

Sekundární metabolity lišejníků a jejich význam pro taxonomii

Všeobecně známou schopností živých organismů je produkce primárních metabolitů, mezi něž patří např. aminokyseliny, sacharidy a fotosyntetické pigmenty. Produkují ale také řadu sekundárních metabolitů, čili látek, které zpravidla nejsou pro život jedince nezbytné (alespoň v krátkodobém měřítku). K těmto organickým sloučeninám patří mimo jiné alkaloidy, glykozidy a mykotoxiny. Jednou ze skupin organismů, kde se můžeme setkat s množstvím různých sekundárních metabolitů, jsou lišejníky. V současné době se počet těchto látek s popsanou strukturou blíží číslu 800. Skutečný počet může však být výrazně vyšší. Naprostá většina z nich je navíc specifická pouze pro lišejníky. Výjimečnost lišejníkových látek tkví v jejich obrovském taxonomickém významu a tudíž v rutinním využívání metod jejich detekce. To je velký rozdíl oproti cévnatým rostlinám, mechorostům, nelichenizovaným houbám nebo řasám, kde se přítomnosti sekundárních metabolitů využívá pro určování taxonů jen ojediněle u vybraných skupin.

První publikace popisující přítomnost sekundárních metabolitů v lišejnících se objevily v druhé polovině 19. stol. Rozvoj chemotaxonomie nastal o 100 let později, v 60. letech minulého stol., v souvislosti s vývojem a širším využitím chromatografických metod. V té době šlo v podstatě o převrat v taxonomii lišejníků srovnatelný s nástupem molekulárních metod v posledních 20 letech. S pomocí chromatografie se mohly nově rozlišovat druhy, které kvůli nedostatku anatomických a morfologických znaků nebylo do té doby možné blíže určovat. Typickým příkladem je běžný a široce rozšířený rod prášenka (*Lepzaria*), který netvoří plodnice a vyskytuje se pouze v podobě sterilních šedavých povlaků. Možnost detekce sekundárních metabolitů však napomohla rozvoji taxonomie i mnoha známých druhů makrolišej-

níků – zvláště z rodů provazovka (*Usnea*), vousatec (*Bryoria*) a dutohlávka (*Cladonia*).

Sekundární metabolity se v lišejnících vyskytují v různých podobách a v různých částech stélky. Většina z nich obaluje povrch houbových vláken. Můžeme je však nalézt také jako granulky, krystaly, kapénky nebo pigmenty v generativních a vzácněji ve vegetativních částech stélky. Jejich přítomnost někdy bývá patrná na první pohled, protože mohou určovat barvu lišejníku. Např. žlutozelené zbarvení provazovek způsobuje kyselina usnová (obr. 2), šedou barvu terčovníků (*Physcia*) atranorin, žlutooranžovou stélku terčovníku zedního (*Xanthoria parietina*) parietin, nebo nápadně červené zbarvení plodnic některých dutohlávek kyselina rodokladonová (obr. 1). Lišejníkové látky také zapříčiňují výrazně hořkou chuť většiny druhů. U děratky



hořké (*Pertusaria amara*, obr. 3) můžeme podle svíravé chuti zjistit přítomnost kyseliny pikrolichenové přímo v terénu, čímž druh celkem spolehlivě odlišíme od velmi podobné děratky bělavé (*P. albescens*). Kyselina alektorialová obsažená např. u některých vousatců zase způsobuje růžové zbarvení herbářových položek po několika letech skladování. Také výskyt některých terpenoidů (zvláště běžně rozšířeného zeorinu) se projevuje vytvořením drobných jehlicovitých krystalů na povrchu stélek

1 Nápadně červenou barvu plodnic některých dutohlávek (*Cladonia*) způsobuje kyselina rodokladonová. Asi nejběžnějším červenoplodným druhem je dutohlávka vyzáblá (*C. macilenta*).

2 Žlutozelenou barvu provazovek (*Usnea*) způsobuje přítomnost kyseliny usnové. U této látky bylo zjištěno její protirakovinné působení (např. Bačkorová a kol. 2011 a 2012).

3 Některé lišejníky můžeme poznat dokonce podle chuti. Díky přítomnosti kyseliny pikrolichenové mají sorály (místa, kde vznikají vegetativní rozmnožovací částice zvané sorédie) děratky hořké (*Pertusaria amara*) palčivě hořkou chuť. Foto J. P. Halda

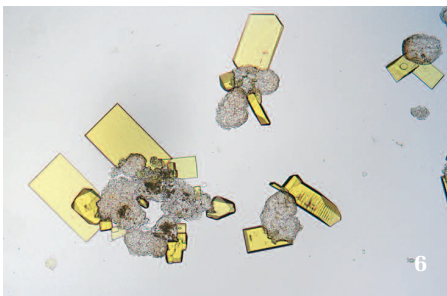
4 Ke zjištění přítomnosti kyseliny fumarprotocetrarové se využívá parafenyldiamin. V případě kladné reakce se vzorek zbarvuje oranžově, až červeně jako u zde použité misničky korové (*Lecanora pulicaris*).

5 Kyselina norstiktová vytváří v hydroxidu draselném nezaměnitelné červené krystalky o délce ca 5–10 μm. Společně s atranorinem se využívá jako standard v tenkovrstevné chromatografii (TLC).

6 Krystaly kyseliny vulpinové vzniklé při mikrokrytalizačních testech. Tato látka způsobuje výrazně žluté zbarvení některých lišejníků a je jedovatá. Foto W. Obermayer

7 Ve stélce větvičnicku žlutého (*Letharia vulpina*) se kyselina vulpinová vyskytuje ve velkém množství. Proto se tento lišejník dříve používal k trávení vlků. Roste hojněji např. v Alpách, v České republice byl před časem nalezen na Šumavě (viz Živa 2000, 6: 249–250). Foto F. Bouda





u několik let starých herbářových položek. K detekci lišejníkových látek slouží více či méně sofistikované metody, které by mohly být popsány v nejedné knize. V následujících kapitolách stručně představím jen několik z nich, které lichenologové rutinně využívají.

● Stélkové reakce a UV světlo

Stélkové (bodové) reakce lišejníků s chemikáliemi jsou jednoduchým způsobem zjištění vybraných látek, a proto se velmi často využívají při určování druhů. V pracovních lichenologů nesmí chybět roztok hydroxidu draselného, chlorové vápno (resp. jiný dezinfekční přípravek obsahující chlór, např. Savo) a parafenyldiamin (obr. 4 a 5). Nepatrné množství těchto reagentů se nanese na stélku lišejníku, kde v případě přítomnosti hledané látky dočká k barevným změnám – nejčastěji na červenou, žlutou, oranžovou a růžovou (viz také obr. na 2. str. obálky). Nevýhodou těchto reakcí je, že bývají nespecifické (specificky reaguje jen určitý typ sloučenin), a tudíž často nelze jednoznačně určit konkrétní látku obsaženou ve stélce. Tato metoda má ještě další slabinu, a sice že

v případě nízkých koncentrací sekundárních metabolitů v lišejníku není bodová reakce zpravidla čitelná. Pro účinnější využití metody můžeme provádět stanovení na mikroskopických řezech. Ke stélkovým reakcím patří také aplikace Lugolova roztoku obsahujícího jód k detekci vybraných skupin polysacharidů. Většinou se nanáší na dřev (střední vrstva lišejníkové stélky tvořená houbovými vlákny), která se v případě kladné reakce zbarvuje modře. Využití Lugolova roztoku však nachází zásadní uplatnění u zkoumání struktury vrveček (kde vznikají výtrusy). Některé sekundární metabolity světélkují v ultrafialovém světle, proto je nezbytným vybavením kvalitní UV lampa. Pokud je látka obsažena, svítí lišejník pod UV lampou bíle až modře (tím je prokázána přítomnost depsidů a depsidonů), popř. v odstínech žluté, oranžové až červené (tyto barvy značí přítomnost xantonů). Ultrafialové záření je velmi užitečným nástrojem např. při určování dutohlávek.

● Mikrokrytalizační testy

Tato metoda se v současné době používá spíše ojediněle, protože byla zastíněna

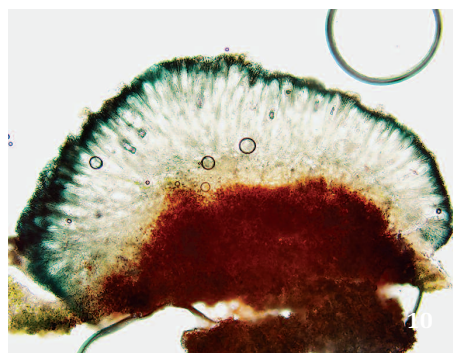
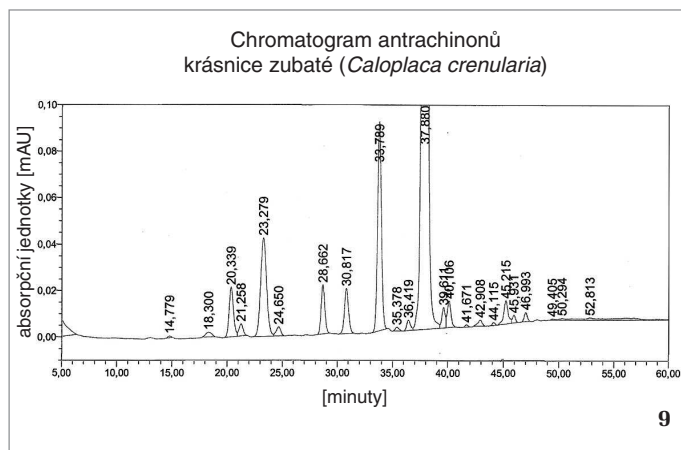
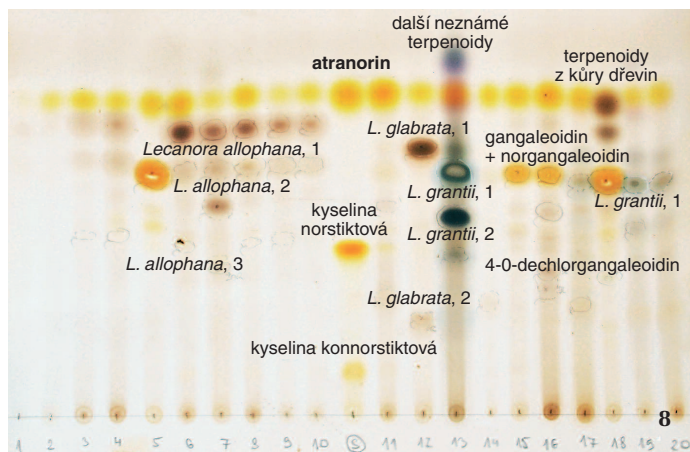
chromatografií (viz dále). Ta je v porovnání s mikrokrytalizačními testy citlivější a spolehlivější, avšak také časově i finančně náročnější. Výhodou mikrokrytalizačních testů je naopak možnost rozlišení několika látek, které se tenkovrstevnou chromatografií neoddelí. Postup je takový, že nejprve nanese kapku rozpouštědla (nejčastěji acetonu) na část stélky umístěnou na podložním sklíčku. Rozpouštědlo z lišejníku vyextrahuje sekundární metabolity. V dalším kroku přidáme k získanému extraktu vybrané mikrokrytalizační činidlo, jehož základ tvoří nejčastěji glycerol, etanol, voda a kyselina octová. Sklíčko zahřejeme a necháme zchladnout. Postupně se vytvoří krystaly specifických tvarů a velikostí, které jsou charakteristické pro jednotlivé látky. Jejich vzhled a vlastnosti pak sledujeme pod mikroskopem (obr. 6).

● Chromatografie

Při zkoumání sekundárních metabolitů využíváme v zásadě dva základní typy chromatografie – tenkovrstevnou (TLC) a vysokoúčinnou kapalinovou (HPLC). Tenkovrstevná chromatografie je na lichenologických pracovištích široce rozšířená a v taxonomii představuje nezbytnou metodu pro zjišťování lišejníkových látek. Sloučeniny vyextrahované v acetonu se nanášejí na chromatografickou desku, kterou po ponoření vzlíná roztok organických rozpouštědel a s ním i nanesené metabolity. Ty se podle velikosti molekul rozmísťují na různých pozicích v rámci desky. Umístění je charakteristické a zásadní pro určování jednotlivých látek. Krátkým ponořením desky do vody je dále možné zjišťovat přítomnost mastných kyselin, které jsou jinak bezbarvé. Po aplikaci kyseliny sírové a zahřátí po dobu několika minut se organické látky zbarvují. Změna barvy také slouží k identifikaci látek, stejně jako zkoumání vlastností skvrn (vzniklých po předchozím zahřívání) pod UV světlem. TLC je velmi efektivní metoda a její používání není složité ani příliš finančně náročné.

Sofistikovanější metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). K jejím přednostem patří možnost stanovení koncentrace metabolitů, detekce látek zastoupených pouze ve stopových množstvích a rozlišení příbuzných látek, které v TLC splyvají v jediné skvrně. Kapalinové chromatografy také zároveň měří absorpční maxima detekovaných sloučenin, což výrazně napomáhá k následné identifikaci (obr. 9). HPLC je zvláště užitečná u skupin lišejníků, které obsahují barevné pigmenty rozpustné v organických rozpouštědlech, jako jsou antrachinony a xantony. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie má ve výzkumu lišejníkových látek do budoucna značný potenciál. Dokáže totiž zjistit mnoho sloučenin zastoupených pouze v nepatrných koncentracích, z nichž velké procento není prozatím známo. Cena zařízení však přesahuje rozpočet průměrného pracoviště, tudíž nebývá standardním vybavením lichenologické laboratoře.

Všeobecnou komplikací chromatografických metod jsou potíže s identifikací jednotlivých metabolitů, která vyžaduje často mnohaletou zkušenost badatele a hojně využívání srovnávacího materiálu.



● Pigmenty a krystaly

Část lišejníkových pigmentů není rozpustná v organických rozpouštědlech (např. ve zmíněném acetonu), a tudíž je nelze identifikovat pomocí chromatografie nebo mikrokrytalizačních testů. Z tohoto důvodu neznáme ani jejich strukturní vzorce. Obvykle se vyskytují v generativních částech stélky – v apotecích a periteciích. Mají různé barvy, nejčastěji zelenou, hnědou, červenou a modrou. Pro identifikaci se sleduje chování (barevná reakce) v zásaditém a kyselém prostředí po přidání hydroxidu draselného, resp. kyseliny chlorovodíkové. Důležitá je také reakce s kyselinou dusičnou, která např. mění barvu některých pigmentů na červenou. V běžné lichenologické praxi jsou pigmenty velmi důležitým vodítkem při mikroskopickém určování řady taxonů.

Mezi sekundární metabolity lišejníků se řadí i šťavelan vápenatý. O produkci této látky houbovými organismy se dočteme více v Živě – v článku O. Koukola (2012, 1: 14–16). Šťavelan se u lišejníků vyskytuje v apotecích, ale také na povrchu stélky v podobě ojínění. U několika rodů hraje velikost a rozmístění krystalů této látky podstatnou roli pro určování. Ke zkoumání krystalů šťavelanu se využívá polarizované světlo, které zviditelňuje za normálních podmínek těžko patrné krystalické komponenty a umožní jejich odlišení od jiných podobných struktur.

Význam sekundárních metabolitů

Sekundární metabolity lišejníků a jejich funkce v organismu jsou doposud velice málo probádanou oblastí. Lišejníkové látky skýtají potenciál nových objevů v budoucnu, např. v medicíně. Jejich využití člověkem bylo v Živě již popsáno (2003, 6: 253–255; 2004, 1: 17–19). Pro připomenutí uvedme alespoň několik nejnvýznamnějších způsobů uplatnění nebo působení

lišejníkových metabolitů: barvení látek, výroba lakmusu, léčivé účinky, antibiotické a protirakovinné působení, výroba parfémů atd. V samotném lišejníku zastávají tyto látky různé úlohy, avšak u většiny z nich funkci neznáme. Uplatňují se v kompetici s jinými organismy nebo pomáhají přežít v extrémních podmínkách – mohou působit jako inhibitory růstu rostlin a enzymové aktivity, chrání lišejník před býložravci, symbiotickou řasu chrání před nadměrným UV zářením, mají vliv na propustnost membrán fotobiontů nebo vznikají jako tzv. stresové metabolity.

Ne všechny druhy lišejníků obsahují sekundární metabolity – chybějí např. u většiny cyanolišejníků (obsahují jako fotobionta sinici; obr. 11) a také u pyrenokarpních lišejníků (typem plodnice je periteciem). Zde se při determinaci musíme spoléhat na anatomické, morfologické a popřípadě molekulární znaky.

S lišejníkovými látkami také souvisí jejich fytogeografická variabilita a přítomnost tzv. chemotypů. Označení chemotyp se používá pro případy, kdy se jeden druh vyskytuje s různými sekundárními metabolity. U některých taxonů je popsána změna v přítomnosti určitých látek v rámci jejich areálu, např. evropské populace houboplodky krvavějící (*Mycoblastus sanguinarius*, obr. 10) obsahují kyselinu kaperatovou, zatímco americké a asijské kyselinu rangiformovou. Často je tudíž zajímavé studovat, zda chemotypy mají nějaký taxonomický význam a neodlišují jinak morfologicky totožné druhy. V mnoha případech ale jde pouze o přítomnost chemicky blízké příbuzných látek, kde o výsledném metabolitu mohou rozhodovat např. podmínky prostředí či stabilita molekul daného produktu (ačkoli někteří lichenologové se spíše přiklánějí ke genetickým příčinám).

8 Příklad výsledné chromatografické desky, kde byla analyzována skupina příbuzných zástupců rodu misnička. Právě v tomto případě se setkáváme s doposud neznámými látkami (v obr. označeny jménem druhu), jež jsou charakteristické pro jednotlivé druhy. K nejrozšířenějším sekundárním metabolitům u lišejníků patří atranorin, který se v tenkovrstevné chromatografii používá jako standard.

9 Výsledný chromatogram z vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Na ose X je zobrazen tzv. retenční čas, který pomáhá k identifikaci sloučeniny, na ose Y je koncentrace látek. Jednotlivé vrcholy představují různé antrachinony obsažené v krásnici zubaté (*Caloplaca crenularia*). Orig. U. Söchting

10 Řez plodnicí houboplodky krvavějící (*Mycoblastus sanguinarius*). Pro horní část výtrusorodé vrstvy (epihymenium) je charakteristický tmavě zelený pigment (Cinereorufa-green), ve spodní části plodnice (hypotecium) se koncentruje rodokladonová kyselina. Tuto látku nalezneme i ve stélce, proto jsou narušená místa stélky sytě červená.

11 Většina cyanolišejníků (jako fotobionta obsahují sinici) tvoří žadné sekundární metabolity. Na obrázku typický zástupce této skupiny huspeník tuhý (*Collema tenax*). Foto F. Bouda

12 Vysokohorský lišejník šídlovec kůstkovitý (*Thamnolia vermicularis*) se ve střední Evropě vyskytuje ve dvou chemotypech. Jeden obsahuje kyselinu baeomycesovou a squamatuovou (vlevo) a svítí pod UV lampou bělavě, zatímco druhý chemotyp s kyselinou thamnolovou (vpravo) na UV záření nereaguje. Někdy bývají oba chemotypy považovány za samostatné druhy. Snímky J. Malíčka, pokud není uvedeno jinak