

BEATA GUZOW-KRZEMIŃSKA¹, MARTIN KUKWA²

¹Uniwersytet Gdański
Katedra Biologii Molekularnej
Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk

²Uniwersytet Gdański
Katedra Taksonomii Roślin i Ochrony Przyrody
Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk
E-mail: beata.guzow@biol.ug.edu.pl
dokmak@ug.edu.pl

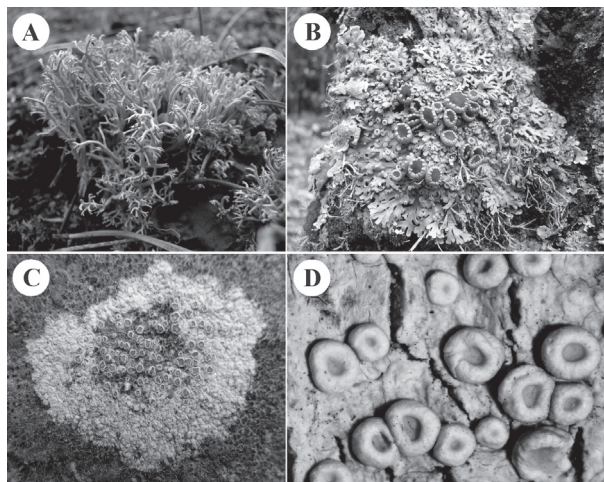
METODY BADAWCZE WE WSPÓŁCZESNEJ TAKSONOMII POROSTÓW

POROSTY

Porosty (grzyby zlichenizowane) są grupą organizmów żywych tworzonych przez co najmniej dwa całkowicie odmienne organizmy z różnych grup taksonomicznych. W wyniku połączenia komponentów powstała zupełnie nowa jakość biologiczna, niepodobna do organizmów wyjściowych. Opracowana przez HAWKSWORTH i HONEGGER w 1994 r. definicja porostu jako ekologicznie obligatoryjnego związku mutualistycznego pomiędzy zewnętrznym partnerem grzybowym (mikobiontem) oraz zasiedlającą go międzykomórkową populacją glonów lub cyjanobakterii (fotobiontem), pomimo swych ograniczeń, jest obecnie akceptowana przez większość lichenologów i mikologów.

Do połowy XIX w. porosty były traktowane jako proste organizmy (rośliny) i klasyfikowane jako niezależna jednostka taksonomiczna Lichenes. Pomimo odkrycia w 1867 r. przez szwajcarskiego badacza S. Schwendenera ich dualistycznej natury, systematyka porostów jeszcze przez długi czas nie odzwierciedlała rzeczywistego pokrewieństwa między nimi i innymi organizmami. Obecnie systematyka porostów stanowi integralną część systemu klasyfikacyjnego grzybów i nazwa mikobionta jest nazwą gatunkową porostu, który tworzy, natomiast komponent autotroficzny (fotobiont) klasyfikowany jest niezależnie. Międzynarodowy Kodeks Nomenklatury (*International*

Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants) reguluje zasady nazewnictwa roślin i grzybów, w tym również porostów. Zgodnie z artykułem 13 Kodeksu, ważne opublikowane nazwy porostów odnoszą się właśnie do ich komponenta grzybowego.



Ryc. 1. Morfologia plech porostów.

A. plecha krzaczkowata (*Cladonia rangiferina* (L.) Weber ex F.H. Wigg., Mierzeja Helska, Polska); B. plecha listkowata z apotecjami (*Heterodermia* sp., Boliwia); C. plecha skorupiasta z owocnikami (*Aspicilia* sp., Kreta, Grecja); D. morfologia apotecjów (*Ochrolechia* cf. *laevigata* (Räsänen) Versegghy ex Kukwa, Wielka Brytania).

W erze biologii molekularnej pozycja porostów wśród grzybów znalazła potwierdzenie w badaniach nad filogenezą królestwa Fungi (HIBBETT i współaut. 2007). Spośród grzybów zlichenizowanych największą grupę (ponad 98%) stanowią workowce (Ascomycota), natomiast mniej liczni są przedstawiciele podstawczaków (Basidiomycota) zgrupowani w zaledwie kilku rodzajach (zobacz np. NELSEN i współaut. 2007). Liczbę dotychczas opisanych porostów szacuje się na około 14 000 gatunków (HONEGGER 2009).

Taksonomia porostów przez długi czas opierała się wyłącznie na cechach fenetycznych, takich jak np. morfologia plechy (Ryc. 1), obecność i rodzaj diaspor wegetatywnych, wielkość i kształt zarodników czy typ worków. Współcześnie również cechy

chemiczne plech są szeroko wykorzystywane do odróżniania gatunków. Porosty są sztandarem przykładem organizmów, których systematyka w wielu przypadkach opiera się na chemotaksonomii. Jednak prowadzone obecnie na szeroką skalę badania molekularne sugerują konieczność weryfikacji znaczenia taksonomicznego poszczególnych cech, zarówno morfologicznych, jak i chemicznych, ponieważ okazało się, że pojawiały się one lub zanikały wielokrotnie i niezależnie w wielu liniach ewolucyjnych. Gatunki spokrewnione ze sobą mogą posiadać cechy pochodzące od wspólnego przodka, ale te same cechy mogą występować również w odległych filogenetycznie grupach porostów, w których pojawiły się w sposób niezależny.

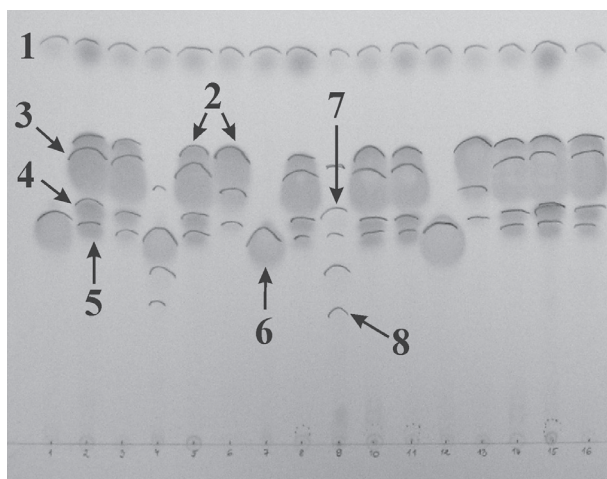
BADANIA CHEMOTAKSONOMICZNE

Wiele gatunków porostów wytwarza wtórne metabolity zwane także substancjami porostowymi. Spełniają one różne funkcje (LAWREY 1986, OPANOWICZ 2002), jednak w wielu przypadkach ich rola wydaje się jeszcze niedostatecznie poznana. Oprócz dużego znaczenia tych metabolitów dla samych porostów, mają one także zastosowanie w taksonomii tej grupy organizmów, zwłaszcza gatunków o plechach skorupiastych często tworzących wyłącznie stadia sterylne, a przez to ubogich w cechy morfologiczne i anatomiczne (np. TØNSBERG 1992, KUKWA 2006). W takich wypadkach substancje porostowe niejednokrotnie odgrywają decydującą rolę w identyfikacji materiału badawczego.

Pomimo raczej powszechnego traktowania wtórnych metabolitów porostowych jako cech wyróżniających taksony, część badaczy krytycznie odnosi się do opisywania nowych gatunków porostów tylko i wyłącznie na podstawie cech chemicznych. Niestety, jak dowodzą ostatnie badania genetyczne, nie można zastosować w tym przypadku żadnej reguły. W niektórych rodzajach, np. u *Lepraria* Ach. czy *Haematomma* A. Massal., gatunki podobne lub identyczne pod względem morfologii i anatomii, a różniące się tylko cechami chemicznymi, reprezentują niezależne linie ewolucyjne, które zasługują na rangę gatunków (LUMBSCH i współaut. 2008, LENDEMER 2011). U innych rodzajów, np. *Usnea* Dill. ex Adans. czy *Xanthoparmelia* (Vain.) Hale, chemizm wydaje się być mało konserwatywny, a linie ewolucyjne (klady, gatunki)

reprezentowane są przez okazy wykazujące dużą zmienność chemotypową (LEAVITT i współaut. 2011, SAAG i współaut. 2011).

Pierwszych danych z zakresu chemotaksonomii dostarczył W. Nylander, wybitny lichenolog pracujący i żyjący głównie w Helsinkach. Odkrył on, że wodne roztwory wodorotlenku potasu [KOH, w skrócie K] oraz podchlorynu wapnia [$\text{Ca}(\text{OCl})_2$, w skrócie C] mogą wykazywać różne reakcje barwne z plechami porostów i uznał to za ważną cechę przy rozróżnianiu taksonów porostów. Dla przykładu, Nylander opisał *Cetrelia olivetorum* (Nyl.) W.L. Culb. & C.F. Culb. (wtedy pod nazwą synonimiczną *Parmelia olivetorum* Nyl.) jako nowy takson na podstawie czerwonej reakcji miąższu plechy od podchlorynu wapnia, co pozwoliło mu odróżnić ten porost od morfologicznie prawie identycznej, lecz nie barwiącej się *Cetrelia cetrarioides* (Delise) W.L. Culb. & C.F. Culb. (synonim: *Parmelia cetrarioides* Delise). Badacz ten nie zdawał sobie do końca sprawy z mechanizmów tych reakcji barwnych, gdyż w tamtych czasach nieznany był fakt występowania w porostach wtórnych metabolitów porostowych (często później nazywanych kwasami porostowymi) (VITIKAINEN 2001), niemniej właściwie wykorzystał to zjawisko w klasyfikacji porostów. W późniejszym czasie wprowadzono do chemotaksonomii porostów także inne odczynniki chemiczne, m.in. parafenyldwuaminę [PD] (VITIKAINEN 2001). Aplikowanie odczynników chemicznych na plechy w sposób jaki zapropono-



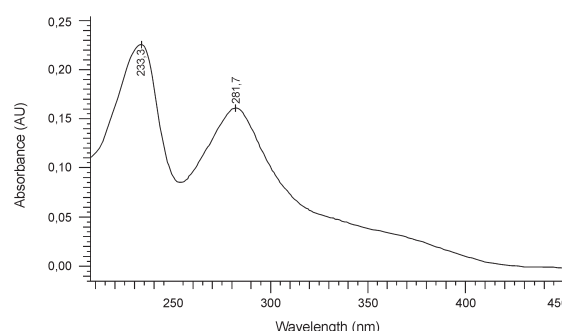
Ryc. 2. Przykładowy chromatogram rozwinęty w eluencie A obrazujący rozkład wtórnych metabolitów u porostów z rodzaju *Cetrelia* W. L. Culb. & C. F. Culb.

Główne substancje diagnostyczne: 1 – atranoryna; 2 – kwas perlatolowy; 3 – kwas imbrikariowy; 4 – kwas anizanowy; 5 – kwas 4-O-demetyloimbrikariowy; 6 – kwas oliwetorowy; 7 – kwas α -kollatolowy; 8 – kwas alektorolowy.

wał Nylander nazywane jest obecnie testem plamkowym.

Test plamkowy jest stosowany do dziś, zwłaszcza w trakcie rutynowej identyfikacji wielu porostów. Metoda ta jednak, pomimo łatwości wykonywania oraz interpretacji wyników, obarczona jest dużym błędem. Powodem jest to, że dzięki niej można wykryć substancje reagujące tylko z danym odczynnikiem, a szczególnie, że kilka substancji może reagować w taki sam sposób od tegoż odczynnika. Dlatego też obecnie, w celu identyfikacji wtórnych metabolitów porostowych, stosuje się bardziej dokładne techniki.

Jedną z nich jest mikrokrystalografia (ASHINA i SHIBATA 1954, BYSTREK 1997), która polega na rozpoznawaniu wtórnych metabolitów na podstawie budowy ich kryształków. Metoda ta była wykorzystywana przez wiele lat przed wprowadzeniem chromatografii cienkowarstwowej, która zostanie omówiona poniżej, gdyż jest ona łatwa w wykonaniu, nie wymaga specjalistycznego sprzętu, laboratorium ani odczynników. Jednak warto podkreślić, że identyfikacja substancji porostowych tą techniką nastręcza często wiele trudności. Jednym z powodów jest to, że wiele gatunków porostów zawiera liczne, wtórne metabolity i powstające kryształy mogą stanowić tak naprawdę asocjacje krysz-



Ryc. 3. Spektrum UV kwasu usninowego uzyskanego w wyniku rozdzielu HPLC ekstraktu z *Protoparmeliopsis muralis* (Schreb.) M. Choisy.

tałów dwóch lub więcej substancji. To często powodowało błędy w interpretacji otrzymanych kryształów, a w konsekwencji w identyfikacji wtórnych metabolitów, będących bardzo istotną cechą diagnostyczną wielu taksonów porostów (por. ORANGE i współaut. 2001).

Z tego też względu w celu uzyskania dokładniejszych wyników analiz chemicznych stosuje się obecnie przede wszystkim techniki chromatograficzne, choć inne metody są nadal w użyciu. Jeden z typów chromatografii, chromatografia cienkowarstwowa (ang. thin-layer chromatography, TLC) (Ryc. 2) oraz jej odmiana, wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa (ang. performance thin-layer chromatography, HPTLC) jest powszechnie stosowana w różnego typu badaniach, m.in. przy inwentaryzacji porostów, w badaniach ekologicznych czy też taksonomicznych (np. ORANGE i współaut. 2001, LUMBSCH 2002).

Dzięki chromatografii cienkowarstwowej możliwe jest rozdzielenie wtórnych metabolitów, a następnie zbadanie ich właściwości chromatograficznych oraz ich identyfikacja. Metoda ta jest znacznie trudniejsza, jeśli wziąć pod uwagę interpretację chromatogramów i oznaczanie wtórnych metabolitów, jednak znacznie bardziej miarodajna pod względem otrzymanych danych o składzie ilościowym i jakościowym tychże substancji w plechach porostów. Szczegółowe dane o tej metodzie oraz przykładowe schematy rozkładu substancji na chromatogramach można znaleźć w pracach ORANGE'a i współaut. (2001) i LUMBSCHA (2002) oraz polskim opracowaniu KUBIAKA i KUKWY (2011).

Dokładniejsze od chromatografii cienkowarstwowej są inne techniki tego typu, w tym dość często stosowana wysokospraw-

na chromatografia cieczowa (ang. high performance liquid chromatography, HPLC) (Ryc. 3). Metoda ta jest używana głównie w celu wykrycia substancji o niewielkim stęże-

niu, trudnych do identyfikacji oraz do wybranych grup substancji, np. ksantonów (np. LUMBSCH 2002).

BADANIA MOLEKULARNE

Rozwój metod biologii molekularnej na zawsze zmienił oblicze nowoczesnej taksonomii. Tak jak w XVII w. wynalezienie mikroskopu zrewolucjonizowało studia taksonomiczne, tak obecnie badania molekularne pozwalają na wykrywanie różnic między organizmami na poziomie DNA. Upowszechnienie metod molekularnych spowodowało gwałtowny rozwój taksonomii filogenetycznej i w wielu przypadkach zweryfikowało postrzeganie znaczenia niektórych cech fenetycznych i chemicznych dotychczas wykorzystywanych w badaniach taksonomicznych, (np. GRUBE i HAWKSWORTH 2007 i literatura tam cytowana). Porosty, jako układy złożone z dwóch lub więcej odległych filogenetycznie biontów, stanowią interesujący materiał badawczy. W oparciu o dane molekularne odtworzono hipotetyczne drzewo życia grzybów i stwierdzono, że lichenizacja nie jest cechą charakterystyczną dla wybranej grupy grzybów, a raczej strategią życiową pojawiającą się kilkakrotnie w różnych liniach filogenetycznych grzybów (GARGAS i współaut. 1995). Co więcej, dalsze badania sugerują, że wiele grzybów niesymbiotycznych miało przodków wśród grzybów zlichenizowanych, a zdolność współżycia z fotobiontem pojawiała się niezależnie od siebie w różnych grupach grzybów, a następnie stan lichenizacji był wielokrotnie tracony na drodze ewolucji (LUTZONI i współaut. 2001).

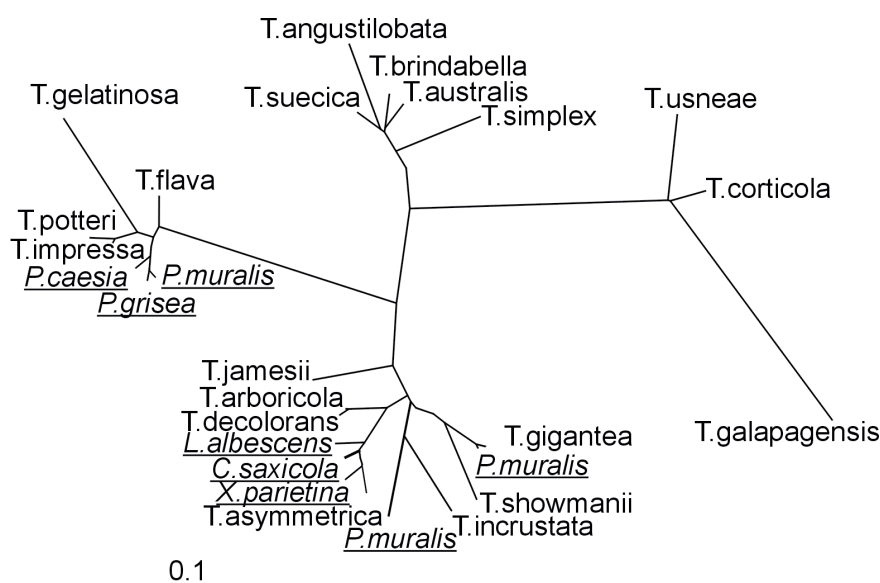
Nie ulega wątpliwości, że metody molekularne stanowią skuteczne narzędzie badania bioróżnorodności pozwalające na identyfikację okazów słabo wykształconych, zdegenerowanych, pochodzących z siedlisk o wysokim stopniu skażenia, a także na wyróżnianie tzw. gatunków kryptycznych. Gatunkami kryptycznymi nazywamy taksony, które są dobrze zdefiniowane filogenetycznie, natomiast ich wyodrębnianie nie znajduje poparcia w cechach morfologicznych (patrz CRESPO i PÉREZ-ORTEGA 2009). Analiza zmienności genetycznej tych taksonów, zarówno wśród grzybów zlichenizowanych, jak i niesymbiotycznych, prowadzi niekiedy do opisywania gatunków różniących się drobnymi, subtelnymi cechami morfologicznymi,

chemicznymi czy ekologicznymi (np. w obrębie *Parmelia saxatilis* (L.) Ach. s.l.) i jest niezbędna w celu pełniejszego poznania bioróżnorodności.

Kolejną grupą porostów, w przypadku której wprowadzenie badań molekularnych pozwoliło odkryć ich tożsamość, są fotomorfy, czyli porosty tworzone przez różne organizmy autotroficzne (chloromorfy - w związku z zielenicą i cyjanomorfy - w symbiozie z cyjanobakterią). Występują one przede wszystkim w rzędzie Peltigerales i nazywane są najczęściej fototypami, fotomorfami lub fotosymbiodemami. Badania genetyczne wykazały, że taksony te pomimo odmiennej morfologii plechy, tworzone są przez ten sam gatunek grzyba połączony z dwoma typami fotobiontów (np. ARMALEO i CLERC 1991). W konsekwencji, jako że nazewnictwo porostów opiera się na klasyfikacji partnera grzybowego, te dwie różne formy morfologiczne klasyfikowane są obecnie pod tą samą nazwą.

W badaniach molekularnych porostów stosuje się zarówno analizy oparte na pojedynczym genie, jak i analizy wielogenowe (ang. multilocus). Wielu badaczy podkreśla jednak konieczność stosowania kilku markerów (np. GRUBE i KROKEN 2000). Dotychczas badania te koncentrują się na analizach sekwencji kilku specyficznych markerów grzybowych, przede wszystkim ITS rDNA (ang. Internal Transcribed Spacer), SSU rDNA, LSU rDNA, mtSSU rDNA, RPB1 czy RPB2. Metody AFLP (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism) i RAPD (ang. Randomly Amplified Polymorphic DNA), ze względu na niespecyficzną amplifikację fragmentów genomu obu biontów, mają bardzo ograniczone zastosowanie w badaniach porostów.

Badania molekularne stały się doskonałym narzędziem wykorzystywanym do identyfikacji fotobiontów. Organizmy autotroficzne tworzące porosty są trudne do oznaczenia w stanie symbiotycznym, w związku z czym w wielu przypadkach konieczna jest izolacja i hodowla tych organizmów w stanie aposymbiotycznym w warunkach *in vitro*. Aby uniknąć tej długotrwałej procedury opracowano



Ryc. 4. Drzewo uzyskane w wyniku analizy sekwencji markera ITS rDNA z różnych szczepów *Trebouxia* Puymały w oparciu o model TrNef w programie PhyML.

Nazwy podkreślone odnoszą się do gatunków porostów, z których pochodziły analizowane sekwencje fotobiontów. Pozostałe sekwencje *Trebouxia* uzyskano z bazy danych GenBank.

metodę molekularnej identyfikacji partnerów glonowych za pomocą markerów DNA. W przypadku najczęściej występujących w plechach fotobiontów z rodzaju *Trebouxia* Puymały stosowany jest przede wszystkim region ITS rDNA. Za pomocą starterów specyficznych amplifikowany jest fragment DNA, a następnie uzyskaną sekwencję porównuje się z sekwencjami szczepów referencyjnych. Analiza filogenetyczna oparta na sekwencji markera ITS rDNA pozwala na oznaczenie komponentów autotroficznych obecnych w plechach, a także dostarcza informacji na temat nowych, nieznanych jeszcze szczepów tworzących porosty. Przykładowe drzewo uzyskane w wyniku analizy fotobiontów z rodzaju *Trebouxia* zamieszczone jest na Ryc. 4.

Analiza danych molekularnych pozwala na ewaluację cech morfologiczno-anato-

micznych oraz chemicznych wykorzystywanych do definiowania gatunków (np. GRUBE i HAWKSWORTH 2007), a także na dokonanie reklasyfikacji porostów, również na wyższych poziomach taksonomicznych, jak np. w przypadku rodziny Parmeliaceae (np. CRESPO i współaut. 2010).

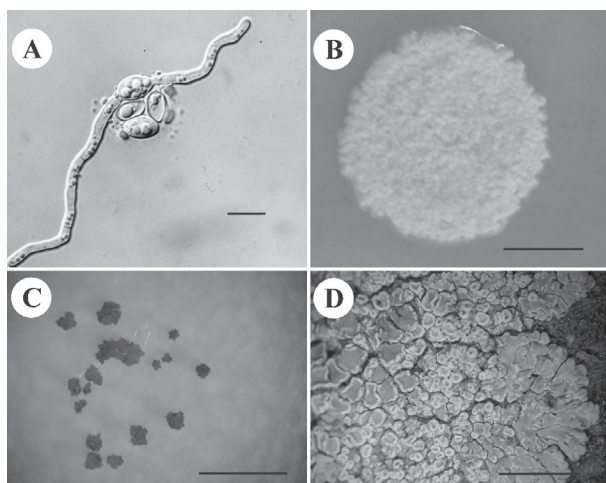
W ostatnich latach podjęto działania mające na celu opracowanie systemu identyfikacji organizmów na podstawie ich zmienności genetycznej, poprzez tzw. barkody DNA (ang. DNA barcoding). Dla poszczególnych grup organizmów wytypowano markery genetyczne o odpowiednim poziomie zmienności, np. dla grzybów zalecany jest region ITS rDNA. W bazie danych BOLD (www.

barcodinglife.org) gromadzone są sekwencje tego markera oraz informacje na temat badanych gatunków wraz z dokładnymi danymi dotyczącymi analizowanych okazów. Błyskawiczny przyrost liczby deponowanych sekwencji powinien umożliwić utworzenie biblioteki barkodów dla wszystkich organizmów eukariotycznych w ciągu najbliższych 20 lat (RATNASINGHAM i HEBERT 2007). Stwarza to nowe możliwości w badaniach taksonomicznych, ponieważ ilość materiału niezbędnego do badań DNA jest niewielka, co pozwoli na identyfikację nawet słabo wykształconych czy zdegenerowanych okazów. Przyczyni się także z pewnością do pełniejszego poznania bioty porostów w skali regionalnej i globalnej.

BADANIA EKSPERYMENTALNE

Lichenologia eksperymentalna obejmuje m.in. badania kultur mycelialnych grzybów lichenizujących, hodowle ich partnerów autotroficznych, a także resyntezy *in vitro* biontów tworzących porosty. Już pierwsze próby rozdzielania komponentów porostowych pokazały, że morfologia tych organizmów

żyjących niezależnie od siebie bardzo różni się od formy, którą tworzą razem (Ryc. 5). Metody eksperymentalne wykorzystywane są przede wszystkim do analiz fizjologii tych organizmów, ale znajdują również zastosowanie w badaniach taksonomicznych. W przypadku mikobiontów wyprowadzenie czy-



Ryc. 5. A. Kielkujący zarodnik *Protoparmeliopsis muralis* (Schreb.) M. Choisy na pożywce BBM. Skala 20 μm . B. Hodowla *in vitro* mikobionta *P. muralis* na pożywce G-LBM. Skala 1 cm. C. Hodowla *in vitro* fotobionta *Trebouxia incrustata* Ahmadjian ex Gärtner na pożywce BBM. Skala 1 cm. D. Fragment plechy porostu *P. muralis*. Skala 5 mm.

stych kultur mycelialnych jest niezbędnym elementem podczas opracowywania nowych specyficznych markerów molekularnych, np. mikrosatelitarnych, do badań nad zmiennością tych organizmów.

Przed upowszechnieniem metod molekularnych, w celu identyfikacji fotobiontów występujących w plechach porostowych, niezbędne było wyizolowanie ich oraz hodowla

w warunkach *in vitro*. Obecnie, stosując odpowiednie markery genetyczne, możliwa jest identyfikacja tych organizmów autotroficznych bez konieczności ich hodowania. Jednak w dalszym ciągu podejmowane są prace nad izolacją i prowadzeniem kultur *in vitro* fotobiontów, szczególnie w przypadku opisywania nowych taksonów.

Ponadto, metody lichenologii eksperymentalnej wykorzystywane są do sztucznej resyntezy mikobionta z fotobiontem (np. AHMADJIAN 1973, STOCKER-WÖRGÖTTER i TÜRK 1994, STOCKER-WÖRGÖTTER 2002). Próby odtworzenia symbiotycznego fenotypu sięgają XIX w. i chociaż wielokrotnie udało się połączyć bionty w warunkach *in vitro*, uzyskanie plechy porostowej *de novo* jest znacznie bardziej skomplikowane niż się wydawało. Dobór odpowiedniej pożywki i warunków prowadzenia hodowli wydają się być kluczowe dla odtworzenia plechy o morfologii zbliżonej do rosnącej w warunkach naturalnych. Szczególnie interesujące są badania prowadzone na gatunkach tworzących różne fotomorfy. W oparciu o kultury *in vitro* przeprowadzono resyntezę fotosymbiodemów tworzonych przez *Peltigera leucophlebia* (Nyl.) Gyeln. i stwierdzono, że ten sam grzyb tworzy obie formy morfologiczne obserwowane w warunkach naturalnych (STOCKER-WÖRGÖTTER i TÜRK 1994). Metody lichenologii eksperymentalnej stały się obecnie narzędziem wspomagającym badania taksonomiczne.

TECHNOLOGIE INFORMACYJNE W TAKSONOMII POROSTÓW

Upowszechnienie internetu i rozwój informatyki stworzyły nowe możliwości w badaniach taksonomicznych. W ostatnich latach powstają dostępne on-line bazy danych na temat biot porostów w różnych regionach geograficznych, np. http://www.biologie.uni-hamburg.de/checklists/portalpages/index_index.htm; <http://botan.ib-pan.krakow.pl/lichens-bolivia/en,strona,catalogue,5.html>. Ponadto, istnieje szereg baz zawierający fotografie porostów, niekiedy wraz z ich opisami, np. <http://www.britishlichens.co.uk/speciesgallery.html>. Podejmowane są również próby tworzenia elektronicznych kluczy do oznaczania porostów, np. <http://www.liasliht.lias.net/>.

Współczesna taksonomia wykorzystuje możliwości internetowych baz danych do

zbierania informacji na temat znanych jak i nowo opisywanych taksonów. Funkcjonujące obecnie bazy MycoBank (<http://www.mycobank.org/>) czy Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/>) od pewnego czasu zachęcały autorów do umieszczania opisów nowych gatunków w swoich zasobach. Ostatnie zmiany w Międzynarodowym Kodeksie Nomenklatury, wprowadzone w 2011 r. podczas Kongresu Botanicznego w Melbourne, nałożyły na badaczy ostatecznie obowiązek zdeponowania opisu nowego taksonu w bazie MycoBank, aby jego publikacja była uznana za ważną.

Wspomniana wcześniej baza barkodów DNA (www.barcodinglife.org) zawiera dane na temat porostów i charakteryzujących je markerów. W miarę poszerzania swych za-

sobów, w najbliższej przyszłości powinna ułatwić badaczom identyfikację okazów, których oznaczenie klasycznymi metodami może sprawiać trudności.

Ponadto, powstają również bazy literatury taksonomicznej, np. <http://www.cybertruffle.org.uk/cyberliber/index.htm>, w której znajdują się zdigitalizowane zasoby literatury mikologicznej sięgające początków XIX w. O ile literatura współczesna jest na ogół łatwiej dostępna z uwagi na fakt, że wiele czasopism publikuje artykuły zarówno w wersji drukowanej, jak i elektronicznej, dane historyczne

są zazwyczaj dostępne w ograniczonej liczbie egzemplarzy w wybranych bibliotekach. Tworzenie, zwłaszcza ogólnodostępnych, baz literatury historycznej niewątpliwie sprzyja wymianie informacji na temat bioróżnorodności oraz usprawnia studia taksonomiczno-nomenklatoryczne. W przypadku porostów poruszanie się w całości literatury, szczególnie współczesnej dodatkowo ułatwia aktualizowana na bieżąco baza "Recent Literature of Lichens" (<http://nhm2.uio.no/botanisk/lav/RLL/RLL.HTM>).

PODSUMOWANIE

Współczesne badania taksonomiczne porostów obejmują analizę zarówno cech morfologicznych, anatomicznych, chemicznych, jak i genetycznych. Badania prowadzone w ostatnich latach wykazały, że konieczna jest re-ewaluacja cech stosowanych w taksonomii porostów, zarówno morfologicznych, jak i chemicznych, ponieważ stwierdzono, że większość z nich jest homoplastyczna. Nowoczesne narzędzia badawcze wykorzystywane przez lichenologów pozwalają lepiej poznać różnorodność bioty porostów, a zastosowanie metod genetycznych pozwala na identyfikację fotobiontów również w stanie symbiotycznym. Rozwój technologii informatycznych umożliwia tworzenie baz danych

ułatwiających rozpowszechnianie i wymianę informacji taksonomicznych, a dostępne klucze elektroniczne pozwalają na łatwiejszą identyfikację okazów.

PODZIĘKOWANIA

BGK dziękuje za wsparcie finansowe Marie Curie European Reintegration Grant nr projektu 239343 w ramach 7th European Community Framework Programme. Zdjęcie *Heterodermia* sp. z Boliwii wykonano w trakcie badań finansowanych przez NCBiR w ramach programu LIDER na lata 2010-2013 (nr 92/L-1/09). BGK dziękuje Prof. E. Stocker-Wörgötter (University of Salzburg, Austria) za pomoc w analizach HPLC.

METODY BADAWCZE WE WSPÓŁCZESNEJ TAKSONOMII POROSTÓW

Streszczenie

Porosty to symbiotyczne układy tworzone przez co najmniej dwa genetycznie odmienne organizmy: grzyba, zielenicę lub sinicę. Systematyka porostów stanowi integralną część systemu klasyfikacyjnego grzybów i nazwa mikobionta jest nazwą gatunkową porostu, który tworzy, natomiast organizm autotroficzny klasyfikowany jest niezależnie. W pracy omówione są metody badawcze współcześnie stosowane w taksonomii porostów. Dane morfologiczno-anatomiczne oraz cechy chemiczne od wielu lat są wykorzystywane do identyfikacji porostów. Za pomocą prostych testów plamkowych, mikrokrystalizacji oraz metod chromatograficznych (TLC, HPTLC i HPLC) identyfikowane są wtórne metabolity obecne w plechach porostów. Jednak współczesne badania molekularne sugerują konieczność weryfikacji znaczenia taksonomicznego poszczególnych cech, zarówno anatomicznych, morfologicznych jak i chemicznych. W oparciu o zmienność na poziomie DNA identyfikowane są gatunki kryptyczne, których odrębność potwierdzają w dalszych analizach drobne cechy

morfologiczno-anatomiczne. Przez wiele lat identyfikacja fotobiontów możliwa była jedynie po izolacji szczepu z plechy i jego hodowli w stanie aposymbiotycznym. Jednakże wykorzystanie specyficznych starterów pozwalających na selektywną amplifikację DNA partnerów glonowych pozwala zidentyfikować gatunki fotobiontów bez czasochłonnych hodowli *in vitro*. Markery DNA wykorzystywane jako barkody stanowią nowe narzędzie do oznaczania gatunków. Ponadto, rozwój technologii informacyjnych stworzył nowe możliwości rozpowszechniania i wymiany danych taksonomicznych. Tworzone są bazy danych dostępne *on-line* zawierające informacje na temat różnorodności porostów w poszczególnych obszarach geograficznych, bazy znanych i nowo opisanych taksonów, wyszukiwarki barkodów DNA, bazy literatury taksonomicznej i interaktywnych kluczy do oznaczania. Opracowywane są również elektroniczne klucze do oznaczania porostów, które powinny ułatwić identyfikację okazów.

RESEARCH METHODS IN MODERN TAXONOMY OF LICHENS

Summary

Lichens are symbiotic associations, composed of a fungus and green alga, and/or cyanobacterium, but lichen systematics deals with their fungal partners and photobionts are classified separately. In the paper research methods used in lichen taxonomy are briefly reviewed. Besides morphological and anatomical studies, chemotaxonomy became a very important tool for identification of lichens. Using simple spot tests, microcrystal tests and chromatography (TLC, HPTLC and HPLC) secondary metabolites are identified. With the introduction of molecular approaches, traditionally used characters, such as anatomy, morphology and chemistry need to be re-evaluated. Cryptic species are identified based on molecular variation and hidden biodiversity is being

discovered. For many years identification of lichen photobionts was possible only after isolation and aposymbiotic growth of an algal strain. However, using specific primers appropriate molecular markers are amplified and the algal partners are identified without time-consuming *in vitro* culture. DNA markers used as barcodes provide a new tool for determination of species. Moreover, the development of information technology created new opportunities for dissemination and exchange of taxonomical data. On-line databases containing information on lichens from particular areas, newly described taxa, DNA barcodes, taxonomical literature etc. and interactive determination keys are being developed.

LITERATURA

- AHMADJIAN V., 1973. *Resynthesis of lichens*. [W:] *The Lichens*. AHMADJIAN V., HALE M. E. (red.), Academic Press, New York, 565–579.
- ARMALEO D., CLERC P., 1991. *Lichen chimeras, DNA analysis suggests that one fungus forms two morphotypes*. Exp. Mycol. 15, 1–10.
- ASAHINA Y., SHIBATA S., 1954. *Chemistry of Lichen Substances*. Jap. Soc. Promot. Sci., Tokyo.
- BYSTREK J., 1997. *Podstawy lichenologii*. Wydawnictwo UMCS, Lublin.
- CRESPO A., KAUFF F., DIVAKAR P.K., DEL PRADO R., PÉREZ-ORTEGA S., DE PAZ G.A., FERENCIOVA S., BLANCO O., ROCA-VALIENTE B., NÚÑEZ-ZAPATA J. i współaut., 2010. *Phylogenetic generic classification of parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) based on molecular, morphological and chemical evidence*. Taxon 59, 1735–1753.
- CRESPO A., PÉREZ-ORTEGA S., 2009. *Cryptic species and species pairs in lichens: A discussion on the relationships between molecular phylogenies and morphological characters*. Anales de Jardín Botánico de Madrid 66S1, 71–81.
- GARGAS A., DEPRIEST P. T., TAYLOR J. W., 1995. *Multiple origins of lichen symbioses in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny*. Science 268, 1492–1495.
- GRUBE M., HAWKSWORTH D. L., 2007. *Trouble with lichen: the re-evaluation and re-interpretation of thallus form and fruiting body types in the molecular era*. Mycol. Res. 111, 1116–1132.
- GRUBE M., KROKEN S., 2000. *Molecular approaches and the concept of species and species complexes in lichenized fungi*. Mycologia 104, 1284–1294.
- HAWKSWORTH D. L., HONEGGER R., 1994. *The lichen thallus: a symbiotic phenotype of nutritionally specialized fungi and its response to gall producers*. [W:] *Plant Galls: Organisms, Interactions, Populations*. WILLIAMS M. A. J. (red.). Clarendon Press, Oxford, 77–98.
- HIBBETT D. S., BINDER M., BISCHOFF J. F., BLACKWELL M., CANNON P. F., ERIKSSON O. E., HUHNDOERF S., JAMES T., KIRK P. M., LÜCKING R., LUMBSCH H. T., LUTZONI F., MATHENY P. B., MCLAUGHLIN D. J., POWELL M. J., REDHEAD S., SCHOCH C. L., SPATAFORA J. W. i współaut., 2007. *A higher-level phylogenetic classification of the Fungi*. Mycol. Res. 111, 509–547.
- HONEGGER R., 2009. *Lichen-forming fungi and their photobionts*. [W:] *Plant Relationships. The Mycota*. V. DEISING H. (red.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 307–333.
- KUBIAK D., KUKWA M., 2011. *Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) w lichenologii*. [W:] *Mikologia laboratoryjna. Przygotowanie materiału badawczego i diagnostyka*. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, Olsztyn, 176–190.
- KUKWA M., 2006. *The lichen genus Lepraria in Poland*. Lichenologist 38, 293–305.
- LAWREY J. D., 1986. *Biological role of lichen substances*. Bryologist 89, 111–122.
- LEAVITT S. D., JOHNSON L. A., GOWARD T., CLAIR L. L. S., 2011. *Species delimitation in taxonomically difficult lichen-forming fungi: An example from morphologically and chemically diverse Xanthoparmelia (Parmeliaceae) in North America*. Mol. Phylogen. Evol. 60, 317–332.
- LENDEMER J. C., 2011. *A taxonomic revision of the North American species of Lepraria s.l. that produce divaricatic acid, with notes on the type species of the genus L. incana*. Mycologia 103, 1216–1229.
- LUMBSCH H. T., 2002. *Analysis of phenolic products in lichens for identification and taxonomy*. [W:] *Protocols in Lichenology. Culturing, biochemistry, ecophysiology and use in biomonitoring*. KRANNER I., BECKETT R. P., VARMA A. K. (red.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 281–295.
- LUMBSCH H. T., NELSEN M. P., LÜCKING R., 2008. *The phylogenetic position of Haematommataceae (Lecanorales, Ascomycota), with notes on secondary chemistry and species delimitation*. Nova Hedwigia 86, 105–114.
- LUTZONI F., PAGEL M., REEB V., 2001. *Major fungal lineages are derived from lichen symbiotic ancestors*. Nature 411, 937–940.
- NELSEN M. P., LÜCKING R., UMAÑA L., TREST M. T., WILL-WOLF S., CHAVES J. L., GARGAS A., 2007. *Multi-clavula ichthyiformis (Fungi: Basidiomycota: Cantharellales: Clavulinaceae), a remarkable new basidiolichen from Costa Rica*. Am. J. Bot. 94, 1289–1296.
- OPANOWICZ M., 2002. *Ekologiczna rola wtórnych metabolitów porostowych*. Wiadomości Botaniczne 46, 35–44.
- ORANGE A., JAMES P. W., WHITE F. J., 2001. *Microchemical methods for the identification of lichens*. British Lichen Society, London.

- RATNASINGHAM S., HEBERT P. D. N., 2007. *BOLD: The Barcode of Life Data System* (www.barcodinglife.org). Mol. Ecol. Notes 7, 355–364.
- SAAG L., TÖRRA T., SAAG A., DEL-PRADO R., RANDLANE T., 2011. *Phylogenetic relations of European shrubby taxa of the genus Usnea*. Lichenologist 43, 427–444.
- STOCKER-WÖRGÖTTER E., 2002. *Resynthesis of photosymbiodemes*. [W:] *Protocols in lichenology – culturing, biochemistry, ecophysiology and use in biomonitoring*. KRANNER I., BECKETT R. P., VARMA A. K. (red.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 47–60.
- STOCKER-WÖRGÖTTER E., TÜRK R., 1994. *Artificial resynthesis of the photosymbiodeme Peltigera leucophlebia under laboratory conditions*. Cryptogam. Bot. 4, 300–308.
- TØNSBERG T., 1992. *The soorediate and isidiate, corticulous, crustose lichens in Norway*. Sommerfeltia 14, 1–331.
- VITIKAINEN O. 2001. *William Nylander (1822–1899) and lichen chemotaxonomy*. Bryologist 104, 263–267.