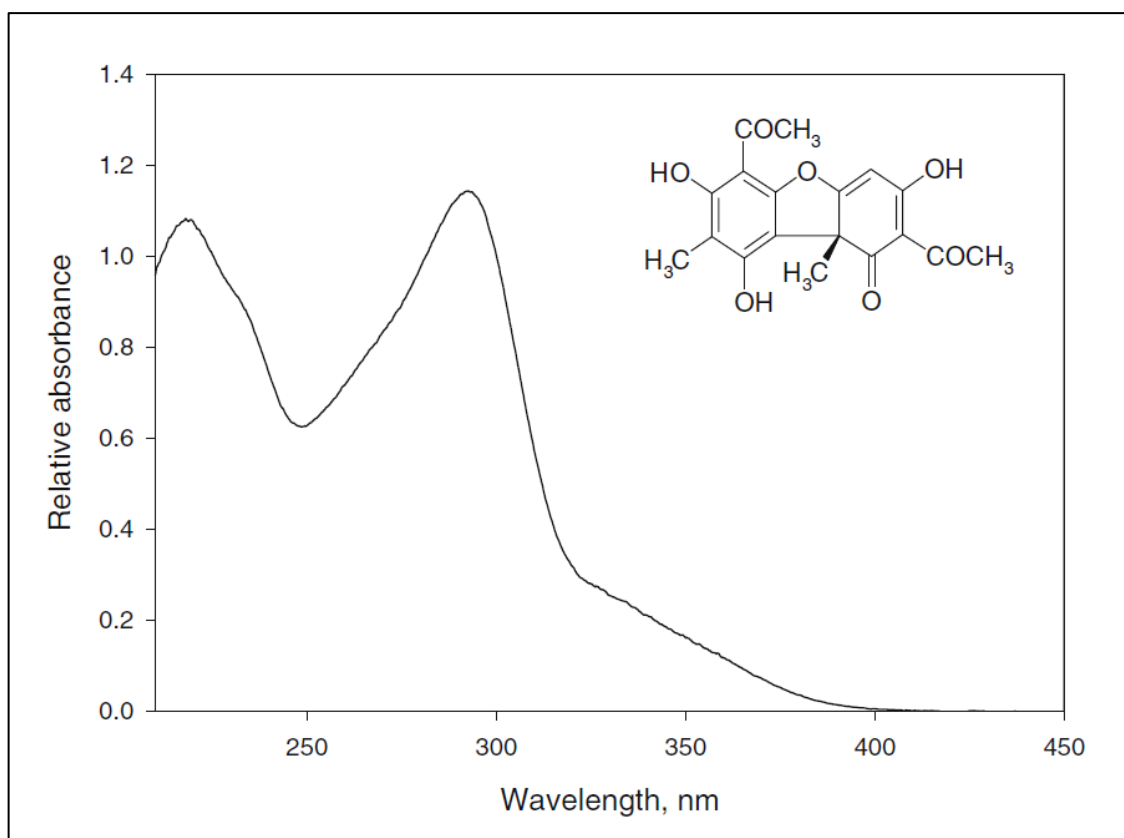
BeGora a Fahselt (2001) zkoumali účinky UV záření na druhy *Cladonia uncialis* a *C. rangiferina*. Tyto lišejníky byly 7 dní vystaveny viditelnému světlu, ke kterému byly doplněny dvě intenzity tří různých pásem UV záření (UV-A, UV-B a UV-C). Dle jejich výsledků obsahovala stélka *C. uncialis* menší množství kyseliny usnové oproti kontrole, když byla vystavena UV-A a UV-B záření, zatímco pokud byla vystavena jen UV-A záření, bylo

množství kyseliny usnové větší. Stejný efekt se projevil u *C. rangiferina* a koncentrace atranorinu. Jejich závěrem tedy bylo, že UV-A záření způsobuje zvýšenou akumulaci sloučenin (kyseliny usnové a atranorinu), přičemž tento efekt je eliminován UV-B zářením. Výsledky dále porovnávali s koncentrací kyseliny usnové v *Cladina mitis*, která v přírodních populacích obsahuje kyseliny usnové méně na jaře a v létě, kdy je větší tok UV-B záření.

K opačnému závěru došli Nybakken a Julkunen-Tiito (2006), kteří zkoumali vliv UV záření na tři sobí lišejníky (*Cladonia arbuscula*, *C. rangiferina* a *C. stellaris*). Stélkám těchto lišejníků byly nejprve acetonem vymyty sekundární sloučeniny a poté byly po dobu 4 týdnů vystaveny třem světelným režimům (PAR⁵; PAR + UV-A; PAR + UV-A + UV-B). Následně byla provedena pomocí HPLC analýza všech syntetizovaných sekundárních sloučenin. UV-B záření indukovalo re-syntézu kyseliny usnové u *Cladonia arbuscula* a *C. stellaris* a re-syntézu melanických pigmentů u *C. rangiferina*. Po 4 týdnech vystavení UV-B záření obsahovaly stélky dvakrát více kyseliny usnové než stélky, které byly vystaveny pouze PAR. Kyselina usnová absorbuje pouze velmi málo PAR (viz Obr. 5) a může tedy jen těžko hrát roli v ochraně před viditelným světlem. Oproti tomu její absorpce v UV pásmu je značná (viz Obr. 5: λ_{\max} = 220 a 290 nm; McEvoy et al. 2006).

Podobný výzkum provedli v tomtéž roce McEvoy et al. (2006). Zkoumali vliv UV záření na obsah kyseliny usnové a kyseliny salazinové u lišejníku *Xanthoparmelia stenophylla*. Ze stélky byly acetonem vymyty zmíněné sekundární metabolity a stélka byla následně vystavena po dobu 21 dní různým úrovním stínění před UV. Poté byla zkoumána úroveň re-syntézy kyseliny usnové a kyseliny salazinové. Přirozený obsah těchto látek ve stélce tvoří přibližně 12 %, oproti tomu byla jejich re-syntéza relativně nízká (u kyseliny usnové 2,5 % a u kyseliny salazinové 3,1 %). Re-syntéza obou těchto sloučenin byla indukována UV zářením, přičemž úroveň re-syntézy kyseliny usnové lze ještě zvýšit dodáním ribitolu (sacharid, který je dodáván mykobiontovi fotobiontem *Trebouxia*).

⁵ PAR – z angl. Photosynthetically Active Radiation, fotosynteticky aktivní záření, 400-700 nm



Obr. 5: Kyselina usnová – chemická struktura a absorbance (převzato z McEvoy et al., 2006)

U člověka může UV-A a UV-B záření způsobovat mutace genů a potlačovat imunitu, což může dále vést k rakovině kůže (včetně melanomů). Russo et al. (2008) vyzkoumali, že některé sekundární metabolity lišejníků (sphaerophorin a pannarin) jsou schopny inhibovat růst buněk melanomů a u některých i indukovat jejich apoptickou smrt. Tyto látky se slibnými biologickými vlastnostmi by tak mohly být potenciálně využity při léčbě melanomů. Nicméně princip, jakým látky spouští apoptózu u buněk melanomů, není zcela jasný. V této oblasti je tedy nutný další výzkum.

4.2. Vliv sekundárních metabolitů na homeostázu kovů a toleranci znečištění

Minerální výživa lišejníků závisí především na atmosférických vstupech. Vzhledem k chybějící ochranné pokožce a průduchům může stélka lišejníku akumulovat minerální prvky (včetně těžkých kovů) v množstvích, která překračují její metabolické požadavky (Bačkor & Loppi 2009). Při stresu, způsobeném vysokou koncentrací kovů, dochází k produkci vyšší hladiny vysoce reaktivních forem kyslíku, což může způsobit poškození proteinů a nukleových kyselin (Bačkor & Fahselt 2008).

Sekundární metabolity lišejníků jsou citlivé na akumulaci těžkých kovů a mohou hrát všeobecnou roli v homeostáze kovů a toleranci ke znečištění u daného lišejníku (Hauck & Huneck 2007a). Tato citlivost sekundárních metabolitů k těžkým kovům je druhově specifická (Molnár & Farkas 2010).

V roce 2005 Białonska a Dayan zkoumali vliv akumulace těžkých kovů na sekundární metabolismus lišejníků. Na šest měsíců přenesli stélky lišejníku *Hypogymnia physodes* do různých částí průmyslového regionu. Stélky, které byly přeneseny do okolí chemické továrny produkující sloučeniny chromu, fosforu a síry, vykazovaly výrazné snížení obsahu atranorinu, kyseliny physodové (physodic acid) a kyseliny hydroxyphysodové (hydroxyphysodic acid). Ve všech stélkách byl naopak zvýšen obsah kyseliny physodalicové (physodalic acid), což naznačuje možnou roli této sloučeniny v obraně proti stresu, způsobeném nahromaděním znečišťujících látek. Jejich výsledky potvrzují, že lišejníkové sloučeniny jsou citlivé k akumulaci těžkých kovů a lišejníky tak mohou být využity jako biomarkery v environmentálních studiích.

Hauck a Huneck (2007a) se věnovali výzkumu hypotézy, zda mohou lišejníkové sloučeniny kontrolovat příjem toxických kovů adsorpcí kovových iontů na výměnných místech kationtů. Tato hypotéza byla testována u lišejníku *Hypogymnia physodes* a jeho čtyř sekundárních metabolitů (kyseliny physodové, kyseliny physodalicové, kyseliny protocetrarové a atranorinu). V ovlivnění adsorpce kovů byla nejefektivnější kyselina physodalicová, která zvýšila adsorpci Fe^{3+} , ale redukovala adsorpci Cu^{2+} , Mn^{2+} a Na^+ .

O rok později Hauck (2008) zkoumal roli kyseliny physodalicové (u *Hypogymnia physodes*) v selektivě příjmu určitých dvojmocných kovů (Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+}). Došel k závěru, že sekundární sloučeniny tohoto lišejníku selektivně inhibují příjem Cu^{2+} a Mn^{2+} . To je ekologicky výhodné, jelikož bylo již dříve zjištěno, že koncentrace těchto kovů ve srážkách a v borce omezují abundanci *H. physodes*, zatímco stejné omezení u Fe^{2+} či Zn^{2+} nebylo zjištěno. Mezi sedmi sekundárními metabolity, které *H. physodes* produkuje, byla v redukci Cu^{2+} a Mn^{2+} nejefektivnější právě kyselina physodalicová.

Hauck a Huneck také vznesli hypotézu, že kyselina fumarprotocetrarová hraje roli v toleranci manganu u lišejníku *Lecanora conizaeoides*. V jejich výzkumu z roku 2007 bylo potvrzeno, že kyselina fumarprotocetrarová výrazně redukuje absorpci manganu v místech výměny kationtů v podmínkách *in vitro*. Je tedy pravděpodobně klíčovým faktorem ve vysoké toleranci k manganu tohoto lišejníku (Hauck & Huneck 2007b).

Kyselina usnová podporuje intracelulární příjem Cu^{2+} u *Evernia mesomorpha* a *Ramalina menziesii*. *E. mesomorpha* dále produkuje kyselinu divaricatovou, díky níž je tento lišejník schopen absorbovat Cu^{2+} lépe, než *R. menziesii*. Oba zmíněné lišejníky rostou primárně epifyticky na kyselých borkách, chudých na živiny. Zvýšený příjem Cu, který je jedním z nejvzácnějších stopových prvků, může mít tedy zcela zásadní význam pro přežití těchto epifytů (Hauck et al. 2009).

Výsledky těchto studií ukazují, že určité sekundární metabolity kontrolují homeostázu kovů ve stélce lišejníků. Podporují příjem některých kationtů kovů a naopak redukují adsorpci jiných, čímž zvyšují toleranci daného lišejníku k těžkým kovům ve znečištěných oblastech (Molnár & Farkas 2010).

4.3. Antioxidační aktivita sekundárních metabolitů

Sekundární sloučeniny mohou lišejníkům také poskytovat ochranu před volnými radikály, které jsou vytvářeny UV zářením, a které stélce lišejníku způsobují oxidativní stres (Marante et al. 2003). Volné radikály (reaktivní formy kyslíku – např. hydroxylový radikál a peroxid vodíku; reaktivní formy dusíku – např. oxid dusnatý) hrají významnou roli v mnoha chemických procesech v buňce, ale jsou také spojeny s nežádoucími vedlejšími účinky, které mohou způsobovat poškození buňky. Škodlivé účinky volných radikálů mohou být zmírněny zachycovači volných radikálů a terminátory řetězových reakcí (Molnár & Farkas 2010).

Řada sekundárních sloučenin, vyskytujících se u lišejníků, vykazuje silnou antioxidační aktivitu. Tyto látky mají díky svým fenolickým skupinám schopnost vyhledávat toxické volné radikály (Behera et al. 2006). Hidalgo et al. uvádějí antioxidační aktivitu u depsidů (například atranorin izolovaný z *Placopsis* sp. či kyselina divaricatová z *Protousnea malacea*) a depsidonů (př. pannarin), přičemž efektivnějšími byly shledány depsidony (Hidalgo et al. 1994). Tento výsledek byl potvrzen výzkumem Russa et al. (2008).

Odabasoglu et al. (2004) porovnávali obsah fenolů ve stélkách tří lišejníků s jejich antioxidační aktivitou. Zkoumanými druhy byly lišejníky *Lobaria pulmonaria*, *Usnea longissima* a *Usnea florida*. Z nich byly získány metanolové a vodné extrakty, u nichž byla posléze testována antioxidační aktivita. Metanolový extrakt *Lobaria pulmonaria* měl nejvyšší obsah fenolických látek a vykázal také silnou antioxidační aktivitu. U těchto dvou jevů byla zjištěna silná pozitivní korelace, přičemž podobná korelace nebyla zaznamenána u *Usnea longissima*. A to navzdory tomu, že metanolový extrakt tohoto lišejníku vykazoval silnou

antioxidační aktivitu. U *Usnea florida* byla antioxidační aktivita, v porovnání s ostatními studovanými lišejníky, zanedbatelná.

Stejný tým provedl o rok později podobný výzkum, ovšem u jiných lišejníků. Nejvyšší antioxidační aktivita byla zjištěna u extraktů *Peltigera rufescens*, na rozdíl od výše uvedeného výzkumu zde však nebyla nalezena korelace mezi mírou antioxidační aktivity a obsahem fenolických látek. Naopak metanolvý extrakt *Pseudevernia furfuracea* vykazoval nízkou antioxidační aktivitu, přičemž u něj byl nalezen nejvyšší obsah fenolických látek (Odabasoglu et al. 2005). Na základě těchto výzkumů lze tedy říci, že obsah fenolických látek ve stélce pravděpodobně nehraje roli v antioxidační aktivitě.

Antioxidační aktivita vodného extraktu z lišejníku *Cetraria islandica* je uváděna v práci Gülçina et al. (2002). Komponenty, které jsou za antioxidační činnost tohoto lišejníku odpovědné, jsou však zatím nejasné (Gülçin et al. 2010). Vysoký obsah antioxidačních látek je také nacházen u antarktických lišejníků a to kvůli extrémním podmínkám na Antarktidě (nízká teplota, sucho, vysoké UV-B a sluneční záření), které zvyšují oxidativní stres. Lišejníky antarktické oblasti proto vykazují vyšší antioxidační aktivitu než lišejníky tropických a mírných oblastí (Luo et al. 2009).

Dle výsledků zmíněných studií mohou být lišejníky potencionálně využity jako snadno dostupný zdroj přírodních antioxidantů, využitelných jako možný doplněk stravy, případně ve farmaceutickém průmyslu (Gülçin et al. 2002).

5. Závěr

V současné době je známo více než 1000 sekundárních metabolitů lišejníků, přičemž další budou velmi pravděpodobně objeveny u málo studovaných, příp. nově objevených, druhů. Mnoha studii, zmíněnými v této práci, bylo dokázáno, že sekundární sloučeniny lišejníků vykazují obrovský soubor mimořádných biologických aktivit a mnoho z nich má významnou ekologickou roli. Látky mohou ovlivňovat interakce lišejníků s okolními mikroorganismy, rostlinami i živočichy. Zároveň ochraňují fotobionta před nadměrným zářením, udržují homeostázu kovů ve stélce a pomáhají předcházet vzniku volných radikálů, které by mohly stélku poškodit.

Aktivity sekundárních sloučenin by měly být nadále důkladně studovány, jelikož některé mechanismy působení lišejníkových sloučenin stále nejsou vysvětleny. Navíc byly u mnoha těchto látek objeveny funkce, které by mohly být pro lidstvo přínosné a mohly by nám pomoci léčit rozličné choroby.

Mnoho lišejníkových sekundárních metabolitů by mohlo být, díky svým jedinečným vlastnostem, potencionálně využito (nejen) ve farmaceutickém průmyslu. Je ovšem nutné mít na paměti, že lišejníky jsou pomalu rostoucí organismy a jejich zdroje nejsou nevyčerpatelné. Pokud bychom zužitkovávali zdroje z lišejníků nadměrně, mohlo by tím být ohroženo jejich přežití.

6. Seznam použité literatury

- AKPINAR, A. U.; OZTURK, S. & SINIRTAS, M. (2009): Effects of some terricolous lichens [*Cladonia rangiformis* Hoffm., *Peltigera neckerii* Hepp ex Müll. Arg., *Peltigera rufescens* (Weiss) Humb.] on soil bacteria in natural conditions. *Plant, Soil and Environment*, 55: 154-158.
- ARMSTRONG, R. A. & WELCH, A. R. (2007): Competition in lichen communities. *Symbiosis*, 43: 1-12.
- ARUP, U.; EKMAN, S.; LINDBLOM, L. & MATTSON, J. E. (1993): High performance thin layer chromatography (HPTLC), an improved technique for screening lichen substances. *Lichenologist*, 25: 61-71.
- ASAHINA, Y. & SHIBATA, S. (1954): Chemistry of lichen substances. Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo.
- ASPLUND, J. & GAUSLAA, Y. (2007): Content of secondary compounds depends on thallus size in the foliose lichen *Lobaria pulmonaria*. *Lichenologist*, 39: 273-278.
- ASPLUND, J. & GAUSLAA, Y. (2010): The gastropod *Arion fuscus* prefers cyanobacterial to green algal parts of the tripartite lichen *Nephroma arcticum* due to low chemical defence. *Lichenologist*, 42: 113-117.
- ASPLUND, J.; LARSSON, P.; VATNE, S. & GAUSLAA, Y. (2010a): Gastropod grazing shapes the vertical distribution of epiphytic lichens in forest canopies. *Journal of Ecology*, 98: 218-225.
- ASPLUND, J.; SOLHAUG, K. A. & GAUSLAA, Y. (2010b): Optimal defense: snails avoid reproductive parts of the lichen *Lobaria scrobiculata* due to internal defense allocation. *Ecology*, 91: 3100-3105.
- BAČKOR, M. & FAHSELT, D. (2008): Lichen photobionts and metal toxicity. *Symbiosis (Rehovot)*, 46: 1-10.
- BAČKOR, M. & LOPPI, S. (2009): Interactions of lichens with heavy metals. *Biologia plantarum*, 53: 214-222.
- BEGORA, M. D. & FAHSELT, D. (2001): Usnic acid and atranorin concentrations in lichens in relation to bands of UV irradiance. *Bryologist*, 104:134-140.
- BEHERA, B. C.; VERMA, N.; SONONE, A. & MAKHIJA, U. (2006): Determination of antioxidative potential of lichen *Usnea ghattensis* in vitro. *LWT-Food Science and Technology*, 39: 80-85.
- BENTLEY, R. (1999): Secondary metabolite biosynthesis: the first century. *Critical reviews in biotechnology*, 19: 1-40.

- BIAŁONSKA, D. & DAYAN, F. E. (2005): Chemistry of the lichen *Hypogymnia physodes* transplanted to an industrial region. *Journal of Chemical Ecology*, 31: 2975-2991.
- CONTI, M. E. & CECCHETTI, G. (2001): Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment – a review. *Environmental Pollution*, 114: 471-492.
- COOK, W. E.; RAISBECK, M. F.; CORNISH, T. E.; WILLIAMS, E. S.; BROWN, B.; HIATT, G. & KREEGER, T. J. (2007): Paresis and death in elk (*Cervus elaphus*) due to lichen intoxication in Wyoming. *Journal of Wildlife Diseases*, 43: 498-503.
- CULBERSON, W. L. & CULBERSON, Ch. F. (1994): Secondary metabolites as a tool in ascomycete systematics: lichenized fungi. *Ascomycete systematics*, 155-163.
- ČERNAJOVÁ, I. & SVOBODA, D. (2014): Lichen compounds of common epiphytic Parmeliaceae species deter gastropods both in laboratory and in Central European temperate forests. *Fungal Ecology*, 11: 8-16.
- DAILEY, R. N.; MONTGOMERY, D. L.; INGRAM, J. T.; SIEMION, R.; VASQUEZ, M. & RAISBECK, M. F. (2008): Toxicity of the lichen secondary metabolite (+)-usnic acid in domestic sheep. *Veterinary Pathology*, 45: 19-25.
- ELIX, J. A. & STOCKER-WÖRGÖTTER, E. (2008): Biochemistry and secondary metabolites. In: Nash III, T. H. (ed) *Lichen Biology*. Cambridge University Press, 104-133.
- EMMERICH, R.; GIEZ, I.; LANGE, O. L. & PROKSCH, P. (1993): Toxicity and antifeedant activity of lichen compounds against the polyphagous herbivorous insect *Spodoptera littoralis*. *Phytochemistry* 33: 1389-1394.
- ERTL, L. (1951): Über die lichtverhältnisse in laubflechten. *Planta*, 39: 245-270.
- FISHER, R. F. (1979): Possible allelopathic effects of reindeer-moss (*Cladonia*) on jack pine and white spruce. *Forest Science*, 25: 256-260.
- GARDNER, Ch. R. & MUELLER, D. M. J. (1981): Factors affecting the toxicity of several lichen acids: effect of pH and lichen acid concentration. *American Journal of Botany*, 68: 87-95.
- GAUSLAA, Y. (2005): Lichen palatability depends on investments in herbivore defence. *Oecologia*, 143: 94-105.
- GAUSLAA, Y.; HOLIEN, H.; OHLSON, M. & SOLHØY, T. (2006): Does snail grazing affect growth of the old forest lichen *Lobaria pulmonaria*?. *Lichenologist*, 38: 587-593.
- GAZZANO, C.; FAVERO-LONGO, S. E.; IACOMUSSI, P. & PIERVITTORI, R. (2013): Biocidal effect of lichen secondary metabolites against rock-dwelling microcolonial fungi, cyanobacteria and green algae. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 84: 300-306.

- GÜLÇİN, İ; OKTAY, M.; KÜFREVİOĞLU, Ö. İ. & ASLAN, A. (2002): Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. *Journal of Ethnopharmacology*, 79: 325-329.
- HALAMA, P. & VAN HALUWIN, Ch. (2004): Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. *BioControl*, 49: 95-107.
- HAUCK, M. & HUNECK, S. (2007a): Lichen substances affect metal adsorption in *Hypogymnia physodes*. *Journal of Chemical Ecology*, 33: 219-223.
- HAUCK, M. & HUNECK, S. (2007b): The putative role of fumarprotocetraric acid in the manganese tolerance of the lichen *Lecanora conizaeoides*. *Lichenologist*, 39: 301-304.
- HAUCK, M. (2008): Metal homeostasis in *Hypogymnia physodes* is controlled by lichen substances. *Environmental Pollution*, 153: 304-308.
- HAUCK, M.; WILLENBRUCH, K. & LEUSCHNER, Ch. (2009): Lichen substances prevent lichens from nutrient deficiency. *Journal of Chemical Ecology*, 35: 71-73.
- HERMS, D. A. & MATTSON, W. J. (1992): The dilemma of plants: to grow or defend. *The Quarterly Review of Biology*, 67: 283-335.
- HIDALGO, M. E.; QUILHOT, W. & LISSI, E. (1994): Antioxidant activity of depsides and depsidones. *Phytochemistry*, 37: 1585-1587.
- HUNECK, S. & YOSHIMURA, I. (1996): Identification of lichen substances. Springer Berlin Heidelberg.
- HUNECK, S. (1999): The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften*, 86: 559-570.
- International Allelopathy Society (IAS)* [online], dostupné na: <<http://www.international-allelopathy-society.org/>>, [cit. 2014-08-08].
- LAND, C. J. & LUNDSTRÖM, H. (1998): Inhibition of fungal growth by water extracts from lichen *Nephroma arcticum*. *Lichenologist*, 30: 259-262.
- LAUTERWEIN, M.; OETHINGER, M.; BELSNER, K.; PETERS, T. & MARRE, R. (1995): In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)- usnic acid, and (-)- usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 2541.
- LAWREY, J. D. (1977a): Adaptive significance of *O*-methylated lichen depsides and depsidones. *Lichenologist*, 9: 137-142.
- LAWREY, J. D. (1977b): Inhibition of moss spore germination by acetone extracts of terricolous *Cladonia* species. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 104: 49-52.
- LAWREY, J. D. (1983): Lichen herbivore preference: a test of two hypotheses. *American Journal of Botany*, 70: 1188-1194.

- LAWREY, J. D. (1986): Biological role of lichen substances. *Bryologist*, 89: 111-122.
- LAWREY, J. D. (2000): Chemical interactions between two lichen-degrading fungi. *Journal of Chemical Ecology*, 26: 1821-1831.
- LINDSAY, S. (1992): *High Performance Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons Ltd., second edition.
- LOKAJOVÁ, V.; BAČKOROVÁ, M. & BAČKOR, M. (2014): Allelopathic effects of lichen secondary metabolites and their naturally occurring mixtures on cultures of aposymbiotically grown lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta). *South African Journal of Botany*, 93: 86-91.
- LUMBSCH, H. T. (1998): Taxonomic use of metabolic data in lichen-forming fungi. *Chemical Fungal Taxonomy*. Marcel Dekker, New York, 345-387.
- LUO, H.; YAMAMOTO, Y.; KIM, J. A.; JUNG, J. S.; KOH, Y. J. & HUR, J. S. (2009): Lecanoric acid, a secondary lichen substance with antioxidant properties from *Umbilicaria antarctica* in maritime Antarctica (King George Island). *Polar Biology*, 32: 1033-1040.
- MACÍAS, F. A.; MOLINILLO, J. M.; VARELA, R. M. & GALINDO, J. C. (2007): Allelopathy – a natural alternative for weed control. *Pest Management Science*, 63: 327-348.
- MALÍČEK, J. (2012): Sekundární metabolity lišejníků a jejich význam pro taxonomii. *Živa*, 6: 276-278.
- MARANTE, F. J. T.; CASTELLANO, A. G.; ROSAS, F. E.; AGUIAR, J. Q. & BARRERA, J. B. (2003): Identification and quantitation of allelochemicals from the lichen *Lethariella canariensis*: phytotoxicity and antioxidative activity. *Journal of Chemical Ecology*, 29: 2049-2071.
- MCEVOY, M.; NYBAKKEN, L.; SOLHAUG, K. A. & GAUSLAA, Y. (2006): UV triggers the synthesis of the widely distributed secondary lichen compound usnic acid. *Mycological Progress*, 5: 221-229.
- MOLINA, M. C.; CRESPO, A.; VICENTE, C. & ELIX, J. A. (2003): Differences in the composition of the phenolics and fatty acids of cultured mycobiont and thallus of *Physconia distorta*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41: 175-180.
- MOLNÁR, K. & FARKAS, E. (2010): Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Zeitschrift für Naturforschung*, 65c: 157-173.
- NASH III, T. H. (2008): *Lichen Biology*. Cambridge University Press, second edition.
- NGUYEN, K. H.; CHOLLET-KRUGLER, M.; GOUAULT, N. & TOMASI, S. (2013): UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. *Natural Product Reports*, 30: 1490-1508.

- NYBAKKEN, L. & JULKUNEN-TIITTO, R. (2006): UV-B induces usnic acid in reindeer lichens. *Lichenologist*, 38: 477-485.
- NYBAKKEN, L.; HELMERSEN, A. M.; GAUSLAA, Y. & SELÅS, V. (2010): Lichen compounds restrain lichen feeding by bank voles (*Myodes glareolus*). *Journal of Chemical Ecology*, 36: 298-304.
- NYBAKKEN, L.; SOLHAUG, K. A.; BILGER, W. & GAUSLAA, Y. (2004): The lichens *Xanthoria elegans* and *Cetraria islandica* maintain a high protection against UV-B radiation in arctic habitats. *Oecologia*, 140: 211-216.
- ODABASOGLU, F.; ASLAN, A.; CAKIR, A.; SULEYMAN, H.; KARAGOZ, Y.; HALICI, M. & BAYIR, Y. (2004): Comparison of antioxidant activity and phenolic content of three lichen species. *Phytotherapy research*, 18: 938-941.
- ODABASOGLU, F.; ASLAN, A.; CAKIR, A.; SULEYMAN, H.; KARAGOZ, Y.; BAYIR, Y. & HALICI, M. (2005): Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. *Fitoterapia*, 76: 216-219.
- ORANGE A., JAMES P. W. & WHITE F. J. (2001): *Microchemical Methods for the Identification of Lichens*. British Lichen Society.
- PAUDEL, B.; BHATTARAI, H. D.; LEE, J. S.; HONG, S. G.; SHIN, H. W. & YIM, J. H. (2008): Antibacterial potential of Antarctic lichens against human pathogenic Gram-positive bacteria. *Phytotherapy Research*, 22: 1269-1271.
- PENTECOST, A. (1980): Aspects of competition in saxicolous lichen communities. *Lichenologist*, 12: 135-144.
- PÖYKKÖ, H. & HYVÄRINEN, M. (2003): Host preference and performance of lichenivorous *Eilema* spp. larvae in relation to lichen secondary metabolites. *Journal of Animal Ecology*, 72: 383-390.
- PYATT, F. B. (1967): The inhibitory influence of *Peltigera canina* on the germination of graminaceous seeds and the subsequent growth of seedlings. *Bryologist*, 70: 326-329.
- RANKOVIĆ, B. & MIŠIĆ, M. (2008): The antimicrobial activity of the lichen substances of the lichens *Cladonia furcata*, *Ochrolechia androgyna*, *Parmelia caperata* and *Parmelia conspersa*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 22: 1013-1016.
- RANKOVIĆ, B.; MIŠIĆ, M. & SUKDOLAK, S. (2006): Antimicrobial activity of extracts of the lichens *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *Parmelia pertusa*, *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla*. *British Journal of Biomedical Science*, 64: 143-148.
- RANKOVIĆ, B.; MIŠIĆ, M. & SUKDOLAK, S. (2007): Evaluation of antimicrobial activity of the lichens *Lasallia pustulata*, *Parmelia sulcata*, *Umbilicaria crustulosa*, and *Umbilicaria cylindrica*. *Microbiology*, 76: 723-727.

- RANKOVIĆ, B.; MIŠIĆ, M. & SUKDOLAK, S. (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: 1239-1242.
- RANKOVIĆ, B.; MIŠIĆ, M. & SUKDOLAK, S. (2009): Antimicrobial activity of extracts of the lichens *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *Parmelia pertusa*, *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla*. *Biologia*, 64: 53-58.
- RANKOVIĆ, B.; RANKOVIĆ, D. & MARIC, D. (2010): Antioxidant and antimicrobial activity of some lichen species. *Microbiology*, 79: 809-815.
- RUNDEL, P. W. (1978): The ecological role of secondary lichen substances. *Biochemical Systematics and Ecology*, 6: 157-170.
- RUSSO, A.; PIOVANO, M.; LOMBARDO, L.; GARBARINO, J. & CARDILE, V. (2008): Lichen metabolites prevent UV light and nitric oxide-mediated plasmid DNA damage and induce apoptosis in human melanoma cells. *Life Sciences*, 83: 468-474.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; TAPIA, A.; LIMA, B.; PERTINO, M.; SORTINO, M.; ZACCHINO, S.; DE ARIAS, A. R. & FERESIN, G. E. (2008): A new antifungal and antiprotozoal depside from the Andean lichen *Protousnea poeppigii*. *Phytotherapy Research*, 22: 349-355.
- SMITH, C. W.; APTROOT, A.; COPPINS, B. J.; FLETCHER, A.; GILBERT, O. L.; JAMES, P. W. & WOLSELEY, P. A. (2009): *The Lichens of Great Britain and Ireland*. The British Lichen Society, London, 1046 pp.
- STOCKER-WÖRGÖTTER, E. (2008): Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Natural Product Reports*, 25: 188-200.
- TAY, T.; TÜRK, A. Ö.; YILMAZ, M.; TÜRK, H. & KIVANÇ; M. (2004): Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen *Ramalina farinacea* and its (+)-usnic acid, norstictic acid, and protocetraric acid constituents. *Zeitschrift für Naturforschung*, 59: 384-388.
- TÜRK, A. Ö.; YILMAZ, M.; KIVANÇ; M. & TÜRK, H. (2003): The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cetraria aculeata* and its protolichesterinic acid constituent. *Zeitschrift für Naturforschung*, 58: 850-854.
- WHITON, J. C.; LAWREY, J. D. (1982): Inhibition of *Cladonia cristatella* and *Sordaria fimicola* ascospore germination by lichen acids. *Bryologist*, 85: 222-226.