

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/309646232>

Selektivität der Symbionten schwermetalltoleranter Flechten.

Book · November 2002

CITATIONS

31

READS

305

1 author:



[Andreas Beck](#)

Botanische Staatssammlung München SNSB-BSM

83 PUBLICATIONS 2,546 CITATIONS

SEE PROFILE

Selektivität der Symbionten schwermetalltoleranter Flechten

Andreas Beck

München 2002

Selektivität der Symbionten schwermetalltoleranter Flechten

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

Vorgelegt
von Andreas Beck
aus
München

München 2002

1. Gutachter: Prof. Dr. G. RAMBOLD
2. Gutachter: Prof. Dr. H-U. KOOP

Tag der Einreichung: 13.05.2002

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2002

Wir müssen sämtliche Fälle, wo überhaupt ein Auf- oder Ineinanderwohnen zweier verschiedener Species stattfindet, unter einen weitesten Begriff bringen, welcher die Rolle, die beide Wesen dabei spielen, noch nicht berücksichtigt, also auf das blosse Zusammenleben begründet ist, und wofür sich die Bezeichnung Symbiotismus empfehlen dürfte. Dieses Verhältnis zeigt nun in der organischen Schöpfung verschiedenen Charakter, indem wir mehrere Stufen von dem lockeren Verhältnisse bis zur innigsten und nothwendigen Verbindung beider Wesen unterscheiden können.

A.B. FRANK (1876)

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	1
Aktueller Kenntnisstand	1
Der Habitus der Flechte	1
Reproduktionsmechanismen bei Flechten	3
Flechtengesellschaften und ihr ökologischer Zeigerwert	6
Flechten und Schwermetalle.....	6
Physikalisch-chemische Einteilung der Metalle	9
Phytochelatine als schwermetallentgiftendes Prinzip in Pflanzen.....	10
Begriffsklärungen zur Beziehung von Symbiosepartnern	11
Hypothesenentwicklung	13
Zielsetzung.....	16
Material und Methoden	17
Biologisches Material	17
Algen-Typusstämme.....	17
Herbarmaterial	18
Im Rahmen dieser Arbeit isolierte Algenklone	22
Methoden und benötigtes Material	25
Isolierung von Flechtenalgen.....	25
Kulturmedien	26
Kulturbedingungen	27
Optische Geräte	27
Färbungen	27
Kryokonservierung von Flechtenalgen.....	28
Analyse der Nukleotidsequenz der 18S und ITS nrDNA-Regionen	28
DNA-Extraktion nach der CTAB-Methode.....	28
DNA-Extraktion mit dem DNeasy-Kit von Qiagen	30
Amplifizierung der DNA mittels PCR	30
DNA-Sequenzierungsreaktion.....	33
Phylogenetische Auswertung der Sequenzen	36
Untersuchung von DNA-Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (SSCP) ...	40
Ableitung von RNA-Sekundärstrukturen	42
Methoden für die soziologischen Vegetationsaufnahmen.....	42
Dünnschichtchromatographie	44
Untersuchungen zur Schwermetallresistenz von Flechtenalgen.....	45
Chemikalien und verwendete Geräte.....	45
Kultur der Flechtenalgen	45
Bestimmung der Schwermetallgehalte durch AAS und ICP-AES	51
Nachweis von Phytochelatin-Metall-Komplexen durch Gelfiltration.....	51
Ergebnisse.....	53
Beschreibung der bearbeiteten Flechtenarten	53
Ordnung Agyriales.....	53
Fam. Agyriaceae	53
Ordnung Lecanorales	54
Unterordnung Acarosporineae.....	54
Fam. Acarosporaceae.....	54

Inhaltsverzeichnis

Fam. Hymeneliaceae.....	55
Unterordnung Lecanorineae (inkl. Cladoniineae)	55
Rhizocarpaceae Group.....	55
Lecidiaceae Group	57
Micareaceae Group.....	62
Fam. Catillariaceae	63
Lecanoraceae Group	63
Flechten der Lecanorales mit unklarer Stellung im System	67
Flechten der Lecanoromycetes mit unklarer Stellung im System.....	68
Fam. Umbilicariaceae	68
Fam. Icmadophilaceae	68
Soziologische Untersuchungen.....	69
Vorkommende Flechtenalgen.....	75
Morphologische Charakterisierung der Phycobionten	75
Verwendete Terminologie	75
Phycobionten der Gattung <i>Trebouxia</i> PUYM.	77
Phycobionten der Gattung <i>Asterochloris</i> TSCHERM.-WOESS (1980) emend. T.FRIEDL (ined.).....	87
Phycobionten der Gattung <i>Chlorella</i> BEIJ. (1890).....	91
Phycobionten der Gattung <i>Apatococcus</i> F.BRAND (1925) em. GEITLER (1942)	94
Phycobionten der Gattung <i>Coccomyxa</i> SCHMIDLE (1901).....	96
Zusammenfassende Darstellung der vorkommenden Phycobionten	98
Molekulargenetische Untersuchungen an ausgewählten Flechtenalgen.....	99
Untersuchungen zur phylogenetischen Stellung der Algenpartner <i>Chlorella</i> <i>saccharophila</i> und <i>Coccomyxa</i> sp. mittels 18S nrDNA-Analysen.....	101
Analyse der nrDNA-Bereiche von Phycobionten der Gattung <i>Trebouxia</i>	104
Phylogenetische Analyse der ITS nrDNA-Sequenzen.....	104
Analyse der ITS nrDNA-Sequenzen durch SSCP	111
Sekundärstruktur der ITS2 nrRNA.....	114
Phylogenetische Analyse eines Group I-Introns in der 18S nrDNA.....	117
Vergleich der ITS- und 1512-Intron-Allele innerhalb <i>T. simplex</i> [gt A].....	120
Korrelationen zwischen dem Auftreten von Flechtenalgen und deren Flechtenpilzen	122
Selektivität der Flechtenpartner.....	122
Flechtenalgen der Familien Lecideaceae und Porpidiaceae	124
Zusammenfassung der Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen.....	128
Schwermetallresistenz von Flechtenalgen.....	130
Wachstum der Flechtenalgen bei Schwermetallbelastung.....	130
Vergleich der verschiedenen Wachstumsmessungen	130
Belastung durch Eisen	132
Belastung durch Kupfer	133
Belastung durch Cadmium	136

Inhaltsverzeichnis

Auswirkungen der Schwermetalltoleranz der Photobionten auf die Substratwahl und das Vorkommen der Flechten.....	142
Analyse des Schwermetallgehalts des Substrats.....	142
Zusammenfassung der Ergebnisse zur Schwermetallresistenz.....	145
Diskussion	146
Schwermetalltoleranz-Untersuchungen.....	146
Schwermetalltoleranz von Photobionten und ihre Auswirkungen auf das Vorkommen von Flechten	146
Die Schwermetalltoleranz von Flechtenalgen beeinflusst die Photobiontenwahl von Mykobionten nicht.....	149
Einfluss der Versuchsbedingungen auf die Schwermetalltoleranz.....	150
Mechanismen der Schwermetalltoleranz von Flechtenalgen.....	151
Identität, Selektivität, Spezifität und Koevolution von Flechtenbionten.....	152
Phylogenetische Position der Flechtenalgen.....	152
Lateraler Gentransfer eines Introns der 18S nrDNA	152
Relichenisierung der Flechten	153
Selektivität der Flechtenbionten	155
Geographische Verbreitung der Photobionten der <i>Trebouxia simplex</i> -Gruppe.....	158
Kospeziation und Koevolution bei Flechten	159
Zusammenfassung	162
Abstract.....	164
Literaturverzeichnis	166
Anhang.....	179
Anhang A: Sekundärstrukturvergleiche der ITS2 nrRNA.....	179
Anhang B: Photographien der Flechten und Photobionten	189
Danksagung	194

1 Einleitung

Flechten besiedeln ein weites Spektrum von Oberflächen, wie z.B. Silikat- und Kalkgestein (vor allem in höheren Lagen extratropischer Regionen), karge Böden (vor allem in der Subarktis), die Rinde von Bäumen (in allen Gebieten der Erde) und Laubblättern (in den Tropen und Subtropen). Die symbiontische Natur der Flechten, bestehend aus mindestens je einem Pilz („Mykobiont“) und einer Alge („Photobiont“), die zusammen eine neue, stabile Struktur, den Flechtenthallus hervorbringen (AHMADJIAN, 1993), hat auf wesentliche Abschnitte in ihrem Lebenszyklus Auswirkungen. So ist es zur Bildung eines Flechtenthallus nötig, dass kompatible Bionten aufeinandertreffen. Aber nur von einer Minderheit der Flechten ist bisher die Artzugehörigkeit des Algenpartners bekannt. Dementsprechend gering ist die Kenntnis der möglichen Kombinationen von Pilzen und Algen, die Flechten bilden können, und davon, welche Faktoren für eventuell unterschiedliche Kombinationen verantwortlich sind. Oft sind in der Flechtensymbiose sogar mehr als zwei Partner beteiligt, wie zum Beispiel bei cephalodiaten Grünalgenflechten oder bei lichenicolen Pilzen und Flechten. In letzterem Fall stellt sich die Frage, ob die lichenicole Flechte den Photobionten der Wirtsflechte übernimmt oder einen anderen Photobionten bevorzugt. Ähnliche Fragestellungen ergeben sich bei der Betrachtung ganzer Gemeinschaften. So ist zum Beispiel gänzlich unbekannt, ob in eine Flechtengemeinschaft neu hinzukommende, aposymbiontische Mykobionten die Photobionten bereits etablierter Flechtenthalli übernehmen können oder nur mit freilebenden, d.h. aposymbiontisch vorkommenden Photobionten einen Thallus bilden. Die hier dargestellten Studien zielen auf ein besseres Verständnis der Biodiversität und Dynamik innerhalb der Lebensgemeinschaften von Flechten, die global einen beträchtlichen Anteil terrestrischer Habitats einnehmen.

1.1 Aktueller Kenntnisstand

1.1.1 Der Habitus der Flechte

In den meisten Fällen von Flechtensymbiosen bestimmt der Pilzpartner das äußere Erscheinungsbild dieser zusammengesetzten Organismen. Ausnahmen sind filamentöse Gattungen wie *Coenogonium*, *Ephebe*, *Cystocoleus* oder *Racodium*, bei denen der Photobiont den größeren Einfluss auf die Thallusform hat (BÜDEL & SCHEIDEGGER, 1996). Makroskopisch erkennbare Unterschiede der Thallusstruktur aufgrund unterschiedlicher Photobionten bei ein- und derselben Mykobionten-Art sind nur selten und ausschließlich für phylogenetisch fern stehende Photobionten dokumentiert. Zwei Beispiele hierfür sind die Artenpaare *Sticta filix* (SW.) NYL. und *Dendriscoaulon* spp. beziehungsweise *Sticta canariensis* (ACH.) BORY ex DELISE und *Sticta dufourii* DELISE, die jeweils als eigenständige Arten beschrieben worden sind. Im ersten genannten Paar von Flechtentaxa zeigt die Wuchsform große Unterschiede. Während der Thallus von *Sticta* blättrig ist, ist jener von *Dendriscoaulon* strauchig. Beim zweiten genannten Paar sind beide blättrig. Da bei diesen Beispielen Übergangsformen mit jeweils beiden Photobionten beobachtet wurden, konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass beide „Arten“ von ein und demselben Mykobionten gebildet werden, jedoch im jeweils ersteren Fall mit einer coccalen Grünalge („Phycobiont“), im zweiten Fall mit einem Cyanobakterium („Cyanobiont“) als Algenpartner (JAMES & HENSSEN, 1976). Ebenso konnten ARMALEO &

CLERC (1991) durch molekulare Untersuchungen bestätigen, dass *Sticta canariensis* und *Sticta dufourii* sehr nahe verwandte (vermutlich zu ein und derselben Art gehörende) Mykobionten besitzen. Für die beiden verschiedenen Formen aus dem gleichen Myko- aber unterschiedlichen Photobionten (Phyco- bzw. Cyanobiont) wird der Name *Sticta canariensis* benutzt, da sich die Systematik der Flechten nur nach dem Mykobionten richtet (ICBN [Saint Louis Code]: GREUTER et al., 2000: Art. 13.1.d).

Bilden verschiedene Mykobionten-Arten mit dergleichen Photobionten-Art eine Symbiose, so entstehen morphologisch verschiedene Flechten. *Trebouxia simplex* TSCHERM.-WOESS wurde als Photobiont unter anderem aus den Flechtenarten *Allocetraria oakesiana* (TUCK.) RANDLANE & A.THELL, *Cetraria cucullata* (BELLARDI) ACH., *Hypogymnia physodes* (L.) NYL., *Melanelia exasperatula* (NYL.) ESSL., *M. glabratula* (SCHAER.) ESSL., *P. saxatilis* (L.) ACH. und *Pseudevernea furfuracea* (L.) ZOPF isoliert (FRIEDL, 1989b). Der Phycobiont ist in diesen Fällen bezüglich des Mykobionten nur wenig selektiv, da er in verschiedenen Flechtenarten einer Familie (Parmeliaceae) vorkommt. Einige Mykobionten sind offensichtlich ebenfalls nicht selektiv, da für einige Mykobionten-Arten nachgewiesen werden konnte, dass sie mit verschiedenen Photobionten-Arten eine symbiontische Beziehung eingehen, d.h. Flechten bilden, die keine erkennbaren Unterschiede im Habitus aufweisen. Solche Beziehungen können auch auf bestimmte Entwicklungsstadien begrenzt sein. So ist zum Beispiel *Diploschistes muscorum* (SCOP.) R.SANT. zunächst mit dem Photobionten der zuerst besiedelten *Cladonia*-Art (*Asterochloris irregularis* (CHODAT) T.FRIEDL) und im nicht-lichenicolen Adultzustand mit *Trebouxia showmanii* (HILDRETH & AHMADJIAN) G.GÄRTNER assoziiert (FRIEDL, 1987). Es gibt aber auch Beispiele unterschiedlicher Photobiontenwahl, die von geographischen Faktoren bestimmt sein könnte, so bei *Parmelia saxatilis*, in deren Thalli je nach Lokalität entweder *Trebouxia arboricola* PUYM., *T. simplex* oder *Asterochloris irregularis* als Photobionten nachgewiesen werden konnten (FRIEDL, 1989b). Im Gegensatz hierzu gibt es aber auch viele Mykobionten, die bezüglich der Wahl ihres Photobionten sehr selektiv sind. TSCHERMAK-WOESS (1988a) vermutete, dass bei den meisten Mykobionten eine Selektivität bezüglich des Photobionten (zumindest auf Gattungsebene) vorhanden sei. Der erste und bisher eindrucksvollste Beleg einer derartigen Selektivität gelang TSCHERMAK-WOESS (1995), die in über 150 untersuchten Thalli von *Phlyctis argena* (SPRENG.) FLOT. aus Europa und Nordamerika stets dieselbe Phycobionten-Art, *Dictyochloropsis splendida* GEITLER nachwies. Dies scheint vor allem für die höher entwickelten Laub- und Strauchflechten zu gelten, wie man zum Beispiel aus den Untersuchungen an den Parmeliaceae durch FRIEDL (1989b) schließen kann, der in dieser Familie ausschließlich Phycobionten der Gattung *Trebouxia* nachweisen konnte. Allerdings haben neuere Erkenntnisse gezeigt, dass die Gattung *Trebouxia* in zwei Gattungen aufgeteilt werden muss (FRIEDL in RAMBOLD et al., 1998). Die meisten Parmeliaceae besitzen einen zu *Trebouxia* sensu stricto gehörenden Algenpartner, während die zu *Asterochloris* gehörenden Nachweise noch einmal verifiziert werden sollten (RAMBOLD et al., 1998). Bei Krustenflechten dagegen scheint in manchen Fällen die Selektivität des Mykobionten bezüglich des Photobionten auf Gattungsniveau weit geringer ausgeprägt zu sein, so z.B. in der Gattung *Chaenotheca* (TIBELL, 1987). Um bezüglich der Selektivität von Myko- und Photobionten mehr Klarheit zu schaffen, scheint es daher unumgänglich, breiter angelegte Untersuchungen durchzuführen, zumal sich bisher kein einheitliches Bild abzeichnet und folglich noch keine verallgemeinernden Aussagen möglich sind.

Da die Algen den Pilzpartner mit Kohlenhydraten versorgen, sind erstere als der Wirtsorganismus anzusehen (KAPPEN, 1993). Ob überhaupt und wenn ja, welche Vorteile den Photobionten aus Flechtensymbiosen entstehen, ist zur Zeit noch nicht geklärt, da ein Stofffluss vom Myko- zum Photobionten bisher noch nicht nachzuweisen war (HONEGGER, 2001). Auch eine Schutzwirkung durch den Mykobionten scheint geringer als bisher angenommen (KAPPEN, 1994). So konnte zwar gezeigt werden, dass sogenannte sekundäre Flechtenstoffe, wie z.B. das Parietin in *Xanthoria parietina* (L.) TH.FR., den Photobionten vor allzu hohen Strahlendosen schützen (SOLHAUG & GAUSLAA, 1996), dies kann aber nicht für alle Fälle von Lichenisierung angenommen werden (GAUSLAA & SOLHAUG, 2001). Man könnte das Verhältnis der beiden Flechtenbionten somit auch als „kontrollierten Parasitismus“ bezeichnen (AHMADJIAN, 1993), eine Annahme, die der von SCHWENDENER (1869), dem Entdecker der Doppelnatur der Flechten, sehr nahe kommt. Andererseits sind die beteiligten Partner der Flechten-Symbiose (im Sinne des langfristigen Zusammenlebens von Organismen, die nicht derselben Art angehören; DEBARY, 1879) imstande, Biotope zu besiedeln, die sie einzeln, wenn überhaupt, bei weitem nicht so effektiv besiedeln könnten, und in denen Pflanzen kaum eine Existenzmöglichkeit haben (KAPPEN, 1993). Folglich besitzt das Verhältnis der beiden Symbionten zumindest auch eine mutualistische Komponente.

Die Kenntnisse bezüglich der systematischen Stellung der Photobionten sind sehr viel geringer als für die Mykobionten, da der Photobiont, wie bereits dargelegt, nur selten einen morphogenetischen Einfluss besitzt und die zu seiner genauen Bestimmung nötige Isolation und Kultur technisch aufwendig sind. Die Gattungszugehörigkeit des Photobionten ist zwar meist bekannt, die Artzugehörigkeit jedoch nur bei 3% der Flechten (HONEGGER, 1996). Gemessen an ihrer Bedeutung – zur Bildung einer Flechte ist der Photobiont unverzichtbar – ist dies eine erstaunlich geringe Zahl. Erfreulicherweise rückt der Photobiont in den letzten Jahren zunehmend in das Zentrum lichenologischer Forschung, insbesondere seit phylogenetische Zuordnungen mittels molekularbiologischer Methoden die morphologischen Untersuchungen ergänzen. Bisher wurden etwa 100 Arten von Cyanobakterien (ca. 10% aller Photobionten) und eukaryotischen Algen (ca. 90% aller Photobionten), die sich auf ca. 40 Gattungen verteilen, als Photobionten nachgewiesen (TSCHERMAK-WOESS, 1988a; HONEGGER, 1996). TSCHERMAK-WOESS (loc. cit.) vermutet, dass diese Zahl nur einen kleinen Teil der real lichenisierten Algenarten repräsentiert. Weitere Analysen der Photobionten von Flechten sind erforderlich, besonders bei den bisher verhältnismäßig wenig untersuchten Krustenflechten. Auf diese Flechtengruppe wurde in der vorliegenden Arbeit deshalb der Schwerpunkt gelegt.

1.1.2 Reproduktionsmechanismen bei Flechten

Eine gleichzeitige Verbreitung beider Partner einer Flechte kann nur durch Fragmentation des Thallus oder durch spezielle Verbreitungseinheiten, den Isidien und den Soredien erfolgen. Findet sie jedoch unabhängig voneinander durch Sporen statt, ist für die Etablierung eines Flechtenthallus der Vorgang der Relichenisierung nötig (siehe Abb. 1). Bei Flechten können Sporen auf zwei prinzipiell unterschiedlichen Wegen gebildet werden: auf dem vegetativen oder generativen Weg. Beide Möglichkeiten besitzt nur der Mykobiont, während der Photobiont sich vermutlich überwiegend vegetativ vermehrt. Einen Hinweis hierzu geben frühere Einzelbeobachtungen von Gametenfusionen (AHMADJIAN, 1967; GALLÉ, 1968), die in späteren Untersuchungen jedoch nicht bestätigt werden konnten (ETTL & GÄRTNER, 1984, FRIEDL & GÄRTNER, 1988, GÄRTNER, 1985a, b,

diese Arbeit). Vermehrt sich der Mykobiont durch Sporen, so muss er nach der Sporenkeimung zur Bildung eines neuen Flechtenthallus zunächst einen geeigneten Photobionten finden, was sehr vom Zufall abhängig ist, da zumindest Arten der nach AHMADJIAN (1982) wichtigsten eukaryotischen Photobionten-Gattung *Trebouxia*, in der Regel nicht – oder zumindest nur sehr spärlich – frei in der Natur vorkommen (TSCHERMAK-WOESS, 1978a, AHMADJIAN, 1988). SCOTT (1971) hat die Wahrscheinlichkeit, dass eine auskeimende Ascospore einen geeigneten Photobionten findet, auf ein Verhältnis von nur eins zu mehreren Millionen geschätzt. Dieses Problem der nötigen Findung der beiden zueinander kompatiblen Flechtenkomponenten, die vor allem für den Mykobionten – als obligat heterotrophen Organismus – essentiell ist, kann auf zwei unterschiedliche Weisen umgangen werden. Zum einen durch eine temporäre und nur lockere Assoziation der auskeimenden Pilzhyphe mit ubiquitären, freilebenden Bodenalgeln, wie dies von OTT (1987a) am Beispiel von *Xanthoria parietina* und Bodenalgeln der Gattung *Apatococcus* (= *Pleurococcus*) angenommen wurde. Durch solche Assoziationen kann der Mykobiont vorübergehend mit Energie versorgt werden bis er auf einen geeigneten Photobionten trifft. Letzteres dürfte ein zufälliger Prozess sein, wie Studien an Frühstadien der Mykobionten von *Lecanora dispersa* (PERS.) SOMMERF., *Acarospora fuscata* (NYL.) ARNOLD und *Cladonia rangiferina* (L.) F.H.WIGG. zeigen, die kein gerichtetes Wachstum auf die Kolonien ihrer Photobionten erkennen lassen (AHMADJIAN, 1960b). Die Möglichkeit zur Bildung eines ausgedehnten Prothallus und lockerer Assoziation mit Bodenalgeln besitzen aber keineswegs alle Flechtenpilze, wie CLAYDEN (1998) an *Rhizocarpon lecanorinum* ANDERS gezeigt hat. Die Neulichenisierung könnte andererseits auch durch die Keimung auf anderen Flechten erreicht werden, falls es dem neu auskeimenden Mykobionten gelingt, die Photobionten dieser Flechten zu übernehmen. Die Größe der Wirtsflechte dürfte dabei keine Rolle spielen. Als Algenquellen könnten also durchaus auch Soredien, Isidien (AHMADJIAN, 1960b; AHMADJIAN, 1993) oder von Tieren verschleppte oder verwehte Thallusfragmente dienen. Im Fall einer Übernahme des Photobionten aus einem lichenisierten Thallus(-fragment) darf die Keimung der Ascospore jedoch nicht durch Sekundärmetabolite der Wirtsflechte blockiert werden, wie dies für Ascosporen von *Xanthoria parietina* im Bezug auf Substanzen von *Hypogymnia physodes* und *Ochrolechia parella* (L.) A.MASSAL. nachgewiesen worden ist (PYATT, 1969; nach PYATT, 1973). Auch einige Nährstoffe (wie z.B. Glukose) können bei manchen Flechtenarten die Sporenkeimung hemmen (YAMAMOTO et al., 1998).

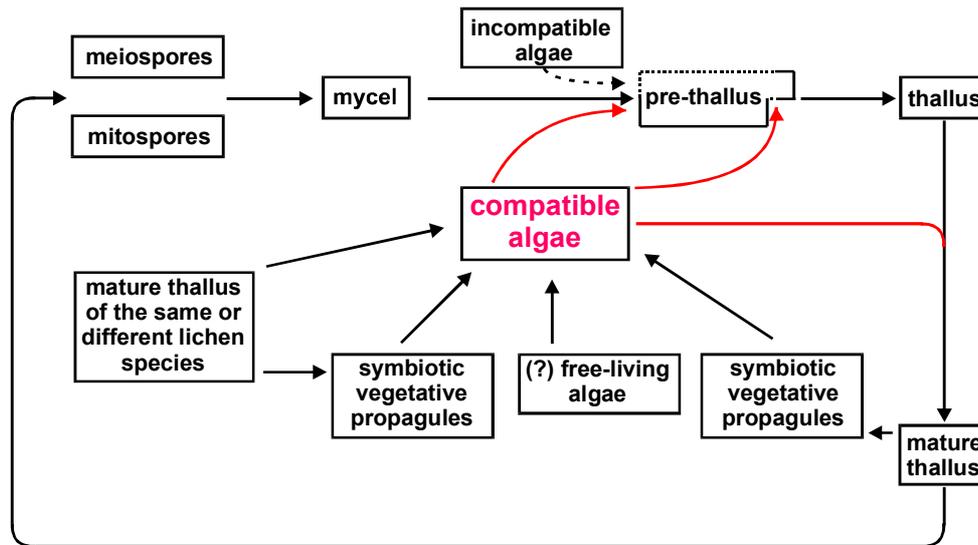


Abb. 1: Lebenszyklus eines Flechtenpilzes unter besonderer Berücksichtigung des möglichen Erwerbs von kompatiblen Photobionten (nach BECK et al., 1998, verändert).

Eine mögliche Koevolution der beiden Partner einer Flechtensymbiose hätte einen Einfluss auf die Relichenisierung, weil diese einerseits zu einer besseren Anpassung, andererseits aber zur zunehmenden gegenseitigen Abhängigkeit der beiden Partner führen würde. Eine solche Abhängigkeit würde die Wahrscheinlichkeit einer Neulichenisierung drastisch verringern, da die benötigte Alge ohne Mykobiont noch schlechter gegen andere, epiphytische Algen kompetieren könnte, also noch seltener frei anzutreffen wäre. Wäre der Selektionswert der Meiose (und somit der Nutzen einer Rekombination des Genoms) des Mykobionten geringer als eine Optimierung des symbiontischen Verhältnisses, dann könnte dies zu einer Förderung der vegetativen Fortpflanzung der Flechte führen (d.h. vor allem zur Bildung von Soredien und Isidien). Wenn jedoch die Neukombination des Erbguts von entscheidender Bedeutung wäre (wie dies in instabilen Habitaten zu erwarten ist), könnte der Evolutionsdruck eine gegenseitige Abhängigkeit weniger begünstigen, um Neulichenisierungen zu erleichtern. Es ist folglich davon auszugehen, dass der jeweilige Selektionswert von den Standortpräferenzen der Flechtenart abhängig ist.

Anzahl und Art der an einem Standort vorhandenen Photobionten hängt einerseits vom Spektrum freilebend vorkommender, potentieller Photobionten, andererseits von am Standort verfügbaren, vegetativen Verbreitungseinheiten von Flechten (z.B. Soredien und Isidien) ab. Die Gesamtheit aller vorhandenen Photobionten bestimmt, welche der sich nur generativ vermehrenden Flechten sich neben solchen, die auch vegetative Verbreitungseinheiten besitzen, in einer Gemeinschaft etablieren und zur Sukzession einer Gemeinschaft beitragen können. Somit ist die Frage nach dem Photobiontenspektrum einer Gemeinschaft auch aus flechtensoziologischen Gesichtspunkten interessant. Da außerdem festgestellt wurde, dass verwandte Flechten ähnliche ökologische Ansprüche haben (WIRTH, 1983) und einzelne Gesellschaften oft von verwandten Arten der Mykobionten dominiert werden (RAMBOLD et al., 1992), ist es denkbar, dass auch verwandte Photobionten vorherrschen, da verwandte Mykobionten möglicherweise mit phylogenetisch sich nahestehenden Photobionten assoziiert sind. Es scheint aber auch möglich, dass verwandte Mykobionten nur aufgrund des gemeinsamen Vorkommens an einem Standort dieselben bzw. näher verwandte Photobionten-Arten besitzen. Dieser Fragestellung wurde bisher jedoch kaum nachgegangen (BECK et al., 1998).

1.1.3 Flechtengesellschaften und ihr ökologischer Zeigerwert

Abiotische und biotische Faktoren des Umfelds bzw. der Lebensbedingungen einer Flechte spiegeln sich in der Artenzusammensetzung der Flechtengesellschaft, der sie entnommen wurde, wider. Die möglichen Einflüsse biotischer Faktoren wurden bereits oben ausgeführt, die abiotischen Faktoren dürften durch ihre wachstumsfördernden oder -hemmenden Effekte die Verbreitung – und damit die Verfügbarkeit – der Flechtenalgen bedingen. Somit sollte es möglich sein, das Photobionteninventar von Flechten auch in Bezug zu diesen autökologischen Faktoren zu setzen, was insbesondere von Bedeutung ist, wenn unterschiedliche Photobionten der gleichen Flechtenart an unterschiedlichen Standorten nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang sind auch die Ursache-Wirkung-Beziehungen zwischen Phytozönosen und ihrem Standort von Interesse, deren Klärung ein Ziel der Synökologie ist (DIERBEN, 1990). Hierbei sind klimatische, edaphische und biotische Faktoren zu berücksichtigen. Da diese oft nur mit sehr hohem Aufwand zu bestimmen sind, gibt es nur wenige gut abgesicherte Untersuchungen davon, welche Standortfaktoren für die Ausbildung eines bestimmten Vegetationstyps verantwortlich sind. Als Beispiel eines Standortfaktors für Flechtengesellschaften mag das Substrat dienen, das z.B. je nach Kalkgehalt, die Entstehung unterschiedlicher Gesellschaften bedingen kann. Im Falle schwermetallreicher Substrate unterscheiden sich saure und leicht basische Gesteine in ihrem Flechtenbewuchs (*Acarosporion sinopicae* / *Lecideion inopis*), wobei diese Verbände aus Gemeinschaften bestehen, die nach ihrer Regenexposition unterschieden werden können und unterschiedliche Flechtenarten beherbergen (WIRTH, 1972, PURVIS & HALLS, 1996; siehe Kapitel „Soziologische Untersuchungen“; Seite 69). Dieses Beispiel macht deutlich, wie die einzelnen Umweltfaktoren ineinander greifen und durch Angabe der Zusammensetzung der beobachteten Flechtengemeinschaft spezifiziert werden können.

1.1.4 Flechten und Schwermetalle

Bisher ist zwar nicht bekannt, ob Flechten für ihr Wachstum die selben essentiellen Elemente benötigen wie höhere Pflanzen. Dies kann aber vermutet werden, denn Flechten unbelasteter Standorte besitzen ähnliche Mengen dieser Elemente wie die Pflanzen (NIEBOER et al., 1978). Unter den essentiellen Mikronährelementen sind auch viele Schwermetalle (z.B. Fe, Cu, Zn, Co, Ni), die in größeren Konzentrationen stark toxisch sind (siehe z.B. MOHAN, 1998). Einige Flechten sind jedoch in der Lage, Schwermetallkonzentrationen im Substrat zu tolerieren, die für die meisten Organismen kein Überleben zulassen (NOESKE et al., 1970). Daher ist die Fähigkeit von Flechten, auf schwermetallhaltigen Substraten – und in intensivem Kontakt zu diesen – zu wachsen, sehr bemerkenswert, hat schon früh die Aufmerksamkeit von Forschern auf sich gezogen und ist relativ gut dokumentiert. So berichtet bereits ACHARIUS (1799) von rostrot gefärbten Arten mancher eisenreicher Gesteine und vermutet, dass die Färbung der Flechten *Rhizocarpon oederi* (WEBER) KÖRB. (= *Lichen oederi*) und *Lecidea silacea* ACH. (= *Lichen silaceus*) durch das Eisen herrührt. Auch der Gehalt von Schwermetallen und deren Verteilung im Flechtenthallus wurden untersucht (z.B. TOBLER, 1925, LANGE & ZIEGLER, 1963). Die Flechten dieser eisenreichen Substrate sind demzufolge relativ gut bekannt. Die häufigsten Gattungen dieser Substrate sind *Acarospora*, *Aspicilia*, *Bellemeria*, *Cladonia*, *Lecanora*, *Lecidea*, *Porpidia*, *Rhizocarpon*, *Stereocaulon* und *Tremolecia* (NASH, 1989). Auch die Soziologie dieser Gemeinschaften wurde in letzter Zeit eingehend untersucht und verbessert (PURVIS & HALLS, 1996). Wichtige Beispiele derartiger Gemeinschaften sind

das *Acarosporium sinopicae* und das *Lecideetum inopis*. Erstere wird auf Gestein mit hohem Schwermetallgehalt (vor allem Fe und Cu) und ohne löslichem Ca^{2+} angetroffen (WIRTH, 1972), während letztere charakteristisch für Substrate mit hoher Cu-Konzentration und nicht stark saurem pH ist (z.B. wenn Karbonate anwesend sind; PURVIS & HALLS, 1996). Die auf diesen Substraten vorkommenden Flechten können in zwei Gruppen geteilt werden. Ein Teil der Flechten kann zwar auf schwermetallhaltigem Substrat wachsen, ist aber ebenso auf Gesteinen ohne (zugängliche) Schwermetalle zu finden. Beispiele hierfür sind *Bellemerea alpina* (SOMMERF.) CLAUZADE & CL.ROUX, *Lecanora polytropa* (HOFFM.) RABENH., *Lecidea lapicida* (ACH.) ACH., *Pleopsidium chlorophanum* (WAHLENB.) ZOPF und *Umbilicaria cylindrica* (L.) DEL. ex DUBY. Der andere Teil der Flechten umfasst echt chalkophile Arten („Metallophyten“) und besitzt also eine enge Bindung an schwermetallhaltige Substrate. Beispiele hierfür sind *Acarospora rugulosa* KÖRB., *A. sinopica* (WAHLENB.) KÖRB., *Lecanora epanora* (HEPP) TH.FR., *L. subaurea* ZAHLBR., *Lecidea inops* TH.FR., *L. silacea*, *Psilolechia leprosa* COPPINS & PURVIS und *Rhizocarpon ridescens* (NYL.) ZAHLBR. In beiden Gruppen finden sich Vertreter mit einem Schwermetallgehalt im Thallus von bis zu mehreren Prozent. So wurde z.B. bei *Acarospora rugulosa* und *Lecidea lapicida* (= *L. theiodes*; PURVIS 1984), und bei *Acarospora smaragdula* (WAHLENB.) A.MASSAL. und *Lecidea lapicida* (= *L. lactea*; PURVIS et al., 1987) jeweils etwa 5% des Trockengewichts an Kupfer nachgewiesen. HUNECK et al. (1990) geben für *A. smaragdula* und *Miriquidica griseoatra* (FLOT.) HERTEL & RAMBOLD (= *Lecidea griseoatra*) 3% bzw. 2% Kupfer im Trockengewicht an, *Pleopsidium chlorophanum* besaß über 1% Kupfer (CZEHURA, 1977). Ähnliche Werte werden für den Eisengehalt angegeben, z.B. 3–6% in *Acarospora sinopica*, 1,5% in *A. smaragdula*, 4,5% in *Lecanora epanora*, 1,5% in *Porpidia macrocarpa* (DC.) HERTEL & A.J.SCHWAB (= *Lecidea macrocarpa*) und 4,5% in *Stereocaulon vesuvianum* PERS. (LANGE & ZIEGLER, 1963). Die Schwermetalle sind im Flechtenthallus außerhalb der Zellen festgelegt und daher größtenteils physiologisch inaktiv. So kommt das Eisen als Eisenoxid oder in maskierter Form im Flechtenthallus vor (WEBER, 1962, LANGE & ZIEGLER, 1963, NOESKE et al., 1970). PURVIS (1984) wies in *Acarospora rugulosa* und *Lecidea lapicida* (= *L. theiodes*) nach, dass das meiste Kupfer als Cu-Oxalatkristalle um die Pilzhyphen vorliegt. Es wird daher davon ausgegangen, dass der Mykobiont das Cu durch die Bildung von Oxalat unschädlich macht. Dennoch ist offensichtlich die Anwesenheit von Oxalat für die Cu-Oxalat-Bildung nicht ausreichend, wie eine auf stark Cu-haltigen Substrat wachsende und viel Ca-Oxalat besitzende *Aspicilia mashiginensis* (ZAHLBR.) OXNER beweist (PURVIS, 1996). Auch Melanine können Schwermetalle binden (FOGARTY & TOBIN, 1996) und in bestimmten Thallusbereichen, z.B. im Apothecienrand, festgelegt werden (PURVIS et al., 2000). Ebenso sind sekundäre Flechtenstoffe wie Norstictin- und Psoromsäure wichtige Komplexbildner bei Kupfer-hyperakkumulierenden Flechten (PURVIS et al., 1987, PURVIS et al., 1990). Die Wichtigkeit dieser sekundären Flechtenstoffe für die Kupfer-Akkumulation belegt das Beispiel von *Lecidea lapicida* var. *lapicida* / *Lecidea lapicida* var. *pantherina* (= *L. lactea*), die sich darin unterscheiden, dass erstere Stictinsäure, letztere Norstictinsäure besitzt. Diese Substanzen differieren nur in der Methylierung einer Aldehyd-Gruppe der Norstictinsäure. Diese Änderung bei der Stictinsäure ist aber ausreichend, um eine Cu-Komplexierung zu verhindern. *Lecidea lapicida* var. *lapicida* bildet auch dann keine Cu-Komplexe, wenn sie direkt neben – durch Cu-Norstictinsäure grün gefärbter – *Lecidea lapicida* (ACH.) ACH. var. *pantherina* ACH. wächst, sondern akkumuliert Eisen (PURVIS, 1996). Die Mechanismen der Schwermetallakkumulation in Flechten schließen also neben der Festlegung ganzer

Substratpartikel auch die Lösung der Ionen aus dem Substrat mit anschließender Fällung derselben durch Oxidation, organische Säuren oder sekundäre Flechtenstoffe ein.

Um die mögliche Schwermetallexposition der einzelnen Symbionten von Flechten einschätzen zu können, muss die Verteilung der Schwermetalle im Flechtenthallus betrachtet werden. Generell sind höhere Schwermetallmengen in vom Mykobionten dominierten Thallusbereichen gemessen worden. Die Verteilung ist aber auch von der Flechtenart und vor allem vom betrachteten Metallion abhängig. So zeigten die mikroskopischen Untersuchungen an *Acarospora rugulosa*, *A. sinopica*, *A. smaragdula*, *Lecanora epanora*, *Porpidia macrocarpa* und *Rhizocarpon oederi* im Hypothallus, der Rinde und dem Mark hohe Konzentrationen von Cu, Fe und Pb, dagegen einen deutlich geringeren Schwermetallgehalt in der Algenschicht (LANGE & ZIEGLER, 1963, NOESKE et al., 1970, PURVIS et al., 2000). Im Gegensatz dazu war Zn im Thallus von *A. smaragdula* gleichmäßig verteilt (NOESKE et al., 1970). In den Flechtenthalli von Arten der Gattungen *Cladonia* und *Peltigera* an schwermetallbelasteten Standorten finden sich die Metalle (Fe, Cu, Zn, Cr, Pb, Ni, Mn) bevorzugt in den Rhizinen (GOYAL & SEAWARD, 1981). Im restlichen Thallus findet sich das Fe und Pb vor allem im Mykobionten (2–6-fach erhöht), während in den Photobionten vor allem Cu, Cr und Ni überproportional repräsentiert sind (ca. 4-fach erhöht; GOYAL & SEAWARD, 1981). Es ist also davon auszugehen, dass beide Symbiosepartner den Schwermetallionen ausgesetzt sind und daher in der Lage sein müssen, diese zu tolerieren.

Studien an den physiologischen Auswirkungen einer Schwermetallbelastung, d.h. Untersuchungen der Schwermetalltoleranz, wurden bisher nur an Vertretern der leichter manipulierbaren Blatt- oder Strauchflechten durchgeführt (PURVIS & HALLS, 1996). Da diese allerdings auf stark belasteten Flächen kaum vorkommen (sie werden dort durch Krustenflechten ersetzt), wurden sie auf schwächer belasteten Flächen gesammelt oder auch als Kontrollen von unbelasteten Gebieten verwendet. NASH (1975a, b) untersuchte den Einfluss einer Zn-Schmelze auf die Flechtenvegetation. Die Kontrollarten *Cladonia cristatella* TUCK. und *Lasallia papulosa* (ACH.) LLANO zeigten eine signifikante Photosynthese-Depression bei Behandlung mit 200 µM Zn oder Cd (NASH, 1975a). Die Algen von *Cladonia cristatella* und *Flavoparmelia caperata* (L.) HALE, *Asterochloris erici* (AHMADJIAN) T.FRIEDL (= *Trebouxia erici*) und *Trebouxia anticipata* AHMADJIAN ex P.A.ARCHIBALD zeigten eine signifikante Wachstumshemmung bei 50 µM Zn oder Cd (NASH, loc. cit.). Da die im kontaminierten Gebiet um die Zn-Schmelze vorkommenden *Verrucaria nigrescens* PERS. (2,5% Zn, 334 µg/g Cd) und *Micarea trisepta* (HELLB.) WETMORE (2,3% Zn, 320 µg/g Cd) große Mengen an Schwermetallen enthielten, kann davon ausgegangen werden, dass sie eine Toleranz ausgebildet haben (NASH, loc. cit.), obwohl sie leider nicht direkt untersucht worden sind. BAČKOR et al. (1998a) untersuchten die Schwermetalltoleranz des Algenpartners von *Cladonia mitis* SANDST., die an einer Kupfermine in der Slowakei (Špania dolina) gesammelt wurde. Trotz dieses Standortes lag der Gehalt dieser Flechte an Cu, Cd und Hg nur im oberen Bereich der von NIEBOER et al. (1978) angegebenen Hintergrundswerte. Dennoch zeigten die Photobionten (aufgrund früherer Literaturangaben als *Asterochloris irregularis* [= *T. irregularis*] bezeichnet) eine deutlich höhere Toleranz gegenüber Cadmium als die von NASH (1975a) untersuchten (der EC₅₀-Wert wird mit 0,9 mM angegeben). Für Kupfer wurde ein EC₅₀-Wert von ca. 2 mM bestimmt (dieser war abhängig von der Inkubationsdauer). Auch Flechten mit Cyanobionten wurden untersucht. BROWN & BECKETT (1983) berichten von einer Photosynthesereduktion auf 5–40% der Kontrolle nach einer Behandlung mit 1 mM Zn bei

10 Arten mit Cyanobionten aus den Gattungen *Collema*, *Lichina*, *Lobaria*, *Nephroma*, *Peltigera* und *Sticta*. *Peltigera horizontalis* (HUDS.) BAUMG. zeigt eine Photosynthesereduktion um mehr als 50% nach einer Behandlung mit 100 μM Cd, Cu oder Zn (BROWN & BECKETT, 1983). In Populationen von *Peltigera* führt eine Behandlung mit 100 μM Zn (30 min Eintauchen) zu 12–90% Photosynthesereduktion (BECKETT & BROWN, loc. cit.), die bei den Populationen aus alten Minengebieten geringer war als bei denen von unbelasteten Standorten. Diese Toleranz korrelierte direkt mit der Zn-Konzentration im Thallus. Auch MARTI (1985) kommt in seinen Analysen an isolierten Flechtensymbionten epiphytischer Flechten zu dem Schluss, dass die Flechtenpartner von gegenüber Luftschadstoffen weniger empfindlichen Flechten auch weniger empfindlich auf Sulfit, Nitrit und Zink reagieren.

Es besteht also Grund zu der Vermutung, dass die Photobionten von schwermetalltoleranten Flechten Mechanismen zur Schwermetalltoleranz entwickelt haben. Da diese allerdings bisher noch nicht untersucht worden ist, war es ein Ziel dieser Arbeit, nicht nur die Photobionten zu bestimmen, sondern anhand von ausgewählten Algenklonen auch deren Schwermetalltoleranz zu ermitteln.

1.1.4.1 Physikalisch-chemische Einteilung der Metalle

Schwermetalle, ihrer Definition nach Metalle mit einer höheren Dichte als 4 g/cm^3 bzw. 5 g/cm^3 (Zusammenstellung bei NIEBOER & RICHARDSON, 1980), sind in ihrer biologischen Wirkung heterogen. Dies liegt daran, dass die Dichte eines Elements von seiner Stellung im Periodensystem der Elemente abhängt (Periode und Gruppe), während die chemische Reaktivität, die auch die biologische Wirkung bedingt, im wesentlichen durch die Gruppe bestimmt wird. NIEBOER & RICHARDSON (1980) leiteten aus verschiedenen physikalisch-chemischen Parametern eine Einteilung der Metalle in drei Gruppen ab, die auch aus biologischer Sicht bedeutsam ist: *Class A*, *Class B* und *Borderline*-Metalle. Ionen der Metalle aus den verschiedenen Gruppen bevorzugen unterschiedliche Liganden, entweder O-Atome (*Class A*) oder S-Atome (*Class B*). Die Ionen der *Borderline*-Metalle liegen zwischen diesen beiden Gruppen, ihre genaue Abgrenzung ist aber problematisch, da es einen fließenden Übergang zwischen *Borderline*- und *Class B*-Ionen gibt. Die hauptsächliche Trennlinie verläuft zwischen Ionen dieser beiden Gruppen und *Class A*-Ionen. Dies ist auch daran zu erkennen, dass Ionen desselben Metalls zu unterschiedlichen Gruppen gehören können, nämlich Cu^{2+} zu den *Borderline*- und Cu^+ zu den *Class B*-Ionen. Zu den *Class A*-Metallen gehören die Metalle der ersten beiden Hauptgruppen (außer H), Gruppe IIIA, die Lanthaniden, Actiniden und Al. Die *Borderline*-Metalle umfassen H, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Cd, In, Sn, Sb und Pb, während Cu, Rh, Pd, Ag, Ir, Pt, Au, Hg, Tl und Bi zu den *Class B*-Metallen gehören (NIEBOER & RICHARDSON, 1980). Die meisten Schwermetalle gehören also zu den *Class B*- oder *Borderline*-Metallen. Daher wird davon ausgegangen, dass Kupfer und Cadmium von den Photobionten durch Moleküle mit S-Atomen komplexiert werden. Moleküle, die auf diese Art und Weise der Entgiftung bzw. Toleranz dienen, stehen im Zentrum der physiologischen Experimente dieser Arbeit.

1.1.4.2 Phytochelatine als schwermetallentgiftendes Prinzip in Pflanzen

Als schwermetallentgiftende Peptide wurden bei Pflanzen, Algen und vielen Pilzen die Phytochelatine (Kurzform PC; synonyme Namen sind Cadystin oder Metallothioneine Klasse III) beschrieben (GRILL et al., 1985, GEKELER et al., 1988, GEKELER et al., 1989, RAUSER, 1999). Phytochelatine sind kurze Peptide aus 5–23 Aminosäuren, die aus alternierenden Glutamat- und Cystein-Resten aufgebaut sind und einen terminalen Glycin-Rest besitzen (einige homologe Peptide weisen statt des Glycins β -Alanin, Serin oder Glutamat auf; Abb. 2). Zellkulturen und intakte Pflanzen bilden als Reaktion auf viele toxische Schwermetalle (z.B. Cd, Pb, As, Sb, Hg, Cu, Zn) Phytochelatine (RAUSER, 1999).

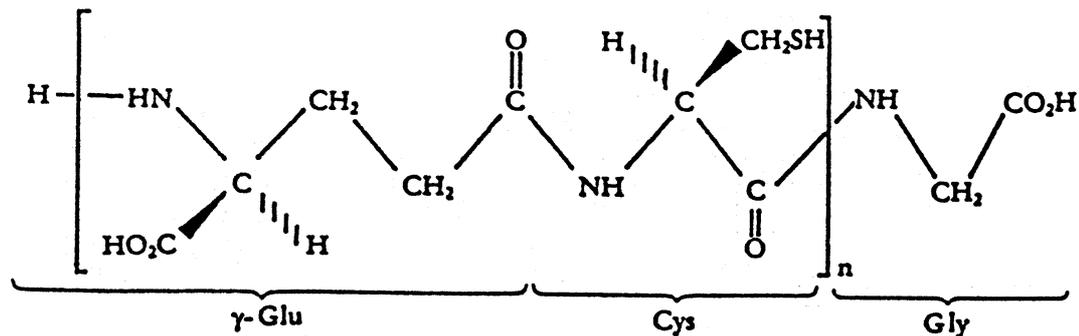


Abb. 2: Strukturformel der Phytochelatine. Die repetitiven γ -Glutamyl-Cysteinyl-Einheiten können $n = 2$ –11 Glieder umfassen.

Aufgrund der ungewöhnlichen Verknüpfung des Glutamats über die γ -Carboxy-Gruppe an das Cystein können diese Peptide nicht an Ribosomen synthetisiert werden, sondern entstehen enzymatisch aus Glutathion. Glutathion (GSH) ist ein Tripeptid (γ -Glu-Cys-Gly); die Struktur entspricht derjenigen der Phytochelatine in Abbildung 2, wobei n gleich eins ist. PC_2 entsteht aus zwei Glutathion-Molekülen, längere Phytochelatine entstehen aus vorhandenen Phytochelatinen und Glutathion. Die Reaktion ist eine Polykondensation von Glutathion unter Austritt von Glycin:



Das Gen, das für die Phytochelatinsynthese codiert, wurde vor kurzem von drei Arbeitsgruppen kloniert (CLEMENS et al., 1999; HA et al., 1999; VATAMANIUK et al., 1999). Durch die hohe Affinität der SH-Gruppen des Cysteins zu Schwermetallen bilden sich Komplexe aus PCs und Schwermetallen, welche durch Sulfid stabilisiert werden (KNEER & ZENK, 1997). Die so gebundenen Schwermetalle können keine anderen Proteine mehr vergiften. Damit erfüllen sie dieselbe Funktion wie die Metallothioneine bei Tieren. Metallothioneine sind kleine, cysteinreiche Proteine, die im Gegensatz zu Phytochelatinen genkodiert sind und an Ribosomen synthetisiert werden. Vor kurzem wurden erstmals auch aus dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* Phytochelatine isoliert (VATAMANIUK et al., 2001). Die strikte Trennung der Vorkommen von Metallothionein in Tieren und Phytochelatinen in Pflanzen kann deshalb nicht aufrechterhalten werden.

Die Flechten des *Acarosporium sinopicae* und *Lecideetum inopis* sind ständig toxischen Konzentrationen von Schwermetallen ausgesetzt. Es stellte sich die Frage, ob bei den Photobionten ähnliche Entgiftungs- und Toleranzmechanismen zu finden wären, wie sie oben dargestellt wurden. Ziel der Experimente war es, zum ersten Mal Phytochelatine in Flechtenalgen nachzuweisen.

1.2 Begriffsklärungen zur Beziehung von Symbiosepartnern

Zur Charakterisierung des Verhältnisses von Symbionten unterscheiden GALUN & BUBRIK (1984) zwischen den Ausdrücken ‚Selektivität‘, mit der Bedeutung ‚bevorzugte Interaktion zwischen Organismen‘, und ‚Spezifität‘, als ‚Zell-Zell-Interaktionen mit absoluter Exklusivität‘. SMITH & DOUGLAS (1987) verstehen unter Spezifität das taxonomische Spektrum an Partnern, mit denen ein Organismus Symbiosen ausbildet. Andere Autoren benutzen diese Begriffe synonym. Daher muss die hier verwendete Terminologie zur Beschreibung der bevorzugten Partnerwahl in Symbiosen geklärt werden.

In der Lichenologie wurde ‚Selektivität‘ bisher nur auf den Mykobionten der Flechte bezogen, aber nicht auf den Photobionten. In einem Klassifikationsschema, welches das gesamte Spektrum an möglichen Interaktionen berücksichtigt, sollte jedoch die Selektivität aller beteiligten Bionten der Symbiose bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wird Selektivität zur Charakterisierung der Interaktion zwischen Organismen aus der Perspektive eines Organismus benutzt. Sie bezeichnet die Größe des Spektrums an Partnern, die von einem Bionten gewählt, d.h. selektiert werden – als dessen Grad an Selektivität. Spezifität wird für das symbiontische System als Ganzes verwendet und hängt daher vom jeweiligen Selektivitätsgrad der beteiligten Bionten ab. Diese Klassifikation von Selektivität und Spezifität kann am besten durch die Darstellung sämtlicher möglicher Konstellationen verdeutlicht werden. In Anlehnung an SMITH & DOUGLAS (1987) können fünf Selektivitäts-Grade unterschieden werden, von sehr hoch: Assoziation mit Organismen desselben Genotyps – bis sehr gering: Assoziation mit Organismen unterschiedlicher Ordnungen oder Klassen (Tab. 1, Abb. 3). Eine korrekte systematische Zuordnung der Symbiosepartner ist daher die Voraussetzung zur Bestimmung ihrer (jeweiligen) Selektivitäts-Grade.

Tab. 1: Definition der Grade der Selektivität (nach BECK et al., 2002, verändert).

Selektivitäts-Grad	Spektrum an akzeptierten Partnern
sehr hoch	innerhalb desselben Genotyps
hoch	innerhalb derselben Art
mittlerer	innerhalb derselben Gattung
gering	innerhalb derselben Ordnung
sehr gering	innerhalb höherer systematischer Gruppierungen

Bildet eine Mykobionten-Art einen Flechtenthallus mit Photobionten, die unterschiedlichen Familien angehören, so besitzt er eine geringe Selektivität. Beispiele hierfür sind vor allem aus der Gattung *Chaenotheca* bekannt. *C. brunneola* (ACH.) MÜLL.ARG. ist an einigen Fundorten in Österreich mit *Dictyochloropsis splendida* assoziiert (TSCHERMAK-WOESS,

1978b), an anderen Stellen in Österreich, aber auch in Costa Rica und Neuseeland, jedoch mit einem trebouxioiden Phycobionten (TIBELL, 1996). Auch *C. chlorella* (ACH.) MÜLL.ARG. (= *C. carthusiae*) ist in Costa Rica mit einer trebouxioiden Alge assoziiert, während dieselbe Art an den anderen untersuchten Stellen der nördlichen Hemisphäre den Flechtenthallus mit *Stichococcus* bildet (TIBELL, 1987). In der Flechte *C. chrysocephala* (TURNER ex ACH.) TH.FR. ist der Algenpartner entweder *Trebouxia* (Trebouxiales, Trebouxiophyceae) oder *Stichococcus* (Ord.: inc. sed., Trebouxiophyceae; TIBELL, 1980). Da auch andere Mykobionten mit denselben Photobionten Flechten bilden können, ist diese Assoziation nicht exklusiv. Die ‚Exklusivität‘ wird also vom Symbiosepartner festgelegt. Ist ein Mykobiont nur mit einer Photobionten-Art lichenisiert, so besitzt er eine hohe Selektivität. *Phlyctis argena* ist ein Beispiel hierfür, da er immer mit *Dictyochloropsis splendida* lichenisiert ist (TSCHERMAK-WOESS, 1995). Dieser Photobiont bildet auch Symbiosen mit anderen Mykobionten, z.B. *Chaenotheca brunneola* (TSCHERMAK-WOESS, 1978b), weshalb die Assoziation als ganzes wenig spezifisch ist.

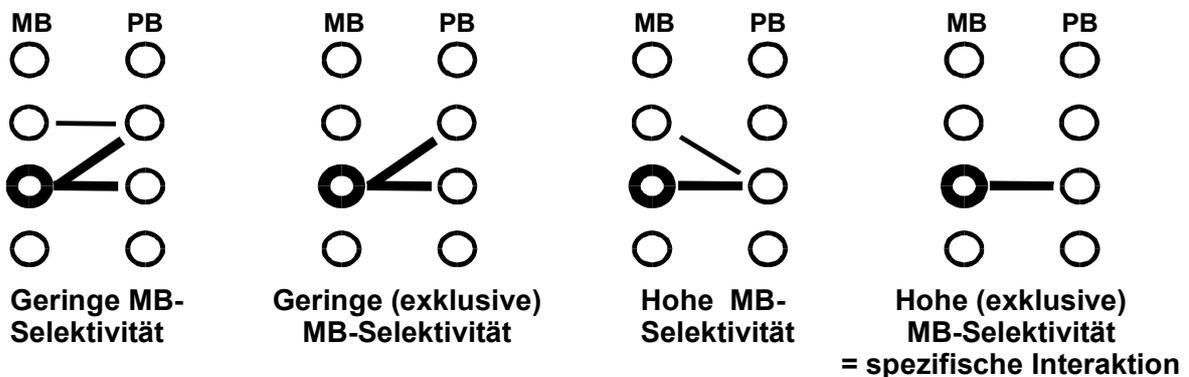


Abb. 3: Schema der Selektivitäts-Grade am Beispiel von Mykobionten-Arten (MB; nach BECK et al., 2002, verändert). Bildet ein MB mit mehreren Photobionten-Arten (PB), die auch mit anderen MB Flechten bilden, eine Flechte, so besitzt er eine geringe Selektivität (links). Bilden die PB nur mit diesem MB Flechten, so zeigt er eine geringe – aber exklusive – Selektivität (Mitte links). Ist an der Flechtenbildung nur ein PB beteiligt, der aber auch mit anderen MB Flechten bildet, so besitzt der MB eine hohe – aber nicht exklusive – Selektivität (Mitte rechts). Bei der spezifischen Interaktion (entspricht einer hohen, exklusiven Selektivität; rechts) bildet der MB mit nur einem PB, der mit keinem anderen MB Flechten bildet, eine Flechte.

Besitzen beide (oder alle) beteiligten Organismen eine hohe Selektivität, so ist die Assoziation spezifisch (Abb. 4). Allerdings ist es nicht möglich ein Beispiel hierfür zu geben, da, wie bereits eingangs erwähnt, nur von 3% der Flechten der Algenpartner bekannt ist (HONEGGER, 1996). Daher wäre es verfrüht, einer Photobionten-Art eine hohe Selektivität zuzuschreiben. Nach den derzeit verfügbaren Daten zu urteilen, besitzen die meisten Photobionten eine geringe Selektivität, so ist z.B. *Trebouxia simplex* mit mehreren lecanoralen Pilzarten vergesellschaftet (BECK, 1999).

Tripartite Assoziationen, wie z.B. cephalodiate Flechten, müssen in drei binäre Beziehungen zerlegt und jede getrennt beurteilt werden.

		Selektivität von Biont 1				
Selektivität von Biont 2		sehr hoch	hoch	mittel	gering	sehr gering
sehr hoch	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">spezifisch</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">mäßig spezifisch</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;">unspezifisch</div>					
hoch						
mittel						
gering						
sehr gering						

Abb. 4: Klassifikation der Spezifität in symbiontischen Systemen (nach BECK et al., 2002, verändert).

Die Kenntnis der Selektivität und Spezifität sind wesentlich, um festzustellen, ob zwei Symbiosepartner eine gemeinsame Evolution durchlaufen haben. Wenn die interagierenden Arten sich gegenseitig in ihrer Evolution beeinflussen, spricht man von Koevolution (JANZEN, 1980). Da koevolutive Prozesse in der Vergangenheit liegen, kann auf eine solche nur durch ihre Auswirkungen, z.B. eine hohe Spezifität der Symbiosepartner, zurückgeschlossen werden. Die Artaufspaltung beider Partner würde aufgrund enger gegenseitiger Beziehungen engste Parallelitäten und kongruente Phylogenien zeigen. Eine solche Kospeziation wäre der überzeugendste Ausdruck von Koevolution. Wenn keine Kospeziation erfolgt ist, kann Koevolution dennoch nicht ausgeschlossen werden. Wenn sich mehrere Partner gegenseitig in ihrer Evolution beeinflussen, sind die auftretenden wechselseitigen Einflüsse und Abhängigkeiten der beteiligten Arten weniger deutlich als bei Kospeziation. Demzufolge spricht man von diffuser Koevolution (THOMPSON, 1999). Koevolution beschreibt nicht nur die enge Beziehung interagierender Organismen sondern kann auch als Mechanismus der Herausbildung neuer Arten verstanden werden. Untersuchungen zur Selektivität in Flechten werden klären, ob koevolutive Prozesse bei Flechten oder in Flechtengruppen aufgetreten sind, denn diese wären nur denkbar, wenn eine hohe Selektivität bei den Symbionten vorläge. Gleichzeitig könnte damit auch geklärt werden, ob Photobionten als Verwandtschaftsanzeiger ihrer Mykobionten verwendet werden können, wie von RAMBOLD et al. (1998) vorgeschlagen worden ist.

1.3 Hypothesenentwicklung

Untersuchungen zur Selektivität einzelner Mykobionten-Arten und ihrer Photobionten-Arten sollten das Augenmerk auf folgende Aspekte legen: a) Screening der Photobionten in einzelnen Flechtenthalli, b) in Flechtenpopulationen und c) Analyse der verwandtschaftlichen Beziehungen (der Myko- und Photobionten). Analysen einzelner Mykobionten-Arten können im lokalen oder globalen Maßstab durchgeführt werden. Auf lokaler Ebene können Unterschiede zwischen Populationen der Mykobionten erarbeitet werden. Um die Selektivität von Mykobionten zu analysieren, müssen die Photobionten auf globaler Stufe erforscht werden, möglichst bezogen auf unterschiedlichste Habitate, in welchen die jeweiligen Flechten vorkommen. Derartige Studien, basierend auf morphologischen Charakteristika, wurden zuerst an *Phlyctis argena* durchgeführt (TSCHERMAK-WOESS, 1995). Gegenwärtig wird derartigen Fragestellungen in mehreren Arbeitsgruppen mit molekularen Techniken nachgegangen. KROKEN & TAYLOR (2000) zeigten die Selektivität in der Photobiontenwahl bei der Gattung *Letharia*.

Durch die Analyse ganzer Flechtengesellschaften lassen sich, wie in der vorliegenden Arbeit, mögliche Umwelteinflüsse auf die Photobiontenwahl feststellen. Benachbart wachsende Flechten könnten denselben Photobionten besitzen, was sich nur nachweisen lässt, wenn sämtliche Flechtenarten oder -thalli einer Gemeinschaft diesbezüglich untersucht werden (z.B. BECK et al., 1998, BECK, 1999). Solche Aufstellungen sind besonders wichtig, um Relichenisierungsprozesse in „gesättigten“ Gesellschaften nachzuvollziehen, in denen vorhandene Flechtenthalli als Photobiontenquellen für hinzukommende Mykobiontensporen dienen könnten.

Um die Relichenisierungsprozesse besser zu verstehen, sind außerdem Populationsstudien erforderlich (z.B. BECK et al., 2002). Sporenkeimungsexperimente geben dabei wichtige Hinweise über Besiedlungsmöglichkeiten von biologischen und nichtbiologischen Substraten. Resynthesen von Flechten mit den ursprünglichen Symbionten, aber auch mit verschiedenen Myko- und Photobionten-Stämmen, geben Aufschluss über das potentielle Spektrum kompatibler Symbiosepartner.

Zur Festlegung der Spezifität einer Symbiose müssen viele verschiedene (idealerweise alle) Flechtenarten untersucht werden. Nur so kann geprüft werden, welche Symbionten exklusiv miteinander vergesellschaftet sind. Aufgrund der hohen zu bearbeitenden Flechtenartenzahl kann jeweils nur eine kleine Anzahl von Thalli analysiert werden. Ein mögliches Ergebnis derartiger Untersuchungen ist die perfekte Koevolution, die zur Kospeziation führt („Kospeziationshypothese“). Wenn Kospeziation stattgefunden hat, kann sie durch kongruente Myko- und Photobionten-Phylogenien dargestellt werden (Abb. 5).

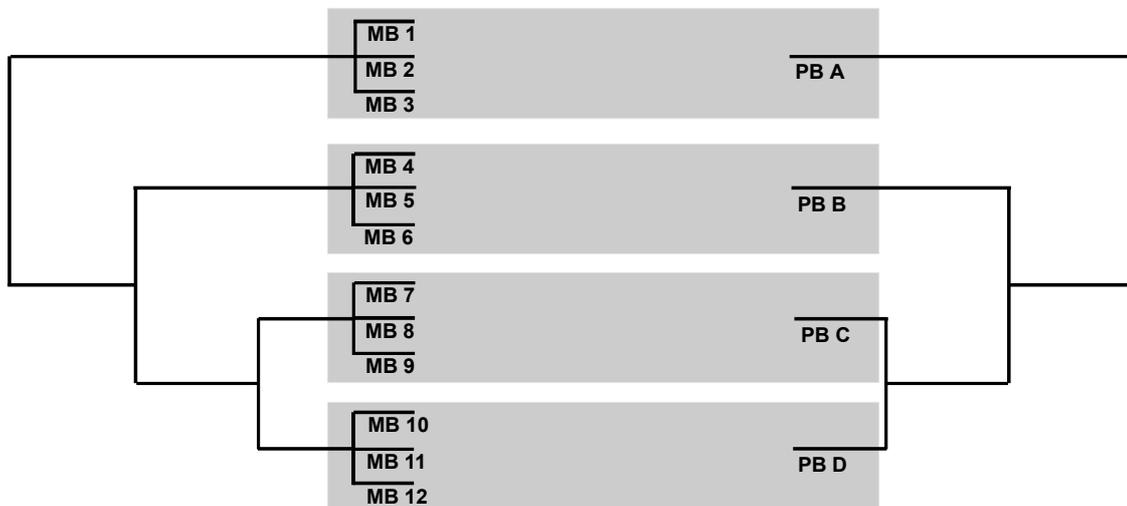


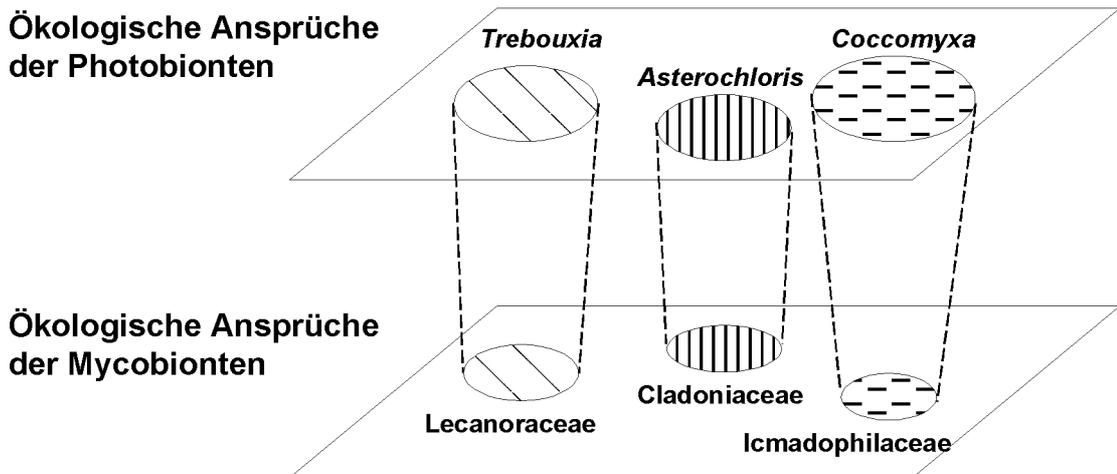
Abb. 5: Schema für Koevolution zwischen Myko- (MB) und Photobiont (PB) von Flechten, die zu Kospeziation geführt hat (aus BECK et al., 2002).

Es sind noch nicht genug Daten vorhanden, um festzustellen, ob derartige Szenarien auch für bestimmte Flechtengruppen gelten. Bei Verwandtschaftskreisen mit bisher besser bekannten Photobionten dürfte dies jedenfalls nicht der Fall sein. So ist z.B. die Gattung *Coccomyxa* (Trebouxiophyceae) als Photobiont in den Familien Icmadophilaceae, Peltigeraceae, Clavariaceae (*Multiclavula*) und Tricholomataceae (*Omphalina*) bekannt. Kospeziation kann in diesen Gruppen nicht stattgefunden haben, da hier entfernt verwandte

Mykobionten (Ascomycota / Basidiomycota) mit Photobionten einer Gattung lichenisiert sind.

Die Selektivität von Flechtenbionten könnten auch durch Umweltfaktoren beeinflusst sein („Habitatshypothese“). Möglicherweise sind manche alte, aber auch rezente Beziehungen zwischen Myko- und Photobionten durch ähnliche ökologische Präferenzen der Symbionten bedingt (Abb. 6A). In diesem Fall könnten die Phylogenien der Myko- und Photobionten durchaus inkongruent sein (Abb. 6B). Es wird eine wichtige Aufgabe zukünftiger Studien sein, diese Präferenzen genauer zu charakterisieren.

A



B

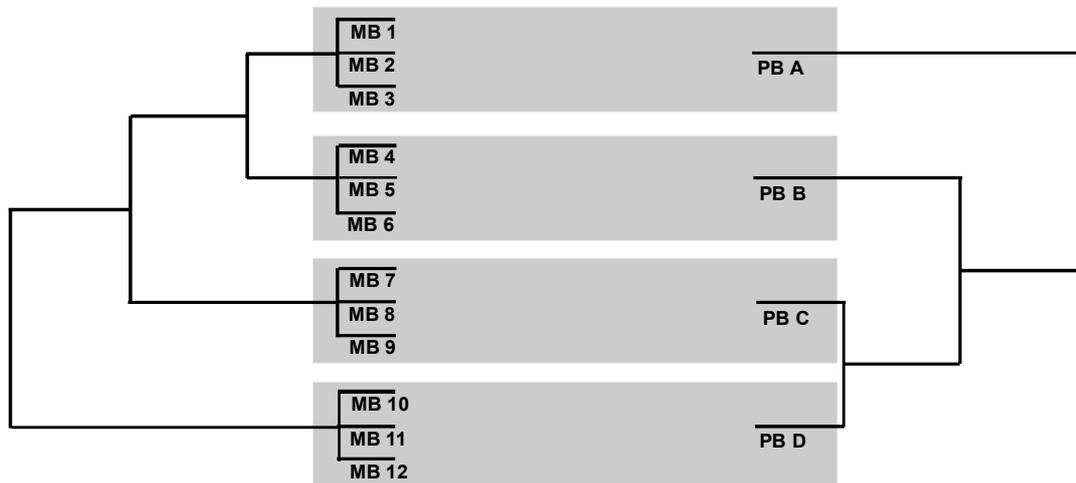


Abb. 6: Die Partnerwahl könnte durch übereinstimmende ökologische Ansprüche der Symbionten bestimmt werden (A). In diesem Fall müssten sich die Phylogenien von Myko- und Photobionten nicht entsprechen (B; nach BECK et al., 2002, verändert).

Da phylogenetisch verwandte Arten oft ähnliche ökologische Ansprüche besitzen, kann das Muster der Photobiontenverteilung auf die Mykobiontengruppen ähnlich sein wie bei perfekter Koevolution, es gäbe aber keine Kongruenz der Phylogenien dieser Gruppen (vgl. Abb. 5 mit Abb. 6).

Da viele Flechtenalgen vor allem lichenisiert, d.h. im Thallus von Flechten, auftreten (z.B. *Trebouxia*, der häufigste Photobiont), stellt das durch den Mykobionten geschaffene Milieu einen zentralen Faktor ihrer Umwelt dar. Auch entfernt verwandte Mykobionten könnten mit ein- und denselben Photobionten-Taxa lichenisiert sein, da sie für diese geeignete Umweltbedingungen bieten („Mykobiontenadaptationshypothese“; Abb. 7). Perfekte Kospeziation zwischen den Symbionten wäre dann nicht nötig, nur eine allgemeine Fähigkeit zur Lichenisierung.

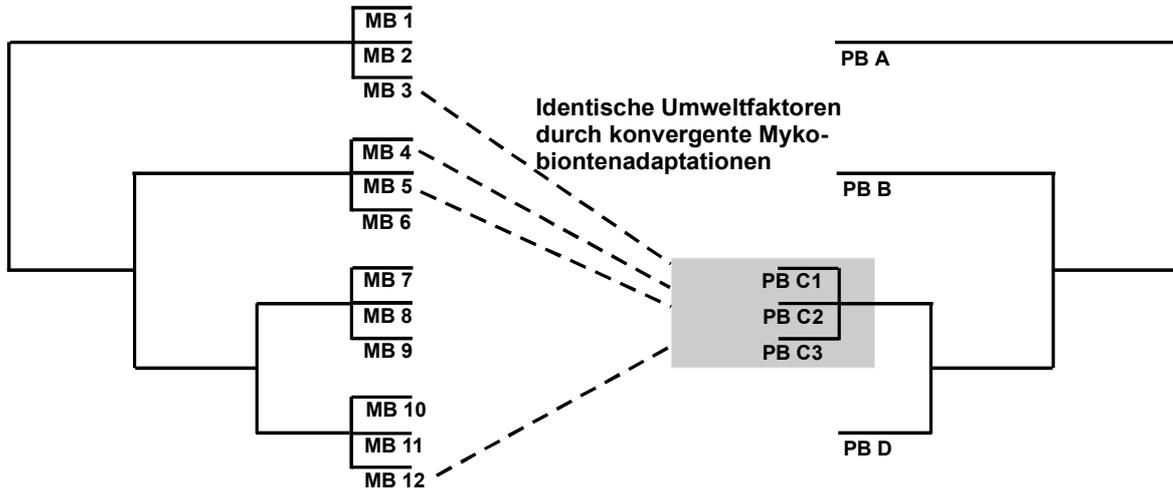


Abb. 7: Die Partnerwahl in Flechten könnte durch ähnliche ökologische Bedingungen für den Photobionten durch konvergente Adaptation der Mykobionten bedingt sein (nach BECK et al., 2002, verändert).

1.4 Zielsetzung

Um den dargestellten Fragen nach der Selektivität des Mykobionten, der Relichenisierung und der Algenübernahme aus lichenisierten Systemen nachzugehen und um einen Beitrag zur Kenntnis der Phycobionten von Flechten im allgemeinen zu liefern, ist es nötig, die Photobionten innerhalb ganzer Flechtengemeinschaften zu analysieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Flechtengemeinschaften schwermetallhaltiger Substrate gewählt, die zunächst soziologisch eingeordnet werden sollten. Von jeder in diesen Gemeinschaften anwesenden Flechtenart sollte der Phycobiont bestimmt werden. Dazu wurden aus jeweils mindestens einem Vertreter jeder Flechtenart einzelne Photobionten-Zellen isoliert, sterilisiert, und in axenische Kultur genommen. Dies sollte mit einer hierfür etablierten Methode unter Zuhilfenahme eines Einzel-Zell-Mikromanipulators erreicht werden (BECK & KOOP, 2001). Alle Algen sollten in axenischer Kultur lichtmikroskopisch, und einige ausgewählte auch molekular durch Sequenzierung der ITS nrDNA-Region, bestimmt werden. Die Phycobionten aus ein- und demselben Thallus, aus derselben Flechtenart und aus derselben Gemeinschaft sollten miteinander verglichen werden. Um zu untersuchen, ob das schwermetallhaltige Substrat einen Einfluss auf die Photobiontenwahl ausübt, sollten zum einen auch in ausgewählten Fällen die Algenpartner derselben Flechtenart von nicht schwermetallhaltigen Substraten untersucht, zum anderen physiologische Experimente zur Schwermetalltoleranz von Flechtenalgen durchgeführt werden. Das auf diese Weise erhaltene Spektrum von Photobionten der Gemeinschaften galt es in Bezug auf die verwandtschaftliche Stellung, die geographische Verbreitung und die Vermehrungsweise der Flechten zu analysieren und zu diskutieren.

2 Material und Methoden

2.1 Biologisches Material

2.1.1 Algen-Typusstämme

Zum Vergleich der isolierten Phycobionten mit den Typusstämmen dienten die in Tabelle 2 aufgeführten Kulturen, die von der „Sammlung von Algenkulturen, Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Göttingen“, Bundesrepublik Deutschland (= SAG), der „Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin“, USA (= UTEX) und der „Culture Collection of Algae and Protozoa, Cambridge“, England (= CCAP), zur Verfügung gestellt wurden.

Tab. 2: Auflistung der gesehenen Typusstämme.

Art	Kultur-Nr.	isoliert aus
<i>Chlorella ellipsoidea</i> GERNECK	SAG 211-1a	
<i>Chlorella saccharophila</i> (W.KRÜGER) MIG.	SAG 211-9a	Wundsaft von <i>Populus alba</i>
<i>Dictyochloropsis reticulata</i> (TSCHERM.-WOESS) TSCHERM.-WOESS	CCHU 5616	<i>Catillaria chalybeia</i>
<i>Dictyochloropsis symbiontica</i> TSCHERM.-WOESS	SAG 46.85	<i>Chaenothecopsis consociata</i>
<i>Dictyochloropsis splendida</i> GEITLER	SAG 244.80	
<i>Elliptochloris bilobata</i> TSCHERM.-WOESS	SAG 245.80	<i>Catolechia wahlenbergii</i>
<i>Leptosira obovata</i> VISCHER	SAG 445-1	Sumpfwasser bei Basel
<i>Myrmecia biatorellae</i> (TSCHERM.-WOESS & PLESSL) J.B.PETERSEN	UTEX 907	
<i>Pleurastrum terrestre</i> FRITSCH & JOHN	UTEX 333	Bodenproben aus England
<i>Stichococcus bacillaris</i> O.NÄGELI	SAG 379-1b	
<i>Trebouxia arboricola</i> PUYM.	SAG 219-1a	unbekannt
<i>Trebouxia asymmetrica</i> T.FRIEDL & G.GÄRTNER	TF 83.002 A1	<i>Diploschistes diacapsis</i>
<i>Trebouxia corticola</i> (P.A.ARCHIBALD) G.GÄRTNER	UTEX 909	auf Rinde freilebend
<i>Trebouxia crenulata</i> P.A.ARCHIBALD	CCAP 219/2	<i>Xanthoria calcicola</i>
<i>Trebouxia erici</i> AHMADJIAN	UTEX 911	<i>Cladonia cristatella</i>
<i>Trebouxia excentrica</i> P.A.ARCHIBALD	UTEX 1714	<i>Stereocaulon dactylophyllum</i>
<i>Trebouxia gelatinosa</i> AHMADJIAN ex P.A.ARCHIBALD	UTEX 905	<i>Parmelia caperata</i>
<i>Trebouxia gigantea</i> (HILDRETH & AHMADJIAN) G.GÄRTNER	TF86.144C2	<i>Xanthoparmelia conspersa</i>
<i>Trebouxia glomerata</i> (WARÉN) AHMADJIAN	UTEX 894	<i>Stereocaulon evolutoides</i>
<i>Trebouxia impressa</i> AHMADJIAN	TF87.026A6	<i>Melanelia glabra</i>
<i>Trebouxia impressa</i> AHMADJIAN	UTEX 892	<i>Physcia stellaris</i>
<i>Trebouxia incrustata</i> AHMADJIAN ex G.GÄRTNER	UTEX 784	<i>Lecanora dispersa</i>
<i>Trebouxia irregularis</i> HILDRETH & AHMADJIAN	TF87.081E1	<i>Melanelia stygia</i>
<i>Trebouxia italiana</i> P.A.ARCHIBALD	CCAP 219/5	<i>Xanthoria parietina</i>
<i>Trebouxia jamesii</i> (HILDRETH & AHMADJIAN) G.GÄRTNER	UTEX 2233	<i>Schaereria tenebrosa</i>
<i>Trebouxia magna</i> P.A.ARCHIBALD	UTEX 902	<i>Pilophorus acicularis</i>
<i>Trebouxia potteri</i> AHMADJIAN ex G.GÄRTNER	UTEX 900	<i>Lecanora rubina</i>
<i>Trebouxia pyriformis</i> P.A.ARCHIBALD	UTEX 1712	<i>Cladonia squamosa</i>
<i>Trebouxia showmanii</i> (HILDRETH & AHMADJIAN) G.GÄRTNER	UTEX 2234	<i>Lecanora hagenii</i>
<i>Trebouxia simplex</i> TSCHERM.-WOESS	TW-1A2	<i>Chaenotheca chrysocephala</i>
<i>Trebouxia usneae</i> (HILDRETH & AHMADJIAN) G.GÄRTNER	UTEX 2235	<i>Usnea filipendula</i>

Der Stamm TF83.002A1 von *Trebouxia asymmetrica* ist die Originalkultur der Erstbeschreibung (FRIEDL & GÄRTNER, 1988), der Stamm *Trebouxia simplex* TW-1A2

stammt ursprünglich von E. TSCHERMAK-WOESS, Wien (FRIEDL, 1989b) und entspricht einem axenischen Klon der Typuskultur SAG 101.80 (TSCHERMAK-WOESS, 1978b). Die mit * markierten Algenstämme entstammen nicht einer Typuskultur, sondern wurden von Dr. T. FRIEDL, Göttingen, isoliert und den entsprechenden Stämmen zugeordnet.

2.1.2 Herbarmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Belege gesammelt und im Flechtenherbar der Botanischen Staatssammlung München (M) hinterlegt. Die Belege sind in numerischer Folge der Sammelnummern aufgeführt, um die Zuordnung zu den aus ihnen isolierten Photobionten zu erleichtern. Waren mehrere Arten in einer Herbarkapsel vorhanden, so wurde die Kapsel unter der mit ‚sub‘ gekennzeichneten Flechtenart abgelegt. Abbildung 8 zeigt die geographische Lage der Sammelstellen.

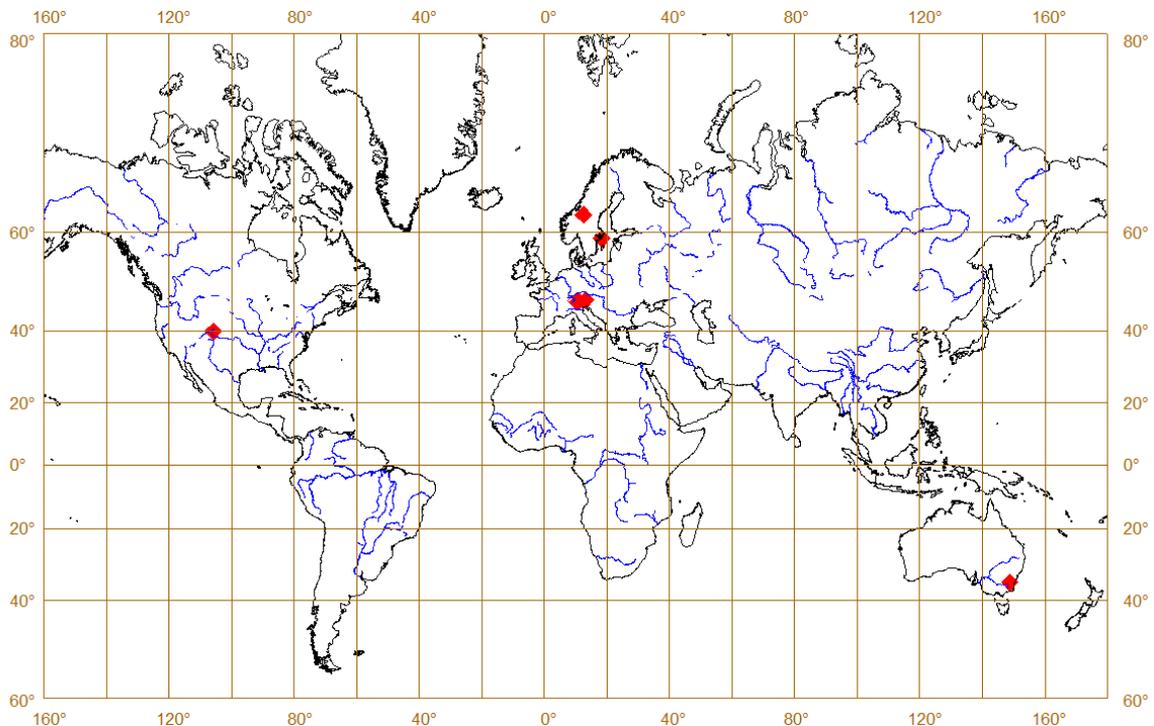


Abb. 8: Geographische Lage der Sammelstellen (♦) von Belegen aus dem *Acarosporium sinopicae*.

Material und Methoden

- SCHWEDEN: Södermanland: Tyresö par., Kumla, Drevviken, Fornudden, 20 m alt., 59°12'N, 18°11'E, 19.09.1998, leg. A. BECK 00175 & B. OWE-LARSSON – *Scoliciosporum umbrinum* (ACH.) ARNOLD.
- SCHWEDEN: Södermanland: Österhaninge par., Gudö, 40 m alt., 59°12'N, 18°12'E, 19.09.1998, leg. A. BECK 00176a & B. OWE-LARSSON – sub *Lecidea plana* (J.LAHM in KÖRB.) NYL. mit *Lecidea fuscoatra* (L.) ACH., *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB.
- SCHWEDEN: Södermanland: Österhaninge par., Gudö, 40 m alt., 59°12'N, 18°12'E, 19.09.1998, leg. A. BECK 00176b & B. OWE-LARSSON – sub *Trapelia obtegens* (TH.FR.) HERTEL mit *Porpidia* spec. (rot, Medulla J-), *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB.
- SCHWEDEN: Södermanland: Österhaninge par., Gudö, 40 m alt., 59°12'N, 18°12'E, 19.09.1998, leg. A. BECK 00176c & B. OWE-LARSSON – sub *Trapelia obtegens* (TH.FR.) HERTEL mit *Rhizocarpon lecanorinum* ANDERS., *Umbilicaria* spec.
- SCHWEDEN: Södermanland: Utön par., Utö, 5 m alt., 58°58'N, 18°20'E, 20.09.1998, leg. A. BECK 00177a & B. OWE-LARSSON – sub *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB. mit *Acarospora rugulosa* KÖRB., *Acarospora smaragdula* (WAHLENB.) A.MASSAL., *Lecidea silacea* ACH.
- SCHWEDEN: Södermanland: Utön par., Utö, 5 m alt., 58°58'N, 18°20'E, 20.09.1998, leg. A. BECK 00177b & B. OWE-LARSSON – sub *Tremolecia atrata* (ACH.) HERTEL mit *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB., *Acarospora smaragdula* (WAHLENB.) A.MASSAL., *Candelariella vitellina* (HOFFM.) MÜLL.ARG., *Lecidea silacea* ACH., *Trapelia obtegens* (TH.FR.) HERTEL, *Umbilicaria torrefacta* (LIGHTF.) SCHRAD.
- SCHWEDEN: Södermanland: Utön par., Utö, 5 m alt., 58°58'N, 18°20'E, 20.09.1998, leg. A. BECK 00177c & B. OWE-LARSSON – sub *Trapelia obtegens* (TH. FR.) HERTEL mit *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB., *Scoliciosporum umbrinum* (ACH.) ARNOLD, *Tremolecia atrata* (ACH.) HERTEL.
- SCHWEDEN: Södermanland: Utön par., Utö, 5 m alt., 58°58'N, 18°20'E, 20.09.1998, leg. A. BECK 00177d & B. OWE-LARSSON – sub *Candelariella vitellina* (HOFFM.) MÜLL.ARG. mit *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB., *Umbilicaria* spec.
- SCHWEDEN: Södermanland: Utön par., Utö, 5 m alt., 58°58'N, 18°20'E, 20.09.1998, leg. A. BECK 00178a & B. OWE-LARSSON – sub *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB. mit *Acarospora smaragdula* (WAHLENB.) A.MASSAL., *Immersaria athroocarpa* (ACH.) RAMBOLD & PIETSCHM., *Lecidea silacea* ACH., *Miriquidica atrofulva* (SOMMERF.) A.J.SCHWAB & RAMBOLD, *Tremolecia atrata* (ACH.) HERTEL, *Umbilicaria torrefacta* (LIGHTF.) SCHRAD.
- SCHWEDEN: Södermanland: Utön par., Utö, 5 m alt., 58°58'N, 18°20'E, 20.09.1998, leg. A. BECK 00178b & B. OWE-LARSSON – sub *Immersaria athroocarpa* (ACH.) RAMBOLD & PIETSCHM. mit *Lecanora polytropica* (HOFFM.) RABENH., *Lecidea lapicida* (ACH.) ACH. var. *lapicida*, *Miriquidica atrofulva* (SOMMERF.) A.J.SCHWAB & RAMBOLD, *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC.
- SCHWEDEN: Södermanland: Utön par., Utö, 5 m alt., 58°58'N, 18°20'E, 20.09.1998, leg. A. BECK 00178c & B. OWE-LARSSON – sub *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC. mit *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB., *Immersaria athroocarpa* (ACH.) RAMBOLD & PIETSCHM., *Miriquidica atrofulva* (SOMMERF.) A.J.SCHWAB & RAMBOLD.
- SCHWEDEN: Södermanland: Utön par., Utö, 5 m alt., 58°58'N, 18°20'E, 20.09.1998, leg. A. BECK 00178d & B. OWE-LARSSON – sub *Protopermella atriseda* (FR.) R.SANT & V.WIRTH mit *Rhizocarpon* (gelb)
- SCHWEDEN: Södermanland: Utön par., Utö, 5 m alt., 58°58'N, 18°20'E, 20.09.1998, leg. A. BECK 00178e & B. OWE-LARSSON – sub *Protopermella badia* (HOFFM.) HAFELLNER mit *Immersaria athroocarpa* (ACH.) RAMBOLD & PIETSCHM.
- SCHWEDEN: Södermanland: Utön par., Utö, 5 m alt., 58°58'N, 18°20'E, 20.09.1998, leg. A. BECK 00178f & B. OWE-LARSSON – sub *Lecidea lapicida* (ACH.) ACH. var. *pantherina* ACH. mit *Lecanora polytropica* (HOFFM.) RABENH.
- SCHWEDEN: Södermanland: Utön par., Utö, 5 m alt., 58°58'N, 18°20'E, 20.09.1998, leg. A. BECK 00179 & B. OWE-LARSSON – sub *Tremolecia atrata* (ACH.) HERTEL mit *Scoliciosporum umbrinum* (ACH.) ARNOLD.
- SCHWEDEN: Härjedalen: Tännäs par., 1.2 km E of Ramundberget, 930 m alt., 62°42'N, 12°25'E, 02.09.1998, leg. A. BECK 00140 – sub *Tremolecia atrata* (ACH.) HERTEL mit *Acarospora rugulosa* KÖRB., *Bellemerea alpina* (SOMMERF.) CLAUZADE & CL.ROUX, *Bellemerea subsorediza* (LYNGE.) R.SANT., *Carbonia aggregantula* on *Lecanora polytropica* (HOFFM.) RABENH., *Porpidia tuberculosa* (SM.) HERTEL & KNOPH, *Rhizocarpon polycarpum* (HEPP) TH.FR., *Rhizocarpon* (braun), *Rhizocarpon* (gelb), *Rhizocarpon* (grau).
- SCHWEDEN: Härjedalen: Tännäs par., 1.2 km E of Ramundberget, 930 m alt., 62°42'N, 12°25'E, 02.09.1998, leg. A. BECK 00141 – sub *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB. mit *Acarospora rugulosa* KÖRB., *Bellemerea* spec., *Miriquidica atrofulva* (SOMMERF.) A.J.SCHWAB & RAMBOLD, *Rhizocarpon norvegicum* RÄS., *Rhizocarpon* (braun).
- SCHWEDEN: Härjedalen: Tännäs par., 1.2 km E of Ramundberget, 930 m alt., 62°42'N, 12°25'E, 02.09.1998, leg. A. BECK 00142a – sub *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB. mit *Miriquidica atrofulva* (SOMMERF.) A.J.SCHWAB & RAMBOLD.
- SCHWEDEN: Härjedalen: Tännäs par., 1.2 km E of Ramundberget, 930 m alt., 62°42'N, 12°25'E, 02.09.1998, leg. A. BECK 00142b – sub *Tremolecia atrata* (ACH.) HERTEL mit *Bellemerea subsorediza* (LYNGE.) R.SANT., *Carbonia vorticosa* (FLÖRKE) HERTEL, *Miriquidica atrofulva* (SOMMERF.) A.J.SCHWAB & RAMBOLD, *Lecidea praenublia* NYL., *Porpidia melinodes* (KÖRB.) GOWAN & AHITI, *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC., *Rhizocarpon polycarpum* (HEPP) TH.FR., *Stereocaulon* spec., *Umbilicaria torrefacta* (LIGHTF.) SCHRAD.
- SCHWEDEN: Härjedalen: Tännäs par., 1.2 km E of Ramundberget, 950 m alt., 62°42'N, 12°25'E, 02.09.1998, leg. A. BECK 00143a – sub *Acarospora smaragdula* (WAHLENB.) A.MASSAL. mit *Psilolechia leprosa* COPPINS & PURVIS.
- SCHWEDEN: Härjedalen: Tännäs par., 1.2 km E of Ramundberget, 950 m alt., 62°42'N, 12°25'E, 02.09.1998, leg. A. BECK 00143b – sub *Psilolechia leprosa* COPPINS & PURVIS mit *Acarospora smaragdula* (WAHLENB.) A.MASSAL.
- SCHWEDEN: Härjedalen: Tännäs par., 1.2 km E of Ramundberget, 950 m alt., 62°42'N, 12°25'E, 02.09.1998, leg. A. BECK 00143c – sub *Lecanora polytropica* (HOFFM.) RABENH. mit *Acarospora smaragdula* (WAHLENB.) A.MASSAL., *Psilolechia leprosa* COPPINS & PURVIS.
- SCHWEDEN: Härjedalen: Tännäs par., 2 km NE of Ramundberget, 930 m alt., 62°42'N, 12°25'E, 02.09.1998, leg. A. BECK 00144a – *Lecidea inops* TH.FR.
- SCHWEDEN: Härjedalen: Tännäs par., 2 km NE of Ramundberget, 930 m alt., 62°42'N, 12°25'E, 02.09.1998, leg. A. BECK 00144b – *Psilolechia leprosa* COPPINS & PURVIS.
- SCHWEDEN: Härjedalen: Tännäs par., 2 km NE of Ramundberget, 930 m alt., 62°42'N, 12°25'E, 02.09.1998, leg. A. BECK 00145 – *Porpidia contraponenda* (ARNOLD) KNOPH & HERTEL.
- SCHWEDEN: Härjedalen: Tännäs par., 2 km NE of Ramundberget, 930 m alt., 62°42'N, 12°25'E, 02.09.1998, leg. A. BECK 00147 – *Lecidea inops* TH.FR.
- SCHWEDEN: Härjedalen: Tännäs par., 2 km NE of Ramundberget, 930 m alt., 62°42'N, 12°25'E, 02.09.1998, leg. A. BECK 00148 – *Lecidea silacea* ACH.
- SCHWEDEN: Härjedalen: Tännäs par., 16 km N of Ramundberget, 970 m alt., 62°51'N, 12°29'E, 04.09.1998, leg. A. BECK 00149 – sub *Porpidia macrocarpa* (DC.) HERTEL & A.J.SCHWAB mit *Porpidia tuberculosa* (SM.) HERTEL & KNOPH, *Rhizocarpon* (gelb), *Tremolecia atrata* (ACH.) HERTEL.
- SCHWEDEN: Härjedalen: Tännäs par., 20 km N of Ramundberget, 1100 m alt., 62°52'N, 12°31'E, 04.09.1998, leg. A. Beck 00151 – sub *Tremolecia atrata* (ACH.) HERTEL mit *Immersaria athroocarpa* (ACH.) RAMBOLD & PIETSCHM., *Lecidea* spec. (weiß), *Miriquidica*

- leucophaea* (RABENH.) HERTEL & RAMBOLD, *Miriquidica garovaglii* (SCHAER.) HERTEL & RAMBOLD, *Porpidia macrocarpa* (DC.) HERTEL & A.J.SCHWAB, *Pseudophebe pubescens* (L.) CHOISY, *Rhizocarpon* spec. (gelb), *Umbilicaria proboscidea* (L.) SCHRAD.
- DEUTSCHLAND: Sachsen-Anhalt: Lkr. Mansfelder Land, Hettstedt / 1,5 km SE of Burgörmer, 230m alt., 51°37,5'N, 11°31,5'E, 21.05.2000, leg. A. BECK 261 & P. SCHOLZ – sub *Lecidea inops* TH.FR. mit *Acarospora bullata* ANZI, *Candelariella aurella* (HOFFM.) ZAHLBR., *Lecanora polytropa* (HOFFM.) RABENH., *Stereocaulon nanodes* TUCK., *Stereocaulon* cf. *vesuvianum* PERS.
- DEUTSCHLAND: Sachsen-Anhalt: Lkr. Mansfelder Land, Hettstedt / 1,5 km SE of Burgörmer, 230m alt., 51°37,5'N, 11°31,5'E, 21.05.2000, leg. A. BECK 262a & P. SCHOLZ – *Acarospora bullata* ANZI.
- DEUTSCHLAND: Sachsen-Anhalt: Lkr. Mansfelder Land, S of Wimmelburg., ca. 220m alt., 51°31'N, 11°31'E, 21.05.2000, leg. A. BECK 262b & P. SCHOLZ – sub *Acarospora bullata* ANZI mit *Lecanora polytropa* (HOFFM.) RABENH., *Stereocaulon nanodes* TUCK.
- DEUTSCHLAND: Sachsen-Anhalt: Lkr. Mansfelder Land, Hettstedt / 1,5 km SE of Burgörmer, 230m alt., 51°37,5'N, 11°31,5'E, 21.05.2000, leg. A. BECK 262c & P. SCHOLZ – *Lecanora muralis* (SCHREB.) RABENH.
- DEUTSCHLAND: Sachsen-Anhalt: Lkr. Mansfelder Land, S of Wimmelburg., ca. 220m alt., 51°31'N, 11°31'E, 21.05.2000, leg. A. BECK 265a & P. SCHOLZ – sub *Lecidea inops* TH.FR. mit *Acarospora bullata* ANZI, *Lecanora muralis* (SCHREB.) RABENH., *Lecanora stenotropa* NYL.
- ÖSTERREICH: Salzburg: Niedere Tauern, Großarlal, Schwarze Wand bei Hüttschlag, ca. 500 m SW of Tofernalm, 1700 m alt., 47°10'N, 13°11'E, 30.08.1997, leg. A. BECK 00030 & G. GLÄBER – sub *Lecidea silacea* ACH. mit *Acarospora rugulosa* KÖRB., *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB., *Bellemeria alpina* (SOMMERF.) CLAUZADE & CL.ROUX, *Bellemeria cinereorufescens* (ACH.) CLAUZADE & CL.ROUX, *Bellemera subsorediza* (LYNGE.) R.SANT., *Lecanora polytropa* (HOFFM.) RABENH., *Lecanora subaurea* ZAHLBR., *Lecidea tessellata* FLÖRKE, *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC., *Stereocaulon nanodes* TUCK., *Umbilicaria cylindrica* (L.) DEL. ex DUBY.
- ÖSTERREICH: Salzburg: Niedere Tauern, Großarlal, Schwarze Wand bei Hüttschlag, ca. 500 m SW of Tofernalm, 1700 m alt., 47°10'N, 13°11'E, 30.08.1997, leg. A. Beck 00031 & G. GLÄBER – sub *Lecidea silacea* ACH. mit *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB., *Bellemeria alpina* (SOMMERF.) CLAUZADE & CL.ROUX, *Bellemeria cinereorufescens* (ACH.) CLAUZADE & CL.ROUX, *Lecanora polytropa* (HOFFM.) RABENH., *Lecanora subaurea* ZAHLBR., *Rhizocarpon polycarpum* (HEPP) TH.FR., *Porpidia tuberculosa* (SM.) HERTEL & KNOPH, *Porpidia macrocarpa* (DC.) HERTEL & A.J.SCHWAB, *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC. subsp. *geographicum*.
- ÖSTERREICH: Salzburg: Niedere Tauern, Großarlal, Schwarze Wand bei Hüttschlag, ca. 500 m SW of Tofernalm, 1700 m alt., 47°10'N, 13°11'E, 30.08.1997, leg. A. BECK 00036a & G. GLÄBER – sub *Lepraria* cf. *caesioalba* (DELESD.) J.R.LAUNDON mit *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB., *Arthonia excentrica* (auf *Lepraria* cf. *caesioalba*), *Lecanora epanora* (HEPP) Th.Fr., *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC.
- ÖSTERREICH: Salzburg: Niedere Tauern, Großarlal, Schwarze Wand bei Hüttschlag, ca. 500 m SW of Tofernalm, 1700 m alt., 47°10'N, 13°11'E, 30.08.1997, leg. A. BECK 00038a & G. GLÄBER – sub *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB. mit *Bellemeria cinereorufescens* (ACH.) CLAUZADE & CL.ROUX, *Lecanora polytropa* (HOFFM.) RABENH., *Lecanora subaurea* ZAHLBR., *Lecidea silacea* ACH., *Lepraria* cf. *caesioalba* (DELESD.) J.R.LAUNDON.
- ÖSTERREICH: Salzburg: Niedere Tauern, Großarlal, Schwarze Wand bei Hüttschlag, ca. 500 m SW of Tofernalm, 1700 m alt., 47°10'N, 13°11'E, 30.08.1997, leg. A. BECK 00038b & G. GLÄBER – sub *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB. mit *Bellemeria alpina* (SOMMERF.) CLAUZADE & CL.ROUX, *Lecanora epanora* (ACH.) ACH., *Lecanora polytropa* (HOFFM.) RABENH., *Lecanora subaurea* ZAHLBR., *Lecidea silacea* ACH.
- ÖSTERREICH: Salzburg: Niedere Tauern, Großarlal, Schwarze Wand bei Hüttschlag, ca. 500 m SW of Tofernalm, 1630 m alt., 47°10'N, 13°11'E, 30.08.1997, leg. A. BECK 00044 & G. GLÄBER – *Cladonia furcata* (HUDS.) SCHRAD.
- ÖSTERREICH: Salzburg: Niedere Tauern, Großarlal, Schwarze Wand bei Hüttschlag, ca. 500 m SW of Tofernalm, 1630 m alt., 47°10'N, 13°11'E, 30.08.1997, leg. A. BECK 00045a & G. GLÄBER – *Stereocaulon vesuvianum* PERS.
- ÖSTERREICH: Salzburg: Niedere Tauern, Großarlal, Schwarze Wand bei Hüttschlag, ca. 500 m SW of Tofernalm, 1620 m alt., 47°10'N, 13°11'E, 30.08.1997, leg. A. BECK 00046 & G. GLÄBER – sub *Dibaeis baeomyces* (L.f.) RAMBOLD & HERTEL mit *Cladonia* spec.
- ÖSTERREICH: Salzburg: Niedere Tauern, Großarlal, Schwarze Wand bei Hüttschlag, ca. 500 m SW of Tofernalm, 1600 m alt., 47°10'N, 13°11'E, 30.08.1997, leg. A. BECK 00047 & G. GLÄBER – sub *Porpidia crustulata* (ACH.) HERTEL & KNOPH mit *Trentepohlia iolithus* (L.) WALLROTH.
- ÖSTERREICH: Tirol: Ötztaler Alpen, 7 km SW of Vent., 2800 m alt., 46°48'N, 10°52'E, 11.09.1997, leg. A. BECK 00053 – sub *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB. mit *Lecanora handelii* J.STEINER, *Lecanora subaurea* ZAHLBR., *Porpidia macrocarpa* (DC.) HERTEL & A.J.SCHWAB, *Porpidia melinodes* (KÖRB.) GOWAN & AHTI, *Porpidia* spec. (grau, Medulla J-), *Rhizocarpon ridescens* (NYL.) ZAHLBR.
- ÖSTERREICH: Tirol: Ötztaler Alpen, 7 km SW of Vent., 2800 m alt., 46°48'N, 10°52'E, 11.09.1997, leg. A. Beck 00054 – sub *Porpidia macrocarpa* (DC.) HERTEL & A.J.SCHWAB mit *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB., *Bellemeria subsorediza* (LYNGE.) R.SANT., *Lecanora* cf. *subaurea* ZAHLBR., *Porpidia melinodes* (KÖRB.) GOWAN & AHTI, *Porpidia* spec. (grau).
- ÖSTERREICH: Tirol: Ötztaler Alpen, 7 km SW of Vent., 2800 m alt., 46°48'N, 10°52'E, 11.09.1997, leg. A. BECK 00055 – sub *Pleopsidium chlorophanum* (WAHLENB.) ZOPF mit *Acarospora rugulosa* KÖRB., *Bellemeria alpina* (SOMMERF.) CLAUZADE & CL.ROUX, *Lecidea silacea* ACH., *Lecidea* spec. (Lugol+), *Sporastatia testudinea* (ACH.) A.MASSAL.
- ÖSTERREICH: Tirol: Ötztaler Alpen, 7 km SW of Vent., 2800 m alt., 46°48'N, 10°52'E, 11.09.1997, leg. A. BECK 00056 – sub *Lecidea silacea* ACH. mit *Lecanora polytropa* (HOFFM.) RABENH., *Lecidea lapicida* (ACH.) ACH. var. *pantherina* ACH.
- ÖSTERREICH: Tirol: Ötztaler Alpen, 8 km SW of Vent., 3050 m alt., 46°48'N, 10°51'E, 11.09.1997, leg. A. BECK 00057 – sub *Tephromela armeniaca* (DC) HERTEL & RAMBOLD mit *Sporastatia testudinea* (ACH.) A.MASSAL.
- ITALIEN: Trentino - Alto Adige: Bolzano, Schnalstal, ca. 3 km W of Kurzras, 2650 m alt., 46°46'N, 10°46'E, 12.09.1997, leg. A. BECK 00060 – sub *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB. mit *Lecidea silacea* ACH.
- ITALIEN: Trentino - Alto Adige: Bolzano, Schnalstal, ca. 3 km W of Kurzras, 2650 m alt., 46°46'N, 10°46'E, 12.09.1997, leg. A. BECK 00061 – sub *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB. mit *Lecidea silacea* ACH.
- ITALIEN: Trentino - Alto Adige: Bolzano, Bildstöckljoch (Schnalstal / Matscher Tal), ca. 3,5 km W of Kurzras, 3050 m alt., 46°46'N, 10°45'E, 12.09.1997, leg. A. BECK 00063a – sub *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB. mit *Bellemeria alpina* (SOMMERF.) CLAUZADE & CL.ROUX, *Lecanora handelii* J.STEINER, *Lecanora polytropa* (HOFFM.) RABENH., *Lecanora subaurea* ZAHLBR., *Lecidea silacea* ACH., *Porpidia tuberculosa* (SM.) HERTEL & KNOPH, *Rhizocarpon norvegicum* RÄS.
- ITALIEN: Trentino - Alto Adige: Bolzano, Bildstöckljoch (Schnalstal / Matscher Tal), ca. 3,5 km W of Kurzras, 3050 m alt., 46°46'N, 10°45'E, 12.09.1997, leg. A. BECK 00063b – sub *Bellemeria alpina* (SOMMERF.) CLAUZADE & CL.ROUX mit *Lecidea silacea* ACH., *Rhizocarpon norvegicum* RÄS.

Material und Methoden

- ITALIEN: Trentino - Alto Adige: Bolzano, Bildstöckljoch (Schnalstal / Matscher Tal), ca. 3,5 km W of Kurzras, 3050 m alt., 46°46'N, 10°45'E, 12.09.1997, leg. A. BECK 00063c – sub *Tremolecia atrata* (ACH.) HERTEL mit *Bellemeria alpina* (SOMMERF.) CLAUZADE & CL.ROUX, *Lecanora handelii* J.STEINER, *Lecidea silacea* ACH., *Rhizocarpon norvegicum* RÄS.
- ITALIEN: Trentino - Alto Adige: Bolzano, Bildstöckljoch (Schnalstal / Matscher Tal), ca. 3,5 km W of Kurzras, 3050 m alt., 46°46'N, 10°45'E, 12.09.1997, leg. A. BECK 00064 – sub *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB. mit *Bellemeria alpina* (SOMMERF.) CLAUZADE & CL.ROUX, *Lecidea silacea* ACH., *Rhizocarpon norvegicum* RÄS., *Lecanora handelii* J.STEINER, *Lecanora subaurea* ZAHLBR., *Lecidea confluens* (WEBER) ACH., *Tremolecia atrata* (ACH.) HERTEL.
- ITALIEN: Trentino - Alto Adige: Bolzano, Bildstöckljoch (Schnalstal / Matscher Tal), ca. 3,5 km W of Kurzras, 3050 m alt., 46°46'N, 10°45'E, 12.09.1997, leg. A. BECK 00065 – sub *Bellemeria subsorediza* (LYNGE.) R.SANT. mit *Lecidea silacea* ACH.
- ITALIEN: Trentino - Alto Adige: Bolzano, Bildstöckljoch (Schnalstal / Matscher Tal), ca. 3,5 km W of Kurzras, 3050 m alt., 46°46'N, 10°45'E, 12.09.1997, leg. A. BECK 00067 – sub *Tremolecia atrata* (ACH.) HERTEL mit *Acarospora rugulosa* KÖRB., *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB., *Bellemeria cinereorufescens* (ACH.) CLAUZADE & CL.ROUX, *Bellemeria subsorediza* (LYNGE.) R.SANT., *Lecidea spec.*, *Rhizocarpon norvegicum* RÄS., *Tremolecia atrata* (ACH.) HERTEL.
- ITALIEN: Trentino - Alto Adige: Bolzano, Bildstöckljoch (Schnalstal / Matscher Tal), ca. 3,5 km W of Kurzras, 3050 m alt., 46°46'N, 10°45'E, 12.09.1997, leg. A. BECK 00068 – sub *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB. mit *Acarospora rugulosa* KÖRB., *Bellemeria alpina* (SOMMERF.) CLAUZADE & CL.ROUX, *Carbonea vorticosa* (FLÖRKE) HERTEL, *Lecanora handelii* J.STEINER, *Lecidea confluens* (WEBER) ACH., *Porpidia tuberculosa* (SM.) HERTEL & KNOPH, *Rhizocarpon norvegicum* RÄS., *Tremolecia atrata* (ACH.) HERTEL.
- ITALIEN: Trentino - Alto Adige: Bolzano, Abstieg vom Bildstöckljoch (Schnalstal / Matscher Tal) zur Oberretteshütte; am "Tabernakel", 2850 m alt., 46°46'N, 10°45'E, 12.09.1997, leg. A. BECK 00069 – sub *Tremolecia atrata* (ACH.) HERTEL mit „*Lecidea fuliginosa*-Gruppe“, *Lecidea tessellata* FLÖRKE, *Miriquidica garovaglii* (SCHAER.) HERTEL & RAMBOLD.
- ÖSTERREICH: Styria: 40 km SW of Graz; Koralpe mountain range, Handalpe., 1800 m alt., 46°50'N, 15°01'E, 13.08.1998, leg. A. BECK 00120 – *Porpidia macrocarpa* (DC.) HERTEL & A.J.SCHWAB.
- ÖSTERREICH: Styria: 40 km SW of Graz; Koralpe mountain range, Handalpe., 1730 m alt., 46°50'N, 15°01'E, 13.08.1998, leg. A. BECK 00126 – *Lecidea lapicida* (ACH.) ACH. var. *lapicida*.
- ÖSTERREICH: Styria: 40 km SW of Graz; Koralpe mountain range, Handalpe., 1730 m alt., 46°50'N, 15°01'E, 13.08.1998, leg. A. BECK 00128 – *Lecidea confluens* (WEBER) ACH.
- ÖSTERREICH: Styria: 40 km SW of Graz; Koralpe mountain range, Handalpe., 1750 m alt., 46°50'N, 15°01'E, 13.08.1998, leg. A. BECK 00132 – *Pleopsidium chlorophanum* (WAHLENB.) ZOPF.
- SCHWEIZ: Graubünden: Futschölpaß (knapp jenseits der österr.-schweiz. Landesgrenze), 2760 m alt., 46°52'N, 10°13'E, 08.08.1998, leg. H. HERTEL 34159 – sub *Acarospora sinopica* (WAHLENB.) KÖRB. mit *Acarospora rugulosa* KÖRB., *Lecidea silacea* ACH., *Rhizocarpon norvegicum* RÄS., *Rhizocarpon similimum* (ANZI) LETTAU, *Umbilicaria crustulosa* (ACH.) FREY.
- U.S.A.: Colorado: Larimer Co.: Flattop Mountain, on massive rock outcrops along the track from Bear Lake., 3500 m alt., 40°19'N, 105°41'W, 03.09.1999, leg. A. BECK 00235 – sub *Tremolecia atrata* (ACH.) HERTEL mit *Lecidea lapicida* (ACH.) ACH. var. *lapicida*, *Rhizocarpon spec.*
- U.S.A.: Colorado: Larimer Co.: Flattop Mountain, on massive rock outcrops along the track from Bear Lake., 3550 m alt., 40°19'N, 105°41'W, 03.09.1999, leg. A. BECK 236 – *Tremolecia atrata* (ACH.) HERTEL.
- AUSTRALIEN: Capital Territory: Brindabella Range, summit of Mt Franklin, 45 km WSW of Canberra, 1644 m alt., 35°29'S, 148°47'E, 15.12.1998, leg. J. ELIX 43014a – sub *Tremolecia atrata* (ACH.) HERTEL mit *Lecanora polytropia* (HOFFM.) RABENH., *Umbilicaria cylindrica* (L.) DEL. ex DUBY, *Rhizocarpon cf. cyanescens* (HELLB.) ZAHLBR., *Rhizocarpon spec.* (grau, Sp. 4-zellig), *Rhizocarpon cf. viridiatrum* (WULFEN) KÖRB., *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC., *Protoparmelia badia* (HOFFM.) HAFELLNER, *Neofuscelia stygiodes* (NYL. ex CROMB.) ESSL.
- AUSTRALIEN: Capital Territory: Brindabella Range, summit of Mt Franklin, 45 km WSW of Canberra, 1644 m alt., 35°29'S, 148°47'E, 15.12.1998, leg. J. ELIX 43014b – sub *Tremolecia atrata* (ACH.) HERTEL mit *Lecanora farinacea* FÉE, *Rhizocarpon cf. lecanorinum* ANDERS, *Rhizocarpon cf. cyanescens* (HELLB.) ZAHLBR., *Ramboldia petraeoides* (NYL. ex C. BAB. & MITT.) KANTVILAS & ELIX.

2.1.3 Im Rahmen dieser Arbeit isolierte Algenklone

Tabelle 3 fasst die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Algenklone zusammen und gibt die Herbarbelege für die Flechten an, aus denen sie isoliert wurden.

Tab. 3: Numerische Aufstellung der isolierten Algenklone. Die Abkürzungen für die Sammler der Herbarbelege stehen für: AB: A. BECK, HH: H. HERTEL, JE: JA. ELIX.

Isolationsnr.	isoliert aus	Herbarbeleg	Zahl der isolierten Klone
AB97.017	<i>Lecidea silacea</i>	AB 030	3
AB97.019	<i>Acarospora rugulosa</i>	AB 030	10
AB97.020	<i>Bellemeria cinereorufescens</i> var. <i>diamartha</i>	AB 030	3
AB97.021	<i>Rhizocarpon geographicum</i>	AB 030	5
AB97.022	<i>Lecanora polytropa</i>	AB 030	4
AB97.023	<i>Bellemeria alpina</i>	AB 030	7
AB97.024	<i>Umbilicaria cylindrica</i>	AB 030	5
AB97.025	<i>Lecanora subaurea</i>	AB 030	6
AB97.026	<i>Acarospora sinopica</i>	AB 030	2
AB97.027	<i>Lecidea tessellata</i>	AB 030	6
AB97.057	<i>Lecidea silacea</i>	AB 031	7
AB97.058	<i>Porpidia tuberculosa</i>	AB 031	6
AB97.059	<i>Rhizocarpon polycarpum</i>	AB 031	7
AB97.060	<i>Rhizocarpon geographicum</i> ssp. <i>geographicum</i>	AB 031	5
AB97.061	<i>Lecanora subaurea</i>	AB 031	7
AB97.062	<i>Lecanora polytropa</i>	AB 031	8
AB97.063a	<i>Lecidea silacea</i>	AB 031	11
AB97.063b	<i>Porpidia macrocarpa</i>	AB 031	2
AB97.064	<i>Acarospora sinopica</i>	AB 031	7
AB97.065	<i>Bellemeria alpina</i>	AB 031	4
AB97.066	<i>Bellemeria cinereorufescens</i> var. <i>diamartha</i>	AB 031	11
AB97.067	<i>Rhizocarpon ridescens</i>	AB 053	8
AB97.068	<i>Acarospora sinopica</i>	AB 053	9
AB97.069	<i>Lecanora subaurea</i>	AB 053	12
AB97.070	<i>Porpidia macrocarpa</i>	AB 053	8
AB97.071	<i>Lecanora handelii</i>	AB 053	9
AB97.072	<i>Porpidia flavocaerulescens</i>	AB 053	12
AB98.001	<i>Pleopsidium chlorophanum</i>	AB 055	11
AB98.002	<i>Lecidea silacea</i>	AB 055	5
AB98.003	<i>Sporastatia testudinea</i>	AB 055	8
AB98.006	<i>Porpidia</i> spec. (grau)	AB 053	2
AB98.007	<i>Lecidea silacea</i>	AB 063a	6
AB98.008	<i>Bellemeria alpina</i>	AB 063a	3
AB98.009	<i>Rhizocarpon norvegicum</i>	AB 063a	13
AB98.010	<i>Acarospora sinopica</i>	AB 063a	6
AB98.011	<i>Bellemeria alpina</i>	AB 063a	6
AB98.012	<i>Lecanora handelii</i>	AB 063a	9
AB98.013	<i>Lecanora subaurea</i>	AB 063a	6
AB98.014	<i>Porpidia tuberculosa</i>	AB 063a	2
AB98.015	<i>Bellemeria alpina</i>	AB 063b	11
AB98.016	<i>Tremolecia atrata</i>	AB 063c	12
AB98.017	<i>Stereocaulon nanodes</i>	AB 030	12
AB98.019	<i>Acarospora sinopica</i>	AB 060	4
AB98.020	<i>Lecidea silacea</i>	AB 060	11
AB98.021	<i>Acarospora sinopica</i>	AB 061	8

Material und Methoden

AB98.022	<i>Lecidea silacea</i>	AB 061	7
AB98.023	<i>Bellemeria subsorediza</i>	AB 065	10
AB98.024	<i>Acarospora rugulosa</i>	AB 067	12
AB98.025	<i>Tremolecia atrata</i>	AB 067	6
AB98.026	<i>Bellemeria cinereorufescens</i>	AB 067	11
AB98.027	<i>Rhizocarpon norvegicum</i>	AB 067	13
AB98.028	<i>Bellemeria subsorediza</i>	AB 067	7
AB98.029	<i>Acarospora sinopica</i>	AB 068	5
AB98.030	<i>Lecidea confluens</i>	AB 068	8
AB98.031	<i>Tremolecia atrata</i>	AB 068	5
AB98.032	<i>Bellemeria alpina</i>	AB 068	7
AB98.033	<i>Lecanora handelii</i>	AB 068	3
AB98.034	<i>Porpidia tuberculosa</i>	AB 068	12
AB98.035	<i>Porpidia macrocarpa</i>	AB 054	11
AB98.036	<i>Acarospora rugulosa</i> (bei <i>Carbonea</i>)	AB 068	4
AB98.037	<i>Lepraria</i> cf. <i>caesioalba</i>	AB 036a	15
AB98.038	<i>Miriquidica garovaglii</i>	AB 069	13
AB98.039	<i>Lecidea tessellata</i>	AB 069	10
AB98.040	" <i>Lecidea fuliginosa</i> -Gruppe"	AB 069	12
AB98.041	<i>Tremolecia atrata</i>	AB 069	8
AB98.042	<i>Lepraria</i> cf. <i>caesioalba</i>	AB 038a	13
AB98.043	<i>Lecanora subaurea</i>	AB 038a	6
AB98.045	<i>Porpidia crustulata</i>	AB 047	6
AB98.046	<i>Lecidea silacea</i>	AB 038a	7
AB98.047	cf. <i>Bellemeria cinereorufescens</i> var. <i>diamartha</i>	AB 038a	8
AB98.048	<i>Lecanora polytropia</i>	AB 038a	2
AB98.049	<i>Lecanora polytropia</i>	AB 038a	4
AB98.050	<i>Bellemeria alpina</i>	AB 038b	5
AB98.051	<i>Lecanora epanora</i>	AB 038b	7
AB98.052	<i>Acarospora sinopica</i>	AB 038a	2
AB98.056	<i>Sporastatia testudinea</i>	AB 057	12
AB98.058	<i>Bellemeria alpina</i>	AB 055	14
AB98.059	<i>Lecidea lapicida</i> var. <i>pantherina</i>	AB 056	15
AB98.060	<i>Lecanora polytropia</i>	AB 056	11
AB98.061	<i>Stereocaulon vesuvianum</i>	AB 045a	11
AB98.062	<i>Cladonia furcata</i>	AB 044	15
AB98.063	<i>Lecanora handelii</i>	AB 063c	6
AB98.064	<i>Lecidea confluens</i>	AB 064	15
AB98.065	<i>Tremolecia atrata</i>	AB 064	13
AB98.086	<i>Dibaeis baeomyces</i>	AB 046	15
AB98.111	<i>Lecanora polytropia</i>	AB 030	5
AB98.112	<i>Acarospora sinopica</i>	HH 34159	13
AB98.113	<i>Lecidea silacea</i>	HH 34159	10
AB98.114	<i>Acarospora rugulosa</i>	HH 34159	13
AB98.115	<i>Rhizocarpon norvegicum</i>	HH 34159	14
AB98.116	<i>Umbilicaria crustulosa</i>	HH 34159	9
AB98.117	<i>Rhizocarpon simillimum</i>	HH 34159	13
AB98.118	<i>Porpidia macrocarpa</i>	AB 120	6
AB98.120	<i>Lecidea lapicida</i> var. <i>lapicida</i>	AB 126	14
AB98.121	<i>Lecidea confluens</i>	AB 128	11
AB98.123	<i>Pleopsidium chlorophanum</i>	AB 132	11
AB98.140	<i>Tremolecia atrata</i>	AB 179	13
AB98.141	<i>Scoliciosporum umbrinum</i>	AB 179	11
AB98.142	<i>Lecidea silacea</i>	AB 177a	12
AB98.143	<i>Acarospora sinopica</i>	AB 177a	15
AB98.144	<i>Acarospora smaragdula</i>	AB 177a	13

Material und Methoden

AB98.145	<i>Tremolecia atrata</i>	AB 177b	15
AB98.146	<i>Umbilicaria torrefacta</i>	AB 177b	15
AB98.147	<i>Trapelia obtegens</i>	AB 177c	1
AB98.148	<i>Lecidea lapicida</i> var. <i>pantherina</i>	AB 178b	12
AB98.149	<i>Candelariella vitellina</i>	AB 177d	13
AB98.150	<i>Tremolecia atrata</i>	AB 178a	6
AB98.151	<i>Miriquidica atrofulva</i>	AB 178a	12
AB98.152	<i>Acarospora sinopica</i>	AB 178a	13
AB98.153	<i>Lecidea silacea</i>	AB 178a	15
AB98.154	<i>Acarospora smaragdula</i>	AB 178a	13
AB98.155	<i>Umbilicaria torrefacta</i>	AB 178a	7
AB98.156	<i>Immersaria athroocarpa</i>	AB 178b	13
AB98.157	<i>Lecidea lapicida</i> var. <i>lapicida</i>	AB 178b	15
AB98.158	<i>Rhizocarpon geographicum</i>	AB 178c	12
AB98.159	Areolen mit hellem Rand daneben	AB 178c	6
AB98.160	<i>Protoparmelia atriseda</i>	AB 178d	14
AB98.161	<i>Protoparmelia badia</i>	AB 178e	8
AB98.162	<i>Lecidea lapicida</i> var. <i>pantherina</i>	AB 178f	13
AB98.163	<i>Lecanora polytropia</i>	AB 178f	14
AB99.001	<i>Lecidea inops</i>	AB 144a	9
AB99.002	<i>Psilolechia leprosa</i>	AB 144b	13
AB99.008	<i>Porpidia contraponenda</i>	AB 145	13
AB99.010	<i>Acarospora smaragdula</i>	AB 143a	10
AB99.011	<i>Psilolechia leprosa</i>	AB 143b	11
AB99.012	<i>Lecanora polytropia</i>	AB 143c	12
AB99.026	<i>Tremolecia atrata</i>	JE 43014a	12
AB99.027	<i>Lecanora polytropia</i>	JE 43014a	6
AB99.028	<i>Umbilicaria cylindrica</i>	JE 43014a	2
AB99.029	<i>Rhizocarpon</i> cf. <i>cyanescens</i>	JE 43014a	10
AB99.030	<i>Rhizocarpon</i> spec. (Sp. 4-zellig)	JE 43014a	6
AB99.031	<i>Rhizocarpon</i> cf. <i>viridiatrum</i>	JE 43014a	14
AB99.032	<i>Rhizocarpon</i> cf. <i>geographicum</i>	JE 43014a	9
AB99.033	graue Areolen	JE 43014a	14
AB99.034	<i>Protoparmelia badia</i>	JE 43014a	5
AB99.035	<i>Neofuscelia stygiodes</i>	JE 43014a	13
AB99.036	braune Areolen (weißer Rand)	JE 43014a	10
AB99.037	<i>Lecanora farinacea</i>	JE 43014b	12
AB99.038	<i>Tremolecia atrata</i>	JE 43014b	7
AB99.061	<i>Scoliciosporum umbrinum</i>	AB 175	2
AB99.062	<i>Lecidea inops</i>	AB 147	15
AB99.063	<i>Lecidea silacea</i>	AB 148	7
AB99.064	<i>Tremolecia atrata</i>	AB 151	7
AB99.065	<i>Miriquidica garovaglii</i>	AB 151	15
AB99.066	<i>Trapelia obtegens</i>	AB 176b	10
AB99.067	<i>Porpidia</i> spec. (rot, Lugol -)	AB 176b	15
AB99.068	<i>Lecidea plana</i>	AB 176a	2
AB99.069	<i>Lecidea fuscoatra</i>	AB 176a	5
AB99.070	<i>Umbilicaria</i> spec.	AB 176c	9
AB99.071	<i>Rhizocarpon lecanorinum</i>	AB 176c	15
AB99.072	<i>Trapelia obtegens</i>	AB 176c	8
AB99.073	<i>Bellemeria alpina</i> ("sulphurata")	AB 140	2
AB99.092	<i>Porpidia macrocarpa</i>	AB 149	14
AB99.093	<i>Acarospora sinopica</i>	AB 142a	13
AB99.094	<i>Miriquidica atrofulva</i>	AB 142a	15
AB99.095	<i>Tremolecia atrata</i>	AB 142b	5
AB99.096	<i>Carbonea vorticosa</i>	AB 142b	11

AB99.097	<i>Rhizocarpon geographicum</i>	AB 142b	14
AB99.098	<i>Bellemeria subsorediza</i>	AB 142b	10
AB99.099	<i>Rhizocarpon polycarpum</i>	AB 142b	2
AB99.100	<i>Lecidea paupercula</i>	AB 142b	0
AB99.101	<i>Umbilicaria torrefacta</i>	AB 142b	15
AB99.102	<i>Rhizocarpon norvegicum</i>	AB 141	2
AB99.103	<i>Acarospora rugulosa</i>	AB 141	9
AB99.104	<i>Tremolecia atrata</i>	AB 235	11
AB99.105	<i>Tremolecia atrata</i>	AB 236	13
AB99.106	<i>Lecidea lapicida</i> var. <i>lapicida</i>	AB 235	13
AB99.119	<i>Acarospora sinopica</i>	AB 141	9
AB00.002	<i>Lecidea inops</i>	AB 261	12
AB00.003	<i>Lecidea inops</i>	AB 265a	13
AB00.004	<i>Acarospora bullata</i>	AB 265a	6
AB00.005	<i>Lecanora stenotropa</i>	AB 265a	11
AB00.006	<i>Stereocaulon nanodes</i>	AB 262b	11
AB00.007	<i>Lecanora muralis</i>	AB 262c	7
AB00.008	<i>Acarospora bullata</i>	AB 262b	13
AB00.010	<i>Acarospora bullata</i>	AB 262a	11

2.2 Methoden und benötigtes Material

2.2.1 Isolierung von Flechtenalgen

Um gezielt die Flechtenalgen isolieren zu können, wurde ein computergesteuerter Mikromanipulator verwendet (BECK & KOOP, 2001). Dieser ermöglichte es, mit großer Genauigkeit ungeschädigte Algenzellen auszuwählen und kontaminationsfrei auf das Kulturmedium zu überführen. Auf diese Weise wuchsen wesentlich mehr Algenzellen an als bei der Mikropipettenmethode nach AHMADJIAN (1967), bei der auf Computerunterstützung verzichtet wird (ca. 60% gegenüber 10%; BECK & KOOP, 2001). Der Aufbau der Apparatur ist in Abbildung 9 dargestellt.

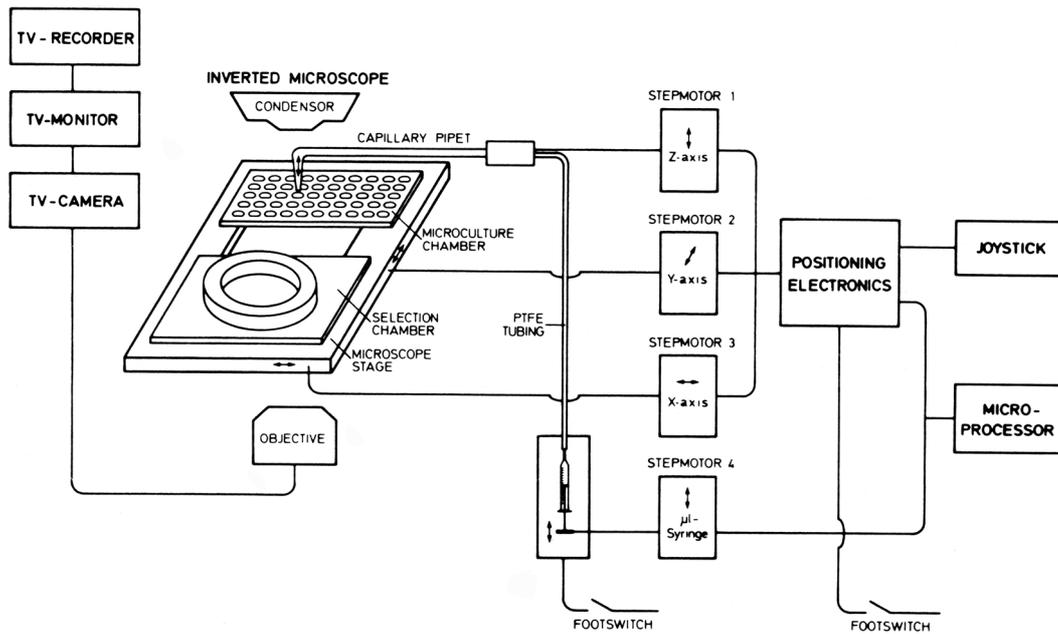


Abb. 9: Aufbau des Mikromanipulators einschließlich der Position des inversen Mikroskops (aus BECK & KOOP, 2001).

2.2.2 Kulturmedien

Als Standardkulturmedium wurde das von FRIEDL (1989b) etablierte MBV-Medium gewählt. Dieses basiert auf dem von BISCHOFF & BOLD (1963) entwickelten „Basalmedium“. Für die Herstellung des MBV-Mediums wurden die folgenden Stammlösungen angesetzt:

I.: Makronährelemente [g / 400 ml]:

A) NaCl	1
B) $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	1
C) KNO_3	20
D) $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	3
E) $(\text{NH}_4)_2 \times \text{HPO}_4$	10

II.: Mikronährelemente [g / 500 ml]:

1.: KOH	15
EDTA	25
2.: $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	2,49
3.: H_3BO_3	5,52
4.: $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	4,41
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	0,72
NaMoO_4	0,36
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,79
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,25

III.: Vitamine [g / 500 ml]:

B12	0,01
Biotin	0,05
Thiamin	5,0
Nicotinsäureamid	0,005

Sämtliche Chemikalien wurden von der Fa. Merck bezogen.

Für einen Liter Kulturmedium wurde von den Makronährelementlösungen jeweils 10 ml und von den Spurenelementlösungen je 1 ml genommen, 0,715 g HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl) - 1 - piperaciny] ethansulfonsäure; Merck Nr. 10110) -Puffer (mit der Endkonzentration 3 mM) dazugegeben und auf 1000 ml aufgefüllt. Der pH betrug 5,5. Nach der Zugabe von 20 g Agar wurde das Medium autoklaviert. Nach der Abkühlung des Mediums auf ca. 60°C wurde 1 ml der sterilfiltrierten Vitaminlösung hinzugefügt und anschließend in die Kulturgefäße gegossen. Das für einige Versuche verwendete MBB-Medium bestand aus denselben Chemikalien, enthielt aber keine Vitamine. Das MBG-Medium wurde für die Anzucht von Algenklonen aus isolierten Zellen und zur Bereitstellung großer Algenmengen (für die molekularbiologischen Untersuchungen) verwendet. Es enthielt zusätzlich zum MBV-Medium noch 1,5% Glucose.

2.2.3 Kulturbedingungen

Für die morphologischen Bestimmungen wurden die Algen in Schrägagarröhrchen oder Petrischalen von 6 cm Durchmesser in einem Klimaschrank der Fa. Rubarth Apparate GmbH, Hannover (Licht-Thermostat, Baureihe 1200) im 12 Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus bei einer Lichtintensität von 10 bis 20 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ (gemessen mit dem Light Meter Li-Cor, Modell LI-189) und einer Temperatur von 14°C kultiviert. Leuchtstoffröhren der Fa. Osram (L 115 W / 20 S a; Hellweiß COOL WHITE, Rapid Start) dienten als Lichtquelle.

2.2.4 Optische Geräte

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurde ein Zeiss Axioplan Forschungsmikroskop mit den folgenden Objektiven benützt: 10 × Plan-Neofluar, 40 × Plan-Neofluar und 100 × Plan-Apochromat. Die Okularvergrößerung betrug 10 ×. Es wurden dabei – soweit nicht anders angegeben – Algenkulturen verwendet, die etwa 4 Wochen (\pm 1 Woche) alt und auf MBV-Medium gewachsen waren. Zusätzlich wurden auch überalterte Kulturen mikroskopiert, die 3 Monate alt waren. Die Photographien von Algen wurden mit dem Fotoaufsatz MC 100 angefertigt.

Die Habitusfotografien von Flechtenthalli wurden mit einem Binokular von Wild Heerbrugg angefertigt, das eine stufenlose Vergrößerung von 6–31 × ermöglichte. Als Fotoaufsatz diente das Modell Wild MPS 51 Spot, als Belichtungsautomat diente ein Wild Photoautomat MPS 45.

2.2.5 Färbungen

Zur Färbung von amyloiden Substanzen wurde eine Lugol'sche-Lösung (Reagenz: J; Fa. Merck; 0,5 g J und 1,5 g KJ ad 100 ml) benutzt, mit dieser Färbung trat bei den Algenzellen auch (neben der Form des Chloroplasten) das Pyrenoid deutlicher hervor. Tusche diente zur Sichtbarmachung von Schleimhüllen. Bei Flechtenpilzen wurden 10%-ige Kaliumhydroxid-Lösung (Reagenz: K) und Natriumhypochlorid (Reagenz: C; wässrige Lösung, \geq 4% aktives Chlor; Fa. Aldrich) zum Nachweis verschiedener sekundärer Inhaltsstoffe (z.B. Gyrophorsäure, Lecanorsäure, Norstictinsäure) eingesetzt. Zusätzlich wurden ausgewählte Arten durch Dünnschichtchromatographie genauer untersucht.

2.2.6 Kryokonservierung von Flechtenalgen

Um Algenzellen für längere Zeit zu konservieren wurde ein Protokoll entwickelt, das die Lagerung der Algenzellen bei -80°C erlaubt. Hierfür wurden die Algenzellen in einer Lösung aus 65% Glycerin, 0,1 M MgSO_4 und 25 mM Tris-HCl pH 7,0 suspendiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

2.2.7 Analyse der Nukleotidsequenz der 18S und ITS nrDNA-Regionen

2.2.7.1 DNA-Extraktion nach der CTAB-Methode

Allgemeines

Die DNA wurde aus vegetativen Algenzellen nach der CTAB-Methode isoliert (ROGERS & BENDICH, 1985). Hierbei wurden die in CTAB-Puffer suspendierten Algenzellen nach Zugabe von sterilen Glaskügelchen mechanisch aufgebrochen. CTAB ist ein kationisches Detergenz, in dem sich unter den eingestellten Bedingungen die DNA selektiv löst. Die Eiweißbestandteile wurden mittels einer Phenol-Chloroform-Fällung abgetrennt.

Benötigte Chemikalien

Für die DNA-Extraktion:

- Puffer A: 1 M NaCl
70 mM TRIS (= Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan)
30 mM Na_2 EDTA
pH einstellen auf 8,6
- CTAB-Lösung (= Cetyl-Trimethyl-Ammoniumbromid): 10%ig in Puffer A
- Chloroform-Isoamylalkohol (v : v) 24 : 1
- Phenol-Chloroform (v : v) 1 : 1
Phenol = redestilliertes, in TE-Puffer äquilibriertes Phenol, pH = 7,5–8,0, Roti®-Phenol; Fa. Roth
- Natriumacetat 3 M pH = 7,5
- Isopropanol (reinst) 96%
- Ethanol (reinst) 70%
- TE-Puffer: 10 mM TRIS
1 mM Na_2 EDTA
pH einstellen auf 8,0
- RNase 10 mg/ml in H_2O (Fa. Pharmacia)
abgekocht zur Elimination von DNase

Für die Gelelektrophorese:

- Agarose: Seakem® LE (Fa. FMC)
- TBE 10 ×-stock Lösung (SAMBROOK et al., 1989): 900 mM TRIS
900 mM Borsäure
20 mM EDTA
pH einstellen auf 8,0
- Ethidiumbromid [0,5 mg/ml] in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$.
- Gellade-Puffer 10 ×-stock (SAMBROOK et al., 1989): 30% Glycerin
Bromphenolblau, gesättigt
- TNE-Lösung: 20 mM TRIS
20 mM NaCl
0,1 mM EDTA
- als Größenmarker, jeweils 500ng eingesetzt: λ -Eco RI (Fa. MBI Fermentas)
1 Kb DNA Ladder (Fa. GibcoBRL)

Zellaufschluss

Die Algen wurden mit einer Impföse von den Schrägagarrröhrchen (mit MBG-Medium) in ein 2 ml-Reaktionsgefäß (safe-lock; Fa. Eppendorf, Nr. 0030120.094) mit 500 µl Puffer A überführt. Nach einer Zentrifugation (3000 g; 5 min) wurde der Puffer durch neuen ersetzt, um die Algen zu waschen. Nach erneuter Zentrifugation und Abdekantieren des Überstandes wurde das Volumen des Algenpellets abgeschätzt, das gleiche Volumen an Glaskügelchen (acid-washed glass beads; Durchmesser: 400–600 µm; Fa. Sigma) zugesetzt und mit Puffer A eine breiartige Konsistenz eingestellt. Da durch Vortexen kein nennenswerter Zellaufschluss zu erreichen war, wurde ein Zellaufbruchgerät (Mini-Beadbeater™, Fa. Biospec.) benutzt. Der Erfolg des Aufschlusses wurde mikroskopisch geprüft. Spätestens als ca. 80% der Zellen aufgebrochen waren, wurde der Aufschluss beendet, da sonst mehr bereits isolierte DNA durch Scherkräfte beschädigt, als neue DNA freigesetzt würde. Zu diesem Aufschluss wurden 100 µl 60°C heißes 10%-iges CTAB gegeben (dieses fällt sonst bei dieser Konzentration aus und wäre aufgrund der hohen Viskosität bei Raumtemperatur nicht pipettierbar) und vorsichtig, aber gut, verrührt. Anschließend wurde für mindestens 1 h bei 70°C im Wasserbad inkubiert. Abschließend wurde mit 500 µl Chloroform-Isoamylalkohol ausgeschüttelt und für 10 min bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit Phenol-Chloroform ausgeschüttelt (zentrifugiert und die wässrige Phase überführt) und noch zweimal mit Chloroform-Isoamylalkohol ausgeschüttelt.

DNA-Fällung

Der so erhaltene, klare Überstand wurde mit 1/10 Volumen Natriumacetat und mit 2/3 Volumen Isopropanol versetzt, gut gemischt und die DNA 1 h bei Raumtemperatur gefällt. Danach wurde 20 min bei 4°C und maximaler Drehzahl (mind. 15000 g) zentrifugiert, das DNA-Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen, 5 min im Exsikkator getrocknet und das Pellet in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Um bessere PCR-Ergebnisse zu erhalten wurde eine RNase-Behandlung (Zugabe von 2,5 µg RNase {0,25 µl RNase [10 µg/µl]} und 30 min Inkubation bei 37°C) durchgeführt.

Gelelektrophorese

Um die Menge und Qualität der isolierten DNA abzuschätzen, wurde diese gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hierfür wurden 3 µl der Probe zu 10 µl Gellade-Puffer (SAMBROOK et al., 1989) pipettiert, gemischt und auf ein 0,8%-iges Agarosegel (Agarose: Seakem® LE, Fa. FMC), das 0,1% Ethidiumbromid enthielt, aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 100 mV für ca. 30 min mit TBE (1 ×) als Laufpuffer. Als Größenmarker diente mit HIND III und ECO RI verdaute λ-DNA (Fa. Promega). Da deren Menge bekannt war, konnte auch die Menge der isolierten DNA abgeschätzt werden. Die im UV-Licht fluoreszierende DNA sollte im Idealfall möglichst hochmolekular (also im Gel eine nur kurze Strecke zurückgelegt haben) und ungeschert (das heißt: wenig DNA-Schmier) sein.

2.2.7.2 DNA-Extraktion mit dem DNeasy-Kit von Qiagen

Alternativ zu der DNA-Extraktion nach der CTAB-Methode wurde das DNeasy-Kit von Qiagen verwendet. Bei dieser Methode wurden die Zellen durch Mörsern mit einem Mikropistill in flüssigem Stickstoff in einem Eppendorf Reaktionsgefäß aufgeschlossen und dieser Aufschluss nach dem mitgelieferten Protokoll behandelt. Diese Methode nutzt die unterschiedliche Bindung von DNA, RNA und Proteinen an eine Silica-Membran, wodurch sehr reine DNA gewonnen wird. Die isolierte DNA wurde direkt für die PCR eingesetzt, ohne eine Mengenabschätzung vorzunehmen.

2.2.7.3 Amplifizierung der DNA mittels PCR

Allgemeines

Ein spezifischer DNA-Abschnitt kann durch die PCR (Polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion) amplifiziert werden (SAIKI et al., 1988; MEDLIN et al., 1988). Somit steht genügend DNA-Material für die nachfolgende Sequenzierung zur Verfügung. Die Amplifizierung geschieht mit Hilfe der thermostabilen Taq-Polymerase (DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*) und zweier Oligonukleotide bekannter Sequenz, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt begrenzen und als Startpunkte der DNA-Synthese (Primer) dienen. Durch Erhitzen auf 94°C wird die DNA zunächst in Einzelstränge denaturiert. Bei einer Annealing-Temperatur von 40°–50°C lagern sich die Oligonukleotid-Primer an die beiden Stränge des zu amplifizierenden Genomabschnittes. In der anschließenden Extensions-Phase bei 72°C synthetisiert die DNA-Polymerase ausgehend von den Primern die Einzelstränge zu Doppelsträngen. Damit ist ein Zyklus geschlossen und es können weitere mit erneuter Denaturierung, Anlagerung der Primer und DNA-Synthese folgen. Nach n Durchgängen wird die DNA-Menge um 2^n vermehrt, denn in jedem Durchgang findet (im Idealfall) eine Verdopplung der Menge des gerade vorhandenen DNA-Abschnittes statt. Der Vorteil der thermostabilen Taq-Polymerase liegt darin, dass sie die hohe Denaturierungstemperatur übersteht und daher nicht bei jedem Zyklus neu zugegeben werden muss.

Benötigte Chemikalien

- Reaktionspuffer (10 ×), Fa. Qiagen (enthält 15 mM MgCl₂)
- dNTPs: Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP; je 10 mM (Fa. Pharmacia)
- Primer: je 10 μM (in 10 mM TRIS-HCl)
- PCR-Additive: DMSO (Fa. Sigma)
Q-Solution (Fa. Qiagen)
- Mineralöl (Fa. Sigma)
- Taq-Polymerase, Fa. Qiagen
- PCR-Apparatur: Primus (Fa. MWG, Ebersberg)
- Auftragspuffer: 30% Glycerin, gesättigt mit Bromphenolblau (Fa. Sigma)

Durchführung der PCR

Nach einem anfänglichem Denaturierungsschritt (3 min, 95°C) wurden 30 Zyklen mit folgenden Einzelschritten durchlaufen:

Denaturierung 94°C für 1 min
 Annealing 50°C für 1 min
 Extension 72°C für 1 min
 Abschließend wurde 7 min bei 72°C inkubiert.

Ein PCR-Ansatz (25 µl) enthielt folgende Komponenten:

DNA des zu untersuchenden Organismus
 Reaktionspuffer (1 ×)
 MgCl₂ (Endkonzentration 1,5 mM)
 Desoxynukleosidtriphosphate (Endkonzentration 0,2 mM)
 Primer (5'), (Endkonzentration 1 µM)
 Primer (3'), (Endkonzentration 1 µM)
 H₂O_{dest.} (ad 25 µl)
 Taq-Polymerase (0,5 U)

Als PCR-Primerpaare dienten für die ITS-Region und das 1512 nrDNA-Intron NS 7M und LR 1850, bei direkter Amplifikation aus dem Flechtenthallus wurde statt NS 7M der Grünalgen-spezifische Al1500bf verwendet. Für den vorderen Teil der 18S nrDNA wurde bei Pilzen die Primer As und 1293-3', bei den Algen As und 1055R und für den hinteren Teil der 18S nrDNA bei Pilzen 1203-5' und ITS4, bei Algen 1055F und ITS4 benutzt. Die Lage der verwendeten Primer zueinander ist in Abbildung 10 dargestellt und deren Sequenz und genaue Position (bezogen auf *Trebouxia impressa*, die Typusart der Trebouxiophyceae [FRIEDL 1995]) in Tabelle 4 angegeben.

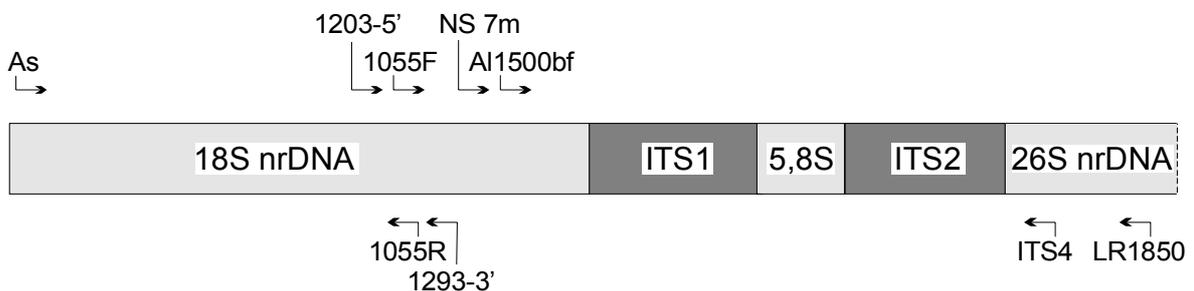


Abb. 10: Lage der PCR-Primer

Tab. 4: Sequenz und Position der verwendeten PCR-Primer. Referenzsequenz ist *Trebouxia impressa* UTEX 892 (Genbank-Nummern: Z21551.1 [18S] und Z95383.1 [26S]).

Primer	Sequenz (5'→3')	Position	Herkunft
1055F	GGTGGTGCATGGCCG	1267-1281 (18S)	HUSS et al. (1999)
1055R	CGGCCATGCACCACC	1281-1267 (18S)	GUNDERSON et al. (1986)
1203-5'	GACTCAACACGGGGAAACTC	1188-1207 (18S) non green algal	GARGAS & TAYLOR (1992)
1293-3'	AATTAAGCAGACAAATCACT	1315-1296 (18S) non green algal	GARGAS & TAYLOR (1992)
All500bf	GATGCATTCAACGAGCCTA	1475-1493 (18S) non fungal	HELMS et al. (2001)
As	CCTGGTTGATCCTGCCAGT	0003-0021 (18S)	MEDLIN et al. (1988)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATAT	0056-0039 (26S)	WHITE et al. (1990)
LR 1850	CCTCACGGTACTTGTTTC	345-361 (26S)	FRIEDL & ROKITTA (1997)
NS 7M	GGCAATAACAGGTCTGT	1419-1435 (18S)	BHATTACHARYA et al. (1996)

Die DNA-Menge wurde immer in drei Parallelansätzen variiert: neben 1 µl der unverdünnten DNA-Lösung wurden auch 1 und 5 µl einer 1:10 verdünnten DNA-Lösung eingesetzt. Schließlich wurden noch 3 Tropfen Mineralöl zu jedem Ansatz gegeben, um während der Reaktion die Verdunstung zu vermeiden.

Wenn unter diesen Standardbedingungen kein PCR-Produkt erhalten werden konnte, dann wurde die Amplifikation unter Zugabe der folgenden Substanzen wiederholt: Q-Solution (Qiagen), DMSO (Sigma, 3% Endkonzentration).

Um festzustellen, ob die PCR erfolgreich verlaufen ist, wurde wieder eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Eingesetzt wurden hier:

2 µl PCR-Produkt (vermischt mit 5 µl Auftragspuffer)
500 ng 1 kb DNA Ladder als Größenmarker

Parallelansätze von erfolgreichen PCR-Reaktionen wurden miteinander vermischt, um eventuelle Polymerisationsfehler, zum Beispiel den Einbau einer falschen Base, der bei der Sequenzierung einen Basenaustausch vortäuschen würde, auszugleichen.

2.2.7.4 DNA-Sequenzierungsreaktion

Prinzip der Ketten-Abbruch-Methode nach Sanger

Das Sequenzierverfahren geht zurück auf SANGER et al. (1977) und wird auch als Ketten-Abbruch-Methode bezeichnet. Hierbei dient einzelsträngige DNA als Matrize für eine in-vitro-DNA-Polymerisation, die von der DNA-Polymerase des Phagen T7 durchgeführt wird. Die Reaktion erfolgt in zwei Schritten: zunächst wird die DNA-Kette durch den Einbau der Desoxy-Nukleotide verlängert, dann erfolgt durch den Einbau von Didesoxy-Nukleotiden der Kettenabbruch und damit die Beendigung der Synthese. Für jeden Sequenzieransatz gibt es vier Parallelreaktionen, in denen jeweils eines der vier Desoxy-Nukleotide dATP, dGTP, dTTP und dCTP ergänzt wird durch ein zusätzlich vorhandenes, geringer konzentriertes Didesoxy-Nukleotid. Wird ein derartig modifizierter Baustein in die wachsende DNA-Kette eingebaut, so kann das darauffolgende Nukleotid nicht angeknüpft werden, weil die Hydroxy-Gruppe für die glykosidische Bindung am Pentosering nicht zur Verfügung steht. Da der Einbau des Didesoxy-Nukleotids statistisch erfolgt, befindet sich in jedem Ansatz eine Schar von unterschiedlich langen DNA-Abschnitten, alle haben jedoch das gleiche Nukleotid (nämlich das zugegebene Didesoxy-Nukleotid) am Ende der Kette gemeinsam. Im Polyacrylamid-Sequenziergel werden die DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt, und die Sequenz kann dann direkt vom Gel abgelesen werden. Detektiert wird die DNA fluorimetrisch mittels markierter Sequenzierprimer, mit denen jedes der neu synthetisierten DNA-Fragmente beginnt.

Reinigung des PCR-Produktes

Da die Reinheit der eingesetzten DNA für das Sequenzierungsergebnis essentiell ist (Amersham Pharmacia Biotech, Produktinformation), wurde das PCR-Produkt mittels des QIAquick Spin Kit gereinigt. Diese Methode nutzt die unterschiedliche Bindung von DNA, RNA und Proteinen an eine Silica-Membran. Die anfangs vorgelegenen hohen Salzkonzentrationen sicherten die Bindung der DNA an die Silica-Membran. Durch die Wahl der Waschlösungen wurde gewährleistet, dass das PCR-Produkt von RNA und Proteinen aber auch von sehr kurzen DNA-Fragmenten (zum Beispiel unverbrauchte Primer) und den restlichen Desoxynucleotiden getrennt wurde. Die einzelnen Schritte erfolgten, wie in dem beiliegenden Handbuch (QIAquick Handbook 09/95) angegeben, mit Ausnahme der Elution der DNA, die mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ erfolgte. Anschließend wurde der Erfolg der Reinigung durch eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Zyklische Sequenzierungsreaktion

Um auch sehr kleine DNA-Mengen sequenzieren zu können, wurde die Methode der wiederholten Primerextension verwendet. Diese funktioniert ähnlich einer PCR-Reaktion, aber mit nur einem Primer, so dass im Idealfall mit jedem Zyklus die Menge an erzeugtem Produkt um den Faktor zwei ansteigt, während dieser Anstieg bei der PCR idealerweise exponentiell erfolgt. Außerdem handelt es sich um eine Sequenzierungsreaktion, so dass keine vollständige Kopie des DNA-Stranges erfolgt, sondern es werden nur DNA-Fragmente erzeugt, die mit den entsprechenden Didesoxynucleotiden enden. Es wurden 2 Kits verwendet: „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“, Fa. Amersham Pharmacia Biotech RPN 2438 bzw. „SequiTherm

EXCEL™ II DNA Sequencing Kits-LC“, Fa. BIOzym SE9202LC. Mit beiden wurde bei Verwendung von 4 pmol Sequenzierprimer, 200 fmol DNA und 4% DMSO gute Ergebnisse erzielt. Im weiteren Verlauf der Arbeit stand ein Li-Cor 4200 für die Sequenzierung zur Verfügung, bei dem gleichzeitig zwei – unterschiedlich markierte – Sequenzierprimer detektiert werden können. Es ist daher möglich zwei unterschiedliche Primer einzusetzen und so gleichzeitig +- und –Strang zu sequenzieren. Die verwendeten Sequenzierprimer sind in Abbildung 11 dargestellt und deren Sequenz und genaue Position (bezogen auf *Trebouxia impressa*, die Typusart der Trebouxiophyceae) in Tabelle 5 angegeben.

Folgendes Sequenzierungsprogramm wurde verwendet:

Nach einem anfänglichem Denaturierungsschritt (2 min, 95°C) wurden 27 Zyklen mit folgenden Einzelschritten durchlaufen:

Denaturierung	95°C für 30 sec
Annealing	54°C für 30 sec
Extension	70°C für 30 sec

Abschließend wurden 6 Zyklen mit folgenden Einzelschritten durchlaufen:

Denaturierung	95°C für 15 sec
Extension	70°C für 30 sec

Die sechs abschließenden Zyklen haben sich sehr bewährt, um sogenannte Sekundärstruktureffekte zu vermeiden. Hierbei handelt es sich um unspezifische Kettenabbrüche, die durch die Sekundärstruktur der zu sequenzierenden DNA bedingt sind und daher unabhängig vom verwendeten Didesoxynukleotid in allen 4 Spuren auftreten. Davon betroffen sind vor allem Moleküle mit Regionen, in denen viele intramolekulare Basenpaarungen vorliegen, wie es für rRNA-Moleküle der Fall ist. Durch die DNA-Strang-Verlängerung direkt nach dem Denaturierungsschritt werden nur bei den Molekülen weitere Basen eingebaut, die durch unspezifischen Kettenabbruch entstanden sind. Denn für die Anlagerung des (kürzeren) Primers an die komplementäre Region sind die Temperaturen zu hoch und die anderen Moleküle können wegen der terminalen Didesoxynucleotide nicht verlängert werden. Somit wird die Zahl der Moleküle mit unspezifischen Kettenabbrüchen deutlich verringert.

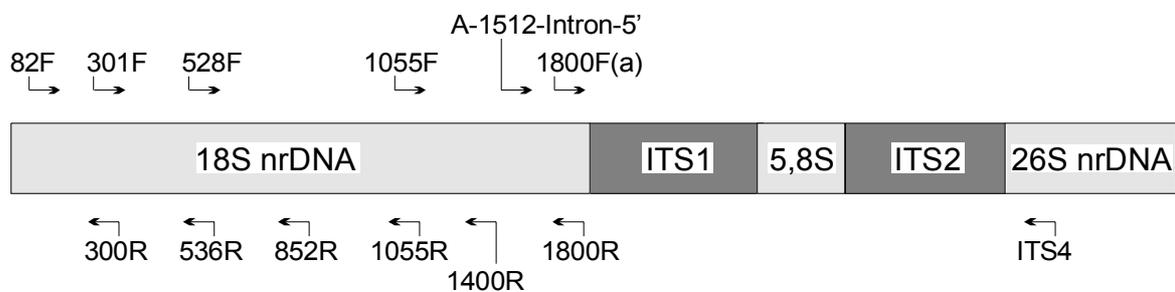


Abb. 11: Lage der verwendeten Sequenzierprimer.

Tab. 5: Sequenz der verwendeten Sequenzierprimer: Referenzsequenz ist *Trebouxia impressa* UTEX 892 (Genbank-Nummern: Z21551.1 [18S] und Z95383.1 [26S]).

Primer	Sequenz (5'→3')	Position in der Referenzsequenz	Herkunft
1055F	GGTGGTGCATGGCCG	1267-1281 (18S)	HUSS et al., 1999
1055R	CGGCCATGCACCACC	1281-1267 (18S)	GUNDERSON et al., 1986
1400R	ACGGGCGGTGTGT(AG)C	1643-1629 (18S)	GUNDERSON et al., 1986
1800 F	ACCTGCGGAAGGATCATTG	1782-1800 (18S)	FRIEDL, 1996
1800 Fa	ACCTGCGGAAGGATCATTAA	1782-1800 (18S) angepasst für Lecanorales	diese Arbeit
1800 R	CAATGATCCTTCCGCAGGT	1800-1782 (18S)	FRIEDL, pers. Mitt.
300R	TCAGGCTCCCTCTCCGG	0396-0380 (18S)	GUNDERSON et al., 1986
301F	CGGAGAGGGAGCCTG	0381-0395 (18S)	GUNDERSON et al., 1986
528F	CGGTAATTCCAGCTCC	0574-0589 (18S)	GUNDERSON, et al. 1986
536R	G(AT)ATTACCGCGGC(GT)GCTG	0582-565 (18S)	GUNDERSON et al., 1986
82F	GAAACTGCGAATGGCTC	0083-0099 (18S)	HUSS et al., 1999
852R	CGTCCCTATTAATCATTACG	0871-0852 (18S) non green-algal	GARGAS & TAYLOR, 1992
A-1512- Intron-5'	CGCCCGTCGCTCCTAC	1637-1652 (18S)	diese Arbeit
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	0056-0039 (26S)	WHITE et al., 1990

2.2.7.5 Phylogenetische Auswertung der Sequenzen

Allgemeine Vorgehensweisen

Mithilfe des Software Programms AlignIR (Fa. Li-Cor, Lincoln, Nebraska) wurden alle Sequenzen ein und desselben PCR-Produkts (es wurde immer +- und -Strang sequenziert) verglichen und eine Konsensussequenz ermittelt. Die Konsensussequenzen wurden in dem Programm Genedoc (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>) manuell aligniert, das erhaltene Alignment exportiert und mit dem Programm PAUP 4.0 β 8 analysiert (Phylogenetic Analysis Using Parsimony, SWOFFORD, 2000).

Die Analysen in PAUP erfolgten nach dem Maximum-Parsimony-Kriterium (Kriterium der größten Sparsamkeit), es wird also die Anordnung der Taxa in einem Stammbaum bevorzugt, bei der die geringste Anzahl von Mutationenschritten benötigt wird um die Abfolge der Sequenzen zu erklären. Die Anzahl der Mutationsschritte entspricht der Baumlänge, es wird also der Stammbaum mit der kürzesten Baumlänge bevorzugt. Kleine Datensätze (bis 33 Taxa) wurden mit dem ‚branch and bound‘-Algorithmus untersucht, der schneller alle kürzesten Bäume findet als eine vollständige Suche (SWOFFORD, 2000). Datensätze mit einer höheren Zahl von Taxa wurden mit heuristischen Suchen analysiert. Durch dieses Näherungsverfahren wird die Suche erheblich beschleunigt, aber es gibt keine Sicherheit für das Auffinden der optimalen Lösung. Um dieses Problem zu umgehen, wurden standardmäßig 500 Replikate der heuristischen Suche durchgeführt. Folgende Parameter wurden gewählt: schrittweises Hinzufügen der Taxa (Stepwise Addition); die Reihenfolge, in der weitere Taxa hinzugefügt werden, ist zufällig (AddSeq = random); die Verlagerung von Ästen wurde mit dem ‚Tree-Bisection-Reconnection‘-Algorithmus durchgeführt (bei dieser Methode wird der Stammbaum zweigeteilt und die beiden Teilbäume an einer anderen Stelle wieder zusammengefügt); die übrigen Einstellungen entsprachen den Grundeinstellungen (SWOFFORD, 2000). Bei gewichteten Analysen wurde zuerst mit dem Datensatz eine heuristische Suche durchgeführt und anschließend die einzelnen Positionen im Alignment bezogen auf ihren Konsistenzindex gewichtet. Mit diesem Datensatz wurden dann die weiteren Untersuchungen durchgeführt.

Kladistische Statistiken dienen der Überprüfung, ob die Stammbaum-Topologie die Information im Datensatz gut widerspiegelt. In dieser Arbeit wird der Konsistenzindex (CI; ‚consistency index‘) und der Konservierungsindex (RI, ‚retention index‘) verwendet. Der Konsistenzindex bewertet die Zahl der Homoplasien (mit dem Dendrogramm nicht kompatible Merkmale) als Anteil der Merkmalsänderungen in einer Topologie (WÄGELE, 2000). Allerdings ist dieser Index auch von der Anzahl der Taxa und Autapomorphien (evolutive Neuheit, die nur bei einem Taxon auftritt) abhängig. Diesen Nachteil umgeht der Konservierungsindex, indem die Zahl der in der Topologie vorkommenden Homoplasien ins Verhältnis zur maximalen Anzahl möglicher Homoplasien gesetzt wird.

Die statistische Unterstützung (Wiederfindungswahrscheinlichkeit) für einzelne Gruppen wurde durch die Berechnung von Jackknife-Werten ermittelt (FARRIS et al., 1996). Wie beim Bootstrap-Test sind die Werte ein Maß für Vertrauenswürdigkeit einzelner Abschnitte eines berechneten Stammbaums. Hierbei wird der ursprüngliche Datensatz modifiziert (Bootstrap: zufällige Auswahl von Merkmalen aus dem Datensatz mit Zurücklegen, bis die ursprüngliche Anzahl von Merkmalen erreicht ist; Jackknife: zufällige

Entfernung von Merkmalen aus dem Datensatz) und dieser modifizierte Datensatz analysiert. Diese Schritte werden mehrmals wiederholt. Jackknife / Bootstrap-Werte geben an, mit welcher Häufigkeit (in Prozent) die entsprechende Gruppe von Taxa in den jeweils berechneten Bäumen vorhanden war. Da die Berechnung von Jackknife-Werten viel schneller als die Berechnung von Bootstrap-Werten erfolgt, wurden Jackknife-Werte berechnet. WEDIN et al. (2000) konnten zeigen, dass mehrere Replikate der heuristischen Suche mit Verlagerung von Ästen durchgeführt werden sollten, um bessere Ergebnisse (z.B. etwaige Unterstützung basaler Gruppen) zu erhalten. Eigene Untersuchungen zeigten, dass bei der Entfernung von 37% des Datensatzes und 25 Replikaten der heuristischen Suche (diese Schritte wurden 500 mal wiederholt) die Jackknife-Werte in guter Übereinstimmung mit unabhängig berechneten Bootstrap-Werte waren.

Datensatz für die 18S nrDNA-Phylogenie der Grünalgen

Folgende Sequenzen aus der Genbank wurden, neben den eigenen Sequenzen, in die Untersuchung mit eingeschlossen (Genbank-Nr. in Klammern): *Acrosiphonia* sp. SAG 127.80 (U03757.1), *Adiantum raddianum* (U18621.1), *Ankistrodesmus stipitatus* SAG 202-5 (X56100.1), *Arabidopsis thaliana* (X16077.1), *Asterochloris magna* UTEX 902 (Z21552.1), *Chlamydomonas moewusii* strain CGC CC-1419 (U41174.1), *Chlamydomonas reinhardtii* (M32703.1), *Chlorella ellipsoidea* SAG 211-1a (X63520.1), *Chlorella lobophora* ANDREYEVA 750-I (X63504.1), *Chlorella luteoviridis* SAG 211-2a (X73997.1), *Chlorella minutissima* LEFEVRE ALCP 87 (Y13761.1), *Chlorella minutissima* SAG 1.80 (AB006046.1), *Chlorella mirabilis* ANDREYEVA 748-I (X74000.1), *Chlorella protothecoides* SAG 211-7a (X56101.1), *Chlorella saccharophila* SAG 211-9a (X63505.1), *Chlorella sorokiniana* BASLEROVÁ Prag A14 (X74001.1), *Chlorella* sp. SAG 211-18 (X73992.1), *Chlorella* sp. ex *Trapeliopsis flexuosa* (AY004348.1), *Chlorococcum hypnosporum* UTEX 119 (U41173.1), *Chondrus crispus* (Z14140.1), *Choricystis minor* SAG 251-1 (X89012.1), *Coleochaete scutata* (X68825.1), *Dictyochloropsis reticulata* CCHU 5616 (Z47207.1), *Dunaliella salina* (M84320.1), *Enteromorpha intestinalis* isolate SY0104 (AJ005413.1), *Friedmannia israeliensis* (M62995.1), *Funaria hygrometrica* (X74114.1), *Gloeotilopsis planctonica* SAG 29.93 (Z28970.1), *Haematococcus pluvialis* SAG 34-1b (AF159369.1), *Hydrodictyon reticulatum* (M74497.1), *Leptosira obovata* SAG 445-1 (Z68695.1), *Lobosphaera tirolensis* ASIB S234 (AB006051.1), *Lycopersicon esculentum* (X51576.1), *Mesostigma viride* strain SAG 50-1 (AJ250108.1), *Microthamnion kuetsingianum* UTEX 1914 (Z28974.1), *Muriella terrestris* strain: ASIB V38 (AB012845.1), *Myrmecia astigmatica* IB T76 (Z47208.1), *Myrmecia biatorellae* UTEX 907 (Z28971.1), *Myrmecia bisecta* IB T74 (Z47209.1), *Nannochloris* sp. SAG 251-2 (X81965.1), *Nanochlorum eucaryotum* Mainz 1 (X06425.1), *Pediastrum duplex* UTEX LB 1364 (M62997.1), *Pinus wallichiana* (X75080.1), *Prasiola fluviatilis* (AF189072.1), *Prasiola mexicana* sample MEX12 (AF189075.1), *Prototheca wickerhamii* SAG 263-11 (X74003.1), *Pseudendoclonium basiliense* UTEX 2593 (Z47996.1), *Scenedesmus abundans* UTEX 343 (X73995.1), *Scenedesmus acutiformis* SAG 276.11 (AB037089.1), *Scenedesmus vacuolatus* SAG 211-8b (X56104.1), *Stichococcus bacillaris* strain: K4-4 (AB055866.1), *Stichococcus bacillaris* UTEX 314 (U18524.1), *Trebouxia arboricola* SAG 219-1a (Z68705.1), *Trebouxia asymmetrica* SAG 48.88 (Z21553.1), *Trebouxia impressa* UTEX 892 (Z21551.1), *Trebouxia jamesii* TF86.132E2 (Z68700.1), *Trebouxia usneae* TF87.019A1 (Z68702.1), *Ulva rigida* EL0102 (AJ005414.1), *Volvox carteri* UTEX 1885 (X53904.1), *Watanabea* sp. SAG 211-9b (X73991.1) und *Zea mays* (AF168884.1).

Regionen mit unsicherem Alignment und die Anfangs- und Endbereiche, die bei einigen Taxa nicht vollständig sequenziert worden sind, wurden von der Analyse ausgenommen. Diese entsprachen den Positionen 1–52, 229, 276–281, 490–495, 640–686, 719–720, 1349–1371, 1389–1396, 1678–1708 und 1762–1791 der Sequenz von *Chlamydomonas reinhardtii* (M32703.1). Der Datensatz enthielt somit die nrDNA-Sequenzen von 68 Taxa mit 1596 Positionen. Von diesen waren 966 Positionen konstant, von den 630 variablen Positionen waren 410 bei Maximum-Parsimony-Analyse phylogenetisch informativ. Als Außengruppe wurde die Sequenz der Rotalge *Chondrus crispus* verwendet.

Datensatz für die ITS nrDNA-Phylogenie von *Trebouxia*

Folgende Sequenzen aus der Genbank wurden, neben den eigenen Sequenzen, in die Untersuchung mit eingeschlossen (Genbank-Nr. in Klammern): *Trebouxia arboricola* SAG 219-1a (Z68705.1), *T. arboricola* AB96032B5 (AJ007385.1), *T. arboricola* TF92011C3 (Z68703.1), *T. asymmetrica* SAG 48.88 (AJ249565.1), *T. corticola* UTEX 909 (AJ249566.1), *T. galapagensis* UTEX 2230 (AJ249567.1), *T. gelatinosa* TF86108B2 (Z68697.1), *T. gigantea* UTEX 2231 (AF242468.1), *T. impressa* AB96027D1 (AJ007383.1), *T. incrustata* UTEX 784 (AJ293795.1), *T. jamesii* TF 85073A1 (AJ249571.1), *T. jamesii* (AF242466.1), *T. jamesii* (AF242458.1), *T. jamesii* TF86001E1 (Z68699.1), *T. jamesii* (AF242459.1), *T. jamesii* TF86132E1 (Z68700.1), *T. jamesii* TF86156C3 (Z68701.1), *T. jamesii* 'vulpinae' (AF242457.1), *T. jamesii* 'letharii' sp. 1 (AF242460.1), *T. jamesii* 'letharii' sp. 2 (AF242461.1), *T. jamesii* 'letharii' sp. 3 (AF242462.1), *T. jamesii* 'letharii' sp. 4 (AF242463.1), *T. jamesii* 'letharii' sp. 5 (AF242464.1), *T. jamesii* 'letharii' sp. 6 (AF242465.1), *T. showmanii* UTEX 2234 (AF242470.1), *T. simplex* TW-1A2 (FRIEDL, pers. Mitt.), *T. sp.* TF?98003B2 (J249572.1), *Trebouxia* sp. (AJ293781.1), *Trebouxia* sp. (AJ293782.1) und *Trebouxia* sp. (AJ293783.1).

Regionen mit unsicherem Alignment und die 5,8S nrDNA wurden von der Analyse ausgenommen. Diese entsprachen den Positionen 28–63, 158–188, 300–457, 483–490 und 581–596 der ITS-Sequenz von *Trebouxia arboricola* SAG 219-1a (Z68705.1). Der Datensatz enthielt somit die ITS-Sequenzen von 54 Taxa mit 465 Positionen. Von diesen waren 202 Positionen konstant, von den 263 variablen Positionen waren 211 bei Maximum-Parsimony-Analyse phylogenetisch informativ. Als Außengruppe wurde die Sequenz von *T. impressa* AB96.027D1 (AJ007383.1) verwendet, da in der Analyse der 18S nrDNA-Sequenzen gezeigt werden konnte, dass dieses Taxon Schwesterngruppe zu den übrigen Vertretern der Gattung *Trebouxia* ist.

Datensatz für die group I-Intron-Phylogenie von *Trebouxia*

Folgende Sequenzen aus der Genbank wurden, neben den eigenen Sequenzen, in die Untersuchung mit eingeschlossen (Genbank-Nr. in Klammern): *Trebouxia arboricola* SAG 219-1a (Z68705.1), *T. arboricola* TF87060E1 (AJ249564.1), *T. arboricola* TF86045E1 (AJ249482.1), *T. arboricola* TF92011A1 (AJ249481.1), *T. arboricola* TF92.001C5 (müsste TF92.011C5 sein) (Z68704.1), *T. corticola* UTEX 909 (AJ249566.1), *T. galapagensis* UTEX 2230 (AJ249567.1), *T. gelatinosa* UTEX 905 (AJ249569.1), *T. gelatinosa* TF87015A1 (AJ249568.1), *T. higginsiae* UTEX 2232 (AJ249574.1), *T. impressa* TF87017E1 (AJ249570.1), *T. jamesii* TF86001E1 (Z68699.1), *T. jamesii* TF86132E2 (Z68700.1), *T. simplex* TF85073A1 (AJ249571.1), *T. usneae* UTEX 2235 (AJ249573.1), *T. usneae* TF87019A1 (Z68702.1) und *T. sp.* TF?98003B2 (AJ249572.1).

Regionen mit unsicherem Alignment wurden von der Analyse ausgenommen. Diese entsprachen den Positionen 5, 54–59, 211–219, 261–293, 327, 347–348 und 407–414 der Sequenz des 1512-Introns von *Trebouxia arboricola* SAG 219-1a (Z68705.1). Der Datensatz enthielt somit die Intron-Sequenzen von 26 Taxa mit 378 Positionen. Von diesen waren 197 Positionen konstant, von den 181 variablen Positionen waren 144 bei Maximum-Parsimony-Analyse phylogenetisch informativ. Als Außengruppe wurde die Sequenz des 1512-Introns von *Trebouxia arboricola* SAG 219-1a (Z68705.1) und die anderen Sequenzen der *T. impressa*-Gruppe verwendet.

Datensatz für die 18S nrDNA-Phylogenie von Ascomyceten

Folgende Sequenzen aus der Genbank wurden, neben den eigenen Sequenzen, in die Untersuchung mit eingeschlossen (Genbank-Nr. in Klammern): *Bacidia rosella* (AF091585.1), *Blumeria graminis* (L26253.1), *Buellia disciformis* (AF241543.1), *Calicium adspersum* (U86694.1), *Caloplaca flavorubescens* (AF241540.1), *Cetraria islandica* (AF117986.1), *Chaenothecopsis savonica* (U86691.1), *Cladonia bellidiflora* (U60900.1), *Cladonia rangiferina* (AF184753.1), *Cliostomum griffithii* (AF091590.1), *Conotrema populorum* (U86582.1), *Cudonia circinans* (AF107343.1), *Cudonia confusa* (Z30240.1), *Cyanodermella viridula* (U86583.1), *Cyphelium inquinans* (U86695.1), *Cyphelium tigillare* (AF241545.1), *Diploschistes ocellatus* var. *almeriensis* (AF038876.1), *Diploschistes ocellatus* (AF038877.1), *Graphis scripta* (AF038878.1), *Hypogymnia physodes* (AF117984.1), *Lecania cyrtella* (AF091589.1), *Lecanora dispersa* (L37535.1), *Lecanora intumescens* (AF091586.1), *Lecidea fuscoatra* (AF088239.1), *Lecidella meiococca* (AF091583.1), *Leifidium tenerum* (U70959.1), *Leotia lubrica* (L37536.1), *Morchella elata* agg. (L37537.1), *Neophyllis melacarpa* (AF117981.1), *Parmelia saxatilis* (AF117985.1), *Peltigera neopolydactyla* (X89218.1), *Peziza badia* (L37539.1), *Physcia aipolia* (AF088243.1), *Pilophorus acicularis* (U70960.1), *Pilophorus robustus* (AF184757.1), *Porpidia crustulata* (L37540.1), *Psora decipiens* (AF184759.1), *Pyrrhospora quernea* (AF091584.1), *Rhizocarpon geographicum* (AF088246.1), *Rhytisma salicinum* (U53370.1), *Saccharomyces cerevisiae* (J01353.1), *Scoliciosporum umbrinum* (AF091587.1), *Solorina crocea* (X89220.1), *Spathularia flavida* (AF107344.1), *Sphaerophorus globosus* (AF117983.1), *Sphinctrina turbinata* (U86693.1), *Squamarina lentigera* (AF088250.1), *Stenocybe pullatula* (U86692.1), *Stereocaulon ramulosum* (U70961.1), *Stereocaulon vesuvianum* (AF184761.1), *Stictis radiata* (U20610.1), *Tephromela atra* (AF091588.1), *Texasporium sancti-jacobi* (U86696.1), *Thelomma mammosum* (U86697.1), *Toninia sedifolia* (AF091591.1), *Urnula hiemalis* (Z49754.1), *Usnea florida* (AF117988.1), *Vulpicida juniperina* (AF117990.1), *Xanthoria elegans* (AF088254.1), *Xanthoria parietina* (AF241541.1) und *Zygosaccharomyces rouxii* (X58057.1).

Regionen mit unsicherem Alignment und die Anfangs- und Endbereiche, die bei einigen Taxa nicht vollständig sequenziert worden sind, wurden von der Analyse ausgenommen. Diese entsprachen den Positionen 1–50 und 1732–1799 der Sequenz von *Saccharomyces cerevisiae* (J01353.1). Der Datensatz enthielt somit die nrDNA-Sequenzen von 71 Taxa mit 1718 Positionen. Von diesen waren 1141 Positionen konstant, von den 577 variablen Positionen waren 386 bei Maximum-Parsimony-Analyse phylogenetisch informativ. Als Außengruppe wurde die Sequenzen der Hefen *Saccharomyces cerevisiae* (J01353.1) und *Zygosaccharomyces rouxii* (X58057.1) verwendet.

2.2.7.6 Untersuchung von DNA-Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (SSCP)

Allgemeines

Ein eleganter Nachweis von Mutationen ist der Nachweis von DNA-Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (SSCP). Diese Methode beruht auf der Erkenntnis, dass sich einzelsträngige DNA-Moleküle unterschiedlich falten, wenn sie eine – auch nur geringfügig – unterschiedliche Sequenz aufweisen. Diese unterschiedlich gefalteten Moleküle besitzen ein unterschiedliches Laufverhalten in nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gelen, wodurch man sie unterscheiden kann. Nach LESSA & APPLEBAUM (1993) können in Einzelsträngen, die zwischen 100 und 300 Basen lang sind, einzelne Basen-Austausche mit 99% Wahrscheinlichkeit durch diese Methode nachgewiesen werden.

Benötigte Chemikalien

- MDE-Acrylamidgel-Lösung (Fa. FMC Bioproducts, Vertrieb durch BIOzym)
- APS (10%)
- TEMED
- TBE-Puffer
- Auftragspuffer (Methylenblau in Formamid)
- Ethidiumbromidfärbeladung
- Biorad Gelapparatur (Biorad, Hercules, CA, USA)

Durchführung

Mit den PCR-Primern T_ITS1Fa und T_ITS1R bzw. T_ITS2F und T_ITS2R (siehe Tab. 6) wurden DNA-Fragmente mit den Längen 204 / 205 bzw. 260 / 261bp (siehe Tab. 7) aus der ITS1 bzw. ITS2 nrDNA mit dem folgenden PCR-Programm amplifiziert:

	95°C	4 min
10 Zyklen mit:		
	94°C	1 min
	55°C	45 sek
	72°C	5 sek
28 Zyklen mit:		
	94°C	1 min
	53°C	45 sek
	72°C	5 sek
	72°C	7 min

Von dem erhaltenen PCR-Produkt wurden 7µl für die weitere Analyse verwendet.

Tab. 6: Sequenz der verwendeten Primer für die SSCP-Analysen. Referenzsequenz ist *Trebouxia arboricola* SAG 219-1a (Genbank-Nummer: Z68705).

Primer	Sequenz (5'→3')	Position	Herkunft
T_ITS1Fa	GGGGCTGGCTCCTTTTG	89-105 (ITS1)	diese Arbeit
T_ITS1R	GATATCCGTTGTTGAGAGT	23-5 (5,8S)	diese Arbeit
T_ITS2F	TGTCTG(G/C)CTCAGCGTC	141-156 (5,8S)	diese Arbeit
T_ITS2R	CCTGACCTCAGGTCGA	1-16 (26S)	diese Arbeit

Tab. 7: Übersicht über die Länge (in bp) der für die SSCP-Analysen verwendeten PCR-Produkte .

Taxon	ITS1-Bereich	ITS2-Bereich
<i>T. angustilobata</i>	205	261
<i>T. australis</i>	204	261
<i>T. simplex</i> [gt A]	204	260
<i>T. simplex</i> [gt A(F)]	204	260
<i>T. simplex</i> [gt D]	205	261
<i>T. suecica</i>	204	260

Für die Polyacrylamid-Gele wurden 7,5 ml MDE-Gellösung, 15 ml TBE (1x) und 7,4 ml H₂O_{bidest.} zusammenpipettiert und entgast. Zu dieser Lösung wurden 120 µl APS (10%) und 12 µl TEMED pipettiert, alles gut gemischt und dann das Gel gegossen. Nach 30 min Polymerisation konnte das Gel benutzt werden. Während der Polymerisation wurden die DNA-Proben mit derselben Menge Auftragspuffer versetzt, 8 min auf 95°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Das schnelle Abkühlen gewährleistet die Ausbildung von intramolekularen Basenpaarungen, so dass nach der anschließenden Auftrennung (120 V, 13 h) drei Banden zu erkennen sind, nämlich die Bande des Doppelstranges und die Banden der jeweiligen – mit sich selbst paarenden – Einzelstränge. Zur Sichtbarmachung der DNA-Banden wurde das PAA-Gel in 0,5 × TBE-Puffer mit 0,5 mg/ml Ethidiumbromid für 5 min gefärbt und anschließend unter UV Licht ausgewertet.

2.2.8 Ableitung von RNA-Sekundärstrukturen

Um die wahrscheinlichste Sekundärstruktur des RNA-Transkripts der ITS2-Region zu bestimmen, wurden zuerst die nach MAI & COLEMAN (1997) für alle Grünalgen vorhandenen 4 helikalen Bereiche aufgrund der stark konservierten Anfangs- und Endbereiche ermittelt. Die Struktur der so erhaltenen Sequenzabschnitte wurde mit dem Programm mfold, Version 3.1 errechnet (ZUKER et al., 1999, MATHEWS et al., 1999, <http://www.bioinfo.math.rpi.edu/~mfold/rna/form1.cgi>).

2.2.9 Methoden für die soziologischen Vegetationsaufnahmen

Für die Tabellen (im Ergebnisteil) wurden die Daten nach den folgenden Kriterien ermittelt:

2.2.9.1 Angaben zum Standort der Gesellschaft

Lokalität: bezeichnet den zur Aufnahmelokalität nächstgelegenen geographischen Ort. Die vollständigen Angaben sind bei den Herbarbelegen angegeben, zur Veranschaulichung sind einige Sammelstellen in Abbildung 70 (Anhang B) abgebildet.

Schweden, R: Schweden, Härjedalen, Tännäs par., 1.2 km E von Ramundberget.

Schweden, Ö: Schweden, Södermanland, Österhaninge par., Gudö, along Gudöbroleden, ca. 800 m SE von Gudövik; vertikale Felsfläche an der Straße, E exponiert.

Schweden, Ü: Schweden, Södermanland, Utön par., Landspitze östlich von Rästavik.

Deutschland, E: Deutschland, Sachsen-Anhalt, Ldkr. Mansfelder Land, Hettstedt / 1,5 km SE of Burgörner; Halde von Schacht Eduard.

Deutschland, O: Deutschland, Sachsen-Anhalt, Ldkr. Mansfelder Land, S von Wimmelburg; Halde der Otto-Schächte.

Alpen, SW: Österreich, Salzburg, Niedere Tauern, Großarlal, Schwarze Wand bei Hüttschlag.

Alpen, F: Schweiz, Graubünden, Futschölpaß.

Alpen, K: Österreich, Steiermark, 40 km SW von Graz: Koralpe, Handalpe.

Alpen, Ö: Österreich, Tirol, Öztaler Alpen, 7 km SW von Vent.

Alpen, B: Italien, Trentino - Alto Adige, Bozen, Bildstöckljoch (Schnalstal / Matscher Tal), ca. 3,5 km W von Kurzras.

USA, RM: USA, Colorado, Rocky Mountains, Larimer Co., Flattop Mountain.

Australien, B: Australien, Capital Territory, Brindabella Range, summit of Mt Franklin, 45 km WSW of Canberra.

Meereshöhe: Höhenangabe in Meter über dem Meeresspiegel (müM).

Vegetation: Bei keiner Probenfläche war eine Phanerogamen-Vegetation vorhanden, die das Mikroklima der Flechten, z.B. durch Beschattung, beeinflusst hätte. Falls kleinere Büsche oder Bäume vorhanden waren (Schwarze Wand und

Ramundberget: *Betula pubescens*, *Salix spec.*), standen diese weit von der besammelten Gesteinsfläche entfernt. Daher wurde dieses Merkmal nicht weiter differenziert.

2.2.9.2 Angaben zur Aufnahme­fläche

Substrat: Schwermetallgehalt und pH-Bereich (sauer durch Sulfide bzw. basisch durch Carbonate).

Aufnahme­fläche:

Bei der Wahl der Größe der Aufnahme­fläche wurde zum einen darauf geachtet, dass sie groß genug war, um einen möglichst repräsentativen Teil des Artbestandes zu erfassen. Um dies zu erreichen, wurde zuerst ein größerer Bereich untersucht und die Aufnahme­fläche so gewählt, dass möglichst viele der vorhandenen Arten erfasst wurden. Falls nötig, wurden mehrere Belege gesammelt, um das Artenspektrum besser abdecken zu können.

Exposition: N: Norden; E: Osten; S: Süden; W: Westen
 Neigung: Abweichung von der Horizontalen in Grad (°);
 Gesteinsunterseite: 180, Überhang (über 180).
 Höhe über dem Boden: Entfernung der Mitte der Aufnahme­fläche vom Erdboden
 (Angabe nur für vertikale Flächen, in cm).
 Flechtendeckung: Mit Flechten bewachsener Aufnahme­flächenanteil in
 Prozent (%), in 5%-Schritten.
 Artenzahl: Gesamtartenzahl einer Einzelaufnahme.

2.2.9.3 Abundanz der Vegetation

Für die flechtensoziologischen Aufnahmen wurde die Abundanzskala nach WIRTH (1972) gewählt:

r	1–2 Thalli
+	Deckung bis 1% (bis 5 Thalli)
1	Deckung bis 5% (bis 20 Thalli)
2m	Deckung bis 5% (über 20 Thalli)
2a	Deckung 5–12,5%
2b	Deckung 12,5–25%
3	Deckung 25–50%
4	Deckung 50–75%
5	Deckung 75–100%

2.2.10 Dünnschichtchromatographie

2.2.10.1 Benötigtes Material

- DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄; Merck 1.05715
- Trennkammern (Höhe: 21 cm, Breite 21 cm, Tiefe: 9 cm)
- Ameisensäure
- Aceton
- Diethylether
- Dioxan
- Eisessig
- Hexan
- Toluol
- Schwefelsäure (10%)

2.2.10.2 Durchführung

Die dünnenschichtchromatographischen Untersuchungen wurden weitgehend nach der „Standardmethode zur Dünnschichtchromatographie von Flechtensubstanzen“ von CULBERSON & AMMANN (1979) durchgeführt. Die Extraktion der Substanzen aus der Flechtenprobe erfolgte in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit Aceton. Diese Lösung wurde direkt mit Schmelzpunktröhrchen (Außendurchmesser ca. 1 mm) auf Kieselgelplatten mit einer Schichtdicke von 0,25 mm aufgetragen. Als Referenz dienten Fragmente der Flechte *Cladonia symphycarpa*, die sowohl Atranorin als auch Norstictinsäure enthielten.

Als Laufmittel wurden die Standardlaufmittel A, B und C gewählt.

Laufmittel A: Toluol – Dioxan – Eisessig	(90 : 22,5 : 2,5)
Laufmittel B: Hexan – Diethylether – Ameisensäure	(60 : 45 : 10)
Laufmittel C: Toluol – Eisessig	(100 : 15)

Die Trennung der Flechtenstoffe erfolgte in Trennkammern mit gesättigter Atmosphäre. Nach Erreichen einer Laufmittelhöhe von 17 cm wurden die Platten aus den Kammern herausgenommen und die Fließmittelfront eingezeichnet. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte im Tageslicht und unter einer UV-Lampe mit den Wellenlängen 254 und 366 nm (letztere diente der Bestimmung der Farbe der Stoffe) und nach Behandlung mit 10%-iger H₂SO₄ (und anschließender Erhitzung auf 100°C für 20 min). Die Inhaltsstoffe wurden durch Ko-Chromatographie mit bereits bestimmten Stoffen aus ausgewählten Flechtenbelegen identifiziert.

2.2.11 Untersuchungen zur Schwermetallresistenz von Flechtenalgen

2.2.11.1 Chemikalien und verwendete Geräte

Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben waren alle verwendeten Chemikalien von p.a.-Qualität und wurden von Fluka (Buchs, Schweiz) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Stickstoff wurde von Messer-Griesheim (Olching) in Druckflaschen (Qualität 4.6) bezogen. Alle Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, in Milli-Q-Wasser (18,2 MΩcm; Millipore, Eschborn) angesetzt.

Geräte

Folgende allgemeinen Labor-Geräte wurden verwendet:

- Minishaker MS1 (IKA, Wilmington, NC, USA)
- Minibeadbeater (Biospec, Bartlesville, OK, USA)
- pH-Meter pH526 (WTW, Weilheim)
- Photometer Ultrospec 3000 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
- Waage BP3100S (Sartorius, Göttingen)
- Feinwaage A200S (Sartorius, Göttingen)
- Schüttelinkubator Thermoshake (Gerhardt)
- Sterilbank Microflow Laminar Flow Workstation (MDH, Andover Hants, UK).
- Vakuum-Konzentrator BA-VC-300H (Bachofer, Reutlingen)
- Zentrifuge Universal 16 (Hettich, Tuttlingen)
- Tischzentrifuge Eppendorf 5415C (Eppendorf, Hamburg)
- Kühlzentrifuge Jouan KR22i mit Rotoren AK500-11 (JA-10-kompatibel) und AK50-22 (JA-20-kompatibel; Jouan, Unterhaching)

2.2.11.2 Kultur der Flechtenalgen

Kulturbedingungen

Verwendet wurden sowohl im Rahmen dieser Arbeit isolierte Algenklone AB97.017A2 (*Trebouxia simplex* [gt A]) und AB97.070B2 (*Asterochloris irregularis*), als auch ein Klon der Typuskultur von *Trebouxia jamesii* UTEX 2233 (siehe Tab. 2 und Tab. 3).

Da alle getesteten Algenklone bei einer Kultivierung im Pflanzenkulturraum bei 23°C binnen zwei Monaten abstarben (für eine Auswahl siehe Abb. 12) wurden alle Schwermetallbelastungs-Versuche im Kühlraum bei 10°C und Dauerlicht durchgeführt. Diese niedrigen Temperaturen sind für die untersuchten Photobionten alpiner Flechten sehr gut geeignet.

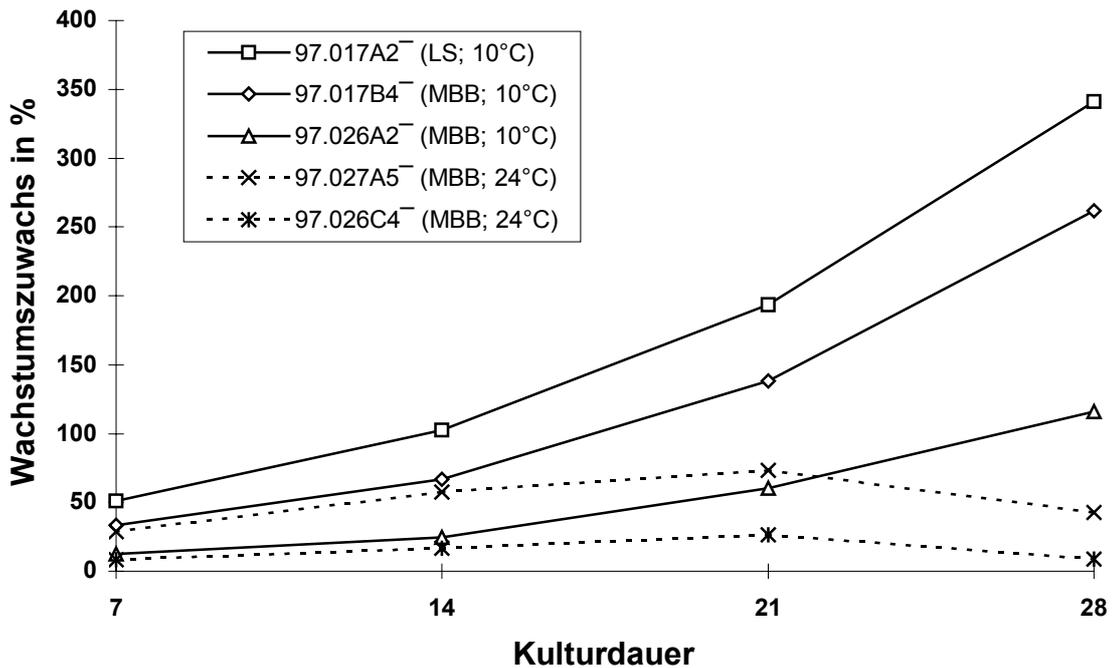


Abb. 12: Wachstum der *Trebouxia*-Klone bei unterschiedlichen Temperaturen (10°C und 24°C) und in unterschiedlichen Medien (LS: nach LINSMAIER & SKOOG; MBB: nach BISCHOF & BOLD, aber mit zugesetzter Saccharose wie bei LS).

Als Kulturmedium wurde das für pflanzliche Zellkulturen bewährte LS-Medium (nach LINSMAIER & SKOOG, 1965) verwendet, in dem die Algenzellen genauso gewachsen sind, wie in dem für die morphologische Bestimmung verwendeten MBB-Medium, dem Saccharose zugesetzt wurde. Das LS-Medium wurde bevorzugt, da es standardmäßig als Medium bei Belastungsversuchen von Suspensionskulturen mit Schwermetallen eingesetzt wird (z.B. GRILL, 1987, SCHMÖGER, 2000). Zur Erhaltung der Kulturen wurde alle 4 Wochen der pH auf 6 eingestellt und anschließend die Zellsuspension mit 2 Volumina frischen Mediums verdünnt.

Als Referenz für Phytochelatine wurden Suspensionszellkulturen von *Rauvolfia serpentina* BENTH. ex KURZ verwendet, von denen bekannt ist, dass sie bei Schwermetallbelastung Phytochelatine bilden. Die verwendete Zellsuspensionskultur stammt ursprünglich aus der Sammlung des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der LMU München (ehem. Prof. ZENK). Sie wurde auf einem Rundschüttler mit 100 U/min gehalten; die Temperatur des Zellkulturraums betrug konstant 23°C bei Dauerlicht. Einmal pro Woche wurden die Kulturen zur Erhaltung in frisches LS-Medium überführt; dabei wurde die Kultur mit zwei Volumina frischen Mediums verdünnt.

Wachstumsuntersuchungen

Das Wachstum der Algenzellen wurde mit drei unterschiedlichen Methoden bestimmt. Zur Zählung der Zellzahl diente eine Thoma-Kammer, die nach Vorschrift benutzt wurde, allerdings wurden – abweichend von dieser – bei kleiner Zellzahl alle 16 Großquadrate ausgezählt, um eine bessere statistische Absicherung des Ergebnisses zu gewährleisten. Als

ein weiteres Maß für die Zellzahl wurde die optische Dichte einer Zellsuspension bei 800 nm in einem Photometer gemessen. Zur Bestimmung des Frischgewichts wurden die Zellen 8 min bei 10000 x g zentrifugiert und das Medium vollständig entfernt. Nach erneuter Zentrifugation (2 min, 10000 x g) wurde das restliche Medium abgenommen und das Gewicht des Zellpellets auf einer Feinwaage bestimmt. Das Trockengewicht der Proben wurde nach 2-tägiger Trocknung bei 60°C bestimmt.

Belastungsversuche mit Schwermetallen

Um die Wirkung von Schwermetallen auf Flechtenalgen zu untersuchen, wurden 10 ml einer vor drei Wochen angezogenen Algenkultur, bei der zuerst der pH mit steriler 1 N NaOH auf 6,5 eingestellt wurde, zu 75 ml LS-Medium in einen 250 ml Erlenmeyerkolben pipettiert und mit weiterem LS-Medium und der entsprechenden Menge der zu testenden Schwermetalllösung (die Stammlösungen hatten eine Konzentration von 100 mM) auf 100 ml aufgefüllt. Bei den Kontrollen wurde nur LS-Medium zugegeben. Nach der angegebenen Inkubationszeit (zumeist drei Wochen) wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Sofern nicht anders angegeben, wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Größere Mengen an mit Schwermetallen belasteten Zellen wurden durch Kultur in Fernbachkolben mit 1 l Kulturmedium erhalten, das 100 ml frisch angezogene, auf pH 6,5 eingestellte, Algensuspension und die entsprechende Menge an Schwermetalllösung enthielt.

Zur Charakterisierung der Schwermetalltoleranz wurde den Vorschlägen von KÖHL & LÖSCH (1999) gefolgt und die Toxizität des getesteten Schwermetalls durch die Konzentration angegeben, die eine Wachstumsinhibition von 50% verursacht (EC₅₀). Außerdem wurde die maximale nicht inhibierende Konzentration (NOEC) und in den meisten Fällen auch die das Wachstum gänzlich hemmende Konzentration (EC₁₀₀) ermittelt.

Die geernteten Zellen wurden dreimal mit LS-Medium gewaschen und ihr Frischgewicht bestimmt. Eine der Parallelproben wurde zur Bestimmung des Trockengewichtes verwendet, die beiden anderen mittels RP-HPCL auf Thiole untersucht. Das Trockengewicht der Proben wurde nach 2-tägiger Trocknung bei 60°C auf einer Feinwaage bestimmt. Die Proben für die HPLC wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

Die Zellen von *Rauvolfia serpentina* wurden wie folgt belastet und geerntet: 250 ml der mit frischem Medium verdünnten Zellkulturen wurde drei Tage vorinkubiert. Nachdem die Schwermetallkonzentration auf 100 µM (für Cd beziehungsweise Cu) eingestellt worden ist, wurde für weitere vier Tage inkubiert und danach die Zellen geerntet. Das Ernten der Zellkulturen erfolgte durch Abnutschen mit einer Saugflasche und Büchnertrichter. Die trockengesaugten Zellen wurden mit destilliertem Wasser gewaschen und wieder trockengesaugt. Das gewonnene Zellmaterial wurde unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

Nachweis von Phytochelatinen durch RP-HPLC mit Nachsäulen-derivatisierung

Probenvorbereitung

Phytochelatine und andere Thiole wurden mit einer für Flechtenalgen angepassten Methode nach KNEER (1993) bestimmt, die eine Modifikation der Methode nach GRILL (1987) darstellt.

Zu dem Zellpellet wurde das gleiche Volumen an Glasperlen geben und dieser Brei in 1 ml von 1 mg/ml NaBH₄, gelöst in 0,6 N NaOH, aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte im Mini-Beat-Beater (4x 30 sek bei 4600). Anschließend wurde 10 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 10000 x g wurden 500 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 100 µl 3,6 N HCl dazugegeben. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde erneut abzentrifugiert und der Überstand in der HPLC analysiert. Ebenso wurden die Suspensionszellen von *Rauvolfia serpentina* aufgeschlossen. Deren Extrakt aus mit Schwermetallen belasteten Zellen diente als Referenz für Phytochelatine.

Von den Lösungen der Chromatographie-Fractionen wurden 250 µl mit 250 µl NaBH₄-Lösung (1 mg/ml in 1 N NaOH) versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl 3,6 N HCl wurden die Proben für 15 min auf Eis inkubiert und dann abzentrifugiert (5 min, 10000 x g). Der Überstand wurde für die HPLC-Analyse verwendet.

Trennung und Derivatisierung

Für die Bestimmung der Thiole wurden 100 µl der Proben auf die HPLC-Trennsäule (Reversed-Phase-Säule CC250/4 Nucleosil 100-10 C18; Macherey-Nagel, Düren) injiziert und bei einer Flussrate von 2 ml/min mit einem Acetonitril-Gradienten getrennt (Tab. 8).

Tab. 8: Gradient der RP-HPLC-Trennung: Laufmittel A war 0,1% Trifluoressigsäure in H₂O; Laufmittel B war 0,1% Trifluoressigsäure in 20% Acetonitril.

t (min)	%A	%B
0	100	0
2,5	75	25
17,5	0	100
18	0	100
19	100	0
26	100	0

Die spezifische Detektion der SH-Gruppen in Glutathion und Phytochelatinen erfolgte durch Nachsäulenderivatisierung mit 5,5'-bisdithio(2-nitrobenzoesäure) (DTNB), Ellman's Reagenz (ELLMAN, 1959). Die Reaktion ist in Abbildung 13 dargestellt; das gebildete gelb gefärbte Thiolatanion (TNB²⁻) kann anhand seiner Extinktion bei 410 nm quantifiziert werden. Nach der Säule wurde über ein T-Stück Ellman's Reagenz (75 µM DTNB in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 8,0 und 10% Acetonitril) mit einer Flussrate von 2 ml/min zugepumpt. Nach einer Reaktionszeit von 75 sek in einer 5 ml Probenschleife (50°C im Wasserbad) wurde die Extinktion bei 410 nm mit dem UV / Vis-Detektor gemessen und automatisch auf den Computer übertragen.

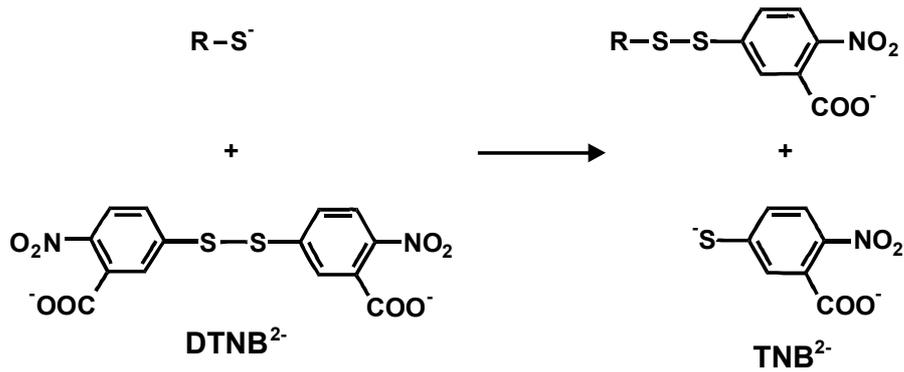


Abb. 13: Reaktion von DTNB (Ellman's Reagenz) mit einem Thiol zum gelb gefärbten Thiolatanion (TNB $^{2-}$), welches bei 410 nm detektiert wird.

HPLC-Anlage

Die HPLC-Anlage (Pharmacia, Uppsala, Schweden) bestand aus: Autosampler Marathon mit Injektionsventil (übliches Injektionsvolumen 100 μ l); Gradientenpumpe Pharmacia LKB 2249 mit Low Pressure Mixer und Entgaser Degasys DG-1310; HPLC-Pumpe Pharmacia LKB 2248 (für die Derivatisierung); Trennsäule CC250/4 Nucleosil 100-10 C18 mit Vorsäule CC8/4 Nucleosil 100-10 C18 (beide Macherey-Nagel, Düren); Wasserbad (50°C) mit Probenschleife (5 ml); UV / Vis-Detektor Pharmacia VWM 2141; Windows95-PC mit Ezchrom Chromatography Data System 6.6 (Scientific Software, San Ramon, Ca, USA).

Tab. 9: Korrekturfaktoren für die Quantifizierung von Thiolen mittels RP-HPLC und Nachsäulenderivatisierung mit Ellman's Reagenz. Aufgrund unterschiedlicher Derivatisierungseffizienz der SH-Gruppen bei unterschiedlich langen Phytochelatinen war die $A_{410\text{nm}}$ pro SH-Gruppe bei längeren Phytochelatinen geringer als bei kürzeren. Bei Verwendung eines Glutathion-Standards zur Quantifizierung mussten daher die aufgeführten Korrekturfaktoren verwendet werden.

Thiol	Korrekturfaktor
Glutathion	1
PC $_2$	1
PC $_3$	1,3
PC $_4$	1,5
PC $_5$	2,9

Die Extinktion bei 410 nm wurde vom UV / Vis-Detektor auf einen Windows95-PC übertragen und dort mit dem Programm EZchrom Chromatography Data System 6.6 analysiert. Die Identifikation der erhaltenen Peaks erfolgte anhand des Vergleichs der Retentionszeiten mit Standardsubstanzen aus *Rauvolfia serpentina*. Die Quantifizierung erfolgte nach der Peakfläche. Als Thiol-Standard wurde Glutathion-Lösung (in Laufmittel A) verwendet. Der Zusammenhang zwischen eingesetzter Menge Glutathion und Peakfläche war zwischen 50 und 10000 pmol linear ($r = 0,99995$). Die Menge an Glutathion, die noch qualitativ nachgewiesen werden konnte, betrug etwa 20 pmol; ab etwa 50 pmol konnten die Peakflächen noch mit hinreichender Genauigkeit quantifiziert werden. Für die Quantifizierung der Phytochelatine war es nötig, die Derivatisierungseffizienz in Abhängigkeit von der Zahl der SH-Gruppen zu bestimmen (siehe auch KNEER, 1993). Dazu wurde die Absorption derivatisierter Phytochelatin-Standards bei 410 nm zu der

Absorption underivatisierter Standardsubstanzen bei 220 nm in Bezug gesetzt; die daraus errechneten Korrekturfaktoren sind in Tabelle 9 aufgelistet. Diese Kalibrierung wurde von Dr. M. SCHMÖGER (München) durchgeführt und hier zur Verfügung gestellt. Alle Thiol-Konzentrationen wurden als $\mu\text{mol SH-Gruppe pro g Trockengewicht}$ (oder pro mg Protein oder pro ml Lösung) dargestellt. In Abbildung 14 ist beispielhaft ein HPLC-Chromatogramm dargestellt.

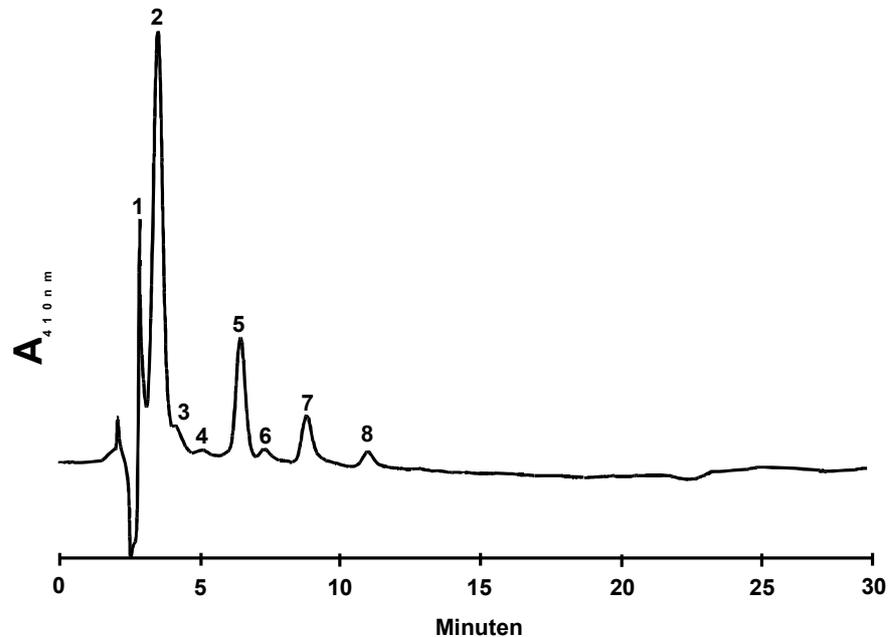


Abb. 14: RP-HPLC-Chromatogramm mit Nachsäulenderivatisierung mit DTNB und Detektion bei 410 nm (Beispiel). Das HPLC-Elutionsprofil zeigt einen Extrakt aus Zellen, die für 7 Tage mit 1 mM Cd behandelt wurden. Die mit Nummern versehenen Peaks repräsentieren: Cystein (1), Glutathion (2), unbekannte Substanzen (3-4), PC 2 (5), unbekannt (6), PC 3 (7), PC 4 (8).

Proteinbestimmung

Bestimmungen der Proteinmenge in Lösungen erfolgten nach BRADFORD (1976). Dazu wurden in 1 ml-Kunststoffküvetten 0,5 ml Bradford-Reagenz (Sigma) mit 1–50 μl Probe versetzt und auf 1 ml mit H_2O aufgefüllt. Die Absorption bei 595 nm wurde nach 10 min Inkubation gegen einen Blindwert, der statt der Probe H_2O enthielt, gemessen. Als Proteinstandard diente Rinderserumalbumin (BSA).

2.2.11.3 Bestimmung der Schwermetallgehalte durch AAS und ICP-AES

Flüssigproben

Gelöste Schwermetalle, z.B. im Medium, wurden mittels AAS (Atomabsorptionsspektrometrie) oder ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry) bestimmt. Die Analysen führte Herr HARTL am Institut für Anorganische Chemie der LMU München durch. Anfangs wurde ein Perkin-Elmer 1100B Atomabsorptions-Spektrometer (Perkin-Elmer, Überlingen) mit Hohlkathodenlampen von Bachofer verwendet. Neben der Direktbestimmung in der Flamme wurden die meisten Analysen mit der Graphitrohrtechnik durchgeführt, da sie empfindlicher ist (Konzentrationsbereich von 0,05–5 statt 1000–8000 µg/l für Cd bei 228,8 nm). Bei den Graphitrohr-Analysen wurde ein Palladium-Ascorbat-Modifizier verwendet (Endkonzentration 1,34 mM Pd(NO₃)₂ und 81,1 mM Ascorbinsäure. Spätere Analysen (die die meisten Gesteinsproben und Proben aus den Cu-Versuchen umfassten) wurden mit einem Simultan-ICP-AES-Gerät Varian Vista RL CCD (Varian, Darmstadt) durchgeführt. Die dabei verwendeten Wellenlängen waren für As 193,696 nm, für Ca 422,673 nm, für Cd 214,439 nm, für Co 228,600 nm, für Cu 327,395 nm, für Fe 259,940 nm, für Ni 230,229 nm, für P 213,618 nm, für Pb 220,353 nm, für S 180,669 nm, für Si 250,690 nm und für Zn 213,857 nm.

Gesteinsproben

Da die Schwermetallgehalte im Gestein sehr stark schwanken können, wurden die zu untersuchenden Proben vom selben Stein genommen, von dem auch die Flechten untersucht wurden. Die Gesteinsbrocken wurden zuerst mit einer Kugelmühle (Fa. Perkin-Elmer) zweimal für 30 sek gemahlen und dann eine definierte Menge dieses Pulvers eingewogen und mit Königswasser (Salpeter- und Salzsäure [1:3]) über Nacht aufgeschlossen. Ein Aliquot der so erhaltenen Lösung wurde mittels AAS (Atomabsorptionsspektrometrie) oder ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry) bestimmt.

2.2.11.4 Nachweis von Phytochelatin-Metall-Komplexen durch Gelfiltration

Zur schonenden Auftrennung von verschiedenen Metall-Spezies, insbesondere von nicht-kovalenten Komplexen, dient üblicherweise die Gelfiltration (auch Gelchromatographie oder Size-Exclusion-Chromatography genannt). Auch für Phytochelatin-Metall-Komplexe wurde diese Methode häufig verwendet (GRILL et al., 1985). Das verwendete Chromatographiesystem (Biorad, Hercules, CA, USA) bestand aus einer BioLogic Workstation mit Ventilen AV7-3, SV5-4, SV3-2, UV-Detektor (254 nm bzw. 280 nm) und Leitfähigkeitsmonitor; einem BioLogic HR Controller (PC mit Windows95 und BioLogic HR 2.0 Software); einem Fraktionssammler 2128.

Für die Gelfiltration wurden die Zellen mit Puffer extrahiert; dazu wurden auf 1 g Frischgewicht 0,5 ml des Puffers genommen. Standardpuffer war 10 mM Tris-Cl (pH 8,0).

Nach Zentrifugation (10000 x g; 30 min) wurden 6 ml des Überstands auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen.

Die Gelfiltrationssäule war 64 cm lang, hatte einen inneren Durchmesser von 1,6 cm und war mit Sephadex G25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) gepackt. Das Ausschlußvolumen V_0 der Säule betrug 55 ml, das Gesamtvolumen V_t 130 ml. Als Laufmittel diente der Extraktionspuffer (10 mM Tris-Cl pH 8.0) mit 100 mM NaCl. Bei einer Flussrate von 0,8 ml/min wurden Fraktionen von 2 ml gesammelt. Die gesammelten Fraktionen wurden mit RP-HPLC auf Thiole und mit AAS bzw. ICP-AES auf Metalle analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Beschreibung der bearbeiteten Flechtenarten

Für die Bestimmung der Flechtenarten wurden die Florenwerke von ELIX (1994a, 1994b), POELT (1969), POELT & VĚZDA (1977), POELT & VĚZDA (1981), PURVIS et al. (1992) und WIRTH (1980, 1995) verwendet. Bei kritischen Gruppen wurde zusätzlich folgende Literatur verwendet: CALATAYUD & RAMBOLD (1998), COPPINS & PURVIS (1987), FEUERER (1978), FEUERER (1991), FRYDAY & COPPINS (1997), GOWAN (1989), GOWAN & AHTI (1993), HERTEL (1995), HERTEL & RAMBOLD (1987), KNOPH et al. (1994), LAUNDON (1992), LEUKERT et al. (1995), ORANGE (1995), RAMBOLD & SCHWAB (1990), SCHWAB (1986).

Alle Flechten gehören zur Klasse der Lecanoromycetes, welche die meisten der lichenisierten Pilze enthält (ERIKSSON et al., 2001). Die benutzte systematische Gliederung stellt eine Synthese der Gliederungen von HAFELLNER et al. (1993) und ERIKSSON et al. (2001) dar, in der die Gattungen der Unterordnung Lecanorineae sensu ERIKSSON et al. (2001) nicht alphabetisch übernommen wurden, sondern in die von HAFELLNER et al. (1993) vorgeschlagenen Gruppen eingeteilt wurden. Die hier vorliegende Beschreibung der untersuchten Flechtenarten will diese nicht möglichst umfassend charakterisieren, vielmehr sind nur diejenigen Merkmale der Flechten angeben, die auch an dem untersuchten Material beobachtet und zur Bestimmung verwendet wurden. Die Farbreaktionen beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf die chemischen Reaktion in der Medulla des Lagers. Unter ‚Bearbeitete Belege‘ sind jene Belege angegeben, von denen der Algenpartner untersucht wurde.

3.1.1 Ordnung Agyriales

3.1.1.1 Fam. Agyriaceae

Trapelia obtegens (TH.FR.) HERTEL

Lager grün, areoliert, sorediös aufgelöst. Apothecien klein (bis 0,8 mm im Durchmesser), sitzend, mit roter Scheibe, ohne Lagerrand, K-. Paraphysen nicht verdickt. Asci mit schwachblauem, apikalem Tholus („*Trapelia*-Typ“). Ascosporen farblos, einzellig.

Chemie: J-, K-, C+ rot.

Bemerkungen: Die Art ähnelt *Trapelia corticola* COPPINS & P.JAMES, welche jedoch auf Baumrinde wächst und kleinere Areolen und Apothecien besitzt.

Bearbeitete Belege: BECK 176b, 176c und 177c (fruchtend bei BECK 176c).

3.1.2 Ordnung Lecanorales

3.1.2.1 Unterordnung Acarosporineae

Fam. Acarosporaceae

Acarospora bullata ANZI

Lager gelappt, (rot-)braun, aus zusammenschließenden Areolen bestehend. Apothecien eingesenkt, meist mehrere je Areole. Hymenium 100–120 µm, farblos. Ascosporen farblos, einzellig, zu sehr vielen je Ascus, 3–4 × 1–2 µm.

Chemie: Medulla J–, K–, C–; oberer Cortex C+ rot.

Bemerkungen: Nach POELT (1969) wächst diese Art bevorzugt auf kalkhaltigem Gestein. Bearbeitete Belege: BECK 262a, 262b und 265a.

Acarospora rugulosa KÖRB.

Lager squamulös, hell- bis dunkelbraun, glänzend. Apothecien erst eingesenkt punktförmig, später gestielt mit dunkel gefärbter, gefalteter Scheibe und einfachem Rand, 0,5–1,5 mm im Durchmesser. Excipulum gut entwickelt; Hypothecium blass gelb; Hymenium farblos, (80–)90–100(–115) µm; Epihymenium mit braunem, in KOH löslichem Pigment; Paraphysen wenig verzweigt, septiert, ca. 2 µm dick, verklebt (sich in KOH trennend), Spitzen kaum verbreitert. Asci keulenförmig, 80–100 × 15–25 µm. Ascosporen >100 je Ascus, unseptiert, farblos, ellipsoidisch, 3–4 × 1,8–2 µm.

Chemie: K–, C+ rot, KC+ rot.

Bemerkungen: *A. rugulosa* ist sehr Cu-tolerant. PURVIS (1984) konnte zeigen, dass Kupfer als Cu-Oxalat in der Medulla abgelagert wird. *A. rugulosa* ist in Abbildung 60C dargestellt (im Anhang B).

Bearbeitete Belege: BECK 30, 67, 68, 141 und HERTEL 34159.

Acarospora sinopica (WAHLENB.) KÖRB.

Lager squamulös, rostrot; Randareolen meist deutlich vergrößert. Apothecien eingesenkt, punktförmig. Asci keulenförmig. Ascosporen >100 je Ascus, unseptiert, farblos, ellipsoidisch, 3–3,5 × 1,2–1,6 µm.

Chemie: K–, C–, KC–.

Bemerkungen: Siehe *A. smaragdula*. *A. sinopica* ist in Abbildung 60A dargestellt (im Anhang B).

Bearbeitete Belege: BECK 30, 31, 38a, 53, 60, 61, 63a, 68, 141, 142a, 177a, 178a und HERTEL 34159.

Acarospora smaragdula (WAHLENB.) A.MASSAL.

Lager squamulös, hellbraun-beige bis gelblich-grün (Cu!) oder rostfarben (Fe!); Areolen zerstreut oder in kleinen Gruppen. Apothecien eingesenkt, punktförmig, 0,1–0,5 mm im Durchmesser; nur sehr selten mit ausgebreiteter Scheibe (–0,8 mm). Hypothecium farblos; Hymenium farblos, 85–135 µm hoch; Epihymenium blass braun; Paraphysen septiert, gelegentlich verzweigt, ca. 1,5 µm dick, verklebt (trennen sich nicht in KOH), Spitzen etwas verbreitert. Asci keulenförmig, 100–120 × 10–25 µm. Ascosporen >100 je Ascus, unseptiert, farblos, ellipsoidisch, 2,3–5 × 1–1,8 µm.

Chemie: J–, K+ rot (Norstictinsäure), C–, KC–.

Bemerkungen: *A. smaragdula* wächst bevorzugt in Spalten und beschatteten Bereichen und ist durch die kleinen, rundlichen Areolen mit mehreren, blassgefärbten, punktförmigen Apothecien charakterisiert. Sehr nahe verwandt ist *A. sinopica*, die aber keine positive K-Reaktion zeigt. PURVIS (1985: 192) findet Konstanz in diesem Merkmal, aber WIRTH (1995: 105) schließt auch K-negativ reagierende Proben in dieses Taxon ein indem er die meist größeren Apothecien und nicht strahlig-rosettig vergrößerten Randareolen bei *A. smaragdula* var. *lesdainii* (HARM. ex A.L.SM.) H.MAGN. als taxonomisch relevant betrachtet. Außerdem findet sich *A. sinopica* bevorzugt auf Horizontalflächen. In einer kürzlich erschienen Arbeit werden auch K- reagierende Thalli unter *A. smaragdula* geführt (PURVIS et al., 2000).

Bearbeitete Belege: BECK 143a, 177a, 178a und 263.

Fam. Hymeneliaceae

***Tremolecia atrata* (ACH.) HERTEL**

Lager rostrot (oder schwarz), dünn, rissig oder fein areoliert, meist unter 3 cm im Durchmesser. Apothecien schwarz konkav, berandet, in den Thallus eingesenkt oder (selten) angedrückt, ca. 0,5 mm im Durchmesser. Excipulum kohlig; Epihymenium grünlichbraun; Hypothecium dunkelbraun. Tholi der Asci ohne deutliche J-Reaktion, Gallerthülle J+ rot-orange. Ascosporen einzellig, farblos, 10–16 × 6–9 µm.

Chemie: J-, K-, C-.

Bemerkungen: Eine gut kenntliche Art aufgrund der kleinen, konkaven, angedrückten Apothecien und einzelligen, farblosen Ascosporen. *T. atrata* ist in Abbildung 60B dargestellt (im Anhang B).

Bearbeitete Belege: BECK 63c, 64, 67, 68, 69, 142b, 151, 177b, 178a, 179, 235, 236, ELIX 43014a und b.

3.1.2.2 Unterordnung Lecanorineae (inkl. Cladoniineae)

Rhizocarpaceae Group

Fam. Rhizocarpaceae

***Rhizocarpon* cf. *cyanescens* (HELLB.) ZAHLBR.**

Lager weiß, rissig. Apothecien in Areolen eingesenkt. Hymenium farblos, 65 µm; Epihymenium grünlich schwarzbraun, in K unverändert. Ascosporen 2-zellig, auch jung schon braun(-grau) mit (schwach) warziger Oberfläche.

Chemie: J+ blau, K+ rote Nadelkristalle, C-.

Bemerkungen: Die untersuchten Belege entsprechen *Rhizocarpon cyanescens*, wurden aber dennoch als cf. *cyanescens* geführt, da sie dieser Art nicht mit letzter Sicherheit zuzuordnen waren und die Gattung *Rhizocarpon* für Australien noch nicht eingehend bearbeitet worden ist.

Bearbeitete Belege: ELIX 43014a und 43014b.

***Rhizocarpon geographicum* (L.) DC.**

Lager gelb, aus flachen bis mäßig gewölbten Areolen bestehend. Apothecien flach bis leicht gewölbt, meist eckig und zwischen den Areolen sitzend. Ascosporen mauerförmig septiert, meist mit weniger als 20 Zellen, 25–40 × 11–16 µm.

Chemie: Lager J+, K–, C–.

Bemerkungen: Bearbeitete Belege: BECK 30, 31, 142b, 178b und ELIX 43014a.

***Rhizocarpon lecanorinum* ANDERS**

Lager aus grünlich gelben, gewölbten, die Apothecien kragen- oder ringförmig umfassenden Areolen bestehend, die ein geschlossenes Lager bilden. Apothecien flach, ohne deutlichen Rand. Epihymenium grünlich braun, K–. Ascosporen deutlich mauerförmig septiert, 30–40 × 12–18 µm.

Chemie: J+ blau, K+ gelb; Excipulum K+ rote Lösung.

Bemerkungen: RUNEMARK (1956) bezeichnet diese Art als Pionier. Sie ist bereits von eisenhaltigem Gestein bekannt (FEUERER, 1978).

Bearbeitete Belege: BECK 176c.

***Rhizocarpon norvegicum* RÄSÄNEN**

Lager areoliert; Areolen gelb, stark gewölbt, in kleinen Gruppen zusammenstehend. Apothecien um 0,5 mm im Durchmesser, randlos, konkav, ohne ein weißes Markgeflecht unter dem Hypothecium. Ascosporen 2-zellig, 9,5–11 × 5,5–6,5 µm.

Chemie: Lager J+, K–, C–.

Bemerkungen: HOLTAN-HARTWIG & TIMDAL (1987) berichten ein lichenicoles Wachstum von *R. norvegicum* auf verschiedenen Flechtenarten, vor allem auf *Acarospora sinopica*. Letzteres konnte für drei Belegen des untersuchten Materials bestätigt werden (BECK 63a, 68 und 141). *R. norvegicum* ist in Abbildung 60A dargestellt (im Anhang B).

Bearbeitete Belege: BECK 63a, 67, 141 und HERTEL 34159.

***Rhizocarpon polycarpum* (HEPP) TH.FR.**

Lager aus graubraunen, zusammenstehenden Areolen bestehend. Apothecien 0,5–0,8 mm im Durchmesser, berandet. Epihymenium (rot)braun in K nach rot verfärbend. Ascosporen 2-zellig, bis zur Reife farblos, 20–24 × 9–12 µm, im Alter braun gefärbt und bis 4-zellig.

Chemie: J+ (blau), K–, C–.

Bemerkungen: Bearbeitete Belege: BECK 31 und 142b.

***Rhizocarpon ridescens* (NYL.) ZAHLBR.**

Lager aus sorediösen, hochgewölbten, leuchtend gelben Areolen bestehend.

Chemie: Medulla J+ blau, C–.

Bemerkungen: Die amyloide Medulla unterscheidet diese Art von ähnlichen Arten der Gattung *Lecanora*. Bearbeitete Belege: BECK 53.

***Rhizocarpon simillimum* (ANZI) LETTAU**

Lager grau, rissig, wenig ausgedehnt. Apothecien 0,2–0,5 mm im Durchmesser, berandet. Epihymenium rötlich braun. Ascosporen 2-zellig, schon früh graugrün, später braun gefärbt, 11–14 × 6–7 µm.

Chemie: J+ (blau), K–, C–.

Bemerkungen: Bearbeitete Belege: HERTEL 34159.

Rhizocarpon spec.

Lager aus grauen, konvexen, verstreut auf einem schwarzen Hypothallus sitzenden, Areolen bestehend. Apothecien im Umriss rund, ca. 0,4 mm im Durchmesser. Epihymenium kohlig pigmentiert, in K keine Farbveränderung zeigend. Ascosporen 4-zellig, ohne Längswände, sehr lange farblos, nur alt (absterbend) braun, ca. $30 \times 13 \mu\text{m}$.

Chemie: J+ blau, K-, C-.

Bemerkungen: Bearbeitete Belege: ELIX 43014a.

***Rhizocarpon cf. viridiatrum* (WULFEN) KÖRB.**

Lager aus gelben, rundlichen, gewölbten, über die Apothecien hinausstehenden, Areolen bestehend. Apothecien gewölbt, 0,4–0,5 mm im Durchmesser. Excipulum deutlich, am Rand schwarz sonst braun; Hymenium farblos; Epihymenium braunschwarz, K-. Ascosporen mit nur wenigen Längswänden (2–3), graubraun gefärbt, leicht gebogen $20\text{--}25 \times 8\text{--}11 \mu\text{m}$.

Chemie: Lager: J-, K-, C-.

Bemerkungen: Bei der untersuchten Probe fehlt die K+ purpur Reaktion des braunschwarzen Epihymeniums. Nach WIRTH (1980) wächst *R. viridiatrum* lichenicol auf *Aspicilia* Arten (selten auf Arten anderer Gattungen), bei dem vorliegenden Beleg konnte allerdings kein eindeutiges lichenicoles Wachstum beobachtet werden.

Bearbeitete Belege: ELIX 43014a.

Lecidiaceae Group

Fam. Lecideaceae

***Lecidea confluens* (WEBER) ACH.**

Lager grau, rissig, mit flachen bis mäßig gewölbten Areolen. Apothecien sitzend, oft an den Thallus gedrückt. Hypothecium braun; Epihymenium olivgrün. Ascus mit J+ blauer Kappe. Ascosporen farblos, einzellig, $10\text{--}13 \times 4,5\text{--}6 \mu\text{m}$.

Chemie: J+ blau, K-, C-.

Bemerkungen: Durch Dünnschichtchromatographie (TLC) konnte als Hauptinhaltsstoff Confluentinsäure nachgewiesen werden. *L. confluens* ist von der ebenfalls Confluentinsäure besitzenden *L. tessellata* durch das dunkle Hypothecium und die etwas größeren und dünnwandigeren Ascosporen getrennt (HERTEL, 1995).

Bearbeitete Belege: BECK 64, 68 und 128.

***Lecidea fuscoatra* (L.) ACH.**

Lager ausgeprägt areoliert, Areolen konkav bis mäßig gewölbt, (grau-)braun, mit Epinekralschicht.

Chemie: J-, K-, Cortex C+ rot.

Bemerkungen: Mittels TLC konnte Gyrophorsäure nachgewiesen werden. Obwohl nicht fruchtend konnte diese Art durch die C+ rote Reaktion in dem Cortex und dem Nachweis von Gyrophorsäure identifiziert werden. Von den ebenfalls Gyrophorsäure-haltigen *Lecidea confluentula* MÜLL.ARG. und *Lecidea siderolithica* MÜLL.ARG. unterscheidet sie sich durch den wesentlich deutlicher entwickelten, großen und dickkrustigen Thallus. Diese Art wächst oft auf staubimprägnierten oder leicht gedüngten Substraten.

Bearbeitete Belege: BECK 176a.

***Lecidea inops* TH.FR.**

Lager grau, areoliert. Apothecien sitzend, konvex, 1–3 mm im Durchmesser. Excipulum gering entwickelt, C–; Hypothecium dunkelbraun; Epihymenium braun, in K grünlich. Ascus mit J+ blauer Kappe. Ascosporen farblos, einzellig, 8–10 × 3–4 µm.

Chemie: J+ blau, K–, C–.

Bemerkungen: Für die Belege BECK 147 und BECK 265a, die auch für die Sequenzanalysen verwendet wurden, konnte durch TLC Perlatolsäure nachgewiesen werden, was eine eindeutige Artzuordnung ermöglichte. *L. inops* ist in Abbildung 61A dargestellt (im Anhang B).

Bearbeitete Belege: BECK 144a, 147, 261 und 265a.

Lecidea lapicida* (ACH.) ACH. *lapicida

Lager grau-weiß, rissig, mit flachen bis mäßig gewölbten Areolen. Apothecien sitzend, oft an den Thallus gedrückt. Hypothecium farblos oder hellbraun; Epihymenium grünlich-schwarz, in K leuchtend grün. Ascus mit J+ blauer Kappe. Ascosporen farblos, einzellig, 9–14 × 4,5–6,5 µm.

Chemie: J+ blau, K+ gelb oder K–, C–.

Bemerkungen: Durch TLC konnte Stictinsäure als Hauptinhaltsstoff nachgewiesen werden.

Bearbeitete Belege: BECK 126, 178b und 235.

***Lecidea lapicida* (ACH.) ACH. var. *pantherina* ACH.**

Syn.: *L. lactea* FLÖRKE ex SCHAER.

Lager grau-weiß, manchmal teilweise rostrot überlaufen, rissig, mit flachen Areolen. Apothecien sitzend, oft an den Thallus gedrückt. Hypothecium farblos oder hellbraun; Epihymenium grünlich-schwarz, in K leuchtend grün. Ascus mit J+ blauer Kappe. Ascosporen farblos, einzellig, 9–14 × 4–6,5 µm.

Chemie: J+ blau, K+ rote Nadelkristalle, C–.

Bemerkungen: Beim ersteren Beleg zeigten nicht alle Thallusbereiche, obwohl morphologisch einheitlich, eine K+ rote Tüpfelreaktion. Dies könnte auf einen Mischthallus oder eine fehlende Abgrenzbarkeit der Varietäten von *Lecidea lapicida* zurückzuführen sein. Der einzige Unterschied zwischen den Varietäten liegt in der Anwesenheit von Norstictinsäure (K+ rote Reaktion) in *L. lapicida* var. *pantherina*, die auch mittels TLC identifiziert werden konnte. Daher fassen SCHWAB (1986) und RAMBOLD (1989) diese Varietäten zusammen, andererseits tritt HERTEL (1995) für ihre Beibehaltung ein. Hier wurden diese Varietäten unterschieden, da das Auftreten der Norstictinsäure einen Einfluss auf den Algenpartner haben könnte. Die morphologischen und molekularen Untersuchungen zeigten jedoch, dass dies nicht der Fall ist.

Bearbeitete Belege: BECK 56, 178b und 178f.

***Lecidea praenublia* NYL.**

(incl. *Lecidea paupercula* TH.FR.)

Lager vom *L. atrobrunnea*-Typ (Anwesenheit einer ausgeprägten Epinekralschicht auf braun pigmentiertem Cortex); Areolen flach bis leicht konvex, grau(-braun). Apothecien sitzend. Hypothecium dunkelbraun; Paraphysen verklebt, kopfig verdickt. Asci mit J+ blauer Kappe. Ascosporen farblos, einzellig, 7,5–9 × 3,5–5 µm.

Chemie: J+ bläulich, K+ (gelb), C–.

Bemerkungen: Bearbeitete Belege: BECK 142b.

***Lecidea plana* (J.LAHM in KÖRB.) NYL.**

Lager zusammenhängend bis rissig, grau, ohne Epinekralschicht. Apothecien berandet, sitzend, flach (bis leicht konvex), schwarz (auch wenn feucht). Hypothecium farblos bis hellbraun; Epihymenium grünlich-schwarz. Ascosporen farblos, einzellig, $8-12(-14) \times 3,5-4,5 \mu\text{m}$.

Chemie: J-, K-, C-.

Bemerkungen: Mittels TLC ließen sich Planasäure und 4-O-Demethylplanasäure nachweisen.

Bearbeitete Belege: BECK 176a.

***Lecidea silacea* ACH.**

Lager warzig areoliert; Areolen gewölbt, rostrot. Apothecien berandet, sitzend, flach. Hypothecium braun; Subhymenium smaragdgrün; Hymenium farblos; Epihymenium grünschwarz. Ascosporen farblos, einzellig, $8-11 \times 5-6 \mu\text{m}$.

Chemie: Lager J+, K-, C-.

Bemerkungen: *L. silacea* ist in Abbildung 60C dargestellt (im Anhang B).

Bearbeitete Belege: BECK 30, 31, 38a, 55, 60, 61, 63a, 148, 177a, 178a und HERTEL 34159.

***Lecidea tessellata* FLÖRKE**

Lager grau-weiß, rissig, mit flachen bis mäßig gewölbten Areolen. Apothecien sitzend, oft an den Thallus gedrückt. Hypothecium farblos oder hellbraun; Epihymenium grünlich-schwarz. Ascus mit J+ blauer Kappe. Ascosporen farblos, einzellig, relativ dickwandig (um $1 \mu\text{m}$), $7,5-11 \times 4-6 \mu\text{m}$.

Chemie: J+ blau, K-, C-.

Bemerkungen: Durch TLC konnte Confluentinsäure als Hauptinhaltsstoff nachgewiesen werden. Häufig beginnt *L. tessellata* ihr Wachstum lichenicol auf *Aspicilia*-Arten (HERTEL, 1995), dieses Verhalten war an den untersuchten Belegen aber nicht zu erkennen.

Bearbeitete Belege: BECK 30 und 69.

Fam. Porpidiaceae

***Bellemeria alpina* (SOMMERF.) CLAUZADE & CL.ROUX**

Lager zusammenhängend, rissig areoliert, grau bis blass gelb-grün (dann mit Cu-Einlagerungen; z.B. BECK 140), meist mit deutlichem, schwarzem Hypothallus. Apothecien eingesenkt, 0,5–1 mm im Durchmesser, von einem dünnen Thallusrand umgeben; Scheibe dunkelbraun bis schwarz, feucht hellrotbraun. Hypothecium farblos; Hymenium 60–75 μm , blass bräunlich; Epihymenium mit braunem, in K löslichem Pigment; Paraphysen septiert, gelegentlich apikal verzweigt, verklebt (sich in K nicht trennend). Asci keulenförmig, $35-60 \times 15-20 \mu\text{m}$. Ascosporen unseptiert, farblos, ellipsoidisch, $9-20 \times 5-12 \mu\text{m}$; Episor J+ blau. Pykniden eingesenkt, strichförmig; Pyknosporen stabförmig, acrogen gebildet, $5-6 \times 1 \mu\text{m}$ auf unverzweigten (oder verzweigten) Bildungshyphen.

Chemie: J+ blau, K+ rot (Norstictinsäure), C-, KC-.

Bemerkungen: Siehe *Bellemeria cinereorufescens*. *B. alpina* ist in den Abbildungen 60B und 61C dargestellt (im Anhang B).

Bearbeitete Belege: BECK 30, 31, 38b, 55, 63a, 63b, 68 und 140.

***Bellemeria cinereorufescens* (ACH.) CLAUZADE & CL.ROUX**

Lager zusammenhängend, rissig areoliert, grau bis rostrot. Apothecien eingesenkt, 0,5–1 mm im Durchmesser, von einem dünnen Thallusrand umgeben; Scheibe dunkelbraun bis schwarz, feucht rotbraun. Hypothecium farblos; Hymenium 60–75 µm, blass bräunlich; Epihymenium mit braunem Pigment, das in KOH löslich ist; Paraphysen septiert, gelegentlich apikal verzweigt, verklebt (sich in KOH nicht trennend). Asci keulenförmig, 35–60 × 15–20 µm. Ascosporen unseptiert, farblos, ellipsoidisch, 9–20 × 5–12 µm; Epispor J–.

Chemie: J+ blau, K–, C–, KC–.

Bemerkungen: Ähnlich *Bellemeria alpina*, jedoch mit K– reagierendem Thallus, nicht amyloiden Ascosporen und dunkler pigmentierten Apothecienscheiben. Ihr Thallus kann rostrot gefärbt sein (*Bellemeria diamartha* (ACH.) HAFELLNER & ROUX, die hier nicht als eigene Art anerkannt wird). Die Art wächst nach WIRTH (1995) im Vergleich zu *Bellemeria alpina* an stärker schattig-feuchten Stellen. *B. cinereorufescens* ist in Abbildung 60C dargestellt (im Anhang B).

Bearbeitete Belege: BECK 30, 31, 38a und 67.

***Bellemeria subsorediza* (LYNGE) R.SANT.**

Lager krustig, blass gelb-, grün- oder gräulich; 1–4 cm im Durchmesser; Areolen leicht konvex oder plan, 0,4–1,2 mm im Durchmesser, mit zentralem Soral von gleicher Farbe wie der Thallus und einem erhöhten Thallusrand umgeben. Apothecien nicht beobachtet.

Chemie: J + blau, K+ rot (Norstictinsäure), C–, KC–.

Bemerkungen: *B. subsorediza* ist bekannt aus Grönland, Skandinavien und Neuseeland. Es ist eine Pionierart, die nicht auf Cu-haltige Substrate beschränkt ist. Sie kommt auch im Lecideion inopis, aber nur selten in geschlossenen Flechtengemeinschaften vor. Ähnlich sind *Bellemeria alpina*, die jedoch nicht sorediös ist und *Porpidia tuberculosa*, die keine positive K-Reaktion besitzt.

Bearbeitete Belege: BECK 65, 67 und 142b.

***Immersaria athrocarpa* (ACH.) RAMBOLD & PIETSCHM.**

Lager aus braunen, flachen bis konkaven, etwas glänzenden Areolen (aufgrund der Anwesenheit einer ausgeprägten Epinekralschicht auf braun pigmentiertem Cortex) bestehend. Apothecien flach, eingesenkt oder zwischen den Areolen, undeutlich berandet. Hypothecium farblos; Epihymenium schmutzig olivgrün. Asci hemiamyloid; Tholus des Ascus mit J+ blauer Röhre. Ascosporen einzellig, farblos, nicht amyloid, 18–22 × 9–11 µm.

Chemie: J+ blau, K–, C–.

Bemerkungen: Bearbeitete Belege: BECK 178b.

***Porpidia contraponenda* (ARNOLD) KNOPH & HERTEL**

Lager aus flachen, zerstreuten Areolen bestehend. Apothecien sitzend, vom *Porpidia*-Typ. Excipulum braun bis schwarz; Hypothecium dunkelbraun; Hymenium um 80 µm; Epihymenium kohlig. Ascus mit J+ blauer Röhre. Ascosporen 20–23 × 8–9 µm.

Chemie: J–, K–, C–.

Bemerkungen: Die Zugehörigkeit zu dieser Art konnte durch TLC eindeutig nachgewiesen werden, denn sie besitzt methyl 2'-O-Methylmicrophyllinat und 2'-O-Methylmicrophyllinsäure statt Confluentinsäure, die bei der ähnlichen *P. cinereoatra* (ACH.) HERTEL & KNOPH vorkommt.

Bearbeitete Belege: BECK 145.

***Porpidia crustulata* (ACH.) HERTEL & KNOPH**

Lager fast nur im Gestein entwickelt. Apothecien 0,5–1(–1,6) mm im Durchmesser mit Rand. Epihymenium oliv. Ascosporen farblos, einzellig, halonat, 10–17 × 6–8 µm.

Chemie: Medulla J–, K–, C–.

Bemerkungen: Sehr ähnlich kann *Porpidia macrocarpa* sein, die aber größere Apothecien und Ascosporen (17–27 × 7–12 µm) besitzt. Der Beleg wurde nicht im *Acarosporetum sinopicae* gesammelt, sondern auf Silikatgestein, das kein Eisensulfid aufwies.

Bearbeitete Belege: BECK 47.

***Porpidia macrocarpa* (DC.) HERTEL & A.J.SCHWAB**

Lager deutlich entwickelt, grau aber teilweise rostig überlaufen. Apothecien sitzend, bis 3 mm im Durchmesser, ohne Rand. Epihymenium oliv. Ascosporen farblos, einzellig, halonat 17–27 × 7–12 µm.

Chemie: Medulla J–, K–, C–.

Bemerkungen: Bearbeitete Belege: BECK 31, 53, 54, 120 und 149.

***Porpidia melinodes* (KÖRB.) GOWAN & AHTI**

Lager orange bis orange-grau, steril, sorediös, mit schwarzem Prothallus.

Chemie: J–, K+ (gelb), C–.

Bemerkungen: Diese Art ist nahe verwandt mit *P. flavocaerulescens* (HORNEM.) HERTEL & A.J.SCHWAB. Beide bilden ein Artenpaar, wobei *P. flavocaerulescens* die fertile Art – ohne vegetative Diasporen – darstellt, während *P. melinodes* keine Apothecien sondern nur vegetative Diasporen bildet (GOWAN & AHTI, 1993). Molekulare Untersuchungen von BUSCHBOOM (pers. Mitt.) zeigen jedoch, dass die Taxa in dieser Umschreibung keine monophyletischen Gruppen bilden. Dennoch ist die Art der reproduktiven Vermehrung in dieser Gruppe nicht zufällig verteilt, sondern nahe verwandte Arten zeigen häufig dieselbe Art der reproduktiven Vermehrung. Der bearbeitete Beleg zeigte keine Stärkereaktion in Lugol'scher Lösung und besaß *Asterochloris* als Algenpartner. Die Medulla von *Porpidia melinodes* kann aber gelegentlich J+ schwach blau reagieren (PURVIS et al., 1992). Eine Untersuchung des Algenpartners auch von derartigen Belegen wäre wünschenswert.

Bearbeitete Belege: BECK 53.

***Porpidia tuberculosa* (SM.) HERTEL & KNOPH**

Lager (dunkel-)grau, sorediös. Hypothallus schwarz oder braun, schmal, unregelmäßig oder fehlend. Apothecien nicht beobachtet.

Chemie: J+, K–, C–.

Bemerkungen: Mit TLC konnten 2'-O-Methylmicrophyllinsäure und 2'-O-Methylperlatolsäure als Inhaltsstoffe nachgewiesen werden. Damit fehlt Confluentinsäure, die als Hauptinhaltsstoff – neben den genannten Substanzen – für *P. tuberculosa* angegeben wird (z.B. PURVIS et al., 1992). Dies trifft aber für 15% aller von J. KNOPH (Berlin) untersuchten Belege zu (KNOPH in litt.), weshalb die Belege zu *P. tuberculosa* gestellt werden. SCHWAB (1986: 302) erwähnt eine Varietät var. *rubescens* nomen ad int., die K+ rot reagiert. Diese ist wohl identisch mit *Bellemeria subsorediza* (LYNGE) R. SANT., denn SCHWAB konnte mit TLC keine Confluentinsäure, sondern nur Norstictinsäure nachweisen (1986: 438, 439).

Bearbeitete Belege: BECK 31, 63a und 68.

Porpidia spec. (grau, Medulla J-)

Lager deutlich entwickelt, grau, steril, ohne vegetative Diasporen, aus flachen Areolen bestehend.

Chemie: Medulla J-, K-, C-.

Bemerkungen: Dieser Beleg ist aufgrund der fehlenden Apothecien nicht genauer bestimmbar. Für eine Untersuchung der sekundären Flechtenstoffe mittels TLC stand nicht genügend Material zur Verfügung.

Bearbeitete Belege: BECK 53.

Porpidia spec. (rot, Medulla J-)

Lager deutlich entwickelt, rostig überlaufen, steril, ohne vegetative Diasporen, aus flachen Areolen bestehend.

Chemie: Medulla J-, K-, C- .

Bemerkungen: Dieser Beleg ist aufgrund der fehlenden Apothecien nicht genauer bestimmbar. Für eine Untersuchung der sekundären Flechtenstoffe mittels TLC stand nicht genügend Material zur Verfügung.

Bearbeitete Belege: BECK 176b.

Micareaeae Group

Fam. Cladoniaceae

***Cladonia furcata* (HUDS.) SCHRAD.**

Podetien 2–7 cm lang, aufrecht, graugrün, dünn, hohl oder rinnig wenn längs aufgeschlitzt, meist dichotom verzweigt, berindet, ohne Becher. Primärthallus unscheinbar. Apothecien braun.

Chemie: K-, C-.

Bemerkungen: Bearbeitete Belege: BECK 44.

Fam. Micareaeae

***Psilolechia leprosa* COPPINS & PURVIS**

Lager leprös-granulär, blassgrün. Apothecien biatorin, ohne erkennbares Excipulum, blassbraun bis blassrosa. Hymenium um 30 µm; Hypothecium farblos. Asci mit J+ blauer Röhrenstruktur (ähnlich dem *Porpidia*-Typ). Ascosporen ± tropfenförmig 4–7 × 1–2 µm.

Chemie: K-, C+ rot, KC-.

Bemerkungen: An Vertikalflächen oder Überhängen von kupferreichem Gestein (oder unter Cu-Einfluss [z.B. Blitzableiter]). Die Art unterscheidet sich von *Lepraria* durch die C+ rote Reaktion. Sie besitzt nach COPPINS & PURVIS (1987) trebouxioide Algen (deren angegebene Zellmaße mit 6–9 µm recht klein, bzw. mit 6–12 × 7–8,5 µm ungewöhnlich stark ellipsoidisch sind). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Algenpartner *Chlorella saccharophila* ist (siehe Quetschpräparat in Abbildung 70 im Anhang B). *P. leprosa* ist in Abbildung 61B dargestellt (im Anhang B).

Bearbeitete Belege: BECK 143b und 144b.

Fam. Stereocaulaceae

***Stereocaulon nanodes* TUCK.**

Lager sorediös, Primärthallus bleibend, aufrechte, fächerförmige Schuppen bildend, die auf einer Seite sörediös sind. Phyllokladien P+ leicht gelblich (nicht getestet).

Bemerkungen: Diese Art ist häufig auf alten Abraumhalden, besonders mit hohem Pb / Zn-Gehalt anzutreffen (PURVIS et al., 1992).

Bearbeitete Belege: BECK 30 und 262b (auch BECK 45b, dort fruchtend).

***Stereocaulon vesuvianum* PERS.**

Lager nicht sorediös. Podetien aufrecht; Phyllokladien rundlich, meist mit deutlichen, dunkleren Flecken in der Mitte, P+ rot (nicht getestet). Grundscheiben oft fehlend.

Bemerkungen: Bearbeitete Belege: BECK 45a.

Fam. Catillariaceae

***Sporastatia testudinea* (ACH.) A.MASSAL.**

Lager (dunkel-)braun, glänzend, areoliert, mit schwarzem Vorlager. Apothecien schwarz, eingesenkt, flach mit dünnem Eigenrand. Ascosporen einzellig, fast kugelig, zu über 100 im Ascus.

Chemie: Lager J-, K-, C+ (rot).

Bemerkungen: Bearbeitete Belege: BECK 55 und 57.

Lecanoraceae Group

Fam. Biatoreaceae

"*Lecidea fuliginosa*-Gruppe"

Lager dick, grobwarzig areoliert; Areolen dunkel bis hellgrau. Apothecien berandet, ohne Lagerrand, sitzend. Hypothecium farblos; Hymenium hemiamyloid; Epihymenium olivgrün. Asci vom *Bacidia* / *Lecanora*-Typ. Ascosporen $9,5-11 \times 4,5-5,5 \mu\text{m}$.

Chemie: Medulla J-, K-, KC-, C-

Bemerkungen: Bearbeitete Belege: BECK 69

Fam. Candelariaceae

***Candelariella aurella* (HOFFM.) ZAHLBR.**

Lager wenig ausgebildet, körnig, gelb. Apothecien zahlreich, mit flacher, schmutzig gelber Scheibe. Ascosporen zu 8 im Ascus, $11-18 \times 5-7 \mu\text{m}$.

Bemerkungen: Auf – zumindest leicht – kalkhaltigem Gestein wachsend (WIRTH, 1980).

***Candelariella vitellina* (HOFFM.) MÜLL.ARG.**

Lager gelb, körnig bis kleinschuppig. Apothecien lagerfarben. Paraphysen nicht verdickt. Ascosporen zu 16–32 im Ascus, einzellig (selten zweizellig) 10–15 × 3–6 µm.

Chemie: Lager K–, C+ orange.

Bemerkungen: Bearbeitete Belege: BECK 177d.

Fam. Lecanoraceae

***Carbonea vorticososa* (FLÖRKE) HERTEL**

Lager braun, mit warzigen, gewölbten Areolen. Apothecien im Umriss rundlich, sitzend, scharf berandet, glänzend schwarz, bis 0,9 mm im Durchmesser. Excipulum kohlig; Hypothecium dunkelbraun; Subhymenium farblos, manchmal mit grünlichem Farbton; Hymenium farblos; Epihymenium smaragd-grün; Paraphysen stark verklebt, verzweigt. Tholus des Ascus vom *Carbonea* / *Lecanora*-Typ. Ascosporen (9–)10–13 × 4–5 µm.

Chemie: Lager J–, K–, C–.

Bemerkungen: Aufgrund des braunen Thallus und der kleinen Apothecien zeigt der Beleg auch Merkmale von *Carbonea assimilis* (HAMPE ex KOERB.) HAFELLNER & HERTEL in WIRTH. Dennoch wurde er aufgrund des braunen Hypotheciums und der schmalen Ascosporen zu *C. vorticososa* gestellt. Aufgrund des spärlichen Materials war ein chemischer Nachweis von Pannarin (tritt nur in *C. vorticososa* auf) nicht durchführbar.

Bearbeitete Belege: BECK 142b.

***Lecanora dispersa* (PERS.) SOMMERF.**

Lager undeutlich, neben einzelnen gelben, flachen, Areolen fast nur aus zerstreuten Apothecien bestehend. Diese mit bleibendem, gelben Lagerrand und brauner Scheibe, sitzend. Ascosporen 9–14 × 4–7 µm.

Chemie: J–, K–, C–.

Bemerkungen: Bearbeitete Belege: BECK 145.

***Lecanora epanora* (ACH.) ACH.**

Lager gelb; Areolen und Sorale gewölbt, sich in der Mitte der Areolen entwickelnd. Apothecien generell nur selten gebildet und am untersuchten Beleg nicht vorhanden.

Chemie: J–, K–, C–, P–.

Bemerkungen: *Lecanora reagens* NORMAN unterscheidet sich durch einen K+ gelb reagierenden Thallus, *Lecanora subaurea* ZAHLBR. durch die P+ rote Reaktion).

Bearbeitete Belege: BECK 38b.

***Lecanora farinacea* FÉE**

Lager weiß, kräftig entwickelt. Apothecien spärlich entwickelt, mit rötlich weißer Scheibe und deutlichem, lagerfarbenen Rand, stark bereift. Ascosporen breit ellipsoidisch, 12–15 × 7–11 µm.

Chemie: J–, K+ (gelb), C–.

Bemerkungen: Bearbeitete Belege: ELIX 43014b.

***Lecanora handelii* J.STEINER**

Lager grau(-gelblich); Areolen gewölbt; Sorale randständig, zum Teil auf die Oberfläche übergehend, weißlich bis leicht gelblich. Apothecien selten.

Chemie: J–, K–, KC+ gelb.

Bemerkungen: Bearbeitete Belege: BECK 53, 63a, 63c und 68.

***Lecanora muralis* (SCHREB.) RABENH.**

Lager rosettig, gelappt, mit fest angewachsenen Loben. Diese flach oder konkav, grünweiß, z.T. stark bereift (auf Kalk). Apothecien zahlreich, in der Mitte des Lagers, hell- bis dunkelbraun.

Bemerkungen: Nach PURVIS et al. (1992: 310) ist diese Art resistent gegen Luftverschmutzung.

Bearbeitete Belege: BECK 262c.

***Lecanora polytropa* (HOFFM.) RABENH.**

Lager gelblich, aus einzelnen, nicht sorediösen Areolen bestehend. Apothecien zahlreich, sitzend; Lagerrand bleibend; Scheibe bleich gelblich bis blass braun.

Chemie: J-, K+ gelb, C-.

Bemerkungen: Bearbeitete Belege: BECK 30, 31, 38a, 56, 143c, 178f und ELIX 43014a.

***Lecanora stenotropa* NYL.**

Lager hellbraun bis gelblich, aus zerstreuten Areolen bestehend. Apothecien sitzend, mit weißlichem, deutlichem Lagerrand; Scheiben hellbraun, flach oder nur schwach gewölbt. Ascosporen $8-12 \times 3-4,5 \mu\text{m}$.

Bemerkungen: *L. stenotropa* unterscheidet sich von *Lecanora polytropa* nur durch die kleineren Ascosporen und den weniger gelben Thallus und Apothecienscheiben. Ob diese geringen Unterschiede die Aufrechterhaltung einer eigenen Art rechtfertigen, erscheint zweifelhaft.

Bearbeitete Belege: BECK 265a.

***Lecanora subaurea* ZAHLBR.**

Lager gelbgrün; Areolen wenig gewölbt; Sorale randständig, schwefelgelb. Apothecien selten.

Chemie: J-, K-, C-, P+ rot.

Bemerkungen: Siehe *Lecanora epanora*.

Bearbeitete Belege: BECK 30, 31, 38a, 53 und 63a.

***Miriquidica atrofulva* (SOMMERF.) A.J.SCHWAB & RAMBOLD**

Lager areoliert; Areolen gewölbt, meist in kleinen Gruppen zusammenstehend, rostrot, mit rundlichem, schwärzlichem Sorale. Apothecien nicht beobachtet.

Chemie: Lager J-, K+ (gelb um die Sorale), C-.

Bemerkungen: Bearbeitete Belege: BECK 142a und 178a.

***Miriquidica garovaglii* (SCHAER.) HERTEL & RAMBOLD**

Lager glänzend, vom *Lecidea atrobrunnea*-Typ (Anwesenheit einer ausgeprägten Epinekralschicht auf braun pigmentiertem Cortex); Areolen flach bis leicht konvex, braun. Apothecien schwarz, gequollen bräunlich, flach bis gewölbt mit Rand. Hypothecium farblos; Epihymenium oliv. Ascosporen einzellig (ältere Exemplare selten 2-zellig) $10-18 \times 4-6 \mu\text{m}$.

Chemie: Lager J-, K+ (gelb), C-.

Bemerkungen: Von der sehr ähnlichen *Lecidea atrobrunnea* unterscheidet sie sich durch den abweichenden Ascus-Typ (*Miriquidica*-Typ gegenüber *Lecidea*-Typ), der fehlenden J+ blauen und der vorhandenen K+ gelben Farbreaktion in der Medulla.

Bearbeitete Belege: BECK 69 und 151.

***Pleopsidium chlorophanum* (WAHLENB.) ZOPF**

Lager rosettig, am Rand gelappt, gelb. Apothecien halb eingesenkt bis sitzend, gelb, mit Lagerrand. Ascosporen zu sehr vielen im Ascus, $3-4 \times 1,5 \mu\text{m}$.

Chemie: Lager K-.

Bemerkungen: An regengeschützten, absonnigen vertikalen Flächen, oft auf eisenreichem Gestein (WIRTH, 1995).

Bearbeitete Belege: BECK 55 und 132.

***Ramboldia cf. petraeoides* (NYL. ex C. BAB. & MITT.) KANTVILAS & ELIX**

Lager hell- bis dunkelgrau, aus konvexen Areolen bestehend. Apothecien nicht gesehen.

Chemie: J-, K+ (rote Nadelkristalle ausfallend), C-.

Bemerkungen: Die Areolen können, statt wie in diesem Fall grau-braun, auch braun gefärbt sein (KANTVILAS & ELIX, 1994).

Bearbeitete Belege: ELIX 43014b.

Fam. Parmeliaceae

***Neofuscelia stygiodes* (NYL. ex CROMB.) ESSL.**

Lager aus gelb- bis schwarzbraunen, schmalen, $0,3-1,5 \text{ mm}$ breiten, fest mit dem Gestein verbundenen Loben (so dass fast der Eindruck einer Krustenflechten entsteht), unterseits schwarzbraun bis schwarz, keine Rhizinen tragend. Apothecien sitzend, bis 5 mm im Durchmesser, mit dunkelbrauner Scheibe und Lagerrand. Ascosporen $9-11 \times 5-6 \mu\text{m}$.

Chemie: Lager K+ (gelb), C-.

Bemerkungen: Die Art ist häufig im alpinen und subalpinen Bereich im Südosten Australiens (ELIX, 1994b). Der nur spärlich entwickelte Thallus besitzt nur wenige Apothecien.

Bearbeitete Belege: ELIX 43014a.

***Protoparmelia atriseda* (FR.) R.SANT & V.WIRTH**

Lager nur wenig ausgedehnt (bis 3 cm im Durchmesser), braun, aus gewölbten Areolen bestehend. Apothecien jung eingesenkt, später sitzend, mit Lagerrand und dunkel rotbrauner Scheibe. Ascosporen farblos, ungeteilt, oval, $9-12 \times 4,5-6 \mu\text{m}$.

Chemie: J-, K+ gelb, stellenweise rot, C-.

Bemerkungen: Zumindest jung lichenicol auf *R. geographicum*, so auch bei diesem Beleg.

Bearbeitete Belege: BECK 178d.

***Protoparmelia badia* (HOFFM.) HAFELLNER**

Lager ausgedehnt, dunkelbraun, glänzend, aus konvexen Areolen bestehend. Apothecien mit Lagerrand; Scheibe etwas dunkler als der Thallus. Ascosporen farblos, einzellig, fusiform (d. h. beidseitig zugespitzt), $10-15 \times 4-6 \mu\text{m}$.

Chemie: J-, K-, C-.

Bemerkungen: Bearbeitete Belege: BECK 178e und ELIX 43014a.

Fam. Scoliciosporaceae

***Scoliciosporum umbrinum* (ACH.) ARNOLD**

Lager granulär, grün. Apothecien braunschwarz bis schwarz, 0,4–0,8 mm im Durchmesser, gewölbt, fast randlos. Ascosporen farblos, 4-zellig, gebogen, 20–35 × 1,5–2,5 µm.

Chemie: J–, K–, C–.

Bemerkungen: *Scoliciosporum umbrinum* ist eine euryöke aber konkurrenzschwache Pionierart, die als auf schwermetallhaltigen Gestein vorkommend bekannt ist (WIRTH, 1995). Nach WIRTH (1980) sind die Arten der Gattung *Scoliciosporum* mit Algen der Gattung *Trebouxia* assoziiert, die hier untersuchten Belege waren jedoch mit *Apatococcus lobatus* lichenisiert.

Bearbeitete Belege: BECK 175 und 179.

3.1.2.3 Flechten der Lecanorales mit unklarer Stellung im System

***Lepraria cf. caesioalba* (DELESD.) J.R.LAUNDON**

Lager dick, weiß mit graugrünlichem Farbton, am Rand begrenzt, mit körniger Oberfläche, die aus zum Teil mehligem Soredien besteht (Hyphen aus den Soredien herausragend).

Chemie: K+ (gelb), C–, KC+ (gelb).

Bemerkungen: Die Zugehörigkeit zu *Lepraria caesioalba* ist sehr wahrscheinlich, konnte aber nicht eindeutig geklärt werden. Für die Zugehörigkeit zu *L. caesioalba* und nicht zu der (aufgrund der Inhaltsstoffe) auch in Frage kommenden *Lepraria nivalis* J.R.LAUNDON sprechen sowohl die körnige Oberfläche als auch das Substrat, denn letztere bevorzugt Kalkgestein. Allerdings gibt es auch Funde von Proben auf schattigem Silikatgestein (LAUNDON, 1992). Andererseits besitzt *L. caesioalba* in der Regel keine mehligem Soredien und wächst an sonnigen Standorten (PURVIS et al., 1992, WIRTH, 1995). Im Gegensatz hierzu wuchsen die untersuchten Lager an beschatteten Standorten, an der Unterseite von Gesteinsbrocken. Es scheint aber durchaus möglich, dass die Steine nicht in ihrer ursprünglichen Lage angetroffen wurden, sondern, z.B. durch einen Gesteinsrutsch, umgedreht worden sind. Hierfür spräche auch das gleichzeitige Auftreten von *Lecanora subaurea* (B36b, B38a), die typisch für besonnte Standorte ist. Allerdings wurde auch *Lecanora epanora* (B36a, B38b) gefunden, die typisch für beschattete Standorte ist. Mit TLC wurden Fumarprotocetrarsäure, Atranorin und Anagardiansäure (oder die durch TLC nicht von dieser zu trennenden Roccellsäure) als sekundäre Inhaltsstoffe nachgewiesen. Diese Kombination ist bereits für Chemotyp 1 von *L. caesioalba* bekannt (z.B. LEUCKERT et al., 1995). Allerdings sind diese Substanzen auch in *L. nivalis* nachgewiesen worden (LEUCKERT et al., 1995; ORANGE, 1995). Es können daher diese chemischen Merkmale nicht zur Klärung der Artzugehörigkeit verwendet werden. Aufgrund der chemischen Merkmale kann allerdings eine Zugehörigkeit der Belege zu *Lepraria membranacea* ausgeschlossen werden. Letztere Art ist, im Gegensatz zu *Lepraria caesioalba*, bereits aus dem Acarosporion sinopicae bekannt (WIRTH, 1972). Das Vorkommen von *Arthonia excentrica* (B36a), einem lichenicolen Pilz (det. D. TRIEBEL, München), kann ebenfalls nicht zur Unterscheidung herangezogen werden, da seine Wirtsflechten bisher nicht genau untersucht wurden. In der Gesamtheit der Merkmale wird deutlich, dass die untersuchten Belege mit großer Wahrscheinlichkeit zu *L. caesioalba* gehören und die morphologischen Abweichungen durch das ungewöhnliche Habitat (Gesteinsunterseite) bedingt sein könnten.

Bearbeitete Belege: BECK 36a und 38a.

3.1.3 Flechten der Lecanoromycetes mit unklarer Stellung im System

3.1.3.1 Fam. Umbilicariaceae

Umbilicaria crustulosa (ACH.) FREY

Lager graubraun, am Rand leicht herabgebogen, unterseits braun mit zahlreichen Rhizinen.

Apothecien zahlreich, glatt. Ascosporen einzellig, farblos, 18–24 × 11–21 µm.

Bemerkungen: Bearbeitete Belege: HERTEL 34159.

Umbilicaria cylindrica (L.) DEL. ex DUBY

Lager grau, am Rand mit schwarzen Borsten und auf der Unterseite mit Rhizinen besetzt.

Apothecien schwarz, häufig, mit rilliger Scheibe. Ascosporen einzellig, farblos, 9–15 × 3–9 µm.

Bemerkungen: Bearbeitete Belege: BECK 30 und ELIX 43014a.

Umbilicaria torrefacta (LIGHTF.) SCHRAD.

Lager braun, 2–4 cm im Durchmesser, am Rand siebartig durchlöchert, oberseits gefeldert, unterseits dunkelbraun mit zerfransten radialen Lamellen besetzt. Apothecien zahlreich, gyrodisk, oft eckig.

Bemerkungen: Bearbeitete Belege: BECK 142b, 177b und 178a.

3.1.3.2 Fam. Icmadophilaceae

Dibaeis baeomyces (L.F.) RAMBOLD & HERTEL

Lager krustig, weißlich grün bis grau. Apothecien gestielt, mit rosafarbenem, kugeligem Apothecium. Ascosporen einzellig, ellipsoidisch, 10–20 × 2–3 µm.

Bemerkungen: Diese Art, die sonst auf sauren Heiden zu finden ist, gehört zu den artenarmen Bodenflechtengemeinschaften, die im Bereich von Eisensulfid-haltigen Gesteinen auftreten (PURVIS & HALLS, 1996).

Bearbeitete Belege: BECK 46.

3.2 Soziologische Untersuchungen

Um die bearbeiteten Flächen genauer zu charakterisieren, wurden flechtensoziologische Aufnahmen durchgeführt. Durch diese sollte untersucht werden, welche Flechtenarten häufig miteinander vergesellschaftet auftreten und welcher soziologischen Gesellschaft diese zuzurechnen sind. Diese Analysen geben auch Aufschluss über ökologische Gegebenheiten an dem entsprechenden Standort, da Flechtengemeinschaften durch das Substrat und das dort herrschende Klima beeinflusst werden (z.B. WIRTH, 1972). Daher wird der Lebensraum der Flechten genauer charakterisiert, was eine ökologische Einordnung der Ergebnisse ermöglicht.

Die in dieser Arbeit analysierten Bestände gehören zu drei Assoziationen aus zwei Verbänden, dem *Acarosporion sinopicae* und dem *Lecideion inopis*. Ersterer wird auf Gestein mit hohem Schwermetallgehalt und ohne lösliches Ca^{2+} angetroffen (WIRTH, 1972) und beinhaltet das *Acarosporium sinopicae* und das *Lecanoretum epanorae*, während letzterer charakteristisch für Substrate mit hoher Cu-Konzentration und nicht stark saurem pH ist (z.B. wenn Carbonate anwesend sind) und als einzige Assoziation das *Lecideetum inopis* beinhaltet (PURVIS & HALLS, 1996). Das *Acarosporion sinopicae* beherbergt viele rostig gefärbte Flechten und ist typisch für FeS_2 haltige, saure (pH) Gesteine, denn bei niedrigem pH, der durch die Verwitterung (Oxidation) des FeS_2 zu Eisensulfat und Schwefelsäure entsteht, wird zuerst Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert und fällt dann aus, während das Cu^{2+} in Lösung bleibt (bis zum neutralen pH, dann fällt es als Oxid, basisches Sulfat oder Carbonat aus; PURVIS & HALLS, 1996). Daher findet im neutralen / basischen pH-Bereich eine starke Cu-Festlegung im Flechtenthallus statt.

Das *Acarosporium sinopicae* ist klimatisch durch Lichtoffenheit und direkte Besonnung und Beregnung gekennzeichnet. Es kann als Pioniergesellschaft betrachtet werden, die mit zunehmender Auslaugung der Schwermetalle aus dem Substrat von anderen Gesellschaften ersetzt wird (WIRTH, 1972). Die Aufnahmen Nummer 1 bis 20 (Tab. 10) gehören zu dieser Gesellschaft.

Das *Lecanoretum epanorae* besiedelt ebenso wie das *Acarosporium sinopicae* schwermetallreiches Gestein, aber ist nur auf stark geneigten und daher regengeschützten Felsflächen zu finden. Oft ist das Substrat stark zerklüftet, der Verwitterungsprozess ist schon weit fortgeschritten und es liegt ein stark saurer pH-Wert vor. Das *Lecanoretum epanorae* ist artenärmer als das *Acarosporium sinopicae* und besteht oft nur aus *Acarospora sinopica* und *Lecanora epanora*, die *L. subaurea* aus dem *Acarosporium sinopicae* ersetzt. Daneben können noch *L. handelii* und *Leproloma membranacea* (= *Crocynia membranacea*) vertreten sein, die im *Acarosporium sinopicae* fehlen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde kein reiner Bestand dieser Gesellschaft untersucht, die charakteristischen Arten (*L. epanora*, *L. handelii* und *Lepraria spec.*) wuchsen durchmischt mit z.B. *Lecanora subaurea*, allerdings ausschließlich bei den Aufnahmen von Gesteinsunterseiten und daher möglicherweise doch eine eigene Gesellschaft auf kleinstem Raum bildend. Ein ähnliches Mosaik auf kleinsten Raum wurde z.B. von FELFÖLDY (1941) an der rissigen Borke von *Robinia* und *Populus* und von JOHN (1989) an saxicolen Flechten beschrieben. Die Aufnahmen Nummer 19 und 20 (Tab. 10) beinhalten Flechten aus dieser Gesellschaft.

Charakterart des *Lecideetum inopis* ist *Lecidea inops*, die in keiner anderen schwermetallreichen Gesellschaft vorkommt und charakteristisch für Substrate mit hoher Cu-Konzentration und nicht stark saurem pH ist (z.B. wenn Carbonate anwesend sind; PURVIS & HALLS, 1996). PURVIS & HALLS (loc. cit.) unterscheiden diese Gesellschaft in ihrer typischen Ausprägung mit *Bellemeria alpina*, *B. subsorediza*, *Lecidea lactea* und *Rhizocarpon interstitium*, die an offenen, besonnten Stellen anzutreffen ist, von 2 weiteren Ausprägungen: einer feuchten Facies mit dominierender *Aspicilia mashiginensis*, die an feuchte, schattige Stellen gebunden ist, und einer trockenen Facies, charakterisiert durch *Psilolechia leprosa*, die an regengeschützten Überhängen zu finden ist. Die Aufnahme Nummer 24 (Tab. 11) aus dem Harz und Nummer 23 aus Schweden, Ramundberget, entsprechen der typischen Ausprägung, während die Aufnahmen Nummer 21 und 22 (Tab. 11) aus Schweden, Ramundberget, der trockenen Facies zuzuordnen sind.

Ergebnisse__Soziologische Untersuchungen

Tab. 10: Aufnahmen des *Acarosporium sinopicae*. Aufgrund der Vielzahl der Taxa wurden die Begleitflechten alphabetisch geordnet. Bei den Aufnahmen Nr. 11, 17 und 18 wurden keine Häufigkeitsangaben gemacht, da nur kleine Proben vorlagen; stattdessen wurden die auftretenden Arten durch ### gekennzeichnet.

Aufnahme-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Herbarbelege	BECK 30	BECK 31	BECK 33	BECK 36b	BECK 53-54	BECK 55-56	BECK 60	BECK 61	BECK 65-68	BECK 69	HERTEL 34159	BECK 140 - 142	BECK 148	BECK 176	BECK 177	BECK 178	BECK 235 - 236	ELIX 43014	BECK 36a + 38	BECK 63 + 64
Lokalität	Alpen, SW	Alpen, SW	Alpen, SW	Alpen, SW	Alpen, Ö	Alpen, Ö	Alpen, B	Alpen, B	Alpen, B	Alpen, B	Alpen, F	Schweden, R	Schweden, R	Schweden, Ö	Schweden, Ü	Schweden, Ü	USA, RM	Australien, B	Alpen, SW	Alpen, B
Meereshöhe [m NN]	1700	1700	1700	1700	2800	2800	2650	2650	3050	2850	2760	930	930	40	5	5	3500	1640	1700	3050
Substrat	SM, sauer	SM, sauer	SM, sauer	SM, sauer	SM, sauer	SM, sauer	SM, sauer	SM, sauer	SM, sauer	SM, sauer	SM, sauer	SM, sauer	SM, sauer	SM, sauer	SM, sauer	SM, sauer				
Größe der Fläche [m²]	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,1	0,01	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,01	0,02	0,3	0,2
Exposition	SE	SE	SE	SE	S	S	E	E	E	W		W	S	E	SE	SW	N		(SE)	(E)
Neigung [°]					20	90	90	90					90	80	90	10			180	180
Höhe über dem Boden [m]						2	1	1					2	4	2				0,5	0,5
Deckung durch Flechten [%]	90	95	95	95	95	90	70	70	90	80	50	85	80	60	70	95			75	90
Artenzahl	12	11	5	9	8	6	2	2	13	5	6	13	1	6	8	14	2	14	10	10
Char. u. Diff.taxa																				
<i>Acarospora rugulosa</i>	2a								1		###	1								
<i>Lecanora polytropa</i>	1	1	1	1		1			1	1						1		###	1	1
<i>Lecanora subaurea</i>	2a	2b	2b	2a	2a					1									+	+
<i>Lecidea lapicida</i> var. <i>lapicida</i>																1	###			
<i>Lecidea lapicida</i> var. <i>pantherina</i>						3										1				
<i>Lecidea silacea</i>	2b	3		2b		2b	3	3	1		###		5		2a	2a			+	2b
<i>Stereocaulon nanodes</i>	+		+																	
<i>Tremolecia atrata</i>									2b	3		2a			2a	2b	###	###		1
Föderations-Char.arten																				
<i>Acarospora sinopica</i>	1	1	1	2a	2b		3	3	2b		###	2b			2b	2a			2b	2b
<i>Rhizocarpon ridescens</i>					2a															

Ergebnisse__Soziologische Untersuchungen

Aufnahme-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
sonstige Flechtenarten:																				
<i>Acarospora smaragdula</i>															2a	+				
<i>Bellemeria alpina</i>	+	1				1			1			2a							+	3
<i>Bellemeria cinereorufescens</i>	+	1	3	2a					1										1	
cf. <i>Bellemeria cinereo-rufescens</i> var. <i>diamartha</i>																			+	
<i>Bellemeria subsorediza</i>	2a	1		1					2a			2a								
<i>Candelariella vitellina</i>															2a					
<i>Carbonea vorticosa</i>												+								
<i>Cladonia furcata</i>																				
<i>Dibaeis baeomyces</i>																				
<i>Immersaria athroocarpa</i>																1				
<i>Lecanora epanora</i>																				2b
<i>Lecanora farinacea</i>																		###		
<i>Lecanora handelii</i>					+				+											1
<i>Lecidea confluens</i>									2a											1
<i>Lecidea fuscoatra</i>														2a						
<i>Lecidea paupercula</i>												1								
<i>Lecidea plana</i>														2b						
<i>Lecidea tessellata</i>	2a			2a						2a										
" <i>Lecidea fuliginosa</i> -Gruppe"										1										
<i>Lepraria</i> cf. <i>caesioalba</i>																				2b
<i>Miriquidica atrofulva</i>												2a				2b				
<i>Miriquidica garovaglii</i>										2b										
<i>Neofuscellia stygiodes</i>																		###		
<i>Pleopsidium chlorophanum</i>						2a														
<i>Porpidia flavocaerulescens</i>					2b															
<i>Porpidia macrocarpa</i>		r			2b															
<i>Porpidia</i> spec. (grau, I _{Lugol} -)					2a															
<i>Porpidia</i> spec. (rot, I _{Lugol} -)														1						
<i>Porpidia tuberculosa</i>		1							+			1								+
<i>Protoparmelia atriseda</i>																+				
<i>Protoparmelia badia</i>																1		###		
<i>Ramboldia petraeoides</i>																		###		
<i>Rhizocarpon</i> cf. <i>cyanescens</i>																		###		
<i>Rhizocarpon geographicum</i>	2a	2a		2a	1							1				2a		###	1	
<i>Rhizocarpon lecanorinum</i>														1				###		
<i>Rhizocarpon norvegicum</i>									2a		###	2a								2a
<i>Rhizocarpon polycarpum</i>		1										1								
<i>Rhizocarpon simillimum</i>											###									

Ergebnisse__Soziologische Untersuchungen

Aufnahme-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>Rhizocarpon cf. viridiatrum</i>																		###		
<i>Rhizocarpon spec. (Sp. 4-zellig)</i>																		###		
<i>Scoliciosporum umbrinum</i>															+					
<i>Sporastatia testudinea</i>						1														
<i>Stereocaulon nanodes</i>	+		+																	
<i>Stereocaulon vesuvianum</i>																				
<i>Trapelia obtegens</i>														2b	1					
<i>Umbilicaria crustulosa</i>											###									
<i>Umbilicaria cylindrica</i>	+			2a														###		
<i>Umbilicaria torrefacta</i>												1		1	1	1				
graue Areolen																		###		
braune Areolen (weißer Rand)																		###		

Tab. 11: Aufnahmen des *Lecideetum inopis*.

Aufnahme-Nr.	21	22	23	24
Herbarbelege	BECK 143	BECK 144	BECK 145 - 147	BECK 260- 263
Lokalität	Schweden, R	Schweden, R	Schweden, R	Deutschland, E
Meereshöhe [m NN]	950	930	930	230
Substrat	SM, basisch	SM, basisch	SM, basisch	SM, basisch
Größe der Fläche [m ²]	0,1	0,04	0,3	0,2
Exposition	E	W	W	
Neigung [°]	90	270	90	
Höhe über dem Boden [m]	3	0,5	2	
Deckung durch Flechten [%]	50	80	80	60
Artenzahl	3	2	6	9
Char. u. Diff.taxa				
<i>Lecidea inops</i>		3	2b	2b
sonstige Flechtenarten:				
<i>Acarospora bullata</i>				2a
<i>Acarospora peliscypha</i>				1
<i>Acarospora rugulosa</i>			r	
<i>Acarospora smaragdula</i>	2b			1
<i>Bellemeria subsorediza</i>			1	
<i>Buellia aethalea</i>				1
<i>Candelariella aurella</i>				1
<i>Lecanora dispersa</i>			2b	
<i>Lecanora muralis</i>				1
<i>Lecanora polytropha</i>	+			
<i>Lecanora stenotropa</i>				+
<i>Porpidia contraponenda</i>			3	
<i>Psilolechia leprosa</i>	2b	3		
<i>Stereocaulon nanodes</i>				1
<i>Tremolecia atrata</i>			+	

3.3 Vorkommende Flechtenalgen

3.3.1 Morphologische Charakterisierung der Phycobionten

Da die Identifikation der Photobionten von Flechten nach wie vor als schwierig angesehen werden muss und überdies unterschiedliche Ansichten über die Taxonomie der wichtigsten – weil häufigsten (AHMADJIAN, 1993) – Phycobionten-Gattung *Trebouxia* existieren, sollen im Folgenden das verwendete Artkonzept und die gefundenen Phycobionten näher dargestellt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit aus den Flechten isolierten Algenklone lassen sich aufgrund der lichtmikroskopischen Untersuchungen 12 Arten aus fünf Gattungen (*Trebouxia* [sechs Arten], *Asterochloris* [zwei Arten], *Coccomyxa* [eine Art], *Chlorella* [zwei Arten], *Apatococcus* [eine Art]) der Trebouxiophyceae T.FRIEDL (1995) zuordnen. Eine erste Gliederung der Gattung *Trebouxia* aufgrund molekularer Untersuchungen der ITS nrDNA-Sequenz wurde von BHATTACHARYA et al. (1996) veröffentlicht und durch nachfolgende Untersuchungen von BECK et al. (1998), FRIEDL et al. (2000) und HELMS et al. (2001) verfeinert. Sie entspricht weitgehend dem Konzept von FRIEDL (1989b), das sich vor allem auf die Morphologie des Chloroplasten stützt. Einige Abweichungen zwischen diesen beiden Gliederungen zeigen jedoch, dass bisher als geringfügig betrachtete morphologische Abweichungen durchaus phylogenetisch relevant sein können (oder noch andere, bisher zu wenig beachtete Merkmale zur Gliederung dieser Gattung existieren). Ein Beispiel hierfür ist die Gruppe um *Trebouxia gigantea* (*T. gigantea*, *T. incrustata* und *T. showmanii*), die FRIEDL (1989b) zu einer Art zusammenfasst. Zwar kann nur *T. gigantea* von den anderen beiden Arten aufgrund der deutlich breiteren Chloroplastenloben getrennt werden (FRIEDL, 1989b, eigene Untersuchungen), dennoch bilden sie in der ITS-Phylogenie drei getrennte Gruppen (Abb. 17). Die Gliederung der Gattung *Trebouxia* von FRIEDL (1989b) wurde auch von AHMADJIAN (1993) übernommen. Im Gegensatz dazu erwähnen Ettl & GÄRTNER (1995) diese Gliederung und damit die dort vorgenommene Synonymisierung von Artnamen nicht und führen diese weiterhin als eigene Arten.

3.3.1.1 **Verwendete Terminologie**

Da die Terminologie bezüglich der bei *Trebouxia* gebildeten Sporentypen nicht einheitlich gebraucht wird, diese Sporentypen aber für die taxonomische Gliederung der Gattung benutzt werden (TSCHERMAK-WOESS, 1989, FRIEDL, 1989b und 1993), soll im Folgenden ein kurzer Überblick über die bestehenden Auffassungen gegeben werden.

Zoosporen (nach TSCHERMAK-WOESS, 1989) werden meist in Zellen gebildet, die größer sind als Autosporenmutterzellen und im Gegensatz zu diesen eine einseitige Zellwandverdickung besitzen. Diese Verdickung markiert die spätere Öffnungsstelle des Zoosporangiums. Der Chloroplast wird im Laufe der Teilungen stark vereinfacht und in die Zellperipherie verlagert. Auch das Pyrenoid wird resorbiert und ist nicht mehr zu erkennen. Dies trifft aber nur für die lichtmikroskopische Betrachtung zu, im Elektronenmikroskop sind die Pyrenoide weiterhin zu erkennen (FRIEDL, 1989a). Es werden Öle und Stärke gespeichert, die in der Schwärmerphase der Zoosporen aufgebraucht werden.

Aplanosporen (nach TSCHERMAK-WOESS, 1989) sind arretierte Zoosporen, das heißt die anfängliche Aplanosporenenentwicklung entspricht der Zoosporenenentwicklung, diese wird jedoch abgebrochen, die Zellwandverdickung verschwindet, und die Tochterzellen runden sich ab und bilden eine Zellwand. Die Stärke wird abgebaut und das Pyrenoid wieder sichtbar. Die Freisetzung der Aplanosporen, die generell viel kleiner sind als Autosporen, wird durch keinen besonderen Mechanismus reguliert, sondern die Sporangienwand reißt einfach auf.

Autosporen (nach TSCHERMAK-WOESS, 1989) werden nur in kleiner Anzahl je Sporangium gebildet (meist 4 oder 8, selten 16 und 32). Die Zellwand wird erst gebildet, wenn die endgültige Anzahl von Sporen erreicht wurde (Gonitogonie). Sie werden – zumindest anfangs – im Sporangium aneinander gepresst, so dass die aneinandergrenzenden Zellwände abgeplattet sind und radial verlaufen. Oft bilden sie Autosporenverbände, da sie von der Mutterzellwand zusammengehalten werden. Die Form des Chloroplasten wird nur geringfügig vereinfacht und das Pyrenoid verschwindet nicht. Es findet keine oder nur eine geringe Akkumulation von Stärke oder Öl in der Autosporenmutterzelle beziehungsweise den Autosporen statt.

Diese Definitionen unterscheiden sich von jenen Ettl's (1988), der als Aplanosporen nur Sporen bezeichnet, die – abgesehen vom Fehlen der Geißel – Merkmale von Zoosporen, wie zum Beispiel eine pulsierende Vakuole oder ein Stigma, besitzen. Demnach wären die Aplanosporen sensu TSCHERMAK-WOESS (1989) ebenfalls Autosporen, denn sie weisen die geforderten Merkmale nicht auf, und eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Sporenformen wäre nicht möglich. TSCHERMAK-WOESS (1989) beruft sich aber auf die Definitionen von PRINTZ (1927) und von BOLD & WYNNE (1985) die die Ontogenie der Sporen für die Benennung derselben für wesentlicher halten als die Merkmale der ausgebildeten Sporen.

Da das Vorhandensein von Sporen, die in ihrer Morphologie nur geringfügig von der Mutterzelle abweichen, bei *Trebouxia* ein taxonomisches Merkmal ist, wird im Folgenden, um die Einführung neuer Begriffe zu vermeiden, die Terminologie von TSCHERMAK-WOESS (1989) verwendet. Die Autorin zieht dieses Merkmal heran, um Untergattungen der Gattung *Trebouxia* zu definieren: subg. *Trebouxia* mit Autosporen (*T. arboricola* als Typusart) und subg. *Eleutherococcus* ohne Autosporen (*T. glomerata* als Typusart). Dieses Konzept wird inzwischen jedoch als überholt angesehen (FRIEDL, 1993), da der Unterschied zwischen Auto- und Aplanosporen hauptsächlich in dem Zeitpunkt der Unterbrechung der Zoosporenenentwicklung liegt (LOKHORST et al., 1989). Nach FRIEDL (1993) sollte dieses Merkmal nicht höher gewertet werden, als die anderen für die Artbestimmung herangezogenen Merkmale. Die molekularen Daten, die von FRIEDL (1996) erhoben wurden, unterstützen zwar die Trennung der Gattung *Trebouxia* in zwei Gattungen, allerdings entsprechen diese nicht den von TSCHERMAK-WOESS aufgestellten Untergattungen, sondern bestätigen eine Gruppierung, wie sie schon von AHMADJIAN (1960a) festgestellt wurde und auf der Lage des Chloroplasten bei der Zellteilung beruhte. Alle Arten der Gattung *Trebouxia*, bei denen der Chloroplast während der Zellteilung eine parietale Stellung einnimmt, werden in die Gattung *Asterochloris* transferiert (FRIEDL ined.). Es ist bemerkenswert, dass alle diese Arten keine Autosporen sensu TSCHERMAK-WOESS bilden. Innerhalb der Gattung *Trebouxia* trifft dies nur für *T. gelatinosa* zu, was deutlich macht, wie ähnlich die Gliederungskonzepte sind. Es wäre denkbar, dass *T. gelatinosa* auch in der Lage ist, Autosporen zu bilden, allerdings nur sehr selten, so dass sie bisher nicht beobachtet wurden, oder, wo sie beobachtet wurden, wurde der Klon zu einer

anderen *Trebouxia*-Art gestellt, da *T. gelatinosa* ja per definitionem keine Autosporen bildet. Diese Möglichkeit verdient eine nähere Betrachtung, um die Abgrenzung der Gattungen *Trebouxia* und *Asterochloris* weiter zu verbessern. In der Tat werden von WATANABE et al. (1997) Klone mit Autosporen zu *T. gelatinosa* gestellt. Da diese Zuordnung einzig aufgrund lichtmikroskopischer Untersuchungen erfolgte, sollte die Zugehörigkeit dieser Klone zu *T. gelatinosa* noch durch elektronenmikroskopische Untersuchungen des Pyrenoids (*T. gelatinosa* besitzt einen eigenen Pyrenoid-Typ; FRIEDL, 1989a) und molekularbiologische Analysen (DNA-Sequenzvergleiche) weiter untermauert werden. Trifft diese Annahme zu, dann ist die Gliederung der Gattung *Trebouxia* von TSCHERMAK-WOESS (1989) identisch mit der Gliederung nach der Chloroplastenstellung bei der Zellteilung. Die Gattung *Asterochloris* wurde von TSCHERMAK-WOESS 1980 mit der einzigen Art *A. phycobiontica*, den Phycobionten von *Anzina* (= *Varicellaria*) *carneonivea* aufgestellt und 1989 mit *Trebouxia* synonymisiert, als sie *A. phycobiontica* in die Untergattung *Eleutherococcus* stellte. Da bei *A. phycobiontica* der Chloroplast bei der Zellteilung eine parietale Stellung einnimmt, greift FRIEDL diesen Namen wieder auf (pers. Mitt.). Nach molekularen Daten ist *Asterochloris* nicht die Schwestergattung zu *Trebouxia* sondern näher verwandt mit *Myrmecia* (FRIEDL, 1995; FRIEDL & ROKITTA, 1997), was von FRIEDL (1989b: 124) schon für *A. magna* zur Diskussion gestellt wurde.

3.3.1.2 Phycobionten der Gattung *Trebouxia* PUYM.

Diese weit verbreitete Phycobionten-Gattung ist auch mit dem größten Teil der im Rahmen dieser Arbeit behandelten Flechtenpilzen lichenisiert. Im Folgenden werden die wichtigsten Gattungs- und Artmerkmale und die Verbreitung als Phycobiont zusammengefasst.

***Trebouxia* PUYM., Rev. Algol. 1(2): 109 (1924)**

Lit.: AHMADJIAN V., Amer. J. Bot. 47: 678–679 (1960); ARCHIBALD PA., Phycologia 14: 126 (1975); GÄRTNER G., Arch. Hydrobiol., Suppl. 71: 508–509 (1985); Ettl H. & GÄRTNER G., Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen: 569 (1995).

Vegetative Zellen einzeln oder in Gruppen von Autosporen zu größeren Komplexen vereinigt, kugelig bis ellipsoidisch oder abgerundet, manchmal auch asymmetrisch, (2,5–)7–20(–25) µm im Durchmesser. Zellwand dünn (0,5–1 µm dick), aber in älteren Zellen gelegentlich dicker (bis 3 µm), nur selten etwas einseitig verdickt, ohne Gallerthülle. Chloroplast parietal und kaum gelappt in Aplano- und Zoosporen, in erwachsenen Zellen zentral mit gelapptem oder gekerbtem Rand, mit einem oder mehreren, nackten, strukturierten, multiplen oder kaum sichtbaren Pyrenoiden. Stärke wird meist als körnige Stromastärke über den ganzen Chloroplasten verteilt gebildet, manchmal um das Pyrenoid konzentriert (Stärkehülle). Ein Zellkern mit deutlich sichtbarem Nukleolus stets exzentrisch in einer Einbuchtung des Chloroplasten liegend. Asexuelle Fortpflanzung durch *Auto*-, *Aplano*- und nackte, zweigeißelige *Zoosporen* mit oder ohne Stigma. Gametenverschmelzung nur von wenigen Autoren berichtet (AHMADJIAN, 1967, GALLÉ, 1968), von anderen dagegen angezweifelt (z.B. GÄRTNER, 1985a). Dennoch scheint auch eine sexuelle Fortpflanzung vorzukommen, denn KROKEN & TAYLOR (2000) konnten mit molekularen Methoden Rekombination bei *Trebouxia* nachweisen. Kolonien auf Agar höckerig, körnig, matt, chlorophyllgrün.

Typus generis: *Trebouxia arboricola* PUYM. (1924: 109). Typus: ARCHIBALD PA., Phycologia 14: 126, fig. 1 (1975) (Neotypus).

***Trebouxia incrustata* AHMADJIAN ex G.GÄRTNER, Arch. Hydrobiol., Suppl. 71(4): 530, fig. 19 (1985)**

Lit.: ARCHIBALD P.A., Phycologia 14: 133, fig.14 (1975, sub *Pseudotrebouxia incrustata* (AHMADJIAN) P.A.ARCHIBALD); Ettl H. & GÄRTNER G., Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen: 578, fig. 196u–v (1995).

Syn.: *Pseudotrebouxia incrustata* (AHMADJIAN) P.A.ARCHIBALD (1975)

Zellen jung kugelig, ältere Zellen leicht oval, im Durchmesser (5–)10–20 (selten bis 23) µm, oft Gruppen von 4–8 Zellen bildend. Zoosporen oval, 3–4 × 5 µm. Nukleus median liegend. Zellwand dünn (< 0,8 µm), keine Wandverdickungen aufweisend. Chloroplast zentral, mit zahlreichen, feinen Loben (crenulat), in Aufsicht punktiert erscheinend. Pyrenoid im Lichtmikroskop ohne Struktur, keine Stärkehülle besitzend. Zellkern in der größten Einbuchtung des Chloroplasten liegend. Neben Zoo- und Aplanosporen auch Autosporen bildend.

Trebouxia incrustata ist in Abbildung 62 (im Anhang B) dargestellt. Im lichenisierten Zustand ist diese Art nicht eindeutig zu identifizieren, da zwar eine crenulate Chloroplastenmorphologie erkennbar ist, die aber auch bei sonst breitlobigen Arten (z.B. *Trebouxia simplex*) im lichenisierten Zustand vorhanden sein kann. In allen Fällen war aber die Gattungszugehörigkeit an dem zentralen Chloroplasten mit zentralem Pyrenoid eindeutig zu erkennen.

Die morphologische Abgrenzung von *T. incrustata* gegenüber *T. gigantea* (HILDRETH & AHMADJIAN) G.GÄRTNER und *T. showmanii* (HILDRETH & AHMADJIAN) G.GÄRTNER ist sehr schwierig. FRIEDL (1989b) synonymisierte diese Arten aufgrund des einheitlichen Pyrenoidtyps, der Autosporenbildung und des gemeinsamen Grundbauplans der Plastiden. AHMADJIAN (1993) folgte dieser Einschätzung, nicht aber Ettl und GÄRTNER (1995). Letztere Autoren führen als Unterschiede die lichtmikroskopische Pyrenoidstruktur (das Pyrenoid erscheint nur bei *T. gigantea* punktiert), und die Chloroplastenloben (nur *T. incrustata* hat einen ganz fein gelappten ‚crenulaten‘ Chloroplasten) an. Allerdings zeigten eigene Untersuchungen – in Übereinstimmung mit denen von FRIEDL (1989b) – für *T. incrustata* und *T. showmanii* denselben crenulaten Chloroplastenbau. Da *T. incrustata* der ältere Name ist, wurde dieser gewählt. Die in dieser Arbeit isolierten Klone entsprechen in Bezug auf die Chloroplastenform *T. incrustata* und sind von *T. arboricola*, die ebenfalls einen crenulaten Chloroplasten besitzt, durch die leicht ovalen Zellen und die häufigen Tetradenkomplexe unterschieden. Einige der isolierten Klone unterscheiden sich im lichtmikroskopischen Bild des Pyrenoids, wobei sich dieses Merkmal über einen Zeitraum von 6 Monaten als konstant erwies (die Kulturen wurden alle 4 Wochen mikroskopiert). Bevor dieses Merkmal jedoch zur Artabgrenzung herangezogen wird, sollen noch elektronenmikroskopische Untersuchungen der Pyrenoide abgewartet werden. Diese müssen auch auf andere, bisher nicht untersuchte, Klone der *T. arboricola*-Gruppe ausgedehnt werden, um so einen Überblick über die Unterschiede innerhalb der gesamten Gruppe zu erhalten. Bis diese erfolgt sind, werden die molekular abweichenden Gruppen *T. incrustata*, *T. incrustata* [gt A] und *T. incrustata* [gt B] genannt, da sie sehr wahrscheinlich eigene Arten darstellen (siehe auch die Ausführungen zu Genotaxa bei *T. simplex*).

Tab. 12: Für folgende Ascomycetenflechten aus Europa, den USA und Australien wurde *Trebouxia incrustata* als Phycobiont beschrieben. Die im Rahmen dieser Arbeit erbrachten Nachweise sind fett gedruckt; in Klammern ist die Anzahl der untersuchten Thalli angegeben.

Ordnung	Unterordnung	Familie	Spezies	Literatur	Phycobiont beschrieben als
Lecanorales	Acarosporineae	Acarosporaceae	<i>Acarospora bullata</i> (1)		<i>T. incrustata</i>
			<i>Acarospora bullata</i> (1)		<i>T. incrustata</i> [gt B]
	Lecanorineae (inkl. Cladoniineae)	Rhizocarpaceae	<i>Rhizocarpon cf. cyanescens</i> (1)		<i>T. incrustata</i> [gt A]
			<i>Rhizocarpon cf. viridiatrum</i> (1)		<i>T. incrustata</i> [gt A]
		Lecanoraceae	<i>Lecanora dispersa</i>	ARCHIBALD, 1975	<i>T. incrustata</i>
			<i>Lecanora muralis</i> (1) <i>Lecanora stenotropa</i> (1)		<i>T. incrustata</i> <i>T. incrustata</i>
Parmeliaceae	<i>Neofuscelia stygiodes</i> (1) <i>Protoparmelia badia</i> (1)		<i>T. incrustata</i> [gt B] <i>T. incrustata</i> [gt A]		
Physciaceae	<i>Rinodina atrocinnerea</i> (1)	HELMS et al., 2001	<i>T. incrustata</i>		

Trebouxia incrustata ist innerhalb der Lecanorales weit verbreitet (siehe Tab. 12). Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Art erstmals als Phycobiont von Flechten der Familien Acarosporaceae, Rhizocarpaceae, und Parmeliaceae nachgewiesen werden.

***Trebouxia simplex* agg.**

Vegetative Zellen kugelig, im Durchmesser (5–)7–17 (sehr selten bis 25) µm. Neben Zoo- und Aplanosporen auch Autosporen bildend. Zoosporen oval, 3–4 × 6–8 µm. Zellwand dünn (< 0,8 µm), keine Wandverdickungen enthaltend. Chloroplast zentral, tief gelappt; typischerweise mit langen Loben, die meist gedreht erscheinen und in Aufsicht ein Muster aus Feldern oder parallelen Leisten bilden, aber es kommen auch andere Chloroplastenmorphologien vor (siehe Artbeschreibungen); Pyrenoid unter dem Lichtmikroskop meist ohne Struktur, keine Stärkehülle besitzend. In Lugol'scher Lösung ist am Rand des Pyrenoids ein radiales Muster zu erkennen, wie es auch für *T. impressa* typisch ist, allerdings mit weniger „Strahlen“, die kürzer sind (sie erreichen die Mitte des Pyrenoids nicht). Zellkern in der größten Einbuchtung des Chloroplasten liegend. Nukleus median liegend; Stigma nicht beobachtet.

Die Arten dieser Artengruppe verbindet vor allem der Pyrenoidtyp. Sie werden hier zusammengefasst, da sie zudem molekular eine Gruppe innerhalb der Gattung *Trebouxia* darstellen, und desweiteren viele Flechtenpilze den Algenpartner aus dieser Gruppe wählen. Eine Mykobiontenart kann also mit verschiedenen Vertretern dieser Gruppe lichenisiert sein (z.B. *Tremolecia atrata*, *Lecanora polytropa*; siehe Kapitel „Selektivität der Flechtenpartner“; Seite 122). Daher erscheint es nützlich, auch für die gesamte Gruppe die möglichen Flechtenpartner in einer Tabelle darzustellen (Tab. 13).

Der Originalstamm von *Trebouxia jamesii* HILDRETH & AHMADJIAN (UTEX 2233) ist ebenfalls durch diese Merkmale charakterisiert, weshalb von FRIEDL (1989b) vorgeschlagen worden ist, diese Art mit *T. simplex* zu synonymisieren. Aufgrund des sehr kleinen Pyrenoids (bis 2 µm im Durchmesser; siehe Abbildung 68A im Anhang B) kann *T. jamesii* jedoch von den anderen Arten dieser Gruppe unterschieden werden. Molekulare Daten bestätigen die Zugehörigkeit von *T. jamesii* zum *T. simplex* Aggregat nicht,

stattdessen fällt die ITS nrDNA-Sequenz des Typuskлона, UTEX 2233, in die Gruppe um *Trebouxia arboricola* (siehe Kapitel „Phylogenetische Analyse der ITS nrDNA-Sequenzen“; Seite 104). Eine Verwechslung von Sequenzen kann ausgeschlossen werden, da unabhängig eine sehr ähnliche Sequenz für diesen Klon bestimmt wurde (Dr. T. FRIEDL, pers. Mitt.). Die Einordnung von *T. jamesii* in die *T. arboricola*-Gruppe erscheint aber aufgrund der morphologischen Merkmale nicht nachvollziehbar, denn weder Chloroplasten-Rippen noch ein Pyrenoid vom *Impressa*-Typ sind aus dieser Gruppe bekannt (in der Gruppe um *T. arboricola* kommen Pyrenoide vom *Arboricola*- und *Gigantea*-Typ vor). Diese Merkmale sind jedoch nicht so gewichtig wie sie zunächst erscheinen. Das Vorkommen von unterschiedlichen Chloroplastenmorphologien innerhalb eines Verwandtschaftskreises ist durchaus möglich, wie in dieser Arbeit anhand der verschiedenen Chloroplasten-Formen in der *T. simplex*-Gruppe belegt wird. Überdies sind sich *Impressa*- und *Gigantea*-Typ Pyrenoide ähnlich, da sie sich nur in der Form der Pyrenoidtubuli unterscheiden (FRIEDL, 1989a). Erstere besitzen gerade, lange Thylakoideinstülpungen, während letztere kurze, verzweigte Tubuli besitzen. Es erscheint denkbar, dass aufgrund des sehr kleinen Pyrenoids bei *T. jamesii* UTEX 2233 diese Unterscheidung nur sehr schwer zu treffen ist und ein nur schwach ausgebildetes Pyrenoid vom *Gigantea*-Typ vorliegt. Unter diesen Annahmen könnte der Klon in die *T. arboricola*-Gruppe eingeordnet werden. Es wäre aber auch denkbar, dass eine Verwechslung von Stämmen stattgefunden hat und daher der untersuchte Klon nicht der Typuskultur entspricht. Ein Vergleich des untersuchten Klons von *T. jamesii* UTEX 2233 mit dem Originalstamm ist jedoch nicht mehr möglich, denn der Originalstamm ist in der Algen-Kultursammlung der Universität von Texas erloschen (Dr. B. CLAY, in lit.). Daher ist der untersuchte Klon, neben dem aus der Kultursammlung von Dr. T. FRIEDL, von dem er abstammt und dessen ITS nrDNA-Sequenz sehr ähnlich ist, und neben einem Klon in der Kultursammlung der Universität Innsbruck (ASIB), der noch nicht näher untersucht werden konnte, der vermutlich letzte Vertreter dieses Stammes. Eigene Untersuchungen bestätigten die charakteristischen morphologischen Merkmale von *T. jamesii* (Pyrenoidfeinstruktur und Chloroplastenform), weshalb davon ausgegangen werden muss, dass keine Verwechslung vorliegt. Die dritte Erklärungsmöglichkeit wäre eine Inkongruenz zwischen der ITS-Phylogenie und der Phylogenie der morphologischen Merkmale des Klones *T. jamesii* UTEX 2233. Diese könnte z.B. auftreten, wenn mehrere Kopien von ITS-Sequenzen vorliegen und nicht die homologen sondern paraloge Gene verglichen werden. Mehrere unterschiedliche ITS-Kopien innerhalb ein und desselben Organismus sind von einigen Gruppen beschrieben worden, so z.B. in Pilzen der Anamorphengattung *Fusarium* (O'DONNELL & CIGELNIK, 1997) und in der Kakteengattung *Lophocereus* (HARTMANN et al., 2001). Da bei der Vielzahl der in dieser Arbeit untersuchten Photobionten-Klone bisher keine derartige Abweichung der ITS-Phylogenie von einer aufgrund morphologischer Charakteristika erstellten Phylogenie beobachtet wurde, erscheint diese dritte Erklärung unwahrscheinlich. Dennoch sollte molekular nachgewiesen werden, dass alle ITS-Sequenzen einer Zelle identisch sind und daher keine paraloge Gene vorhanden sind. Nur in diesem Falle ist die Bestimmung der ITS-Sequenz für die sichere Artbestimmung bei *Trebouxia* ausreichend. Derartige, nur auf ITS-Sequenzen beruhende Untersuchungen wurden bereits publiziert (KROKEN & TAYLOR, 2000, HELMS et al., 2001) und werden zunehmend durchgeführt. Zudem sollte die Stellung des Klones *T. jamesii* UTEX 2233 innerhalb der Gattung *Trebouxia* durch weitere Untersuchungen (z.B. Sequenzierung anderer Genorte) überprüft werden.

Die Tatsache, dass *T. jamesii* UTEX 2233 aus dem *T. simplex* Aggregat ausgeschlossen werden muss, führt dazu, dass einige bisher als *T. jamesii* bezeichneten Klone nun *T. simplex* genannt werden müssen. Dies trifft auf alle bisher molekular untersuchten Isolate zu und dürfte für die Mehrzahl aller Nachweise der Fall sein, weshalb zunächst alle in der Übersichtstabelle (Tab. 13) als *T. simplex* agg. aufgenommen wurden. Dennoch erscheint in den Fällen eine Überprüfung wünschenswert, in denen aus der morphologischen Beschreibung nicht eindeutig hervorgeht, ob die Klone in ihrer Morphologie *T. jamesii* UTEX 2233 oder *T. simplex* entsprechen.

Bei schlechtem Wachstum ist die tiefe Lappung des Chloroplasten zurückgebildet, und er erscheint massiv, mit wenigen, unregelmäßigen und wenig tiefen Einschnitten (dies ist der Grund für das Art-Epitheton *simplex*). Es ist unbedingt nötig, die Kulturen des öfteren zu mikroskopieren, da diese Reduzierung auch bei scheinbar guten Kulturbedingungen eintreten kann.

Im lichenisierten Zustand war *Trebouxia simplex* nicht eindeutig zu identifizieren, da die Chloroplastenmorphologie sehr unterschiedlich ausgeprägt war (von massiv über breit gelappt bis crenulat) und keine sichere Korrelation mit der Morphologie im kultivierten Zustand gefunden werden konnte. In allen Fällen war aber die Gattungszugehörigkeit am zentralen Chloroplasten mit zentralem Pyrenoid eindeutig zu erkennen.

Verbreitung: Der Typusstamm dieser Art wurde von TSCHERMAK-WOESS aus der Flechte *Chaenotheca chrysocephala* aus Südtirol isoliert. Die Verteilung der unterscheidbaren Gruppen innerhalb von *T. simplex* agg. zu einzelnen Flechtenbelegen ist in der letzten Spalte angegeben und richtet sich nach der vorgeschlagenen Terminologie (siehe unter *T. simplex*). *T. simplex* [gt *] gibt an, dass kein Klon aus diesem Beleg molekular untersucht wurde und daher keine genauere Zuordnung zu einer der Gruppen mit *T. simplex*-Morphologie möglich ist.

Tab. 13: Für folgende Ascomycetenflechten aus Europa, den USA und Australien wurde *Trebouxia simplex* agg. als Phycobiont beschrieben. Die im Rahmen dieser Arbeit erbrachten Nachweise sind fett gedruckt; in Klammern ist die Anzahl der untersuchten Thalli angegeben.

Ordnung	Unterordnung	Familie	Spezies	Literatur	Phycobiont beschrieben / berichtet als
Lecanorales	Acarosporineae	Acarosporaceae	<i>Acarospora rugulosa</i> (3) (2) <i>Acarospora sinopica</i> (7) (1) (1) (1) (3) <i>Acarospora smaragdula</i> (2) (1)		<i>T. simplex</i> [gt A] <i>T. simplex</i> [gt *] <i>T. simplex</i> [gt A] <i>T. angustilobata</i> <i>T. simplex</i> [gt D] <i>T. suecica</i> <i>T. simplex</i> [gt *] <i>T. suecica</i> <i>T. simplex</i> [gt A]
		Hymeneliaceae	<i>Tremolecia atrata</i> (7) (2) (2) (1) (1) (1)		<i>T. simplex</i> [gt A] <i>T. australis</i> <i>T. suecica</i> <i>T. angustilobata</i> <i>T. simplex</i> [gt D] <i>T. simplex</i> [gt *]

Lecanorineae (inkl. Cladoniineae)	Catillariaceae	<i>Sporastatia testudinea</i> (2)		<i>T. simplex</i> [gt A]
	Lecideaceae	<i>Lecidea confluens</i> (2) (1) <i>Lecidea lapicida</i> (2) (1) (2) <i>Lecidea tessellata</i> (1) (1) <i>Lecidea paupercula</i> (1) <i>Lecidea silacea</i> (9) (1) (1) (1)		<i>T. simplex</i> [gt A] <i>T. simplex</i> [gt *] <i>T. suecica</i> <i>T. simplex</i> [gt A] <i>T. simplex</i> [gt *] <i>T. angustilobata</i> <i>T. simplex</i> [gt A] <i>T. simplex</i> [gt A] <i>T. simplex</i> [gt A] <i>T. simplex</i> [gt D] <i>T. suecica</i> <i>T. simplex</i> [gt *]
	Porpidiaceae	<i>Bellemerea alpina</i> (7) (2) <i>Bellemerea cinereorufescens</i> (3) <i>Bellemerea subsorediza</i> (2) (1) <i>Immersaria athroocarpa</i> (1) <i>Porpidia tuberculosa</i> (2) (1)		<i>T. simplex</i> [gt A] <i>T. simplex</i> [gt *] <i>T. simplex</i> [gt A] <i>T. simplex</i> [gt A] <i>T. simplex</i> [gt *] <i>T. suecica</i> <i>T. angustilobata</i> <i>T. simplex</i> [gt *]
	Rhizocarpaceae	<i>Rhizocarpon geographicum</i> (2) (1) (1) (1) <i>Rhizocarpon lecanorinum</i> (1) <i>Rhizocarpon norvegicum</i> (4) <i>Rhizocarpon polycarpum</i> (1) (1) <i>Rhizocarpon ridescens</i> (1) <i>Rhizocarpon simillimum</i> (1)		<i>T. simplex</i> [gt A] <i>T. australis</i> <i>T. suecica</i> <i>T. simplex</i> [gt *] <i>T. simplex</i> [gt D] <i>T. simplex</i> [gt A] <i>T. simplex</i> [gt A] <i>T. simplex</i> [gt *] <i>T. simplex</i> [gt A] <i>T. simplex</i> [gt A]
	Anziaceae	<i>Anzia colpodes</i> (1)	FRIEDL, 1989b	<i>T. jamesii</i>
	Candelariaceae	<i>Candelariella vitellina</i> (1)		<i>T. suecica</i>
	Lecanoraceae	<i>Carbonea vorticosa</i> (1) <i>Lecanora epanora</i> (1) <i>Lecanora farinacea</i> (1) <i>Lecanora handelii</i> (3) (1) <i>Lecanora polytropa</i> (3) (1) (1) (4) <i>Lecanora subaurea</i> (4) (1) <i>Miriquidica atrofulva</i> (1) (1) <i>Miriquidica garovaglii</i> (1) (1) <i>Pleopsidium chlorophanum</i> (1) (1) <i>Protoparmelia atriseda</i> (1) <i>Protoparmelia badia</i> (1)		<i>T. simplex</i> [gt A] <i>T. simplex</i> [gt *] <i>T. australis</i> <i>T. simplex</i> [gt A] <i>T. simplex</i> [gt *] <i>T. simplex</i> [gt A] <i>T. australis</i> <i>T. suecica</i> <i>T. simplex</i> [gt *] <i>T. simplex</i> [gt A] <i>T. simplex</i> [gt *] <i>T. suecica</i> <i>T. simplex</i> [gt *] <i>T. simplex</i> [gt A] <i>T. simplex</i> [gt *] <i>T. simplex</i> [gt A] <i>T. simplex</i> [gt C] <i>T. suecica</i> <i>T. suecica</i>
	Parmeliaceae	<i>Cetraria arenaria</i> (1) <i>Cetraria cucullata</i> (2) <i>Cetraria ericetorum</i> (1)	FRIEDL, 1989b FRIEDL, 1989b FRIEDL, 1989b	<i>T. jamesii</i> <i>T. jamesii</i> <i>T. jamesii</i>

Ergebnisse__Vorkommende Flechtenalgen

			<i>Cetraria oakesiana</i> (1)	FRIEDL, 1989b	<i>T. jamesii</i>
			<i>Hypogymnia physodes</i> (10)	FRIEDL, 1989b	<i>T. jamesii</i>
			<i>Hypogymnia physodes</i> (1)	BHATTACHARYA et al., 1996	<i>T. jamesii</i>
			<i>Hypotrachyna laevigata</i> (1)	FRIEDL, 1989b	<i>T. jamesii</i>
			<i>Letharia ‚barbata‘</i> (7)	KROKEN & TAYLOR, 2000	<i>T. ‚letharii‘</i>
			<i>Letharia ‚gracilis‘</i> (4)	KROKEN & TAYLOR, 2000	<i>T. ‚letharii‘</i>
			<i>Letharia ‚lucida‘</i> (7)	KROKEN & TAYLOR, 2000	<i>T. ‚letharii‘</i>
			<i>Letharia ‚lupina‘</i> (14)	KROKEN & TAYLOR, 2000	<i>T. ‚letharii‘</i>
			<i>Letharia ‚rugosa‘</i> (4)	KROKEN & TAYLOR, 2000	<i>T. ‚letharii‘</i>
			<i>Letharia vulpina</i> (4)	KROKEN & TAYLOR, 2000	<i>T. ‚vulpinae‘</i>
			<i>Melanelia exasperata</i> (1)	FRIEDL, 1989b	<i>T. jamesii</i>
			<i>Melanelia exasperatula</i> (1)	FRIEDL, 1989b	<i>T. jamesii</i>
			<i>Melanelia fuliginosa</i>	nach AHMADJIAN, 1993	
			<i>Melanelia glabratula</i> (3)	FRIEDL, 1989b	<i>T. jamesii</i>
			<i>Melanelia subaurifera</i> (1)	FRIEDL, 1989b	<i>T. jamesii</i>
			<i>Parmelia saxatilis</i> (4)	FRIEDL, 1989b	<i>T. jamesii</i>
			<i>Parmelia saxatilis</i> (1)	BHATTACHARYA et al., 1996	<i>T. jamesii</i>
			<i>Parmelina pastillifera</i> (1)	FRIEDL, 1989b	<i>T. jamesii</i>
			<i>Parmelina tiliacea</i> (1)	FRIEDL, 1989b	<i>T. jamesii</i>
			<i>Parmeliopsis placorodia</i> (1)	FRIEDL, 1989b	<i>T. jamesii</i>
			<i>Pseudevernia cladoniae</i> (1)	KROKEN & TAYLOR, 2000	<i>T. jamesii</i>
			<i>Pseudevernia consocians</i> (1)	KROKEN & TAYLOR, 2000	<i>T. jamesii</i>
			<i>Pseudevernia furfuracea</i> (3)	FRIEDL, 1989b	<i>T. jamesii</i>
			<i>Pseudevernia furfuracea</i> (1)	KROKEN & TAYLOR, 2000	<i>T. jamesii</i>
			<i>Punctelia subrudecta</i> (2)	FRIEDL, 1989b	<i>T. jamesii</i>
inc. sed.		Umbilicariaceae	<i>Umbilicaria crustulosa</i> (1) <i>Umbilicaria cylindrica</i> (1) (1) <i>Umbilicaria torrefacta</i> (2) (2)		<i>T. simplex</i> [gt A] <i>T. simplex</i> [gt A] <i>T. brindabellae</i> <i>T. suecica</i> <i>T. simplex</i> [gt *]
inc. sed.		Coniocybaceae	<i>Chaenotheca chrysocephala</i> (3) <i>Chaenotheca subroschida</i> (1) (4) (1)	TSCHERMAK-WOESS, 1978b TSCHERMAK-WOESS, 1980 TIBELL & BECK, 2002 TIBELL & BECK, 2002	<i>T. simplex</i> <i>T. simplex</i> <i>T. jamesii</i> (<i>T. simplex</i> [gt A]) <i>T. jamesii</i> (<i>T. simplex</i> [gt B])

Trebouxia simplex agg. ist innerhalb der Lecanorales weit verbreitet (siehe Tab. 13), kommt aber auch bei einigen Vertretern der Coniocybaceae als Phycobiont vor. Bemerkenswert ist, dass diese Art bisher nicht als Phycobiont in den Physciaceae gefunden wurde (HELMS et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit konnten Arten des *Trebouxia simplex*-Aggregats erstmals als Phycobiont von Flechten der Familien Acarosporaceae, Hymeneliaceae, Catillariaceae, Porpidiaceae, Rhizocarpaceae, Candelariaceae, Lecanoraceae und Umbilicariaceae nachgewiesen werden. Der Nachweis von *T. simplex* für *Chaenotheca subroscida* wurde bestätigt, allerdings wurden Vertreter einer anderen Gruppe von *Trebouxia simplex* agg. gefunden, nämlich *T. simplex* [gt A] und [gt B] statt *T. simplex* (TIBELL & BECK, 2002).

Innerhalb dieser Artengruppe können eigenständige Einheiten auf der Basis von morphologischen und molekularen Daten unterschieden werden. Diese werden aufgrund der Übereinstimmung der unabhängigen Datensätze (Morphologie und ITS-Sequenzen) als Arten betrachtet. Es erscheint als wahrscheinlich, dass auch die anderen molekular getrennten Gruppen eigene Arten darstellen, was aber mit den vorhandenen Daten nicht eindeutig belegt werden kann. Folgende Arten werden in diesem Komplex unterschieden: *Trebouxia angustilobata*, *T. australis*, *T. brindabellae*, *T. simplex* und *T. suecica*. Die Beschreibungen dieser Arten werden hier durch den Zusatz ‚ined.‘ ungültig gemacht, da die formale Beschreibung dieser Taxa an anderer Stelle erfolgen soll, und die Diagnosen hier nur angeführt werden, um sämtliche zur Verfügung stehenden Informationen zu den Taxa bereitzustellen. Die anderen molekularen Gruppen konnten morphologisch nicht unterschieden werden. Dies erscheint aber nur wenig verwunderlich, da die Anzahl der zur Verfügung stehenden Merkmale bei einzelligen, kokkalen Organismen sehr begrenzt ist.

***Trebouxia simplex* TSCHERM.-WOESS, Pl. Syst. Evol. 129: 206, fig. 6–7 (1978)**

Lit.: GÄRTNER G., Arch. Hydrobiol., Suppl. 71: 538–539, fig. 27 (1985); TSCHERMAK-WOESS E., Pl. Syst. Evol. 164: 164–169, fig. 1–2 (1989); FRIEDL T., Systematik und Biologie von *Trebouxia* (Microthamniales, Chlorophyta) als Phycobiont der Parmeliaceae (lichenisierte Ascomyceten): 158–163, fig. 195–199 (1989, sub *Trebouxia jamesii* (HILDRETH & AHMADJIAN) G.GÄRTNER); Ettl H. & GÄRTNER G., Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen: 583, fig. 196i–m (1995).

Vegetative Zellen kugelig, im Durchmesser (5–)7–17 (sehr selten bis 20) µm, neben Zoo- und Aplanosporen auch Autosporen bildend. Zoosporen oval, 3–4 × 6–8 µm. Zellwand dünn (< 0,8 µm), keine Wandverdickungen aufweisend. Chloroplast zentral, tief gelappt, mit langen, breiten Loben, die meist gedreht erscheinen und in Aufsicht ein Muster aus parallelen Leisten oder Feldern bilden. Diese Leisten können stark ausgeprägt oder nur kurz sein, so dass in Aufsicht Felder sichtbar sind. Pyrenoid im Lichtmikroskop undeutlich oder deutlich, keine Stärkehülle besitzend. In Lugol'scher Lösung ist am Rand des Pyrenoids ein radiales Muster zu erkennen, wie es auch für *T. impressa* typisch ist, allerdings wesentlich schlechter ausgeprägt und mit weniger „Strahlen“. Zellkern in der größten Einbuchtung des Chloroplasten liegend. Nukleus median liegend; Stigma nicht beobachtet.

Typus: vgl. TSCHERMAK-WOESS E., Pl. Syst. Evol. 129: 206, fig. 3–7 (1978).

T. simplex ist in Abbildung 66 dargestellt (Anhang B). Die in der Beschreibung erwähnte unterschiedliche Größe der Chloroplastenloben und der dadurch bedingten Felder in Zellaufsicht wurde bereits von TSCHERMAK-WOESS (1989) festgestellt und besitzt keinen taxonomischen Wert. Nach eigenen Untersuchungen sind diese Felder bei vegetativen

Zellen jedoch meist länglich und stets deutlich größer, als bei einem crenulaten Chloroplasten (wie z.B. bei *T. arboricola* oder *T. incrustata*).

Aufgrund von molekularen Unterschieden in der ITS-Sequenz kann eine Kerngruppe, die die Typuskultur enthält, von anderen Gruppen abgegrenzt werden (siehe Abb. 17). Da aber hierfür keine morphologischen Merkmale zur Verfügung stehen, wird vorgeschlagen, diese als Genotaxa (Abkürzung: ‚gt‘) zu unterscheiden. Der Begriff ‚Genotaxon‘ steht für Taxa, die durch genetische Unterschiede bestimmt werden, während ‚Morphotaxon‘ Taxa bezeichnet, die sich durch morphologische Charakteristika unterscheiden. Die Kerngruppe wird als *T. simplex* und die anderen Gruppen als *T. simplex* [gt *] zu bezeichnen, wobei der Stern für einen beliebigen Buchstaben steht. Da die Gruppen der einzelnen Genotaxa im Stammbaum (siehe Abb. 17) zwischen morphologisch unterscheidbaren Arten stehen, erscheint es wahrscheinlich, dass es sich hierbei um eigene Arten handelt. Allerdings kann dies ohne morphologische Merkmale und mit der Analyse von nur einem Genort nicht zweifelsfrei geklärt werden. Diese Annahme wird aber auch durch die größeren genetischen Distanzen zwischen den einzelnen Genotaxa von *T. simplex*, als zwischen den Arten des *T. ‚letharii‘*-Artenkomplexes unterstützt (siehe Astlängen in Abb. 17).

***Trebouxia angustilobata* (A.BECK) A.BECK comb. nov. ined.**

Basionym: *Trebouxia jamesii* var. *angustilobata* A. BECK, Lichenologist 31: 509, fig. 1C & 1D (1999).

Vegetative Zellen kugelig, im Durchmesser (5–)7–22 µm, neben Zoo- und Aplanosporen auch Autosporen bildend. Zoosporen oval, 3–4 × 6–8 µm. Zellwand dünn (< 0,8 µm), keine Wandverdickungen enthaltend. Chloroplast zentral, mit schmalen Loben, in Aufsicht ein Muster aus Punkten bildend; Pyrenoid im Lichtmikroskop deutlich, ohne Struktur, keine Stärkehülle besitzend. In Lugol’scher Lösung ist am Rand des Pyrenoids ein radiales Muster zu erkennen, wie es auch für *T. impressa* typisch ist. Zellkern in der größten Einbuchtung des Chloroplasten liegend. Nukleus median liegend; Stigma nicht beobachtet.

Typus: vgl. BECK A., Lichenologist 31: 509, fig. 1C & 1D (1999).

Trebouxia angustilobata ist in Abbildung 63 dargestellt (Anhang B).

***Trebouxia australis* A.BECK spec. nov. ined.**

Diagnosis: Cellulae solitariae, globosae, diametro usque ad 23 µm; chloroplasto centrali, anguste lobulato. Differt a *T. simplex* et *T. brindabellae* chromatophoro subtiliter lobato, a *T. angustilobata* lobuli chloroplasti aspecto superficies imaginem punctatum interdum lineatum formantes.

Typus: AB99.026B4 (getrocknete Kultur auf Agar, M-Holotypus; lebende Kultur, SAG); isoliert aus *Tremolecia atrata* (ACH.) HERTEL, Australien, Capital Territory, Brindabella Range, summit of Mt Franklin, 45 km WSW of Canberra, 15 xii 1998, J.A. ELIX 43014a (M). Abbildung 64.

Etymologie: Der Name wurde gewählt, da diese Flechtenalge bisher nur aus der Südhalbkugel (Australien) bekannt ist.

Vegetative Zellen kugelig, im Durchmesser (5–)7–23 (sehr selten bis 25) μm , neben Zoo- und Aplanosporen auch Autosporen bildend. Zoosporen oval, $3\text{--}4 \times 6\text{--}8 \mu\text{m}$. Nukleus median liegend; Stigma nicht beobachtet. Zellwand dünn ($< 0,8 \mu\text{m}$), keine Wandverdickungen enthaltend. Chloroplast zentral, mit sehr schmalen Loben, in Aufsicht ein Muster aus Punkten und sehr schmalen Rippen bildend; Pyrenoid im Lichtmikroskop groß, ohne Struktur, keine Stärkehülle besitzend. In Lugol'scher Lösung ist am Rand des Pyrenoids ein radiales Muster zu erkennen, wie es auch für *T. impressa* typisch ist, allerdings wesentlich schlechter ausgeprägt und mit weniger „Strahlen“, die nicht in die Mitte des Pyrenoids vordringen. Zellkern in der größten Einbuchtung des Chloroplasten liegend.

T. australis ist in Abbildung 64 dargestellt (Anhang B). Sie unterscheidet sich von *T. angustilobata* nicht nur durch die Chloroplastenloben, die in Aufsicht neben Punkten auch sehr schmalen Rippen bilden, sondern auch in ihrer ITS nrDNA-Sequenz (siehe Kapitel „Phylogenetische Analyse der ITS nrDNA-Sequenzen“; Seite 104).

***Trebouxia brindabellae* A.BECK spec. nov. ined.**

Diagnosis: Cellulae solitariae, globosae, diametro usque ad 25 μm ; chloroplasto centrali, late lobulato. Differt a *T. simplex* cellulis magnis usque ad 25 μm .

Typus: AB99.028C2 (getrocknete Kultur auf Agar, M-Holotypus; lebende Kultur, SAG); isoliert aus *Umbilicaria cylindrica* (L.) DEL. ex DUBY, Australien, Capital Territory, Brindabella Range, summit of Mt Franklin, 45 km WSW of Canberra, 15 xii 1998, J.A. ELIX 43014a (M). Abbildung 65.

Etymologie: Der Name wurde gewählt, da diese Flechtenalge bisher nur von der Brindabella Range (Australien) bekannt ist.

Vegetative Zellen kugelig, im Durchmesser (5–)7–25 μm , neben Zoo- und Aplanosporen auch Autosporen bildend. Zellwand dünn ($< 0,8 \mu\text{m}$), keine Wandverdickungen enthaltend. Chloroplast zentral, mit langen, breiten Loben, in Aufsicht ein Muster aus breiten Feldern bildend; Pyrenoid im Lichtmikroskop groß, ohne Struktur, keine Stärkehülle besitzend. In Lugol'scher Lösung ist am Rand des Pyrenoids ein radiales Muster zu erkennen, wie es auch für *T. impressa* typisch ist, allerdings wesentlich schlechter ausgeprägt und mit weniger „Strahlen“, die nicht bis zur Mitte des Pyrenoids vordringen. Zellkern in der größten Einbuchtung des Chloroplasten liegend.

T. brindabellae ist in Abbildung 65 dargestellt (Anhang B). Sie unterscheidet sich von *T. simplex* nicht nur durch die deutlich größeren Zellen, sondern auch in ihrer ITS nrDNA-Sequenz (siehe Kapitel „Phylogenetische Analyse der ITS nrDNA-Sequenzen“; Seite 104).

***Trebouxia suecica* A.BECK & S.KROKEN spec. nov. ined.**

Diagnosis: Cellulae solitariae, globosae, diametro usque ad 13 μm ; chloroplasto centrali, late lobulato. Differt a *T. simplex* cellulis parvis usque ad 13 μm .

Typus: AB98.140B3 (getrocknete Kultur auf Agar, M-Holotypus; lebende Kultur, SAG); isoliert aus *Tremolecia atrata* (ACH.) HERTEL, Schweden, Södermanland, Utön par., Utö, 20 ix 1998, A. BECK 179 & B. OWE-LARSSON (M). Abbildung 67.

Etymologie: Der Name wurde gewählt, da diese Flechtenalge bisher nur aus Flechtenbelegen aus Schweden (Utö) isoliert wurde.

Vegetative Zellen kugelig, im Durchmesser (5–)7–13 (selten bis 15) µm, neben Zoo- und Aplanosporen auch Autosporen bildend. Zellwand dünn (< 0,8 µm), keine Wandverdickungen enthaltend. Chloroplast zentral, tief gelappt, mit – im Verhältnis zu den kleinen Zellen – breiten Loben, die meist gedreht erscheinen und in Aufsicht ein Muster aus parallelen Leisten bilden; Pyrenoid im Lichtmikroskop undeutlich, keine Stärkehülle besitzend. In Lugol'scher Lösung ist am Rand des Pyrenoids ein radiales Muster zu erkennen, wie es auch für *T. impressa* typisch ist, allerdings schlechter ausgeprägt und mit weniger „Strahlen“. Zellkern in der größten Einbuchtung des Chloroplasten liegend.

T. suecica ist in Abbildung 67 dargestellt (Anhang B). Die Chloroplastenloben von *T. suecica* sind, wie bei *T. simplex*, unterschiedlich breit gelappt, jedoch stets breiter, als bei einem crenulaten Chloroplasten (wie z.B. bei *T. arboricola* oder *T. incrustata*). Neben der Zellgröße unterscheidet sich *T. suecica* von *T. simplex* in der ITS-Sequenz (siehe Kapitel „Phylogenetische Analyse der ITS nrDNA-Sequenzen“; Seite 104). *T. suecica* ist, nach ihrer ITS nrDNA-Sequenz zu urteilen, sehr nahe mit der von KROKEN und TAYLOR (2000) aus *Letharia vulpina* nachgewiesenen *Trebouxia ‚vulpinae‘* verwandt. *T. ‚vulpinae‘* ist ein nomen nudum und wird hier nicht als Artnamen gewählt, da nicht mit Sicherheit geklärt werden konnte, ob die beiden Arten wirklich konspezifisch sind. So sind ihre ITS nrDNA-Sequenzen nicht vollkommen identisch, sie besitzen eventuell eine andere Chloroplastenmorphologie (allerdings wurde *T. ‚vulpinae‘* nur lichenisiert untersucht, es liegen keine Kulturen dieses Photobionten vor) und sie unterscheiden sich deutlich in ihrem Verbreitungsareal (siehe Kapitel „Geographische Verbreitung der Photobionten der *Trebouxia simplex*-Gruppe“; Seite 158). Auch die sehr stark ausgeprägte Vermehrungsweise durch lichenisierte Diasporen von *L. vulpina* könnte eine Trennung der beiden Arten unterstützt haben. Daher soll *T. ‚vulpinae‘* für den Algenpartner von *L. vulpina* beibehalten werden. Denn falls die Arten nicht konspezifisch sind, würde es andernfalls zu der ungünstigen Situation kommen, dass der Photobiont von *L. vulpina* umbenannt werden müsste (aus dieser liegt bisher kein Typusmaterial vor), während die nicht aus *L. vulpina* stammenden Algenklone des *Acarosporium sinopicae* *T. vulpinae* genannt werden müssten.

3.3.1.3 Phycobionten der Gattung *Asterochloris* TSCHERM.-WOESS (1980) emend. T.FRIEDL (ined.)

Diese weit verbreitete Flechtenalgenart wurde in dieser Arbeit fast nur in Flechten der Familien Cladoniaceae, Lecideaceae und Porpidiaceae gefunden, wo sie auch generell am häufigsten anzutreffen ist (RAMBOLD et al., 1998).

***Asterochloris* TSCHERM.-WOESS, Pl. Syst. Evol. 135: 291–292 (1980).**

Lit.: TSCHERMAK-WOESS E., Pl. Syst. Evol. 135: 291–292 (1980).

Vegetative Zellen einzeln, ellipsoidisch oder birnenförmig, nur jung kugelig, (2,5–)7–26(–30) µm im Durchmesser. Zellwand dünn (0,5–1 µm dick), aber in älteren Zellen gelegentlich dicker (bis 3 µm), nur selten etwas einseitig verdickt, ohne Gallerthülle. Chloroplast unmittelbar vor der Protoplastenteilung immer parietal und kaum gelappt, ebenso in Aplano- und Zoosporen, in erwachsenen Zellen entweder wandständig

glatt oder gefaltet mit sehr tiefen Einschnürungen, mit einem oder mehreren Pyrenoiden mit undeutlicher Pyrenoidmatrix. Stärke meist als körnige Stromastärke über den ganzen Chloroplasten verteilt, manchmal um das Pyrenoid konzentriert. Ein Zellkern mit deutlich erkennbarem Nukleolus stets (außer bei *A. magna*) exzentrisch in einer deutlichen Einbuchtung des Chloroplasten liegend. Asexuelle Fortpflanzung durch *Aplano*- und nackte, zweigeißelige *Zoosporen* mit oder ohne Stigma. Gametenverschmelzung nur von wenigen Autoren berichtet (AHMADJIAN, 1967; GALLÉ, 1968), von anderen dagegen angezweifelt (z.B. GÄRTNER, 1985a). Kolonien auf Agar höckerig, körnig, matt, chlorophyllgrün.

***Asterochloris irregularis* (CHODAT) T.FRIEDL (ined.)**

Lit.: CHODAT R., Beitr. Kryptogamenfl. Schweiz 4: 205–206, fig. 167 (1913, sub *Cystococcus irregularis* CHODAT).

Syn.: *Trebouxia irregularis* HILDRETH & AHMADJIAN (1981).

Lit.: GÄRTNER G., Arch. Hydrobiol., Suppl. 71: 531–532, fig. 20 (1985); FRIEDL T., Systematik und Biologie von *Trebouxia* (Microthamniales, Chlorophyta) als Phycobiont der Parmeliaceae (lichenisierte Ascomyceten): 154–158, fig. 189–194 (1989); TSCHERMAK-WOESS E., Pl. Syst. Evol. 164: 186–187, fig. 14 (1989); ETTL H. & GÄRTNER G., Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen: 578, fig. 1931–o (1995).

Weitere Syn.: *Asterochloris glomerata* (WARÉN) T.FRIEDL (ined.) = *Asterochloris italiana* (P.A.ARCHIBALD) T.FRIEDL (ined.) = *Asterochloris pyriformis* (P.A.ARCHIBALD) T.FRIEDL (ined.) = *Cystococcus glomeratus* WARÉN (1920).

Der von CHODAT (1913) aus *Cladonia fimbriata* ACH. isolierte und als *Cystococcus irregularis* CHODAT beschriebene Phycobiont gehört der Beschreibung nach eindeutig zur Gattung *Asterochloris*. GÄRTNER (1985) führt sie mit Fragezeichen als Synonym von *Trebouxia glomerata* (WARÉN) AHMADJIAN. *A. irregularis* ist der älteste verfügbare Name in der Gruppe von *Asterochloris glomerata*, *A. irregularis* und *A. pyriformis*. Die von HILDRETH & AHMADJIAN (1981) beschriebene Art *Trebouxia irregularis* HILDRETH & AHMADJIAN ist synonym zu *A. irregularis*, da *Cystococcus irregularis* nicht in die Gattung *Trebouxia* umkombiniert worden ist.

Vegetative Zellen ellipsoidisch bis eiförmig, nur jung kugelig, (4–)7–23(–25) µm im Durchmesser. Zellwand dünn (0,5–1 µm dick), aber in älteren Zellen gelegentlich dicker (bis 3 µm), nur selten etwas einseitig verdickt, ohne Gallerthülle. Chloroplast in vegetativen Zellen tief gelappt mit breiten Loben (in Aufsicht ein Muster aus Schollen bildend), unmittelbar vor der Protoplastenteilung immer parietal und kaum gelappt, ebenso in *Aplano*- und *Zoosporen*; Pyrenoid im Lichtmikroskop deutlich sichtbar, mit indistinkter Pyrenoidmatrix. Zellkern mit deutlich sichtbarem Nukleolus in vegetativen Zellen stets exzentrisch in einer deutlichen Einbuchtung des Chloroplasten liegend. Asexuelle Fortpflanzung durch *Aplano*- und nackte, zweigeißelige *Zoosporen* mit oder ohne Stigma. Kolonien auf Agar höckerig, körnig, matt, chlorophyllgrün.

A. irregularis ist in Abbildung 69A dargestellt (Anhang B). Mit der Synonymisierung von *Asterochloris glomerata* und *Asterochloris pyriformis* mit *A. irregularis* wird FRIEDL (1989b) gefolgt, da eigene Untersuchungen große Ähnlichkeiten der jeweiligen Typuskulturen mit dieser Art bestätigten. Überdies wird sie auch durch molekulare Daten unterstützt (PIERCEY-NORMORE & DEPRIEST, 2001). Alle sequenzierten Klone dieser Arten hatten fast identische ITS-Sequenzen und bildeten zusammen eine Gruppe, die von PIERCEY-NORMORE & DEPRIEST als ‚Clade 1‘ bezeichnet wurde. Überdies zeigten große Ähnlichkeiten der RAPD-Mustern (Random Amplified Polymorphic DNA) von *A. glomerata* und *A. pyriformis*, dass sie vermutlich zu ein und derselben Art gehören. Allerdings wiesen alle untersuchten Klone der Gattung *Asterochloris* eine sehr geringe Variabilität in ihrer ITS-Sequenz auf, sodass weitere Untersuchungen zur Klärung der Verwandtschaftsbeziehungen in dieser Gattung notwendig erscheinen. In der Tabelle 14 sind die bisher bekannten Nachweise von *Asterochloris irregularis* aufgeführt.

Tab. 14: Für folgende Flechten wurde *Asterochloris irregularis* als Phycobiont beschrieben. Die im Rahmen dieser Arbeit erbrachten Nachweise sind fett gedruckt; in Klammern ist die Anzahl der untersuchten Thalli angegeben.

Ordnung	Unterordnung	Familie	Spezies	Literatur	Phycobiont beschrieben als
Graphidales		Thelotremaaceae	<i>Diploschistes gypsaceus</i> (4)	FRIEDL & GÄRTNER, 1988	<i>T. irregularis</i>
Lecanorales	Lecanorineae (inkl. Cladoniineae)	Cladoniaceae	<i>Cladia aggregata</i> (3)	TAKESHITA et al., 1991	<i>T. glomerata</i>
			<i>Cladonia alpestris</i> (1)	MEISCH, 1981	<i>T. glomerata</i>
			<i>Cladonia bellidiflora</i> (1)	MEISCH, 1981	<i>T. pyriformis</i>
			<i>Cladonia boryi</i> (1)	HILDRETH & AHMADJIAN, 1981	<i>T. glomerata</i>
			<i>Cladonia cenotea</i> (1)	MEISCH, 1981	<i>T. glomerata</i>
			<i>Cladonia cenotea</i> (1)	MEISCH, 1981	<i>T. glomerata</i>
			<i>Cladonia chlorophaea</i> (1)	MEISCH, 1981	<i>T. glomerata</i>
			<i>Cladonia chlorophaea</i> (1)	MEISCH, 1981	<i>T. pyriformis</i>
			<i>Cladonia coccifera</i>	WARÉN, 1920	<i>T. glomerata</i>
			<i>Cladonia coccifera</i> (1)	MEISCH, 1981	<i>T. pyriformis</i>
			<i>Cladonia cornuta</i>	WARÉN, 1920	<i>T. glomerata</i>
			<i>Cladonia deformis</i>	WARÉN, 1920	<i>T. glomerata</i>
			<i>Cladonia deformis</i> (1)	MEISCH, 1981	<i>T. glomerata</i>
			<i>Cladonia deformis</i> (1)	MEISCH, 1981	<i>T. pyriformis</i>
			<i>Cladonia elongata</i> (1)	MEISCH, 1981	<i>T. glomerata</i>
			<i>Cladonia fimbriata</i> (1)	MEISCH, 1981	<i>T. glomerata</i>
			<i>Cladonia furcata</i> (1)	MEISCH, 1981	<i>T. glomerata</i>
			<i>Cladonia furcata</i> (1)	Meisch, 1981	<i>T. pyriformis</i>
			<i>Cladonia furcata</i> (1)		
			<i>Cladonia humilis</i> (1)	NAKANO & IGUCHI, 1994	<i>T. glomerata</i>
			<i>Cladonia macilenta</i>	WARÉN, 1920	<i>T. glomerata</i>
			<i>Cladonia mitis</i> (1)	MEISCH, 1981	<i>T. pyriformis</i>
			<i>Cladonia mitis</i> (1)	MEISCH, 1981	<i>T. pyriformis</i>
			<i>Cladonia pityrea</i> (1)	MEISCH, 1981	<i>T. pyriformis</i>
			<i>Cladonia pleurota</i> (1)	MEISCH, 1981	<i>T. pyriformis</i>
			<i>Cladonia pyxidata</i> (1)	MEISCH, 1981	<i>T. glomerata</i>
			<i>Cladonia pyxidata</i> (1)	MEISCH, 1981	<i>T. pyriformis</i>
			<i>Cladonia rangiferina</i>	WARÉN, 1920	<i>T. glomerata</i>
			<i>Cladonia rangiferina</i>	WANG YANG, 1970	<i>T. glomerata</i>
			<i>Cladonia squamosa</i> (1)	ARCHIBALD, 1975	<i>T. pyriformis</i>
		<i>Cladonia stellaris</i> (1)	MEISCH, 1981	<i>T. pyriformis</i>	
		<i>Cladonia uncialis</i> (1)	MEISCH, 1981	<i>T. glomerata</i>	
		<i>Cladonia uncialis</i> (1)	MEISCH, 1981	<i>T. pyriformis</i>	
		<i>Cladonia verticillata</i> (1)	MEISCH, 1981	<i>T. pyriformis</i>	
		Stereocaulaceae	<i>Stereocaulon dactylophyllum</i> (1)	ARCHIBALD, 1975	<i>T. pyriformis</i>
			<i>Stereocaulon pileatum</i> (1)	AHMADJIAN, 1960	<i>T. glomerata</i>
<i>Stereocaulon pileatum</i> (1)	HILDRETH & AHMADJIAN, 1981		<i>T. pyriformis</i>		
<i>Stereocaulon saxatile</i> (1)	HILDRETH & AHMADJIAN, 1981		<i>T. glomerata</i>		
<i>Stereocaulon vesuvianum</i> (1)					
Lecideaceae	<i>Lecidea fuscoatra</i> (1)				
	<i>Lecidea plana</i> (1)				

	Porpidiaceae	<i>Porpidia albocaerulescens</i> (1) <i>Porpidia crustulata</i> (1) <i>Porpidia flavocaerulescens</i> (1) <i>Porpidia macrocarpa</i> (5) <i>Porpidia spec. (grau, I_{Lugol} -)</i> <i>Porpidia spec. (rot, I_{Lugol} -)</i> (1) cf. <i>Bellemeria cinereo-rufescens diamartha</i> (1)	HILDRETH & AHMADJIAN, 1981	<i>T. glomerata</i>
	Parmeliaceae	<i>Cetraria islandica</i> (1) <i>Hypogymnia krogii</i> (1) <i>Melanelia stygia</i> (1) <i>P. omphalodes</i> ssp. <i>discordans</i> (1) <i>Parmelia saxatilis</i> (3) <i>P. taylorensis</i> (1) <i>Parmeliopsis ambigua</i> (1) <i>Parmeliopsis hyperopta</i> (1) <i>Platismatia glauca</i> (1)	FRIEDL, 1989b FRIEDL, 1989b FRIEDL, 1989b FRIEDL, 1989b FRIEDL, 1989b FRIEDL, 1989b FRIEDL, 1989b FRIEDL, 1989b FRIEDL, 1989b	<i>T. irregularis</i> <i>T. irregularis</i> <i>T. irregularis</i> <i>T. irregularis</i> <i>T. irregularis</i> <i>T. irregularis</i> <i>T. irregularis</i> <i>T. irregularis</i> <i>T. irregularis</i>
	Teloschistaceae	<i>Xanthoria parietina</i>	ARCHIBALD, 1975	<i>T. italiana</i>
inc. sed.		<i>Lepraria caesiolba</i> (2)		

Asterochloris irregularis wurde in dieser Arbeit erstmals als Algenpartner von Flechten der Familie Lecideaceae und der Gattung *Lepraria* nachgewiesen. Für Cladoniaceae, Porpidiaceae und Stereocaulaceae wurde das Vorkommen von *A. irregularis* bestätigt.

***Asterochloris magna* (P.A.ARCHIBALD) T.FRIEDL (ined.)**

Lit.: ARCHIBALD PA., Phycologia 14: 130, fig. 10 (1975, sub *Trebouxia magna* P.A.ARCHIBALD); GÄRTNER G., Arch. Hydrobiol., Suppl. 71: 534–535, fig. 23 (1985, sub *Trebouxia magna*); ETTL H. & GÄRTNER G., Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen: 579, fig. 194i–l (1995, sub *Trebouxia magna*).

Synonomie: *Trebouxia lambii* AHMADJIAN (1959), nomen nudum = *Trebouxia magna* P.A.ARCHIBALD (1975).

Vegetative Zellen ellipsoidisch bis eiförmig, nur jung kugelig, (3–)4–20(–23) µm im Durchmesser. Zellwand dünn (0,5–1 µm dick), aber in älteren Zellen gelegentlich dicker (bis 3 µm), nur selten etwas einseitig verdickt, ohne Gallerthülle. Chloroplast in vegetativen Zellen parietal, mit breiten Loben, unmittelbar vor der Protoplastenteilung immer parietal und kaum gelappt, ebenso in Aplano- und Zoosporen, ohne lichtmikroskopisch sichtbarem Pyrenoid. Ein Zellkern mit deutlich sichtbarem Nukleolus stets äquatorial liegend. Asexuelle Fortpflanzung durch *Aplano*- und nackte, zweigeißelige *Zoosporen*. Kolonien auf Agar höckerig, körnig, matt, chlorophyllgrün.

Asterochloris magna ist in Abbildung 69B dargestellt (Anhang B). In der Tabelle 15 sind die bisher bekannten Nachweise von *A. magna* aufgeführt.

Tab. 15: Für folgende Flechten wurde *Asterochloris magna* als Phycobiont beschrieben. Die im Rahmen dieser Arbeit erbrachten Nachweise sind fett gedruckt; in Klammern ist die Anzahl der untersuchten Thalli angegeben.

Ordnung	Unterordnung	Familie	Spezies	Literatur	Phycobiont beschrieben als
Lecanorales	Lecanorineae (inkl. Cladoniineae)	Stereocaulaceae	<i>Pilophorus acicularis</i>	ARCHIBALD, 1975	<i>A. magna</i>
		Porpidiaceae	<i>Porpidia contraponenda</i> (1)		

3.3.1.4 Phycobionten der Gattung *Chlorella* BEIJ. (1890)

Diese weit verbreitete und häufige Algengattung stellt nur wenige Vertreter von Flechtenalgen, obwohl sie oft freilebend neben Flechten gefunden werden kann (TSCHERMAK-WOESS, 1978c).

***Chlorella* BEIJ., Bot. Zeitung 48: 736–738 (1890)**

Lit.: FOTT B. & NOVÁKOVÁ M., *Studies in Phycology*: 18–19 (1969); KOMÁREK J. & FOTT B. in HUBER-PESTALOZZI G. (ed.), *Das Phytoplankton des Süßwassers*. 7. Teil, 1. Hälfte: 583 (1983); ETTL H. & GÄRTNER G., *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*: 403 (1995).

Vegetative Zellen einzeln, meist kugelig, seltener ellipsoidisch oder breit eiförmig. Zellwand glatt, ohne Skulptur, ohne Gallerthülle. Chloroplast parietal, band-, mulden- oder becherförmig, ganzrandig oder selten mit gewelltem Rand, mit oder ohne Pyrenoid. Asexuelle Fortpflanzung nur durch Autosporen.

Die Gattung ist in dieser Umschreibung äußerst heterogen und vereinigt Vertreter aus zwei verschiedenen Klassen der Chlorophyta (Chlorophyceae und Trebouxiophyceae; HUSS et al., 1999). Auch die hier als *Chlorella saccharophila* (W.KRÜGER) MIGULA beschriebenen Klone gehört nicht zur Gattung *Chlorella*, da sie nicht in die Gruppe um *C. vulgaris* (Typusart der Gattung) fällt (loc. cit.). Da allerdings noch keine formale Umbenennung erfolgt ist, wird der Name in dieser Arbeit beibehalten.

***Chlorella saccharophila* (W.KRÜGER) MIG. Algen. Kryptogamenflora von Deutschland, Deutsch-Österreich und der Schweiz 2: 627, fig. 35 (1907)**

Lit.: KRÜGER W., *Hedwigia* 33: 265–266 (1894, sub *Chlorothecium saccharophilum* W.KRÜGER); FOTT B. & NOVÁKOVÁ M., *Studies in Phycology*: 37–39, fig. 10 (1969); KOMÁREK J. & FOTT B. in HUBER-PESTALOZZI G. (ed.), *Das Phytoplankton des Süßwassers*. 7. Teil, 1. Hälfte: 590–592, fig. 167: 1 (1983); ETTL H. & GÄRTNER G., *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*: 404 (1995).

Zellen zylindrisch-ellipsoidisch, selten breit eiförmig mit dünner Zellwand. Chloroplast parietal, mit glattem Rand, bis zu eine Zellhälfte ausfüllend dick; Pyrenoid undeutlich, in Lugol'scher Lösung jedoch stark hervortretend, ohne im LM erkennbare Struktur. Fortpflanzung nur durch (2–32) Autosporen. Zellen 5–13 µm lang und 3–8 µm breit.

C. saccharophila ist in Abbildung 70 dargestellt (Anhang B). Diese Art ist bisher noch nicht als Flechtenalge bekannt, denn obwohl der von TSCHERMAK-WOESS (1948, 1978c) beschriebene Algenpartner von *Trapelia coarctata* von ETTL und GÄRTNER (1995) als *C. saccharophila* bezeichnet wurde, gehört dieser nach physiologischen Untersuchungen von KESSLER (1987) zu *C. ellipsoidea* (und wird von TSCHERMAK-WOESS (1988a) als *C. saccharophila* var. *ellipsoidea* (GERNECK) FOTT & NOVÁKOVÁ [= *C. ellipsoidea*] geführt). *C. ellipsoidea* kann nicht auf Mannit wachsen und ist extrem Cd-sensitiv (KESSLER, loc. cit.). Zu dieser Art gehört auch der Algenpartner von *Bacidina arnoldiana* (= *Woessia fusarioides*; TSCHERMAK-WOESS, 1988b). Um die phylogenetische Stellung der in dieser Arbeit isolierten Stämme zu untersuchen, wurde von drei Vertretern die 18S nrDNA bestimmt (98.017B3, 99.001B5, 99.002B1; siehe Kapitel „Untersuchungen zur phylogenetischen Stellung der Algenpartner *Chlorella saccharophila* und *Coccomyxa* sp. mittels 18S nrDNA-Analysen“; Seite 101).

Im lichenisierten Zustand war eine Bestimmung des Photobionten unmöglich, da der Chloroplast derart dick war, dass seine parietale Lage nicht mehr erkennbar war. Einzig die fehlende Lappung des Chloroplasten unterschied ihn von der für *Trebouxia* / *Asterochloris*

typischen Gestalt. Ähnliches wurde auch von TSCHERMAK-WOESS (1978c) für *C. ellipsoidea* in *Trapelia coarctata* berichtet. Aufgrund dieser starken morphologischen Änderung im lichenisierten Zustand wurde der Photobiont von *Psilolechia leprosa* bisher als „*Trebouxia*-like“ angegeben (COPPINS & PURVIS, 1987). Da es sich bei *Chlorella*-Arten um ubiquitäre Algen handelt, die sehr schnellwüchsig sind, ist die Gefahr einer Kontamination besonders groß. Um sicherzustellen, dass der isolierte Klon auch wirklich der Photobiont ist und nicht nur eine Kontamination durch aerophytische Algen wurde auch die ITS-Sequenz des Algenpartners im Flechtenthallus von *Lecidea inops* bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Sequenz identisch mit der des isolierten Klons war und damit *C. saccharophila* in der Tat der Photobiont ist. In der Tabelle 16 sind die bisher bekannten Nachweise von *Chlorella saccharophila* aufgeführt.

Tab. 16: Für folgende Flechten aus Europa wurde *Chlorella saccharophila* als Phycobiont beschrieben. Die im Rahmen dieser Arbeit erbrachten Nachweise sind fett gedruckt; in Klammern ist die Anzahl der untersuchten Thalli angegeben.

Ordnung	Unterordnung	Familie	Spezies	Literatur	Phycobiont beschrieben als
Lecanorales	Lecanorineae (inkl. Cladoniineae)	Micareaceae	<i>Psilolechia leprosa</i> (2)		
		Stereocaulaceae	<i>Stereocaulon nanodes</i> (2)		
		Lecideaceae	<i>Lecidea inops</i> (4)		

C. saccharophila ist bisher nur in 3 Familien der Lecanorineae (inkl. Cladoniineae) nachgewiesen worden.

***Chlorella ellipsoidea* GERNECK, Beih. Bot. Centalbl. 21: 250–251, fig. 45-51 (1907)**

Lit.: FOTT B. & NOVÁKOVÁ M., Studies in Phycology: 40–41–, fig. 11–12 (1969, sub *Chlorella saccharophila* var. *ellipsoidea* (GERNECK) FOTT & NOVÁKOVÁ); KOMÁREK J. & FOTT B. in HUBER-PESTALOZZI G. (ed.), Das Phytoplankton des Süßwassers. 7. Teil, 1. Hälfte: 592, fig. 167: 2 (1983); Ettl H. & GÄRTNER G., Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen: 404, fig. 116a (1995).
Syn.: *Chlorella saccharophila* var. *ellipsoidea* (GERNECK) FOTT & NOVÁKOVÁ (1969)

Zellen ellipsoidisch bis breit eiförmig. Chloroplast parietal, mit glattem, unregelmäßig gewelltem, Rand, bis zu eine Zellhälfte ausfüllend dick; Pyrenoid undeutlich, in Lugol'scher Lösung jedoch stark hervortretend, ohne im LM erkennbare Struktur. Fortpflanzung nur durch (4–32) Autosporen. Zellen 3–14µm lang und 2–10µm breit.

Chlorella ellipsoidea ist sehr ähnlich zu *C. saccharophila*. Nach Ettl und GÄRTNER (1995) unterscheidet sich *C. ellipsoidea* durch den am Rand gewellten Chloroplasten und ungleich große Autosporen. Allerdings konnten weder bei den Isolaten aus *Trapelia obtegens*, noch bei einer Untersuchung des Klons SAG 211-1a ungleich großen Autosporen gefunden werden und nach KESSLER (1987) sind *C. ellipsoidea* und *C. saccharophila* morphologisch nicht zu trennen.

Zu dieser Art gehört vermutlich der Photobiont von *Trapelia obtegens* aber morphologisch konnte kein wesentlicher Unterschied zu *C. saccharophila* gefunden werden (z.B. ungleich große Autosporen). Daher wären molekulare Untersuchungen zur Absicherung nötig. Auf diese wurde in dieser Arbeit verzichtet, da bisher alle Isolate aus *Trapelia* zu *C. ellipsoidea* gehörten (siehe Diskussion bei *C. saccharophila*), und auch die kürzlich von SCHMITT und LUMBSCH (2001) publizierten Sequenzen der Algenpartner von *Trapeliopsis flexuosa* (FR.)

COPPINS & P. JAMES und *T. granulosa* (HOFFM.) LUMBSCH sehr nahe mit *C. ellipsoidea* verwandt sind (siehe Kapitel „Untersuchungen zur phylogenetischen Stellung der Algenpartner *Chlorella saccharophila* und *Coccomyxa* sp. mittels 18S nrDNA-Analysen“, Seite 101; bei der Analyse wurde die Sequenz des Algenpartners von *T. granulosa* nicht verwendet, da sie mit 744 Basen sehr kurz ist und 16 zweideutige Positionen besitzt). In der Tabelle 17 sind die bisher bekannten Nachweise von *Chlorella ellipsoidea* aufgeführt.

Tab. 17: Für folgende Flechten aus Europa wurde *Chlorella ellipsoidea* als Phycobiont beschrieben. Die im Rahmen dieser Arbeit erbrachten Nachweise sind fett gedruckt; in Klammern ist die Anzahl der untersuchten Thalli angegeben.

Ordnung	Unterordnung	Familie	Spezies	Literatur	Phycobiont beschrieben als
Lecanorales	Agyriineae	Agyriaceae	<i>Trapelia coarctata</i>	TSCHERMAK-WOESS, 1948 & 1978c	<i>C. ellipsoidea</i> <i>C. saccharophila</i> var. <i>ellipsoidea</i>
			<i>Trapelia obtegens</i> (3)		
			<i>Trapeliopsis flexuosa</i> (1)	SCHMITT & LUMBSCH, 2001	<i>Chlorella</i> spec.
	<i>Trapeliopsis granulosa</i> (1)	SCHMITT & LUMBSCH, 2001	<i>Chlorella</i> spec.		
	Lecanorineae (inkl. Cladoniineae)	Lecanoraceae	<i>Bacidina arnoldiana</i> (1)	TSCHERMAK-WOESS, 1988b	<i>C. saccharophila</i> var. <i>ellipsoidea</i>

3.3.1.5 Phycobionten der Gattung *Apatococcus* F.BRAND (1925) em. GEITLER (1942)

Wie *Chlorella* ist auch *Apatococcus* eine sehr weit verbreitete aerophytische Gattung. So ist sie die häufigste Alge in den grünen Algenanflügen an Baumstämmen (GEITLER, 1942). Die bisherigen Nachweise als Phycobiont gelten als nicht gesichert (ETTL & GÄRTNER, 1995). In dieser Arbeit gelang der Nachweis, dass diese Art als Flechtenalge in *Scoliosporum umbrinum* auftritt.

***Apatococcus* F.BRAND, Arch. Protistenk. 52: 348 (1925)**

Lit.: GEITLER L., Flora 136: 9–18, fig. 6 & 7 (1942); VISCHER W., Schweiz. Z. Hydrol. 22: 337–338, fig. 5 (1960); PRINTZ H., Hydrobiologia 24: 280–281 (1964); ETTL H. & GÄRTNER G., Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen: 527 (1995).

Zellen kugelig oder abgeplattet, in Zellpaketen angeordnet, die durch aufeinanderfolgende, senkrecht gerichtete Teilungen entstehen. Gelegentlich mit Ansätzen zu kurzer Fadenbildung. Zellwand mit glatter bis rauer Oberfläche, nur im Alter etwas verdickt. Chloroplast in jungen Zellen immer parietal, in älteren Zellen teilweise von der Zellwand abgehoben und an der Oberfläche gefaltet bis 2-lappig; ohne Pyrenoid. Asexuelle Fortpflanzung durch Zoo- oder Aplanosporen.

***Apatococcus lobatus* (CHODAT) J.B.PETERSEN, The Botany of Iceland 2: 424 (1928)**

Lit.: CHODAT R., Beitr. Kryptogamenfl. Schweiz Vol. 1,3: 284–285, fig. 199 (1902, sub *Pleurococcus lobatus* CHODAT); GEITLER L., Flora 136: 9–18, fig. 6 & 7 (1942); VISCHER W., Schweiz. Z. Hydrol. 22: 337–338, fig. 5 (1960); PRINTZ H., Hydrobiologia 24: 281–282, fig. 87: 5–18 (1964); GÄRTNER G. & INGOLIC E., Pl. Syst. Evol. 164: 135–141, fig. 1–5 (1989); ETTL H. & GÄRTNER G., Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen: 527, fig. 169a (1995).

Syn.: *Pleurococcus lobatus* CHODAT (1902); *Pleurastrum lobatum* PRINTZ (1921); *Apatococcus vulgaris* F.BRAND (1925).

Zellen in kubischen Zellpaketen wachsend, rund bis oval 9–30 × 9–15 µm. Chloroplast parietal, 2-lappig, meist netzartig, ohne Pyrenoid.

A. lobatus ist in Abbildung 71 dargestellt (Anhang B). Der netzartig durchbrochene Chloroplast weicht von der typischen, muldenförmigen Gestalt ab, gehört aber nach Zeichnungen von VISCHER (1960) zur natürlichen Variationsbreite der Art. Dennoch scheinen auch in diesem Fall molekularbiologische Untersuchungen zur Klärung der genauen Verwandtschaftsverhältnisse (insbesondere der Stellung bezüglich *Dictyochloropsis*) sehr wünschenswert. Schon im Flechtenthallus waren die kubischen Zellpakete auffällig, so dass mit Sicherheit davon ausgegangen werden kann, dass der Phycobiont und nicht aerophytische Algen isoliert worden sind.

WATANABE et al. (1997) berichten von *A. lobatus* als Algenpartner der Flechten *Lecanora subimmergens*, *Fuscidea cyathoides* var. *japonica*, *Pyrenopsis* sp., *Caloplaca* sp. 2 und *Verrucaria* sp. Allerdings erscheinen zumindest einige dieser Nachweise zweifelhaft, und die verwendete Methode der Isolation stellte nicht sicher, dass aerophytische Algen, die dem Flechtenthallus fest anhaften, von der Isolation ausgeschlossen waren. In keiner der Flechten war *A. lobatus* der alleinige Algenpartner, es wurden immer auch andere Algen isoliert. Sehr verwunderlich ist vor allem das Auftreten von *A. lobatus* als Photobiont in den Gattungen *Lecanora* und *Caloplaca*, von denen bisher nur Photobionten der Gattung *Trebouxia* isoliert worden sind. Arten der Gattung *Trebouxia* wurden von WATANABE et al. (1997) neben *A. lobatus* auch gefunden. Außerdem geben die Autoren an, dass alle Algenzellen im Flechtenthallus rund oder elliptisch („subspherical“) gewesen seien, Zellpakete werden nicht beschrieben. Daher sollten diese Flechten noch einmal auf ihren

Algenpartner hin untersucht werden, um das Auftreten von *A. lobatus* als zumindest einer ihrer Photobionten zu bestätigen. In der Tabelle 18 sind die bisher bekannten Nachweise von *Apatococcus lobatus* aufgeführt.

Tab. 18: Für folgende Flechten aus Europa wurde *Apatococcus lobatus* als Phycobiont beschrieben. Die im Rahmen dieser Arbeit erbrachten Nachweise sind fett gedruckt; in Klammern ist die Anzahl der untersuchten Thalli angegeben.

Ordnung	Unterordnung	Familie	Spezies	Literatur	Phycobiont beschrieben als
Lecanorales	Lecanorineae (inkl. Cladoniineae)	Scoliciosporaceae	<i>Scoliciosporum umbrinum</i> (2)		

3.3.1.6 Phycobionten der Gattung *Coccomyxa* SCHMIDLE (1901)

Ein Vertreter dieser auch aerophytisch weit verbreiteten Gattung wurde aus der Flechte *Dibaeis baeomyces* isoliert.

***Coccomyxa* SCHMIDLE, Ber. Deutsch. Bot. Ges. 19: 20–23, fig. 6–25 (1901)**

Lit.: JAAG O., Beitr. Kryptogamenfl. Schweiz 8: 18 (1933); KOMÁREK J. & FOTT B. in HUBER-PESTALOZZI G. (ed.), Das Phytoplankton des Süßwassers. 7. Teil, 1. Hälfte: 414–415 (1983); ETTL H. & GÄRTNER G., Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen: 445 (1995).

Kolonien formlose, am Rand meist scharf begrenzte, große Gallertlager bildend, deren Gallerte strukturlos oder um die Zellen herum konzentrisch geschichtet ist. Zellen spindelförmig, ellipsoidisch, eiförmig bis fast kugelig, manchmal dorsiventral gebaut. Fortpflanzung nur durch 2–4(–8) Autosporen, die in \pm einer Reihe gelagert sind; die Sporangienwand verquillt und geht schnell in der gemeinsamen Gallerte verloren. Tochterzellen verbleiben in der Gallerthülle, sind jedoch voneinander getrennt.

Coccomyxa spec.

Kolonien dunkelgrün, schleimig, am Rand deutlich begrenzt. Zellen gerade oder leicht gebogen, schmal bis breit elliptisch, (3–)6–11 \times (2–)4–7 μm , unregelmäßig in der dünnen, strukturlosen Gallerte eingelagert. Der wandständige Chloroplast besitzt kein lichtmikroskopisch sichtbares Pyrenoid.

Coccomyxa spec. ist in Abbildung 72 dargestellt (Anhang B). Folgt man dem Schlüssel von ETTL und GÄRTNER (1995), so entsprechen die isolierten Klone am ehesten *C. gloeobotrydiformis* REISIGL, aber mit deutlich längeren Zellen. Allerdings sind in diesem Schlüssel die von JAAG (1933) beschriebenen Phycobionten nicht mit aufgenommen worden, da die Merkmalsangaben als entweder unzureichend oder als taxonomisch zu klären eingestuft wurden. Daher soll hier keine Zuordnung der isolierten Klone zu einer Art vorgenommen werden sondern eine eingehendere Bearbeitung der Gattung abgewartet werden. Eine molekulare Untersuchung der Gattung wird gegenwärtig durchgeführt (FRIEDL, BECK & ZUFALL, in Vorbereitung). Die nicht selten vorkommenden breit elliptischen Zellen der isolierten Klone erinnern entfernt an *Elliptochloris bilobata* TSCHERMAK-WOESS, allerdings sind aus dieser Gattung keine Gallerthüllen bekannt und ihre Vertreter bilden 2 unterschiedliche Typen von Autosporen. Zur Absicherung wurde daher die phylogenetische Stellung der isolierten Klone in Bezug auf die Gattungen *Coccomyxa* und *Elliptochloris* anhand ihrer 18S nrDNA-Sequenzen untersucht und ihre Zugehörigkeit zu *Coccomyxa* bestätigt (siehe Abschnitt „Untersuchungen zur phylogenetischen Stellung der Algenpartner *Chlorella saccharophila* und *Coccomyxa sp.* mittels 18S nrDNA-Analysen“). In der Tabelle 19 sind die bisher bekannten Nachweise von *Coccomyxa spec.* aufgeführt.

Tab. 19: Für folgende Flechten aus Europa und Nordamerika wurde *Coccomyxa* spec. als Phycobiont beschrieben. Die im Rahmen dieser Arbeit erbrachten Nachweise sind fett gedruckt; in Klammern ist die Anzahl der untersuchten Thalli angegeben.

Ordnung	Unterordnung	Familie	Spezies	Literatur	Phycobiont beschrieben als
Lecanorales	Peltigerineae	Nephromataceae	<i>Nephroma arcticum</i> <i>Nephroma expallidum</i>	WETMORE, 1960 WETMORE, 1960	<i>Coccomyxa</i> spec. <i>Coccomyxa</i> spec.
		Peltigeraceae	<i>Peltigera aphthosa</i> (>5) <i>Peltigera leucophlebia</i> <i>Peltigera venosa</i> <i>Solorina bispora</i> <i>Solorina crocea</i> (2+2) <i>Solorina octospora</i> <i>Solorina saccata</i> (>2+2)	WARÉN, 1920 JAAG, 1933 ZEHNDER, 1949 JAAG, 1933 JAAG, 1933 JAAG, 1933 CHODAT, 1913 JAAG, 1933 BRUNNER, 1985 JAAG, 1933 CHODAT, 1913 JAAG, 1933 BRUNNER, 1985 ZEHNDER, 1949	<i>C. peltigerae</i> <i>C. mucigena</i> <i>C. peltigerae-variolosae</i> <i>C. peltigerae-variolosae</i> <i>C. peltigerae</i> <i>C. peltigerae-venosae</i> <i>C. solorinae-bisporae</i> <i>C. solorinae-croceae</i> <i>C. tirolensis</i> <i>C. solorinae-bisporae</i> <i>C. solorinae-saccatae</i> <i>C. ovalis</i> <i>C. glaronensis</i> <i>C. ellipsoidea</i>
inc. sed.	inc. sed.	Icmadophilaceae	<i>Icmadophila ericetorum</i> (4) <i>Dibaeis baeomyces</i> <i>Dibaeis baeomyces</i> (1)	JAAG, 1933 ZEHNDER, 1949 JAAG, 1933 BRUNNER, 1985	<i>C. icmadophilae</i> <i>C. icmadophilae</i>
inc. sed.	inc. sed.	Baeomycetaceae	<i>Baeomyces phycophyllus</i>	PEVELING & GALUN, 1976	<i>Coccomyxa</i> spec.
Homo-basidio-mycetales	Agaricineae	Clavariaceae	<i>Multiclavula corynoides</i> (4) <i>Multiclavula mucida</i>	POELT, 1959 GEITLER, 1955 GEITLER, 1956	" <i>Coccomyxa</i> -ähnlich" <i>Coccomyxa</i> spec. (?)
		Tricholomataceae	<i>Omphalina hudsoniana</i> <i>Omphalina</i> spec.	PLESSL, 1963 OBERWINKLER, 1984 JAAG, 1933	<i>C. icmadophilae</i> <i>C. subellipsoidea</i> <i>C. pringsheimii</i>

3.3.2 Zusammenfassende Darstellung der vorkommenden Phycobionten

12 Arten aus fünf Gattungen der Trebouxiophyceae T.FRIEDL (1995) wurden als Algenpartner der 62 untersuchten Flechtenarten nachgewiesen. Hierfür wurden 1625 Algenklone aus 176 Flechtenproben lichtmikroskopisch untersucht. Für zwei Flechtenarten wurden die bereits bekannten Photobionten bestätigt: *Cladonia furcata*: *Asterochloris irregularis* (MEISCH, 1981) und *Dibaeis baomyces*: *Coccomyxa* spec. (JAAG, 1933, BRUNNER, 1985). Für vier Flechtenarten wurden andere Photobionten gefunden: *Lecidea fuscoatra*: *Asterochloris irregularis* statt *Trebouxia arboricola* (= *T. aggregata* P.A.ARCHIBALD; HIDRETH & AHMADJIAN, 1981), *L. lapicida*: *Trebouxia simplex* agg. statt *Chlorosarcinopsis minor* (GERNECK) HERNDON (= *Chlorosarcina minor* GERNECK; PLESSL, 1963), *L. plana*: *Asterochloris irregularis* statt *Chlorosarcinopsis minor* (PLESSL, 1963), *Porpidia tuberculosa* (= *Huilia tuberculosa*): *Trebouxia simplex* agg. statt *Asterochloris excentrica* (P.A.ARCHIBALD) T.FRIEDL ined. (= *Trebouxia excentrica* P.A.ARCHIBALD; HIDRETH & AHMADJIAN, 1981). 56 Flechtenarten wurden das erste Mal untersucht. Die Photobionten sind: *Apatococcus lobatus*, *Asterochloris irregularis*, *A. magna*, *Chlorella ellipsoidea*, *C. saccharophila*, *Coccomyxa* spec., *Trebouxia angustilobata*, *T. australis*, *T. brindabellae*, *T. incrustata*, *T. simplex* und *T. suecica*. Die Zuordnung der Photobionten zu den Flechten kann den Tabellen im Text entnommen werden. Drei Arten der Gattung *Trebouxia* (*T. australis*, *T. brindabellae* und *T. suecica*) wurden aufgrund ihrer eigenständigen Morphologie und ITS nrDNA-Sequenz neu beschrieben, eine Unterart von *T. jamesii* wird nun als eigene Art betrachtet (*T. angustilobata*). Erstmals als Algenpartner nachgewiesen wurden die häufigen Bodenalgen *Apatococcus lobatus* (bisher nur unsichere Nachweise) und *Chlorella saccharophila*.

3.4 Molekulargenetische Untersuchungen an ausgewählten Flechtenalgen

Molekulare Untersuchungen von Phycobionten stützen sich bisher fast ausschließlich auf Bereiche des kernkodierten ribosomalen DNA-Operons. Diese Einheit besteht aus dem Gen für die 18S nrDNA, der ITS1 nrDNA, der 5,8S nrDNA, der ITS2 nrDNA, der 26S nrDNA, der NTS nrDNA und der ETS nrDNA, wobei ITS („internal transcribed spacer“) einen internen, transkribierten Bereich bezeichnet, ETS („external transcribed spacer“) einen externen, transkribierten Bereich angibt und NTS („non-transcribed spacer“) den nicht-transkribierten Bereich zwischen benachbarten Operons darstellt (Abb. 15). NTS und ETS werden auch als IGS („intergenic spacer“) zusammengefasst (JORGENSEN & CLUSTER, 1988). Dieses Operon liegt in hoher Kopienzahl (bis zu Tausenden je Zelle) direkt hintereinander auf einem oder mehreren Chromosomen (sog. „tandem repeats“; LONG & DAWID, 1980). Die einzelnen Kopien dieses Operons sind aufgrund der zwischen ihnen auftretenden Rekombination in der Regel einheitlich („concerted evolution“; ARNHEIM et al., 1980)

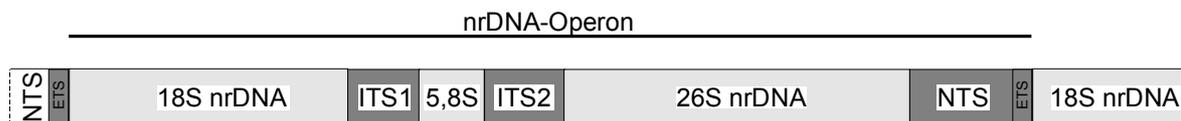


Abb. 15: Aufbau eines nrDNA-Operons (die einzelnen Abschnitte sind nicht maßstabsgetreu wiedergegeben; nach LONG & DAWID, 1980, verändert).

Für die großsystematische Einordnung von Flechtenalgen in das System der Chlorophyta wurde die stark konservierte 18S und 26S nrDNA verwendet (FRIEDL, 1995 bzw. FRIEDL & ROKITTA, 1997). Variabler – und daher für Untersuchungen innerhalb einer Gattung geeigneter – ist die ITS nrDNA. ITS nrDNA-Untersuchungen bei *Trebouxia* wurden erstmals von BHATTACHARYA et al. (1996) durchgeführt und werden seitdem zur Unterstützung von morphologischen Untersuchungen (BECK et al., 1998, BECK, 1999, FRIEDL et al., 2000) oder als alleinige Quelle zur Identifikation von *Trebouxia* (KROKEN & TAYLOR, 2000, HELMS et al., 2001) und *Asterochloris* (PIERCEY-NORMORE & DEPRIEST, 2001) verwendet. Allerdings wurde bisher noch nicht zweifelsfrei gezeigt, dass alle nrDNA-Operons und damit alle ITS nrDNA-Kopien in einer Zelle von *Trebouxia* und *Asterochloris* identisch sind und daher wie ein einziges Gen behandelt werden können. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung zur alleinigen Verwendung von ITS nrDNA-Sequenzen zur Bestimmung von Organismen, da sonst aufgrund paraloger Gene die Analysen verfälscht werden können (vgl. O'DONNELL & CIGELNIK, 1997, HARTMANN et al., 2001).

Außerhalb des nrDNA-Operons wurde bei Flechtenalgen bisher nur das Actin-Gen für phylogenetische Analysen verwendet (KROKEN & TAYLOR, 2000). Die Untersuchungen zeigten, dass bei *Trebouxia* zwei Actingene vorhanden sind, die bei stammesgeschichtlichen Untersuchungen getrennt betrachtet werden müssen. Alle (bis auf zwei) phylogenetisch informativen Positionen des analysierten Actingen-Abschnitts sind in Intron-Bereichen lokalisiert. Letztere sind wesentlich variabler als die für Proteine kodierenden Bereiche, da sie für die Funktion des Proteins unwichtig sind (sie müssen jedoch korrekt erkannt und entfernt werden). Ein weiteres Intron, das eingehender untersucht wurde, liegt in der 18S nrDNA von vielen *Trebouxia*-Klonen (BHATTACHARYA

et al., 1996, FRIEDL et al., 2000). Es handelt sich um ein group I-Intron, das an der Position der 18S nrDNA inseriert ist, die der Position 1512 bei *Escherichia coli* entspricht und deshalb kurz 1512-Intron genannt wird. Die Autoren konnten zeigen, dass die Phylogenie dieses Introns nicht in allen Abschnitten mit der ITS nrDNA-Phylogenie übereinstimmt. Dies lässt darauf schließen, dass diese Introns, die sich selbst aus der preRNA entfernen können (,self-splicing', ZAUG et al., 1983, CECH, 1988), nicht nur von der Mutterzelle auf die Tochterzelle weitergegeben, sondern auch lateral zwischen zwei Zellen transferiert werden können. Letzteres scheint innerhalb *Trebouxia* relativ häufig stattgefunden zu haben, weshalb davon ausgegangen wird, dass Lichenisierung durch den engen Kontakt der Photobiotenzellen den lateralen Transfer von Introns erleichtert (FRIEDL et al., 2000). Bemerkenswert ist hierbei, dass bisher kein Intron-Transfer zum Mykobionten nachgewiesen wurde, der Transfer bleibt also – nach bisherigen Erkenntnissen – auf relativ nahe verwandte Organismen beschränkt.

Es wird davon ausgegangen, dass die Arten der Trebouxiophyceae Haplonten sind (GRAHAM & WILCOX, 2000), die Stadien sexueller Reproduktion sind jedoch bisher nicht mit Sicherheit beobachtet worden (MATTOX & STEWART, 1984, FRIEDL, 1989b). Da die in dieser Arbeit untersuchten Kulturen auf eine einzelne Zelle zurückgehen, liegt für jeden Genort nur ein Allel dieses Gens vor. Die Gesamtheit der Erbanlagen (also die spezifische Allelzusammensetzung) wird als Genotyp bezeichnet (WAGENITZ, 1996), häufig wird dieser Begriff jedoch nur auf ein bestimmtes Gen bezogen (SUZUKI et al., 1991). In letzterem Sinne wird der Begriff auch in dieser Arbeit verwendet, da nur einige wenige Gene untersucht wurden und daher über die restlichen Gene keine Aussage getroffen werden kann. Die molekular unterscheidbaren Gruppen innerhalb des morphologisch einheitlichen *Trebouxia simplex*-Aggregats und bei *T. incrustata* werden verschiedenen hier als ,Genotaxa' bezeichneten phylogenetischen Einheiten zugeordnet (Abkürzung: ,gt'), da ihre Allele des ITS nrDNA-Lokus verschiedenen Gruppen zugeordnet werden können. Innerhalb solcher Genotaxa kommen verschiedene Genotypen mit unterschiedlichen Allelen vor, was eine eingehende Analyse des häufigsten Genotaxons, *T. simplex* [gt A], verdeutlicht (siehe Tab. 24 im Abschnitt „Vergleich der 1512-Intron und ITS-Allel-Varianten innerhalb *T. simplex* [gt A]“).

Im Gegensatz zu den Phycobionten besitzen die Mykobionten, bei denen Apothecien untersucht worden sind, zumindest in bestimmten Bereichen einen doppelten Chromosomensatz und sind dikaryotisch. Es wäre also möglich, dass aufgrund des doppelten Chromosomensatzes zwei verschiedene Allele eines Gens vorhanden sind. Dennoch wurde stets eine eindeutige Sequenz für die 18S nrDNA erhalten, was dadurch erklärt werden kann, dass die 18S nrDNA ein stark konserviertes Molekül ist, dessen Sequenz innerhalb der gesamten Population (oder Art) konstant ist. Ein anderer Grund für die Anwesenheit nur eines Allels könnte in einer Homothallie liegen, da in diesem Fall die sexuelle Fortpflanzung zwischen Teilen eines aus einer Spore entstandenen Thallus möglich ist.

Um die Phycobionten von Flechten schwermetallhaltiger Substrate näher zu charakterisieren werden im folgenden die Analyseergebnisse aus der Sequenzierung der 18S nrDNA von sieben Flechtenalgen (*Asterochloris*, *Chlorella*, *Coccomyxa* und *Elliptochloris*), der ITS nrDNA von 113 Klonen der Gattung *Trebouxia* (aus jeder Flechtenart mindestens ein Vertreter) und des 1512-Introns von 44 dieser *Trebouxia* Klone vorgestellt. Außerdem wurde zur Einordnung der mit diesen assoziierten Flechtenpilze die

18S nrDNA-Sequenz von zehn Vertretern bestimmt und mit bereits bekannten Sequenzen näher verwandter Arten verglichen.

3.4.1 Untersuchungen zur phylogenetischen Stellung der Algenpartner *Chlorella saccharophila* und *Coccomyxa* sp. mittels 18S nrDNA-Analysen

Für die Analyse wurden neben den neu ermittelten Sequenzen (im Stammbaum fett gedruckt) auch Vergleichssequenzen aus der Genbank verwendet. Diese sind im Material- und Methodenteil angegeben. Bei der Auswahl der Sequenzen wurde darauf geachtet, dass Vertreter aus allen Gruppen der Trebouxiophyceae (diese enthalten viele Luft- und Flechtenalgen), sowie den anderen Klassen der Chlorophyta (Chlorophyceae, Ulvophyceae) und der Landpflanzenlinie (Streptophyta), mit einbezogen wurden.

Die phylogenetische Stellung der Flechtenalgen *Chlorella saccharophila* aus *Lecidea inops* und *Stereocaulon nanodes* sowie *Coccomyxa* sp. aus *Dibaeis baeomyces* wurde näher untersucht, da erstere erstmals als Flechtenalge nachgewiesen wurde und letztere in ihrer Morphologie Ähnlichkeiten mit einer anderen Gattung, *Elliptochloris* zeigte (siehe Kapitel „Phycobionten der Gattung *Coccomyxa* SCHMIDLE (1901)“; Seite 96). Um Vergleichssequenzen für die letztere Sequenz zu erhalten, wurden außerdem die Sequenzen der 18S nrDNA von *Coccomyxa solorina bisporae* (SAG 216-10), *Elliptochloris bilobata* (SAG 245.80) und *Elliptochloris bilobata* (AB97.048A2) ermittelt.

Der Stammbaum in Abbildung 16 ist das Ergebnis einer gewichteten Maximum-Parsimony-Analyse (CI = 0,7410, RI = 0,8013). Dargestellt ist der Stammbaum mit der kürzesten Astlänge, die angegebenen Zahlen sind die Jackknife-Werte, die in einer unabhängigen Analyse desselben Datensatzes ermittelt wurden. Die bisher veröffentlichten Verwandtschaftsbeziehungen (z.B. FRIEDL, 1998, HUSS et al., 1999) innerhalb der Chlorobionta (Grünalgen und Landpflanzen) sind auch in dem hier gezeigten Stammbaum wiederzufinden und sollen daher nicht im einzelnen besprochen werden. Die Stellung vieler Gruppen zueinander ist aufgrund der fehlenden statistischen Unterstützung im basalen Bereich vor allem der Trebouxiophyceae nach wie vor unklar (erkennbar an den niedrigen Jackknife-Werten). Dennoch konnten die untersuchten Klone eindeutig bestimmten Gruppen zugeordnet werden.

Sehr gut unterstützt ist die enge verwandtschaftliche Beziehung der Flechtenalgenklone AB98.017B3 (aus *Stereocaulon nanodes*) und AB99.001B5 (aus *Lecidea inops*) mit *C. saccharophila* (100% Jackknife Unterstützung). Allerdings sind diese Klone untereinander näher verwandt als mit dem Klon *C. saccharophila* SAG 211-9a, der aus dem Wundsaft von *Populus alba* isoliert wurde. Bemerkenswert ist, dass sich in der Gruppe um *C. saccharophila* eine weitere Flechtenalgen-gattung befindet, nämlich *Dictyochloropsis*. Bisher wurde angenommen, dass *Dictyochloropsis* der einzige Vertreter dieser Gruppe ist, der als Flechtenalge vorkommen kann (FRIEDL, 1995). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu klären, ob noch mehr – bisher unbekannte – Flechtenalgen in dieser Gruppe vorhanden sind.

Die Zugehörigkeit des Algenpartners von *Dibaeis baeomyces* zu *Coccomyxa* ist statistisch sehr gut abgesichert (98% Jackknife Unterstützung). Die morphologischen Ähnlichkeiten

zu *Elliptochloris* können durch die nahe phylogenetische Stellung dieser beiden Gattungen erklärt werden, die bisher zu verschiedenen Familien gezählt wurden (ETTL & GÄRTNER, 1995). Offensichtlich ist das Vorhandensein einer Gallerthülle – zumindest in dieser Gruppe – kein geeignetes Kriterium zur Abgrenzung von Familien. Trotz der verwandtschaftlichen Nähe beider Gattungen sind sie dennoch eindeutig voneinander getrennt, sodass die Gallerthülle bei *Coccomyxa* und das Auftreten der verschiedenen Sporentypen bei *Elliptochloris* ein geeignetes Kriterium zur Abgrenzung dieser beiden Gattungen darstellt.

Ein weiteres Ergebnis der phylogenetischen Untersuchungen, das für die nachfolgenden Analysen wichtig ist, sind die stammesgeschichtlichen Beziehungen der Arten der Gattung *Trebouxia*. *T. impressa* ist mit sehr guter statistischer Absicherung Schwestergruppe zu den restlichen Arten der Gattung. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den von FRIEDL und ROKITTA (1997) durchgeführten Analysen der 26S nrDNA, weshalb bei den im Anschluss dargestellten Untersuchungen zur ITS nrDNA-Phylogenie der Gattung *Trebouxia* *T. impressa* als Außengruppe verwendet wird.

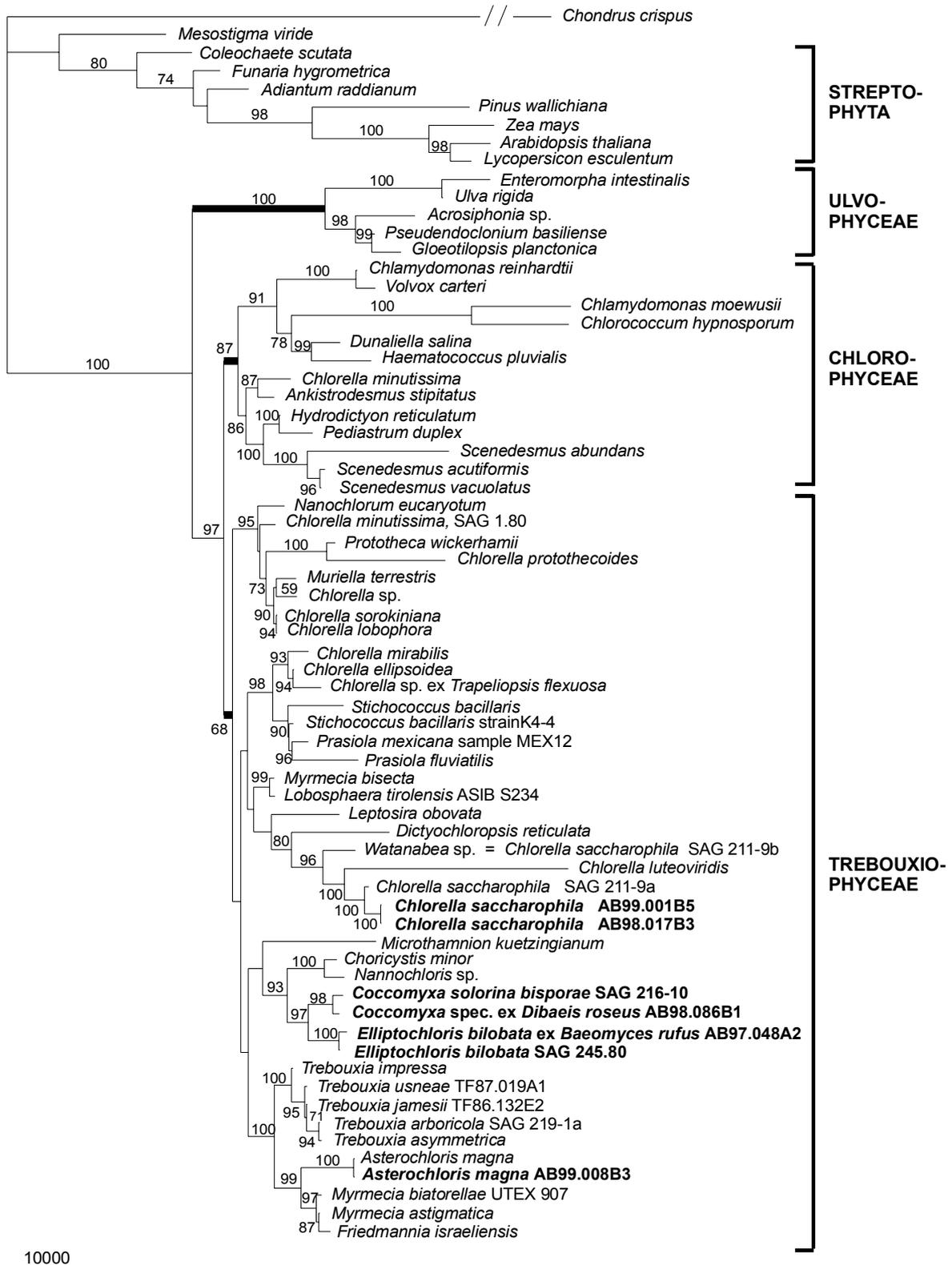


Abb. 16: Phylogenetische Beziehungen zwischen Grünalgen (Chlorophyta) untereinander und den höheren Pflanzen, erhalten durch die phylogenetische Analyse von 18S nrDNA-Sequenzen. Abgebildet ist der Stammbaum mit der kürzesten Astlänge, der in einer gewichteten Maximum-Parsimony-Suche errechnet wurde. Die Zahlen an den horizontalen Ästen sind Jackknife-Werte, die in dieser Arbeit neu gewonnenen Sequenzen sind fett gedruckt dargestellt. Nähere Erläuterungen sind im Text gegeben.

3.4.2 Analyse der nrDNA-Bereiche von Phycobionten der Gattung *Trebouxia*

3.4.2.1 Phylogenetische Analyse der ITS nrDNA-Sequenzen

Um zu überprüfen, ob der isolierte Algenklon auch wirklich der Algenpartner der Flechte ist, wurde für den Algenpartner von *Lecidea silacea* (leg. BECK 148) und *Acarospora bullata* (leg. BECK 262a) sowohl die ITS-Sequenz des isolierten Algenklons, als auch die ITS-Sequenz der Flechtenalgen im Thallus ermittelt. Die mithilfe algenspezifischer Primer direkt aus dem Thallus ermittelten Sequenzen waren identisch mit denen der isolierten Algenklone (B298 = AB99.063B5 und B322 = AB00.010B1). Zudem wurden alle 15 Algenklone aus ein und demselben Beleg von *Tremolecia atrata* (leg. BECK 177b; AB98.145) sequenziert und festgestellt, dass sie identisch in ihrer ITS-Sequenz sind. Diese Befunde legen nahe, dass die Photobionten isoliert wurden und sind in Übereinstimmung mit den von KROKEN und TAYLOR (2000), BECK und KOOP (2001) und BECK et al. (2002) berichteten einheitlichen Flechtenalgenpopulation in *Letharia* spp., *Pleurosticta acetabulum* (NECKER) ELIX & LUMBSCH und *Fulgensia fulgida* (NYL.) SZATALA. Daher wird im folgenden davon ausgegangen, dass bei den hier untersuchten Flechten genetisch homogene Photobionten-Populationen vorlagen.

Die Grenzen von ITS1 und ITS2 in der Gattung *Trebouxia* werden in der Literatur und der Genbank nicht einheitlich angegeben. Daher wurden für die folgenden Analysen die Sequenzgrenzen anhand der Angaben bezüglich der nrDNA-Sequenzen von *Chlorella ellipsoidea* übernommen (Gutell Lab Web Pages: <http://www.rna.icmb.utexas.edu/RNA>). Problematisch ist allerdings die genaue Abtrennung an den jeweiligen Grenzen zur 5,8S nrDNA, denn die Enden dieser nrDNA sind nicht so stark konserviert und daher ist eine genaue Übernahme der Grenzen nicht möglich. Da aber nur 1–2 Basen unklar in ihrer Zuordnung zu den verschiedenen Sequenzabschnitten sind und diese stark konserviert sind, beeinflusst eine eventuell erfolgte falsche Zuordnung das Ergebnis nicht.

Da in den Flechten des *Acarosporium sinopicae* nur Photobionten aus den Gruppen um *Trebouxia simplex* und *Trebouxia arboricola* gefunden wurden, wurde für die phylogenetische Analyse der ITS nrDNA-Sequenzen nur aus diesen beiden Gruppen alle zur Verfügung stehenden und sich unterscheidenden Sequenzen verwendet (siehe Angaben im Teil „Material und Methoden“). Die anderen Gruppen wurden durch je einen Vertreter von *Trebouxia impressa* (AB96.027D1), *T. gelatinosa* (TF86.108B2), *T. galapagensis* (UTEX 2230) und *T. corticola* (UTEX 909) repräsentiert. Dies war möglich, da eine Kurzanalyse (heuristische Maximum-Parsimony-Analyse) gezeigt hatte, dass die Topologie des so erhaltenen Stammbaumes identisch mit der Topologie des Stammbaumes aus allen Sequenzen ist.

Tab. 20: Übersicht der ähnlichen und identischen ITS-Sequenzen und deren Zuordnung zu den Taxa. Aufgenommen wurden neben den neu erhaltenen auch sehr ähnliche, bereits publizierte Sequenzen. Der für die phylogenetische Analysen verwendete Klon ist fett gedruckt.

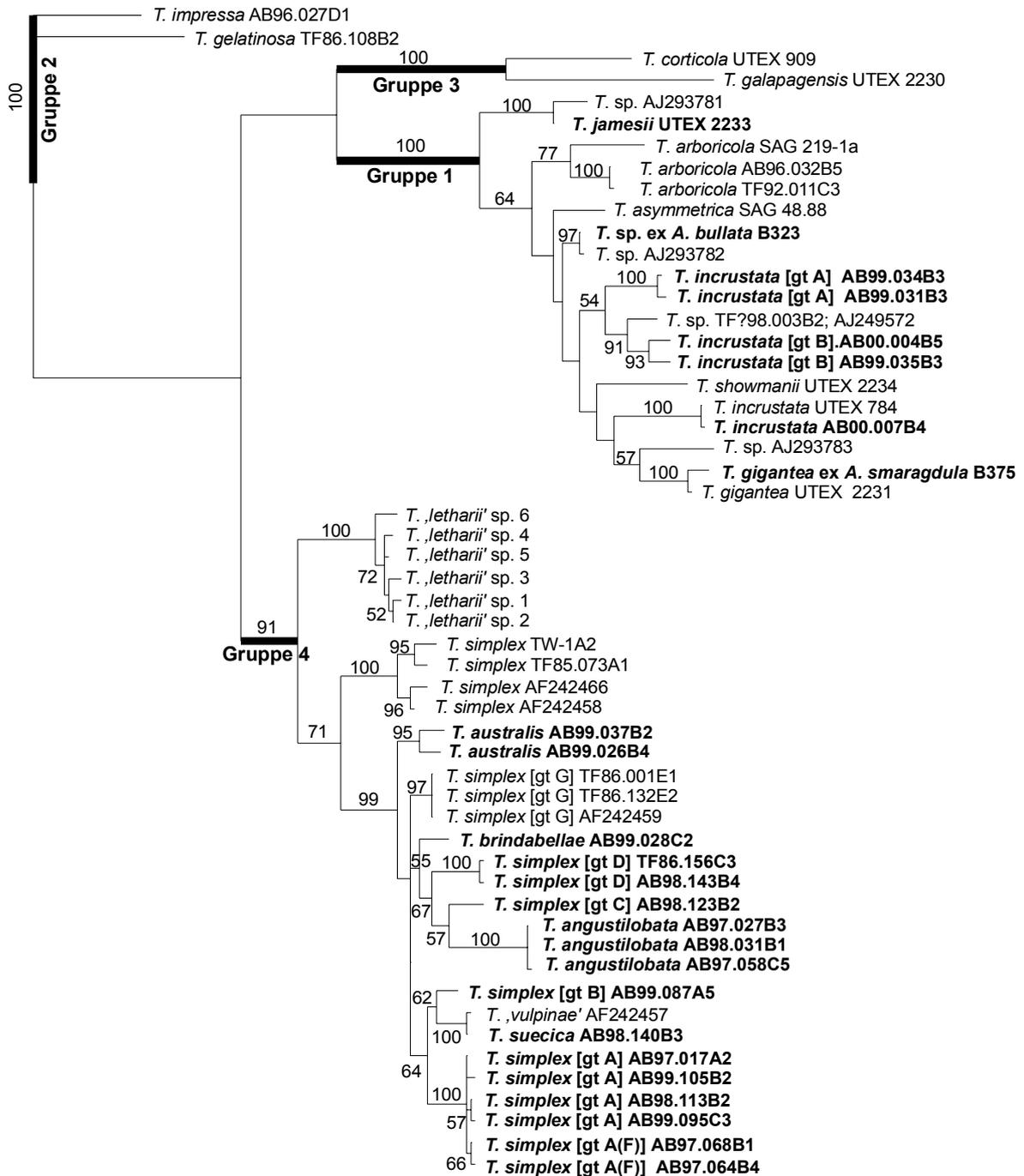
Taxon-Name	Photobionten-Klone
<i>T. angustilobata</i>	AB97.026C4, AB97.027B3 AB97.058C5 AB98.031B1, AB98.034B3
<i>T. australis</i>	AB99.026B4 , AB99.027C2, AB99.030B4, AB99.032B2, AB99.033B3, AB99.038B3 AB99.037B2
<i>T. brindabellae</i>	AB99.028C2
<i>T. gigantea</i>	AF242468 = UTEX 2231 B375exAcSm
<i>T. incrustata</i>	AB00.005B3, AB00.007B4 , AB00.010B1, B322exAcBu AJ293795 = UTEX 784
<i>T. incrustata</i> [gt A]	AB99.029B3, AB99.034B3 , AB99.036B5 AB99.031B3
<i>T. incrustata</i> [gt B]	AB99.035B3 AB00.004B5 TF?98.003B2
<i>T. jamesii</i>	UTEX 2233
<i>T. simplex</i> [gt A]	AB97.017A2 , AB97.019C3, AB97.021C5, AB97.022B3, AB97.023B2, AB97.024C2, AB97.025B5, AB97.057B3, AB97.060B5, AB97.061B5, AB97.062B1, AB97.063B2, AB97.065C5, AB97.066B4, AB97.067B3, AB97.069B5, AB97.071A3, AB98.001B4, AB98.002B4, AB98.003B4, AB98.056B3, AB98.057A1, AB98.063B2, AB98.065B2, AB98.111A3, AB98.112B2, AB98.117B5, AB98.120A1, AB98.121B1, AB99.010B3, AB99.063B5, AB99.064C2, AB99.065A3, B291exLePa, B298exLeSi, B361exBeAl, B362exRhNo, AB99.085B1, AB99.085B3, AB99.088B2, AB99.089A3, AB99.104B3, AB99.106B1 AB98.113B2 , AB98.115A5, AB98.116A5; AB99.086C2 AB97.020B4, AB97.059B1, AB97.064B4 , AB98.114B1 AB97.068B1 AB99.095C3 AB99.105B2
<i>T. simplex</i> [gt B]	AB99.087A5
<i>T. simplex</i> [gt C]	AB98.123B2
<i>T. simplex</i> [gt D]	AB98.142B4, AB98.143B4 , AB98.150C3, AB99.071B1 TF86.156C3
<i>T. simplex</i> [gt G]	TF86.001E1 TF86.132E1 AF242459
<i>T. suecica</i>	AB98.140B3 , AB98.144B2, AB98.145 alle 15 Klone, AB98.146B2, AB98.148B5, AB98.149B5, AB98.155A4, AB98.156B5, AB98.157B4, AB98.158B4, AB98.160A3, AB98.161B4, AB98.162B1, AB98.163B3
<i>T. ,vulpinae'</i>	AF242457

Tabelle 20 zeigt die Zuordnung der in dieser Arbeit sequenzierten Klone zu den Namen der Taxa, die in den folgenden phylogenetischen Analysen verwendet werden. Diese Zuordnung beruht auf morphologischen Analysen und ITS-Sequenz-Untersuchungen. Identische Sequenzen sind in demselben Kästchen aufgeführt. Von ihnen wurde nur eine Sequenz als Repräsentant ausgewählt, diese ist fettgedruckt dargestellt.

Der Stammbaum in Abbildung 17 ist einer von neun gleichlangen Stammbäumen (CI = 0,5679, RI = 0,8448). Er wurde gewählt, da er dem Konsensusbaum aus diesen neun Stammbäumen in der unklaren Anordnung der folgenden drei Gruppen entspricht:

1): *T. simplex* [gt G], 2): *T. angustilobata*, *T. brindabellae*, *T. simplex* [gt C] und *T. simplex* [gt D], 3): *T. simplex* [gt A], *T. simplex* [gt B] und *T. suecica*. Diese besitzen allerdings in manchen Bäumen auch eine klare Abfolge. Dieser Stammbaum besitzt im wesentlichen dieselbe Topologie, wie mit Maximum-Likelihood und Neighbour-Joining-Methoden errechnete Phylogramme. Sie unterscheiden sich nur dann in der Stellung von wenigen Arten, wenn diese auch mit Parsimony-Methoden nicht aufgelöst (oder nicht statistisch unterstützt) wird. Ein Beispiel hierfür ist die Position von *T. angustilobata* und *T. australis* innerhalb der *T. simplex*-Gruppe. Da dieselben Änderungen aber auch auftreten, wenn andere Bereiche des Alignments ausgeschlossen werden, kann davon ausgegangen werden, dass sie nicht durch methodische Probleme auftreten, sondern in dem Datensatz begründet sind. Das Phylogramm (Abb. 17) zeigt 4 Gruppen innerhalb *Trebouxia*, die mit sehr hohen Jackknife-Werten unterstützt werden. Diese Gruppen entsprechen den clades innerhalb *Trebouxia*, die von HELMS et al. (2001) vorgeschlagen wurden. Allerdings werden clade II und III zu Gruppe 2 zusammengefasst, da beide clades zusammen eine eindeutig unterstützte Gruppe bilden und die Diversität innerhalb dieser Gruppe nicht größer ist als innerhalb der anderen Gruppen. So ist die genetische Distanz, berechnet mit dem Parsimonie-Kriterium, in der Gruppe 2 zwischen *T. impressa* (AB96.027D1) und *T. gelatinosa* (TF86.108B2) 0,1379, in der Gruppe 1 zwischen *Trebouxia* sp. (AJ293781) und *T. showmanii* (UTEX 2234) 0,14464, in Gruppe 3 zwischen *T. corticola* (UTEX 909) und *T. galapagensis* (UTEX 2230) 0,1719 und in Gruppe 4 zwischen *T. letharii* sp. 3 (AF242462) und *T. angustilobata* (AB97.058C5) 0,1505. Dies gilt auch, wenn die Distanzen mit dem Modell von Hashegawa et al. (1985) berechnet werden (hier sind die entsprechenden Werte 0,1537; 0,1628; 0,1965 und 0,1695). Alle Gruppen enthalten mehrere Arten. Diese Gruppen können auch mit Namen von charakteristischen Vertretern belegt werden, so wird vorgeschlagen Gruppe 1 als *T. arboricola*-Gruppe, Gruppe 2 als *T. impressa*-Gruppe, Gruppe 3 als *T. corticola*-Gruppe und Gruppe 4 als *T. simplex*-Gruppe zu bezeichnen. Dies sind die jeweils ältesten Artnamen aus den Namen der Vertreter der jeweiligen Gruppe. Als Außengruppe für die phylogenetische Analysen wurde Gruppe 2 gewählt, da die Untersuchungen der 18S nrDNA gezeigt haben, dass diese Gruppe die Schwestergruppe zu den anderen Gruppen der Gattung ist (siehe Kapitel „Untersuchungen zur phylogenetischen Stellung der Algenpartner *Chlorella saccharophila* und *Coccomyxa* sp. mittels 18S nrDNA-Analysen“; Seite 101). Eine Außengruppe außerhalb der Gattung *Trebouxia* kann nicht verwendet werden, da keine Art bekannt ist, die einerseits nicht zu *Trebouxia* gehört und andererseits in ihrer ITS-Sequenz so ähnlich zu den Sequenzen der Vertreter der Gattung *Trebouxia* ist, dass diese Sequenzen miteinander homologisiert werden können.

Die Stellung der vier Gruppen zueinander ist unklar, was an der fehlenden statistischen Unterstützung des Stammbaums in diesem Bereich zu erkennen ist. Zwar werden in den ITS-Sequenz-Analysen die Gruppen 1 und 3 zusammengefasst, aber dieser Tatsache wird keine Bedeutung beigemessen, da sie statistisch nicht unterstützt wird und im Widerspruch zu den 18S nrDNA-Analysen steht, in denen die Gruppen 1 und 4 zusammengefasst wurden (Abb. 16).



10

Abb. 17: Phylogenetische Beziehungen zwischen Klonen der Gattung *Trebouxia*, berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode. Abgebildet ist ein Stammbaum von neun gleichlangen Stammbäumen. Als Außengruppe wurden *T. impressa* und *T. gelatinosa* verwendet, die Abschnitte des Alignments, in denen das Homologiekriterium nicht erfüllt war, wurden von der Untersuchung ausgeschlossen. Die Zahlen an den horizontalen Ästen sind Jackknife-Werte, der Maßstab entspricht 10 evolutiven Schritten. Die in dieser Arbeit erstmals erhaltenen Sequenzen sind fettgedruckt.

In den untersuchten Flechten wurden Photobionten der Gattung *Trebouxia* nur aus den Gruppen 1 und 4 gefunden. Vor allem innerhalb der Gruppe 1, aber auch in einem Teil der Gruppe 4 sind die Beziehungen zwischen den statistisch gut unterstützten Untergruppen unklar (sehr kleine oder fehlende Jackknife-Unterstützung). Da bei der Untersuchung von

allen Gruppen zusammen die variabelsten Sequenzbereiche aus der Analyse ausgenommen werden müssen, weil die Homologisierung nicht zweifelsfrei erfolgen kann, sollte geklärt werden, ob dies die Ursache für die geringe Auflösung innerhalb der Gruppen ist. Daher wurden diese beiden Gruppen noch einmal getrennt untersucht. Verwendet wurden in dieser Analyse die gesamte Sequenz, nur die Bereiche wurden ausgenommen, bei denen die meisten Vertreter der Gruppe (über 90%) keine Basen besaßen (also Deletionen, die bei den meisten Vertretern der Gruppe vorhanden sind). Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 18 und 19 dargestellt.

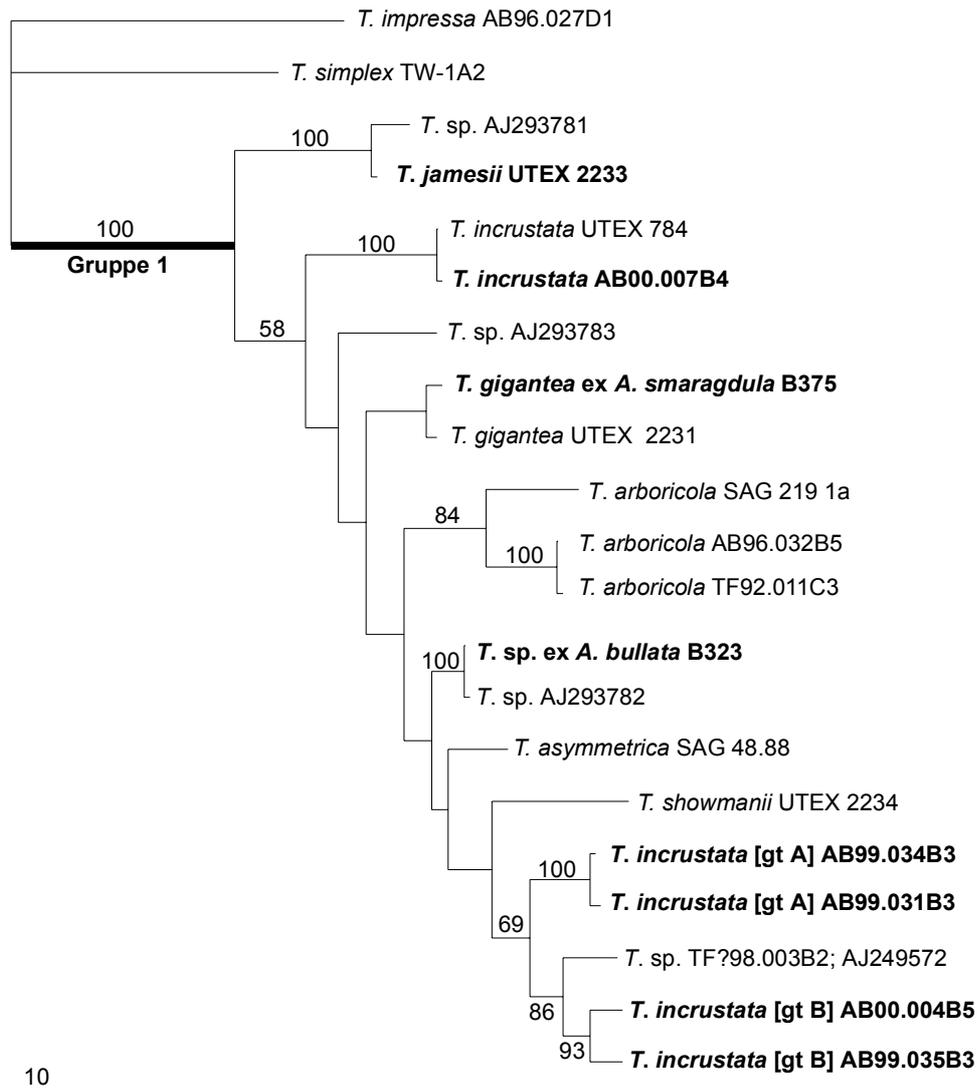
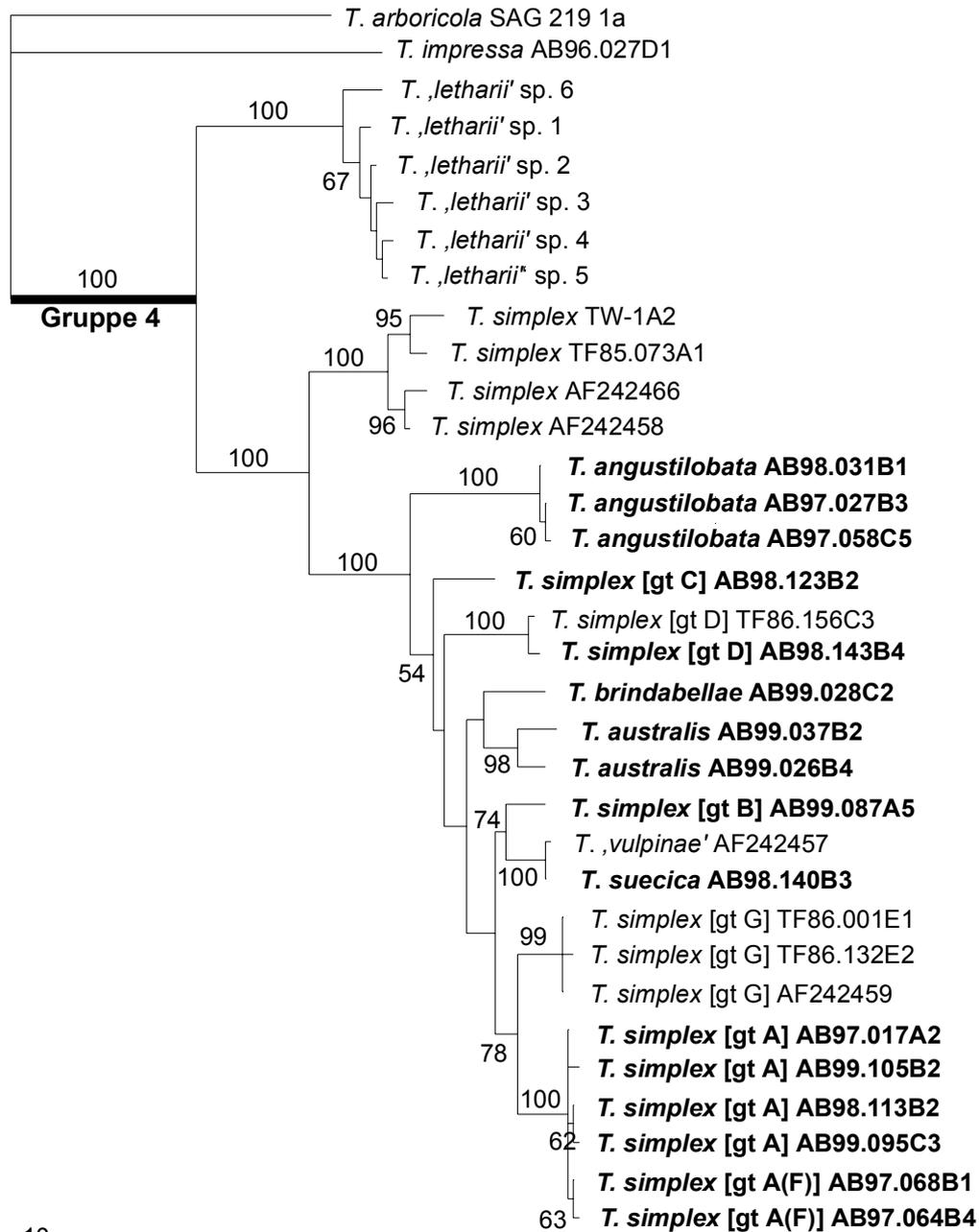


Abb. 18: Phylogenetische Beziehungen zwischen Klonen der *Trebouxia arboricola*-Gruppe, berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode. Abgebildet ist der Stammbaum mit der kürzesten Astlänge. Die Zahlen an den horizontalen Ästen sind Jackknife-Werte, der Maßstab entspricht 10 evolutiven Schritten. Die in dieser Arbeit erstmals erhaltenen Sequenzen sind fettgedruckt.

Das aus allen Positionen des Alignments errechnete Phylogramm (CI = 0,6813, RI = 0,6524; Abb. 18) für Gruppe 1 zeigt zwar eine eindeutige Anordnung der Arten (es gibt nur einen kürzesten Stammbaum), aber diese wird nicht durch Jackknife-Werte unterstützt und sie entspricht auch nicht der Anordnung, wie sie bei der vorhergehenden Analyse gefunden

wurde (mit Ausnahme der statistisch nur schwach gestützten Schwesterngruppenbeziehung von *T. jamesii* UTEX 2233 zu den restlichen Vertretern der Gruppe). Daher ist die Stellung der Arten zueinander unklar. Weitere Sequenzen aus dieser Gruppe und vor allem die Analyse weiterer Genorte sind nötig, um die Abstammungsverhältnisse in dieser Gruppe aufzuklären. Bemerkenswert ist, dass die Klone von *T. arboricola* in beiden Analysen eine – mäßig unterstützte – monophyletische Gruppe bilden. Dies steht im Gegensatz zu den Analysen von HELMS et al. (2001), in denen diese Art paraphyletisch war. Doch HELMS et al. (2001) weisen auch darauf hin, dass es im ITS2 einen Sequenzbereich gibt, der nur bei diesen auftritt, und identisch bei allen Klonen von *T. arboricola* ist, was einen monophyletischen Ursprung nahe legt, so wie er in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Die Anordnung der Arten der Gruppe 4 kann durch Verwendung aller Sequenzpositionen nicht genauer aufgeklärt werden. Abbildung 19 zeigt einen der zehn kürzesten Stammbäume (CI = 0,7247, RI = 0,8589). Diese Stammbäume unterscheiden sich voneinander nur in der Anordnung der Arten von *T. letharii*. Statistisch gut abgesichert sind allerdings nur die Schwesterngruppenbeziehungen der Arten von *T. letharii* zum Rest der Gruppe und von *T. simplex* zum Rest der verbliebenen Gruppe. Die Beziehungen zwischen den verbliebenen Arten sind zwar in allen Phylogrammen gleich, unterscheiden sich aber von denen, die in der Analyse des gesamten Datensatzes erhalten wurden und sind nicht statistisch abgesichert. Auch in dieser Gruppe müssen die Abstammungsverhältnisse durch weiterführende Studien genauer analysiert werden.



10

Abb. 19: Phylogenetische Beziehungen zwischen Klonen der *Trebouxia simplex*-Gruppe, berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode. Abgebildet ist einer von zehn kürzesten Stammbäumen; diese unterscheiden sich nur in der *T. letharii*-Gruppe. Die Zahlen an den horizontalen Ästen sind Jackknife-Werte, der Maßstab entspricht 10 evolutiven Schritten. Die in dieser Arbeit erstmals erhaltenen Sequenzen sind fettgedruckt.

Da die untersuchten Flechten von schwermetallhaltigen Substraten gesammelt wurden, wäre es möglich, dass dieses spezielle Substrat die Wahl des Algenpartners beeinflussen könnte. Daher wurden vier Flechtenarten zusätzlich auch von nicht schwermetallhaltigen Substraten auf ihren Algenpartner hin untersucht. Alle Belege wurden in den Alpen gesammelt. Es zeigte sich, dass *Lecidea lapicida*, *L. confluens* und *Sporastatia testudinea* auch *T. simplex* als Algenpartner haben, wenn sie nicht im *Acarosporium sinopicae* wachsen. Die ITS-Sequenz dieser Algenklone war identisch mit der im *A. sinopicae* am häufigsten angetroffenen Sequenz von *T. simplex* [gt A]. Das untersuchte *Pleopsidium chlorophanum* von nicht schwermetallhaltigem Substrat hatte zwar einen Klon mit bisher

„einzigartiger“ ITS-Sequenz, sie gehört aber – wie auch die Morphologie bestätigte – zur *T. simplex*-Gruppe. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Wahl des Algenpartners – zumindest bei diesen Flechten – nicht durch das Substrat, sondern durch eine hohe Selektivität, bedingt war.

3.4.2.2 Analyse der ITS nrDNA-Sequenzen durch SSCP

Ein eleganter Nachweis von Punktmutationen ist der Nachweis von DNA-Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (SSCP), denn die Sekundärstruktur von DNA-Einzelsträngen ist stark abhängig von ihrer Nukleotidsequenz. Sequenzunterschiede können durch Auftrennung von denaturierten PCR-Produkten in Polyacrylamidgelen sichtbar gemacht werden, da das Laufverhalten von DNA-Einzelsträngen in nicht denaturierenden Polyacrylamidgelen von ihrer Sekundärstruktur abhängt. Sogar einzelne Basen-Austausche können in DNA-Einzelsträngen, die zwischen 100 und 300 Basen lang sind, mit 99% Wahrscheinlichkeit aufgrund unterschiedlichen Laufverhaltens in Polyacrylamidgelen nachgewiesen werden (LESSA & APPLEBAUM, 1993). Diese Methode dient zum einen der Untersuchung, ob Polymorphismen in dem untersuchten DNA-Bereich vorliegen, und zum anderen können Allele eines Genortes des zu untersuchenden Organismus bereits bekannten Allelen dieses Genortes zugeordnet werden, ohne durch Sequenzierung die gesamte Basensequenz des Allels bestimmen zu müssen. Daher wurde im Hinblick auf zukünftig durchzuführende Populationsstudien untersucht, ob durch SSCP-Analysen der ITS nrDNA die Klone aus der *T. simplex*-Gruppe unterschieden werden können. Abbildung 20 zeigt ein typisches SSCP-Gel, mit PCR-Produkten des 3'-Bereiches von ITS1 (204 / 205 bp). Alle untersuchten Taxa zeigen ein charakteristisches Muster, anhand dessen eine Zuordnung erfolgen kann. Selbst die Klone von *T. simplex* [gt A] und *T. simplex* [gt A(F)], deren ITS1 Bereich im untersuchten Abschnitt nur in zwei Basen differiert, können unterschieden werden. Dies trifft allerdings nur für diesen untersuchten Abschnitt der ITS1 nrDNA zu. Untersuchungen des gesamten ITS1-Bereichs zeigten keinen Unterschied im Laufverhalten der beiden PCR-Produkte, was auf die größere Länge der DNA-Fragmente zurückzuführen ist.

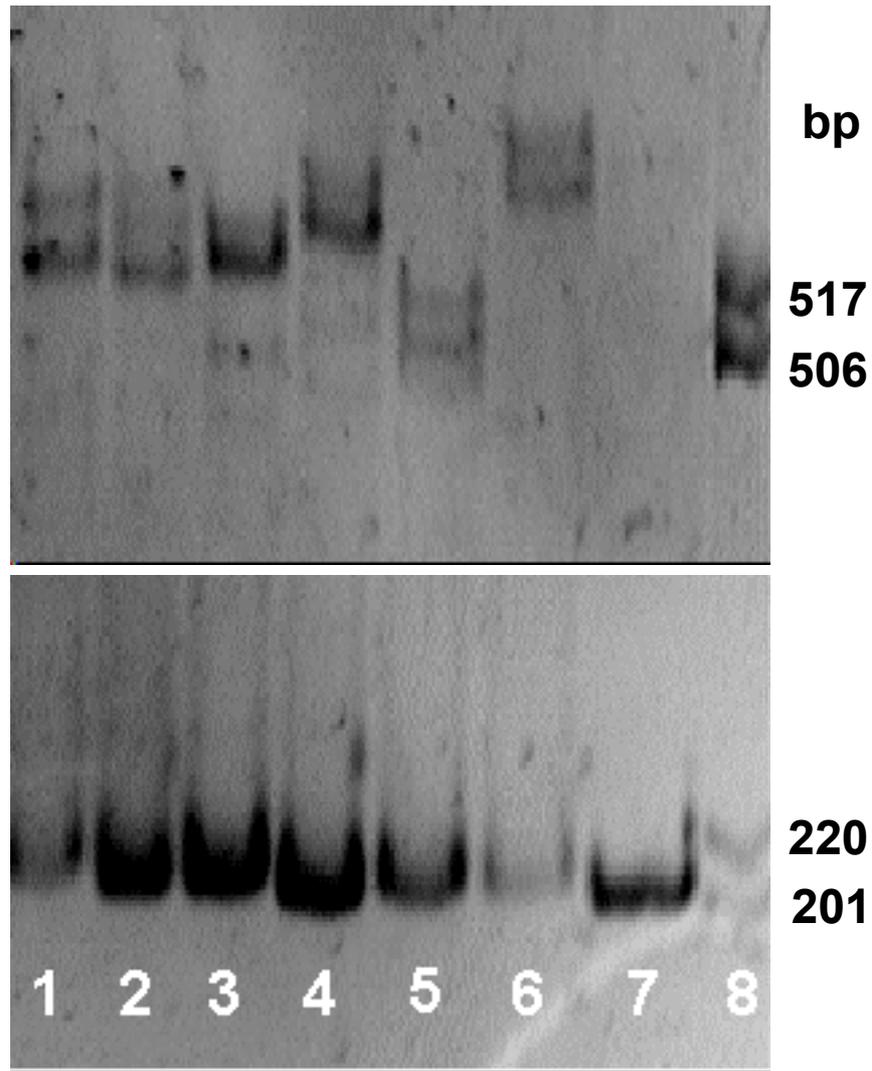


Abb. 20: SSCP-Analyse des ITS1-Bereiches von Algenklonen des *Trebouxia simplex* Aggregats. 1: *T. simplex* [gt A]; 2: *T. simplex* [gt A(F)]; 3: *T. suecica*; 4: *T. australis*; 5: *T. simplex* [gt D]; 6: *T. angustilobata*, 7: *T. simplex* [gt A], nicht denaturiert; 8: Größenmarker, nicht denaturiert.

Auch der ITS2-Bereich kann zur Unterscheidung von Taxa der *T. simplex*-Gruppe verwendet werden. Abb. 21 zeigt die Analyse von ITS2-Bereichen von Algenklonen, die morphologisch als *T. angustilobata* und *T. simplex* bestimmt worden sind. Das Laufverhalten ihrer ITS2 nrDNA entspricht dem von bereits sequenzierten Vertretern dieser Taxa, und die Sequenzanalyse von zwei zufällig ausgewählten Klonen bestätigten diese Zuordnung ebenfalls. Damit steht mit der hier etablierten SSCP-Analyse ein System zur Verfügung, mit dem eine schnelle Genotypifizierung von Klonen möglich ist (z.B. die morphologisch nicht unterscheidbaren Taxa von *T. simplex*, *T. simplex* [gt A], *T. simplex* [gt B], *T. simplex* [gt C], *T. simplex* [gt D] und *T. simplex* [gt G]).

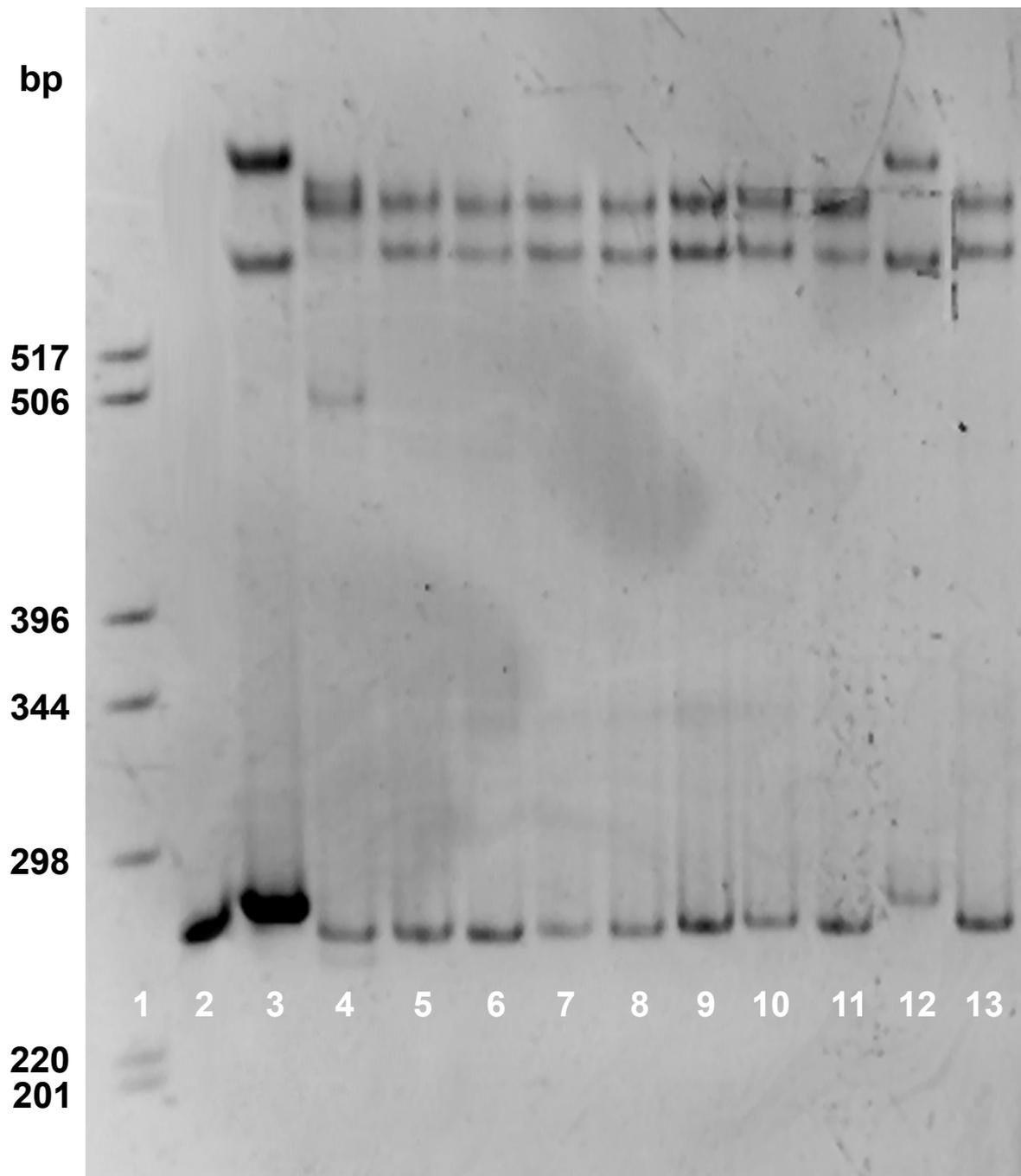


Abb. 21: SSCP-Analyse des ITS2-Bereiches von Algenklonen des *Trebouxia simplex* Aggregats. 1: Größenmarker, nicht denaturiert; 2: *T. simplex* [gt A], nicht denaturiert; 3: *T. angustilobata*; 4: *T. simplex* [gt A]; 5-12: zu untersuchende Klone: AB98.025C1, AB98.026B3, AB98.027B3, AB98.028B4, AB98.029B3, AB98.030B3, AB98.032B2 (alle *T. simplex* [gt A]) und AB98.031B1 (*T. angustilobata*); 13: *T. simplex* [gt A].

Durch SSCP-Analyse wurden die Klone AB98.007B2, AB98.008C5, AB98.009B3, AB98.010B3, AB98.011B2, AB98.012B1, AB98.013B2, AB98.014C1, AB98.015B1, AB98.016B5, AB98.019B4, AB98.020B2, AB98.021B5, AB98.022B4, AB98.023B4, AB98.024B2, AB98.025C1, AB98.026B3, AB98.027B3, AB98.028B4, AB98.029B3, AB98.030B3 und AB98.032B2 dem Taxon *T. simplex* [gt A] und der Klon AB98.031B1 dem Taxon *T. angustilobata* zugeordnet.

3.4.2.3 Sekundärstruktur der ITS2 nrRNA

MAI und COLEMAN (1997) konnten zeigen, dass der ITS2-Bereich in der nrRNA von Grünalgen und höheren Pflanzen eine einheitliche Sekundärstruktur ausbildet. Dieser Befund ließ es als wahrscheinlich erscheinen, dass auch der ITS2-Bereich von *Trebouxia* eine ähnliche Sekundärstruktur ausbildet. Die Erarbeitung dieser Sekundärstruktur war besonders wünschenswert, da hiermit die Möglichkeit gegeben war, die zwischen den Sequenzen auftretenden Basenunterschiede mit der Sekundärstruktur zu korrelieren und den unterschiedlichen Bereichen zuzuordnen (z.B. gepaarte / ungepaarte Bereiche). Darüber hinaus konnte COLEMAN (2000) zeigen, dass in der Grünalgenordnung der Volvocales das Auftreten von bestimmten Basenaustauschen mit der Kompatibilität von sexuellen Kreuzungen zwischen diesen Stämmen korreliert ist. Wenn in gepaarten, stark konservierten Bereichen korrelierte Basenaustausche vorlagen, dann waren die beiden Stämme auch nicht mehr fruchtbar miteinander kreuzbar. Diese stark konservierten Bereiche in der ITS2 nrRNA der Volvocales sind in der Abbildung 22 durch Linien dargestellt.

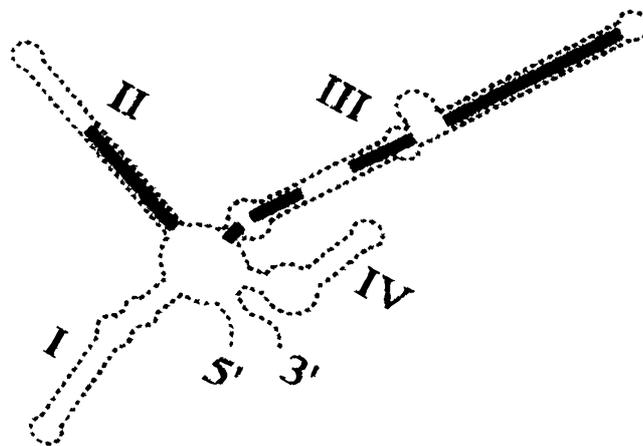


Abb. 22: Stark konservierte Bereiche in der ITS2 nrRNA der Volvocales aus COLEMAN (2000). Die römischen Zahlen bezeichnen die verschiedenen Helices.

Korrelierte Basenaustausche liegen vor, wenn beide gepaarten Basen zu einer jeweils anderen Base mutiert sind, die aber wieder miteinander paaren können. Es wird also eine Änderung an einer Stelle durch die Änderung an einer anderen Stelle, nämlich der mit der ersten Stelle paarenden Position, kompensiert. Durch den Zusammenhang von korrelierten Basenaustauschen in konservierten Bereichen und der Paarungsfähigkeit in der Grünalgenordnung Volvocales ist es möglich, aufgrund der Sequenzunterschiede Vorhersagen über die Paarungsfähigkeit von Stämmen zu machen. Diese Erkenntnis ist von taxonomischer Bedeutung, da nicht kreuzbare Stämme unter Verwendung eines biologischen Artkonzepts zu unterschiedlichen Arten gehören. Somit steht durch die Analyse von Basenaustauschen in der ITS2-Sekundärstruktur – neben morphologischen Merkmalen – ein weiteres Kriterium zur Artabgrenzung zur Verfügung. Hierbei sollte betont werden, dass Stämme, deren ITS2-Sequenzen sich durch einen kompensierten Basenaustausch in einer konservierten Region unterscheiden, zwar nicht miteinander kreuzbar sind, andererseits aber unterschiedliche Kompatibilitätsgruppen nicht unbedingt durch derartige korrelierten Basenaustausche getrennt sein müssen. Folglich kann bei Auftreten dieser korrelierten Basenaustausche auf das Vorhandensein von unterschiedlichen Arten geschlossen werden, aber bei Nichtvorliegen dieser korrelierten

Basenaustausche kann das Vorhandensein von unterschiedlichen Arten nicht ausgeschlossen werden. Obwohl es unklar ist, inwieweit sich dieses Konzept auch auf andere Organismengruppen ausdehnen lässt, so ist es doch bemerkenswert, dass bisher weder bei Tieren (Diotocardia: *Haliotis* [Schnecken]) noch bei Pflanzen (Rosaceae) oder weiteren Algenlinien (Zygnematales: *Closterium*; Laminariales: *Laminaria*) Ausnahmen gefunden wurden (COLEMAN, 2000). Da bei der Gattung *Trebouxia* bisher keine sexuellen Kreuzungen durchgeführt werden können, kann die Gültigkeit dieser Regel nicht überprüft werden, es sollte aber geklärt werden, ob sich die morphologisch abgrenzbaren Arten durch korrelierte Basenaustausche unterscheiden. Hierfür wurde die Sequenz von *Trebouxia arboricola*, dem Typusstamm der Gattung *Trebouxia* als Referenz für Vergleiche innerhalb der Gattung *Trebouxia* und von *T. simplex* [gt A] (AB97.017A2) als Referenz für Vergleiche innerhalb der *Trebouxia simplex*-Gruppe gewählt.

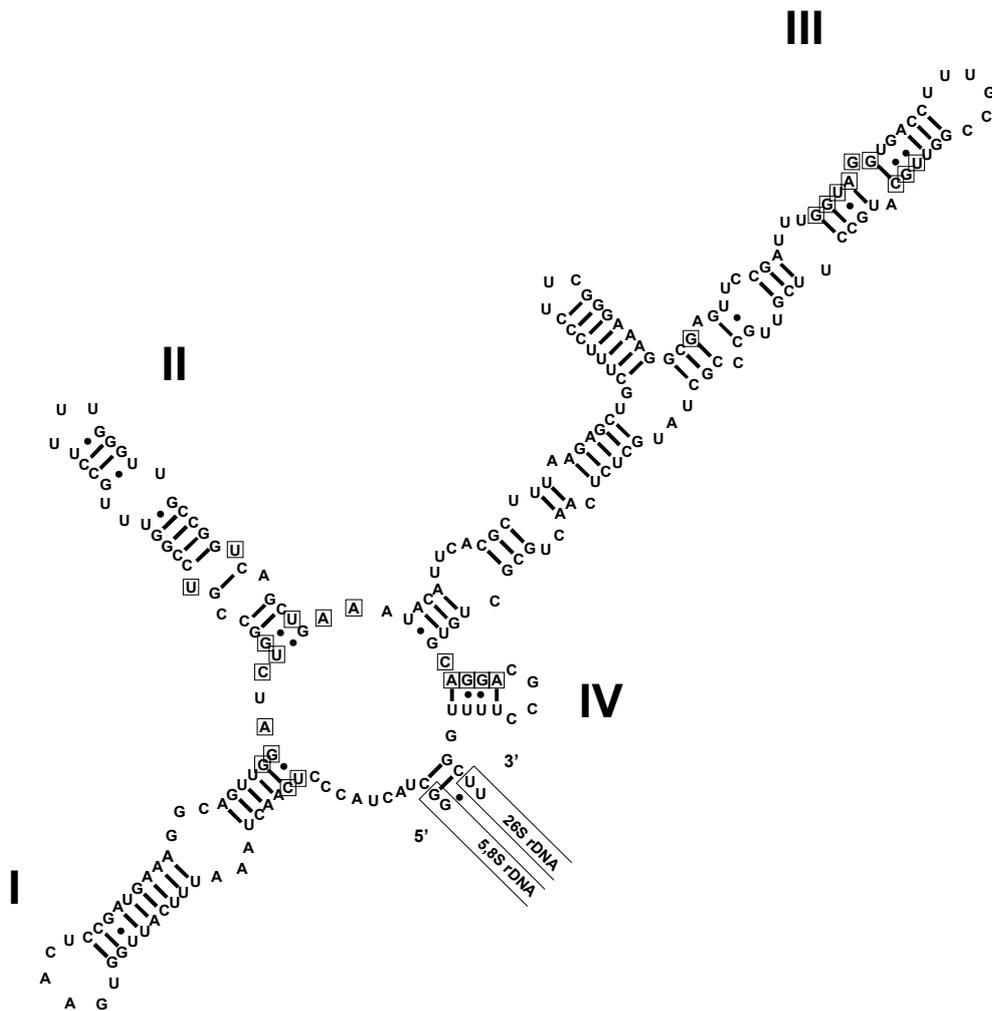


Abb. 23: Abgeleitete Sekundärstruktur der ITS2 nrRNA des Klons *T. simplex* [gt A] (AB97.017A2). Die Struktur wurde durch Analogie zur Sekundärstruktur von *Chlamydomonas reinhardtii* und der Berechnung der freien Energie mit dem Programm mfold abgeleitet. Die von einem Kasten umgebenen Basen sind zwischen den Vertretern der Volvocales und *Trebouxia* identisch. Die römischen Zahlen bezeichnen die verschiedenen Helices.

Die Abbildung 23 zeigt die vermutete Sekundärstruktur der ITS2 nrRNA des Klons AB97.017A2. Der Vergleich mit der Sekundärstruktur der ITS2 nrRNA von *Chlamydomonas reinhardtii* zeigt eine große Ähnlichkeit. Einige Basen, die in den stark konservierten Bereichen der Sekundärstruktur liegen, sind sogar in ihrer Sequenz zwischen

diesen beiden Organismen identisch (siehe Abb. 23). Es finden sich auch alle für die Volvocales gefundenen charakteristischen Abschnitte (z.B. in Helix II und III). Verglichen mit diesen Gemeinsamkeiten sind die Abweichungen gering (z.B. ist die Helix IV bei *Trebouxia* konserviert, während sie in den Volvocales variabel ist). In den Abbildungen, die sich im Anhang A befinden, ist immer die Sekundärstruktur des Klon *T. simplex* [gt A] (AB97.017A2) zugrundegelegt. Ist eine Base mutiert, so ist dies durch einen kleineren Zeichensatz gekennzeichnet. Im Falle einer Mutation steht die neue Base im schwarzen Kästchen daneben, kam es zu einer Deletion fehlt dieses Kästchen. Korrelierte Basenaustausche sind durch Pfeile markiert.

Ein Vergleich der Abbildung 22 mit denen von Abbildung 41 bis Abbildung 50 im Anhang A zeigt, dass sich die untersuchten Klone der Artgruppe um *Trebouxia simplex* nicht durch korrelierte Basenaustausche (durch einen Pfeil markiert) in den sehr stark konservierten Bereichen der ITS2 nrRNA unterscheiden. Es gibt auch keine Korrelation zwischen dem Auftreten von morphologischen Unterschieden und korrelierten Basenaustauschen oder der Gesamtzahl von Mutationen in der Artgruppe um *Trebouxia simplex* (siehe Tabelle 21). Aber mit zunehmender Zahl der Basenaustausche nimmt auch die Zahl der korrelierten Basenaustausche zu.

Tab. 21: Zahl der Basenaustausche, Insertionen / Deletionen und der korrelierten Basenaustausche in der ITS2 nrRNA der angegebenen Klone bezogen auf den Klon AB97.017A2. Nur die fettgedruckten Arten konnten von dem Klon AB97.017A2 morphologisch unterschieden werden.

Klon	Basenaustausche	Insertionen / Deletionen	korrelierte Basenaustausche
<i>T. simplex</i> [gt G] TF86.132E1	6	–	–
<i>T. simplex</i> [gt B] AB99.087A5	9	–	–
<i>T. suecica</i> AB98.140B3	9	–	–
<i>T. brindabellae</i> AB99.028C2	9	1	–
<i>T. australis</i> AB99.026B4	10	1	–
<i>T. simplex</i> [gt C] AB98.123B2	13	1	–
<i>T. simplex</i> [gt D] AB98.143B4	13	1	1
<i>T. simplex</i> TW-1A2	16	1 / 1	1
<i>T. angustilobata</i> AB97.027B3	20	1	2
<i>T. ,letharii‘</i> sp. 1 AF242460.1	28	1	4

Allerdings sind auch die bisher beschriebenen Arten innerhalb der *Trebouxia arboricola*-Gruppe (Abb. 51 bis 55 im Anhang A) und auch die anderen Gruppen der Gattung *Trebouxia* von *Trebouxia arboricola* (Abb. 56 bis 59 im Anhang A) nicht durch korrelierte Basenaustausche in den sehr stark konservierten Bereichen des ITS2 voneinander getrennt.

Daher kann das Merkmal der korrelierten Basenaustausche nicht zur Artunterscheidung innerhalb der Gattung *Trebouxia* verwendet werden, es schließt aber auch nicht das Vorhandensein von unterschiedlichen Arten aus (siehe oben). Die Sekundärstruktur als solche wird aber durch die beobachteten Mutationen gestützt, denn in vielen Fällen bleibt die Paarung zwischen benachbarten Strängen möglich (z.B. G·U-Paarung statt G·C oder A·U-Paarung), oder, falls keine Paarung mehr möglich ist, so wird diese in benachbarten Regionen (z.B. Helix II bei Abb. 55) oder durch leichte Verschiebung der paarenden Basen (z.B. Helix I bei Abb. 59) ermöglicht.

3.4.2.4 Phylogenetische Analyse eines Group I-Introns in der 18S nrDNA

Wegen ihrer Variabilität wurden auch group I-Introns für Populationsstudien und phylogenetische Analysen verwendet (z.B. DEPRIEST, 1995, BEARD & DEPRIEST, 1996, STENROOS & DEPRIEST, 1998, THELL & MIAO, 1999). Aufgrund ihrer ähnlichen Sequenz und Sekundärstruktur und derselben Insertionsstelle werden sie als homolog und daher als für phylogenetische Studien geeignet angesehen. Allerdings ist hierbei Vorsicht geboten, da die Möglichkeit besteht, dass group I-Introns lateral, also zwischen nicht in einer Abstammungslinie stehenden Organismen, transferiert werden können (z.B. FRIEDL et al., 2000) und deshalb die Intron-Phylogenie nicht die Phylogenie des Organismus widerspiegeln muss. In dieser Arbeit wurde ein Group I-Intron untersucht, das an der Position der 18S nrDNA inseriert ist, die der Position 1512 bei *Escherichia coli* entspricht. Da in dieser Studie die PCR-Primer so gewählt wurden, dass das Intron immer zusammen mit dem ITS-Bereich amplifiziert wurde, konnte aufgrund der Größe des PCR-Produkts auf eine mögliche Anwesenheit dieses Introns geschlossen werden. Dabei zeigte sich, dass nicht alle Klone ein Intron an dieser Stelle besaßen. In der Gruppe von *T. simplex* [gt A] hatten alle 53 Klone ein Intron. Die jeweils mit nur einem Stamm gefundenen *T. simplex* [gt B] und *T. simplex* [gt C] besaßen ebenfalls ein Intron an dieser Position, des weiteren nur jeweils ein Klon von *T. australis* (7 Klone) und *T. incrustata* [gt B] (2 Klone). In keinem der untersuchten Klone aus *T. angustilobata* (5 Klone), *T. brindabellae* (1 Klon), *T. gigantea* (1 Klon), *T. incrustata* (4 Klone), *T. incrustata* [gt A] (4 Klone), *T. simplex* [gt D] (3 Klone), *T. sp. B323 ex Acarospora bullata* (1 Klon) und *T. suecica* (28 Klone) konnte dieses Intron nachgewiesen werden. Die Abwesenheit des Introns wurde nicht nur aus der Größe des PCR-Produktes geschlossen sondern für – soweit vorhanden – mindestens 2 Vertreter je Gruppe auch durch Sequenzierung des 5'-Endes der 18S nrDNA bestätigt. Tabelle 22 fasst die durchgeführten Intron-Analysen zusammen, Tabelle 23 führt identische Sequenzen in demselben Kästchen auf. Von ihnen wurde nur eine Sequenz als Repräsentant ausgewählt, diese ist fettgedruckt dargestellt.

Tab. 22: Übersicht über die Zahl der auf die Anwesenheit des group I-Introns untersuchten Photobionten-Klone.

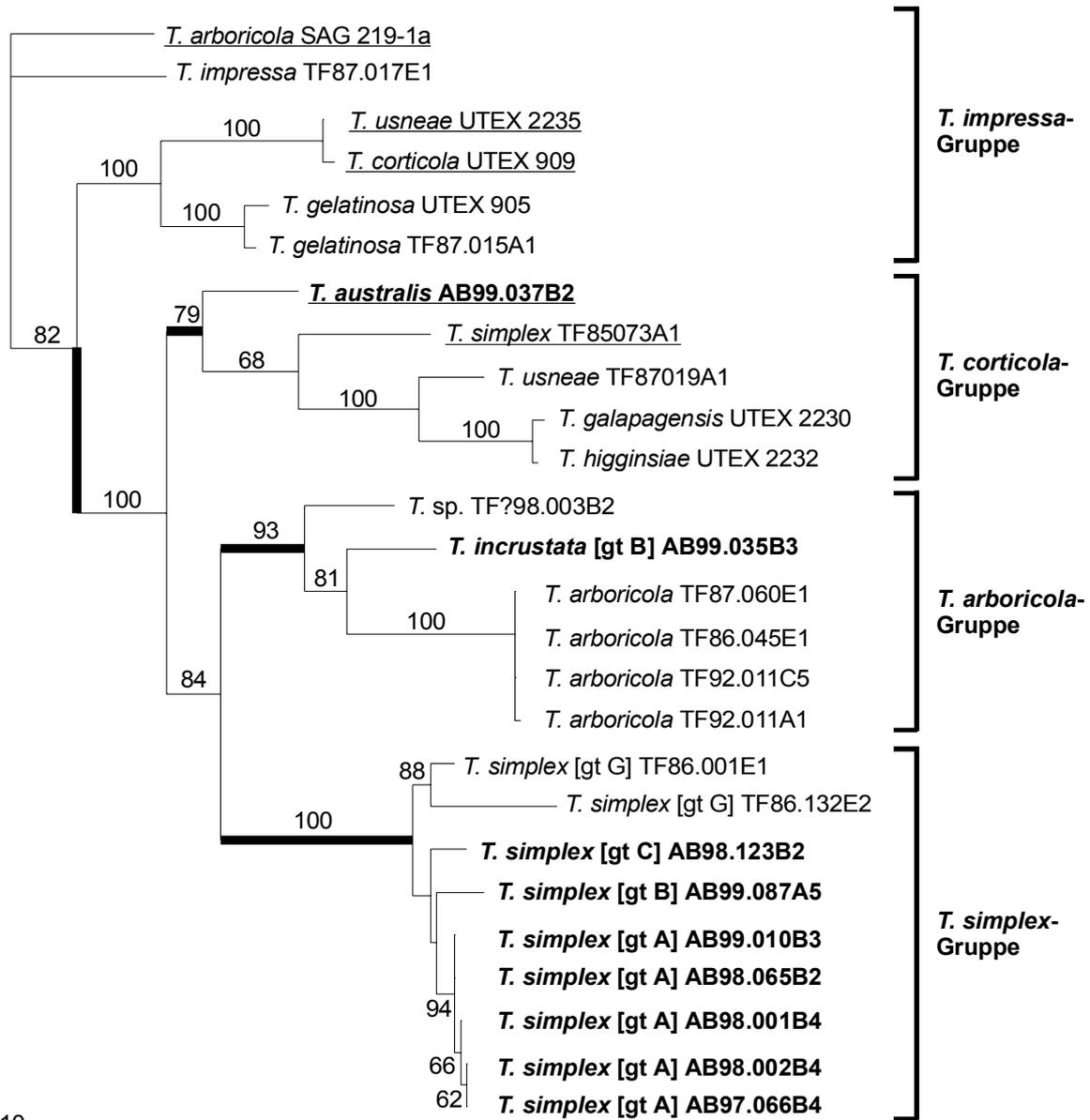
Photobionten-Art	Anzahl der molekular untersuchten Klone	Anzahl der Klone mit Intron	Anzahl der sequenzierten Introns
Trebouxia simplex-Gruppe			
<i>T. angustilobata</i>	5	–	–
<i>T. australis</i>	7	1	1
<i>T. brindabellae</i>	1	–	–
<i>T. simplex</i> [gt A]	54	54	40
<i>T. simplex</i> [gt B]	1	1	1
<i>T. simplex</i> [gt C]	1	1	1
<i>T. simplex</i> [gt D]	4	–	–
<i>T. suecica</i>	28	–	–
Trebouxia arboricola-Gruppe			
<i>T. gigantea</i>	1	–	–
<i>T. incrustata</i>	4	–	–
<i>T. incrustata</i> [gt A]	4	–	–
<i>T. incrustata</i> [gt B]	2	1	1
B323exAcaBul	1	–	–

Tab. 23: Übersicht der in dieser Arbeit gewonnenen, identischen 1512-Intron-Sequenzen und deren Zuordnung zu den Taxa. Der für die phylogenetische Analysen verwendete Klon ist fett gedruckt.

Taxon-Name	Photobionten-Klone
<i>T. australis</i>	AB99.037B2
<i>T. incrustata</i> [gt B]	AB99.035B3
<i>T. simplex</i> [gt A]	AB97.019C3, AB97.022B3, AB97.057B3, AB97.059B1, AB97.064B5, AB97.069B5, AB97.071A3, AB98.111A3, AB98.112B2, AB98.113B2, AB98.114B1, AB98.116A5, AB98.117B5, AB98.120A1, AB98.121B1, AB99.010B3 , AB99.063B5, AB99.064C2, AB99.065A3, B291exLePa, B298exLeSi, AB99.085B1, AB99.086C2, AB99.088B2, AB99.089A3, AB99.095C3, AB99.104B3, AB99.105B2, AB99.106B1
	AB97.067B3, AB98.001B4 , AB98.056B3, AB98.057A1
	AB98.002B4
	AB98.003B4, AB98.063B2, AB98.065B2 , B361exBeAl, B362exRhNo
	AB97.066B4
<i>T. simplex</i> [gt B]	AB99.087A5
<i>T. simplex</i> [gt C]	AB98.123B2

Um zu untersuchen, inwieweit innerhalb der Trebouxien des *Acarosporium sinopicae* die Phylogenie des Group I-Introns identisch mit der ITS nrDNA-Phylogenie ist, wurden 44 aus den 58 Intron besitzenden Klonen ausgewählt und das Intron sequenziert. Dabei wurden aus den Klonen von *T. simplex* [gt A] 40 der 54 Klone zufällig ausgewählt, während aus den anderen Gruppen alle Introns untersucht wurden.

Abbildung 24 zeigt einen von 12 kürzesten Stammbäumen (CI = 0,5991, RI = 0,7893) einer Maximum-Parsimony-Suche. Diese unterscheiden sich zum einen in der Anordnung der Gruppen (*T. simplex* / *T. arboricola* / *T. corticola*-Gruppe), zum anderen in der Abfolge der Taxa in der *T. simplex*-Gruppe. Eine gewichtete Maximum-Parsimony-Suche resultierte in zwei Stammbäumen (CI = 0,7619, RI = 0,8796), die sich nur geringfügig innerhalb der Anordnung der *T. arboricola*-Klone unterschieden und ansonsten dem abgebildeten Stammbaum entsprachen, der daher als der wahrscheinlichste angesehen wird.



10

Abb. 24: Phylogenetische Beziehungen zwischen den 1512-Introns von Vertretern der Gattung *Trebouxia*, berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode. Als Außengruppe wurde *T. impressa* verwendet, die Abschnitte des Alignments, in denen das Homologiekriterium nicht gewährleistet war, wurden von der Untersuchung ausgeschlossen. Die Zahlen an den horizontalen Ästen sind Jackknife-Werte (gewichtet), der Maßstab entspricht 10 evolutiven Schritten. Unterstrichen dargestellt sind die Klone, bei denen es Abweichungen zwischen den ITS- und Intron-Phylogenien gibt, die vermutlich durch einen lateralen Intron-Transfer bedingt sind. Die in dieser Arbeit neu gewonnen Sequenzen sind fett dargestellt. Die Unterteilung der Gattung *Trebouxia* in Gruppen wurde im Kapitel „Phylogenetische Analyse der ITS nrDNA-Sequenzen“ (Seite 104) festgelegt.

Die Intron-Phylogenie der hier untersuchten Photobionten-Klone unterscheidet sich in der Stellung von AB99.037B2 von der ITS-Phylogenie. Das Intron von *T. australis* (AB99.037B2) fällt in die *T. corticola*-Gruppe und nicht in die *T. simplex*-Gruppe, wie es aufgrund der morphologischen und ITS-Sequenzdaten zu erwarten gewesen wäre. Dieser Klon ist der einzige Klon von *T. australis*, der ein Intron besitzt. Außerdem unterscheidet er sich auch geringfügig in der ITS-Sequenz von den anderen *T. australis* Klonen (Abb. 17), aber nicht in seiner Morphologie. Vermutlich hatte der Vorläufer von *T. australis* das group I-Intron an der untersuchten Position verloren, das später in den Klon AB99.037B2 durch einen lateralen Transfer aus einem Vertreter der *T. corticola*-Gruppe wieder eingeführt wurde.

Vergleich der ITS- und 1512-Intron-Allele innerhalb *T. simplex* [gt A]

Innerhalb *T. simplex* [gt A] besitzen nicht alle Klone mit identischer ITS-Sequenz auch identische Intron-Sequenzen (erstere sind in Tab. 20, letztere in Tab. 23 dargestellt). Von der ITS nrDNA wurden 6 verschiedene Allele der Allel-Gruppe A gefunden, von dem 1512-Intron 5 Allele. Tabelle 24 stellt diese Allele, die Unterschiede zwischen ihnen und die Zahl der mit diesem Allel gefundenen Klone dar. Innerhalb der ITS nrDNA von *T. simplex* [gt A] finden sich nur im ITS1-Bereich Sequenzunterschiede. Die Allele A3 und A4 bzw. A5 und A6 haben jeweils einen gemeinsamen Basenunterschied gegenüber dem Allel A1 (erstere an Position 177, letztere an Position 189), die anderen Mutationen kommen nur in dem jeweiligen Allel vor. Im Gegensatz dazu zeigen die verschiedenen Allele des Introns eine größere Ähnlichkeit zueinander und könnten durch Rekombination zwischen den Allelen 1 und 5 entstanden sein. Dies würde allerdings voraussetzen, dass diese beiden Allele in ein und demselben Organismus vorgelegen haben müssen und nach der Rekombination beide ursprünglich vorhandenen Allele verlorengegangen sind, denn in jedem Klon wurde nur ein Allel dieses Introns gefunden. Im unteren Teil der Tabelle 24 sind die auftretenden Allelkombinationen und ihre geographische Verbreitung gezeigt. Das am häufigsten vorkommende Intron-Allel 1 wurde in Kombination mit allen ITS-Allelen der Allel-Gruppe A gefunden, während die anderen Intron-Allele nur in Kombination mit dem ITS-Allel A1 auftraten. An fast allen Standorten wurde mehr als eine Kombination von ITS- und Intron-Allelen gefunden, im Falle der beiden Ausnahmen (Alpen, Koralpe und Alpen, Bildstöckeljoch) wurden nur zwei Klone von *T. simplex* [gt A] auf ihr Intron hin untersucht. Die größte Diversität von Intron-Allelen innerhalb von *T. simplex* [gt A] wurde in den Öztaler Alpen gefunden, wo vier der fünf Allele vorgekommen sind, während die ITS-Allele keine wesentlichen Unterschiede in der Diversität zwischen den einzelnen Standorten zeigten. An den meisten Standorten waren zwei ITS-Allele vorhanden, am Standort „Alpen, Futschölpass“ drei, an den beiden nur wenig untersuchten Standorten (Alpen, Koralpe und Alpen, Bildstöckeljoch) ein Allel.

Tab. 24: Übersicht über die Unterschiede in ITS- und Intron-Sequenzen zwischen Klonen von *T. simplex* [gt A], ihre Zuordnung zu Allelen und die auftretenden Allelkombinationen. Ist keine Base angegeben, entspricht sie der Referenzsequenz (erste Zeile). Die Abkürzungen der geographischen Herkünfte entsprechen den in Kapitel „Angaben zum Standort der Gesellschaft“ (Seite 42) festgelegten.

ITS (1)		Referenzsequenz: AB97.017A2						
Allel	Klon / Position	148	177	189	217	233	270	Klone
A1	AB97.017A2	A	C	T	A	A	A	43
A2	AB99.105B2				T		G	1
A3	AB98.113B2		T					4
A4	AB99.095C3		T			T		1
A5	AB97.068B1			C				1
A6	AB97.064B4	G		C				4

1512-Intron		Referenzsequenz: AB99.010B3						
Allel	Klon / Position	25	78	280	281	282	348	Klone
1	AB99.010B3	A	G	T	G	A	T	29
2	AB98.001B4	G						4
3	AB98.002B4	G	A					1
4	AB98.065B2			A	T	G	A	5
5	AB97.066B4	G	A	A	T	G	A	1

auftretende Kombinationen von ITS und Intron-Allelen:

Allel-kombination	Klone	geographische Herkunft
A1 / 1	21	Alpen, F, K, Ö, SW; Schweden, R, J; USA, RM
A1 / 2	4	Alpen, Ö
A1 / 3	1	Alpen, Ö
A1 / 4	5	Alpen B, Ö; Schweden, R
A1 / 5	1	Alpen, SW
A2 / 1	1	USA, RM
A3 / 1	3	Alpen F; Schweden, J
A4 / 1	1	Schweden, R
A5 / 1	3	Alpen F, SW
	1	
A6 / –	Intron nicht untersucht	Alpen, Ö

3.4.3 Korrelationen zwischen dem Auftreten von Flechtenalgen und deren Flechtenpilzen

3.4.3.1 Selektivität der Flechtenpartner

Eine Auswertung des Photobionteninventars von schwermetallresistenten Flechten zeigt, dass die Flechtenpilze selektiver in ihrer Partnerwahl sind als die Flechtenalgen. Das Spektrum an kompatiblen Interaktionen ist auf Seiten der Flechtenalgen größer als bei den Flechtenpilzen. Während *Trebouxia simplex* als Algenpartner in den gesamten Lecanorales vertreten ist, wählen die Flechtenpilze nur eine begrenzte Anzahl von nahe verwandten Arten aus. Flechten unterschiedlicher Unterordnungen der Lecanorales und anderer Ordnungen besitzen Photobionten, die identisch in ihrer Morphologie und ITS-Sequenz sind (siehe Tab. 13). So wurde am Standort Schwarze Wand in den Alpen die Art *T. simplex* [gt A] mit dem Allel A1 (Tab. 24) z.B. in den lecanoralen Flechten *Acarospora rugulosa* (Acarosporineae), *Lecanora polytropa* (Lecanorineae, Lecanoraceae), *Rhizocarpon geographicum* (Lecanorineae, Rhizocarpaceae) und dasselbe Taxon auch in *Umbilicaria cylindrica* (Lecanoromycetes inc. sed., Umbilicariaceae) und in Schweden, Jämtland in *Chaenotheca subroscida* (Ascomycota inc. sed., Coniocybaceae; TIBELL & BECK, 2002) nachgewiesen. Im Gegensatz zu dieser sehr geringen Selektivität des Photobionten sind die meisten der untersuchten Mykobionten selektiv in ihrer Wahl des Algenpartners. Sie sind mit einem (oder mehreren) Taxon (Taxa) aus der *T. simplex*-Gruppe lichenisiert (siehe Tab. 13). Die einzigen Ausnahmen sind *Acarospora smaragdula*, die mit *T. gigantea*, *T. simplex* [gt A] und *T. suecica* einen Flechtenthallus bildete und *Protoparmelia badia*, die sowohl mit *T. suecica* als auch mit *T. incrustata* [gt A] vergesellschaftet war. Von folgenden Flechtenpilzen wurden mehrere Belege untersucht, und bei allen Belegen wurde ein Vertreter von *T. simplex* agg. als Algenpartner nachgewiesen: *Acarospora rugulosa* (fünf Belege), *Acarospora sinopica* (13 Belege), *Bellemerea alpina* (neun Belege), *Bellemerea cinereorufescens* (drei Belege), *Bellemerea subsorediza* (drei Belege), *Lecanora handelii* (vier Belege), *Lecanora polytropa* (neun Belege), *Lecanora subaurea* (fünf Belege), *Lecidea confluens* (drei Belege), *Lecidea lapicida* (fünf Belege), *Lecidea silacea* (zwölf Belege), *Lecidea tessellata* (zwei Belege), *Miriquidica atrofulva* (zwei Belege), *Miriquidica garovaglii* (zwei Belege), *Pleopsidium chlorophanum* (zwei Belege), *Porpidia tuberculosa* (drei Belege), *Rhizocarpon geographicum* (fünf Belege), *Rhizocarpon norvegicum* (vier Belege), *Rhizocarpon polycarpum* (zwei Belege), *Sporastatia testudinea* (zwei Belege), *Tremolecia atrata* (14 Belege), *Umbilicaria cylindrica* (zwei Belege) und *Umbilicaria torrefacta* (vier Belege).

Welcher Vertreter der *T. simplex*-Gruppe in den Flechten gefunden wurde, hing von dem Fundort – und damit klimatischen und geographischen Faktoren – ab. Am Beispiel der Algenpartner von *Tremolecia atrata* lässt sich diese geographische Abhängigkeit des Photobionten übersichtlicher darstellen. *Tremolecia atrata* wuchs in allen klimatisch und geographisch unterschiedlichen Standorten des *Acarosporium sinopicae* (montane / alpine Zone, Ostseeküste; Alpen, Skandinavien, USA, Australien) und eignet sich daher besonders für diese Darstellung. Tabelle 25 zeigt eine Auflistung, welche Photobionten in den jeweiligen Lokalitäten gefunden wurden, wie viele Belege und wie viele aus diesen isolierten Algenklonen morphologisch untersucht wurden. Je Beleg wurde mindestens ein Algenklon auch molekular untersucht. *T. simplex* [gt A] wurde in den Belegen der nordhemisphärischen Standorte des *Acarosporium sinopicae* nachgewiesen, sofern diese

aus der montanen / alpinen Zone kamen (Schweden, Gebirge; Alpen; USA). In den Alpen war zudem *T. angustilobata* anwesend. An der Ostseeküste Schwedens, die aufgrund des ausgleichenden Einflusses der Ostsee ein gleichmäßigeres, maritimes Klima besitzt, wurden *T. suecica* und *T. simplex* [gt D] als Algenpartner nachgewiesen, während aus den südhemisphärischen Belegen *T. australis* isoliert wurde.

Tab. 25: Algenpartner von *Tremolecia atrata*, bezogen auf die Herkunft der Flechte. Die Zahl der untersuchten Klone bezieht sich auf die lichtmikroskopisch untersuchten Klone, aus jedem Thallus wurde zusätzlich mindestens ein Klon molekular charakterisiert.

Lokalität	Photobiont	untersuchte Thalli / Klone
Alpen	<i>T. simplex</i> [gt A]	4 / 39
	<i>T. angustilobata</i>	1 / 5
Schweden, Gebirge	<i>T. simplex</i> [gt A]	2 / 12
Schweden, Ostsee	<i>T. suecica</i>	2 / 28
	<i>T. simplex</i> [gt D]	1 / 6
USA, Rocky Mountains	<i>T. simplex</i> [gt A]	2 / 24
Australien, Brindabella Range	<i>T. australis</i>	2 / 19

Tabelle 26 zeigt die Fundstellen der einzelnen Arten von *T. simplex* agg. Sie untermauert die an *Tremolecia atrata* festgestellten Befunde zur Verbreitung dieser Arten an einem größeren Datensatz, bestehend aus allen molekular untersuchten Klonen. Die meisten molekular untersuchten Klone kamen aus den Alpen (66 Klone), Schwedens Ostseeküste (32 Klone) und Schwedens Gebirgsregion (Ramundberget und Jämtland; 14 Klone). Die an Schwedens Ostseeküste auftretenden *T. simplex* [gt D] (vier Klone) und *T. suecica* (28 Klone) wurden weder an den untersuchten Standorten der Alpen noch der Schwedens Gebirgsregion gefunden. Andererseits wurde der häufigste Klon der alpinen Bereiche, *T. simplex* [gt A] nicht an der Ostseeküste gefunden, obwohl einige Flechten an beiden Fundorten untersucht wurden (z.B. *Acarospora sinopica*, *Lecanora polytropa*, *Lecidea lapicida*, *Lecidea silacea*, *Rhizocarpon geographicum* und *Tremolecia atrata*). Selbiges gilt auch für die am australischen Standort häufige Art *T. australis*, die in keinem der nordhemisphärischen Belege gefunden wurde. Diese Beobachtungen belegen die Wichtigkeit der unterschiedlichen klimatischen / geographischen Verbreitungen der Arten des *T. simplex*-Aggregats.

Tab. 26: Übersicht über die Herkunft der Photobionten des *Trebouxia simplex*-Aggregats aus dem *Acarosporium sinopicae* und von nicht schwermetallreichem Substrat. Da *T. simplex* [gt A] und *T. simplex* [gt D] morphologisch nicht unterschieden werden konnten, wurden nur molekular charakterisierte Klone in die Tabelle aufgenommen.

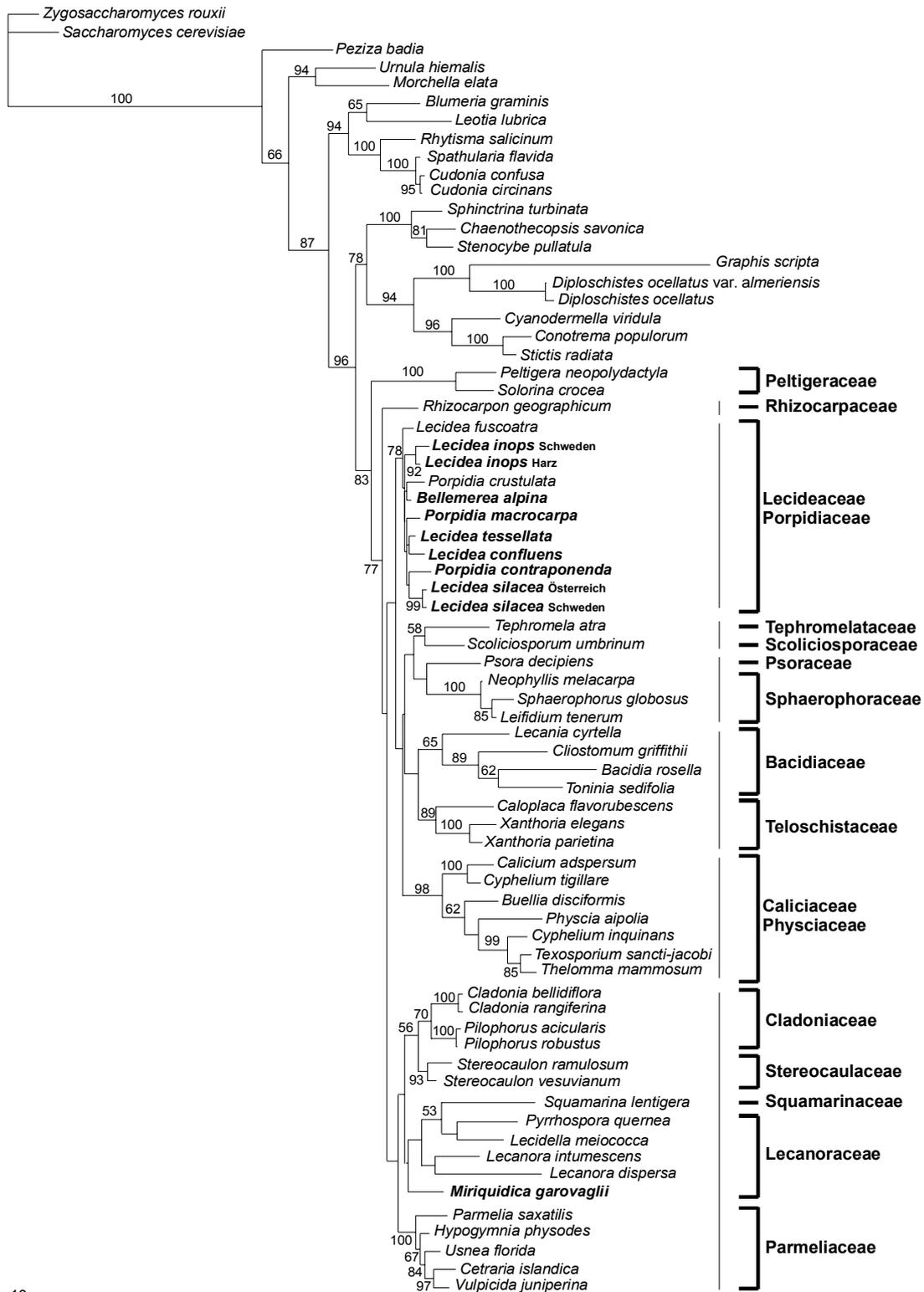
PB-Art	geographische Herkunft (sequ.Klone / Belege)
<i>T. angustilobata</i>	Alpen (5 / 4)
<i>T. australis</i>	Australien (7 / 7)
<i>T. brindabellae</i>	Australien (1 / 1)
<i>T. simplex</i> [gt A]	Alpen (60 / 60) Schweden, Gebirge (13 / 12) USA, Rocky Mountains (3 / 3)
<i>T. simplex</i> [gt B]	Schweden, Gebirge (1 / 1)
<i>T. simplex</i> [gt C]	Alpen (1 / 1)
<i>T. simplex</i> [gt D]	Ostseeküste (4 / 4) Deutschland, Bayreuth (1 / 1)
<i>T. simplex</i> [gt G]	Deutschland, Spessart, Hanau Deutschland, Forstenrieder Park Österreich, Handalpe
<i>T. suecica</i>	Ostseeküste (28 / 14)
<i>T. ‚vulpinae‘</i>	Alpen, Prager Wildsee (2 / 2) USA, Kalifornien (2 / 2)

Auch *Acarospora bullata* zeigt eine ganz ähnliche Selektivität in der Photobiontenwahl, wie die meisten anderen untersuchten Flechten, allerdings in Bezug auf die *T. arboricola*-Gruppe. Dieser Flechtenpilz war mit drei verschiedenen Taxa dieser Gruppe lichenisiert (*T. incrustata*, *T. incrustata* [gt A] und eine nur nach der ITS-Sequenz bekannte *Trebouxia* sp. B323). Auch die Flechten mit anderen Photobionten als *Trebouxia* zeigten Selektivität in der Photobiontenwahl. So war *Lecidea inops* in allen Fällen mit *Chlorella saccharophila* (vier Belege), *Porpidia macrocarpa* (fünf Belege) und *Lepraria* cf. *caesioalba* (zwei Belege) mit *Asterochloris irregularis*, *Scoliciosporum umbrinum* mit *Apatococcus lobatus* (drei Belege) und *Trapelia obtegens* mit *Chlorella ellipsoidea* (drei Belege) vergesellschaftet.

3.4.3.2 Flechtenalgen der Familien Lecideaceae und Porpidiaceae

Bemerkenswert ist die Verteilung von *Trebouxia* und *Asterochloris* als Algenpartner innerhalb der Gruppe der nahe verwandten Gattungen *Bellemeria*, *Lecidea* und *Porpidia*, die zu den Familien Lecideaceae und Porpidiaceae gehören (RAMBOLD, 1989). Diese Gattungen werden unter anderem aufgrund von ähnlichen Ascuspikalstrukturen zusammengefasst, die nach Behandlung mit Lugol'scher Lösung sichtbar werden. *Lecidea* besitzt eine kappenförmige Struktur, die mit Lugol'scher Lösung positiv reagiert, während *Porpidia* und *Bellemeria* röhrenförmige Strukturen zeigen. Diese sind gut von dem ‚*Lecanora*-Typ‘ zu unterscheiden, wie er für die Lecanoraceae charakteristisch ist und z.B. (in etwas abgewandelter Form) auch bei *Miriquidica* auftritt. Bei letzterem Typ reagiert der größte Teil der Ascusspitze mit Lugol'scher Lösung und im zentralen Bereich findet sich

ein ungefärbeter Axialkörper. Um die Korrelation dieser Merkmale mit einem weiteren, unabhängigen Merkmal zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit bei ausgewählten Arten von *Bellemeria*, *Lecidea*, *Miriquidica* und *Porpidia* die 18S nrDNA-Sequenzen bestimmt und zusammen mit anderen in der Genbank vorhandenen Sequenzen phylogenetisch analysiert. Die Analyse zeigt gut unterstützten Gruppierungen innerhalb der Lecanorales (siehe Abb. 25; CI = 0,4515, RI = 0,5693), die Familien entsprechen, die auch durch morphologische Merkmale charakterisiert sind, wie z.B. die Parmeliaceae, Physciaceae (darunter die Caliciaceae), Teloschistaceae, Sphaerophoraceae und Peltigeraceae. Diese sind in Übereinstimmung mit bereits publizierten Erkenntnissen (z.B. WEDIN & DÖRING, 2000, WEDIN et al., 2000, PERŠOH & RAMBOLD, 2002), weshalb sie hier nicht weiter diskutiert werden sollen. Aufgrund der fehlenden statistischen Unterstützung kann über die Stellung der Familien zueinander keine gesicherte Aussage getroffen werden.



10

Abb. 25: Phylogenetische Beziehungen zwischen Ascomyceten, erhalten durch die phylogenetische Analyse von 18S nrDNA-Sequenzen. Abgebildet ist einer von 3900 Stammbäumen mit gleich kurzer Astlänge, die in einer Maximum-Parsimony-Suche errechnet wurden. Diese unterscheiden sich nur in der Anordnung von Taxa innerhalb der Lecanorineae (inkl. Cladoniineae); die Großgruppen, die in allen 3900 Bäumen identisch waren, sind durch Striche markiert, die Beziehungen zwischen diesen Großgruppen sind unklar. Die Zahlen an den horizontalen Ästen sind Jackknife-Werte, die in dieser Arbeit neu gewonnenen Sequenzen sind fett gedruckt dargestellt. Die Familienzugehörigkeit der Vertreter der Lecanorales ist rechts dargestellt. Nähere Erläuterungen sind im Text gegeben.

Die Gattungen *Bellemeria*, *Lecidea* und *Porpidia* bilden eine monophyletische Gruppe, was die Relevanz der eingangs genannten morphologischen Merkmale bestätigt. Diese monophyletische Gruppe ist in allen 3900 kürzesten Bäumen vorhanden und mäßig durch Jackknife-Werte unterstützt (78%). Die verwandtschaftliche Nähe von *Miriquidica* und *Lecanora*, die aufgrund des ähnlichen Ascus-Typs postuliert wurde (HERTEL & RAMBOLD, 1987) findet weitere Unterstützung durch die molekularen Daten. *Miriquidica garovaglii* fällt in keinem der 3900 Bäume in die Gruppe der Lecideaceae und Porpidiaceae, sondern bildet in allen Bäumen eine eigene Gruppe, zusammen mit den übrigen Vertretern der Lecanoraceae, *Squamarina lentigera* (Squamarinaceae), den Parmeliaceae sowie den Cladoniaceae und den Stereocaulaceae. Allerdings gibt es für diese Gruppierung als ganzes keine statistische Unterstützung, weshalb ihr kein großer Wert beigemessen werden kann, Untergruppen sind aber gut statistisch unterstützt (siehe Abb. 25).

Während bisher angenommen wurde, dass die Gattungen *Lecidea*, *Porpidia* und *Bellemeria*, wie die meisten Vertreter der Cladoniineae sensu RAMBOLD und TRIEBEL (1992), mit *Asterochloris* lichenisiert sind (RAMBOLD et al., 1998), so wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass auch *Trebouxia* und *Chlorella saccharophila* als Algenpartner von Flechten dieser Gattungen in Frage kommen. Tabelle 27 gibt die Zuordnung der Mykobionten-Gattungen zu den Photobionten-Gattungen sowie die Anzahl der untersuchten Belege und Algenklone an. Die Verteilung der Flechtenalgen ist keineswegs zufällig, sondern *Asterochloris* findet sich in den Arten ohne amyloide Polysaccharide im Thallus (mit negativer Lugol-Reaktion) während *Trebouxia* (und *Chlorella saccharophila*) in den Arten mit amyloiden Polysacchariden im Thallus (mit positiver Lugol-Reaktion) auftritt. Im Gegensatz hierzu besitzen die lecideoiden Lecanoraceen-Gattungen *Carbonea* und *Miriquidica* *Trebouxia* als Algenpartner, obwohl sie eine negative Lugol-Reaktion im Mark zeigen. Die Kombination von *Trebouxia* als Algenpartner und negativer Lugol-Reaktion im Mark wurde in den Gattungen *Lecidea* und *Porpidia* nicht beobachtet.

Tab. 27: Auflistung der Photobionten der Gattungen *Bellemeria*, *Lecidea* und *Porpidia*, der mit diesen nahe verwandten *Immersaria* sowie der lecideoiden Gattungen *Carbonea* und *Miriquidica*, die beide zur Familie der Lecanoraceae gehören. Die in Klammer angeführten Zahlen geben die Zahl der untersuchten Belege, der aus diesen isolierten Algenklone und der molekular analysierten Klone an. Flechtentaxa mit positiver Lugol-Reaktion im Mark sind unterstrichen dargestellt.

<i>Trebouxia simplex</i> agg.	<i>Asterochloris</i>	<i>Chlorella saccharophila</i>
<u><i>Bellemeria alpina</i> (9 / 59 / 7)</u>	<u>cf. <i>Bellemeria cinereorufescens</i> var. <i>diamartha</i> (1 / 8 / 0)</u>	<u><i>Lecidea inops</i> (4 / 49 / 2)</u>
<u><i>Bellemeria cinereorufescens</i> (3 / 25 / 3)</u>	<i>Lecidea fuscoatra</i> (1 / 5 / 0)	
<u><i>Bellemeria subsorediza</i> (3 / 27 / 2)</u>	<i>Lecidea plana</i> (1 / 2 / 0)	
<u><i>Immersaria athroocarpa</i> (1 / 13 / 1)</u>	<i>Porpidia contraaponenda</i> (1 / 13 / 0)	
<u><i>Lecidea confluens</i> (3 / 34 / 2)</u>	<i>Porpidia crustulata</i> (1 / 6 / 0)	
<u><i>Lecidea lapicida</i> var. <i>lapicida</i> (3 / 42 / 3)</u>	<i>Porpidia flavocaerulescens</i> (1 / 12 / 0)	
<u><i>Lecidea lapicida</i> var. <i>pantherina</i> (3 / 40 / 3)</u>	<i>Porpidia macrocarpa</i> (5 / 41 / 0)	
<u><i>Lecidea paupercula</i> (1 / 0 / 1)</u>	<i>Porpidia</i> spec. (grau, I _{Lugol} -) (1 / 2 / 0)	
<u><i>Lecidea silacea</i> (12 / 101 / 10)</u>	<i>Porpidia</i> spec. (rot, I _{Lugol} -) (1 / 15 / 0)	
<u><i>Lecidea tessellata</i> (2 / 16 / 1)</u>		
<u><i>Porpidia tuberculosa</i> (3 / 20 / 2)</u>		
<i>Carbonea vorticosa</i> (1 / 11 / 0)		
<i>Miriquidica atrofulva</i> (2 / 27 / 0)		
<i>Miriquidica garovaglii</i> (2 / 28 / 1)		
" <i>Lecidea fuliginosa</i> -Gruppe" (1 / 12 / 0)		

Nur ein Beleg von cf. *Bellemeria cinereorufescens* zeigte eine Ausnahme von dieser Regel, da trotz positiver Lugol-Reaktion *Asterochloris* als Algenpartner gefunden wurde. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von 15 *Bellemeria*-Belegen, die alle *Trebouxia* als Algenpartner besaßen. Zudem ist dieser abweichende Fall als kritisch anzusehen, da von dieser Flechte kein gut ausgebildeter Thallus vorhanden war, sondern nur wenige, verstreute Areolen (weniger als zehn), die rostrot gefärbt waren. Daher war es nicht möglich, eine Areole aus der Thallusmitte für die Isolation zu verwenden, was eine sicherere Zuordnung der Areole zum Flechtenthallus ermöglicht hätte. Da die Areolen nur schwer von den ähnlichen Loben rostroter *Porpidia*-Arten zu unterscheiden wären, die *Asterochloris* als Photobiont besitzen (siehe Tab. 27), kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass in diesem Fall bei der Isolation versehentlich eine *Porpidia*-Areole verwendet worden ist. Der Versuch, aus vier der verbliebenen Areolen gleichzeitig den Algen- und Pilzpartner molekular zu bestimmen, schlug fehl, weshalb unklar bleiben muss, ob hier tatsächlich eine Abweichung von der Regel vorliegt oder eine falsche Bestimmung der Areole erfolgt ist.

3.4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen

Die molekulargenetischen Analysen bestätigten die morphologischen Untersuchungen und erlaubten größtenteils eine noch genauere Unterscheidung der isolierten Flechtenalgenklone. Die 18S nrDNA-Sequenzanalysen untermauerten die Zuordnung der Photobionten von *Lecidea inops* und *Stereocaulon nanodes* zu *Chlorella saccharophila* und von *Dibaeis baeomyces* zu *Coccomyxa*.

Die ITS nrDNA-Sequenzanalysen von 113 Klonen der Gattung *Trebouxia* ergaben eine weitergehende Unterscheidung der isolierten Photobionten-Klone als dies die morphologischen Untersuchungen erlauben. Die Gattung *Trebouxia* kann in vier Gruppen eingeteilt werden, deren Stellung zueinander unklar ist. Jede dieser Gruppen besteht aus mehreren Arten. Als Photobionten von Flechten schwermetallreicher Substrate wurden nur Klone von Arten der Gruppen 1 (*T. arboricola*-Gruppe) und 4 (*T. simplex*-Gruppe) nachgewiesen. Die morphologisch unterscheidbaren Arten waren auch in ihren ITS nrDNA-Sequenzen verschieden und zeigten auch eine (geringere) Variabilität der ITS nrDNA-Sequenzen innerhalb der Art (mit Ausnahme von *T. brindabellae*, von der nur ein Klon untersucht wurde). Innerhalb der morphologisch einheitlichen *T. simplex* und *T. incrustata* wurden mehrere Genotypen gefunden, die vermutlich ebenfalls eigene – kryptische und hier als Genotaxa bezeichnete – Arten darstellen. Dies konnte aber nicht abschließend geklärt werden. Um korrelierte Basenaustausche in konservierten Bereichen zu finden, wurde als weiteres mögliches Merkmal zur Unterscheidung von Arten die Verteilung der Mutationen an der ITS2 nrDNA-Sekundärstruktur untersucht. Dieser Merkmalsbereich kann bei der Gattung *Trebouxia* aber wegen des Fehlens von korrelierten Basenaustauschen in konservierten Bereichen der ITS2 nrDNA-Sekundärstruktur nicht zur Unterscheidung von Arten herangezogen werden.

Die Analysen des 1512-Introns in der 18S nrDNA von 44 Photobionten-Klonen erlaubten eine weitere Charakterisierung der Photobionten-Klone, da innerhalb einer Gruppe mit einheitlicher ITS nrDNA-Sequenz (*T. simplex* [gt A]) bis zu fünf verschiedene 1512-Intron-Sequenzen gefunden wurden. Durch den Vergleich der ITS nrDNA-Phylogenie mit der Phylogenie der 1512-Intron-Sequenzen konnte gezeigt werden, dass das Intron von

T. australis durch horizontalen Gentransfer erworben worden sein muss. Es ist mit den Introns aus der *T. corticola*-Gruppe näher verwandt als mit denen der Vertreter der *T. simplex*-Gruppe, zu der *T. australis* nach morphologischen und ITS nrDNA-Analysen gehört.

Nahezu alle untersuchten Flechten zeigten eine ausgeprägte Selektivität bezüglich der Zugehörigkeit ihres Photobionten zu einer der vier Gruppen innerhalb von *Trebouxia*. Welcher Vertreter aus dieser Gruppe, z.B. der *T. simplex*-Gruppe, in den Flechten gefunden wurde, hing dagegen nicht von der Flechtenart sondern von deren Standort – und damit von klimatischen und geographischen Faktoren – ab. Bemerkenswert ist die Verteilung von Photobionten der Gattung *Asterochloris* in den Flechtenfamilien Lecideaceae und Porpidiaceae. Durch die Analyse von 10 neu gewonnenen 18S nrDNA-Sequenzen von Mycobionten mit bereits bekannten Sequenzen konnte gezeigt werden, dass beide Familien eine monophyletische Gruppe innerhalb der Lecanorales bilden. Dennoch besaßen nicht alle Vertreter einen Algenpartner aus derselben Gattung. Nur Vertreter mit negativer Lugol-Reaktion im Mark waren mit *Asterochloris* assoziiert, während Vertreter mit positiver Lugol-Reaktion im Mark mit *Trebouxia* oder *Chlorella* assoziiert waren. Dies ist das erste Beispiel für die Korrelation zwischen einem morphologisch-chemischen Merkmal des Mycobionten und der Wahl des Photobionten innerhalb einer monophyletischen Gruppe von Flechten.

3.5 Schwermetallresistenz von Flechtenalgen

Viele Schwermetalle sind zwar in kleinen Mengen essentiell für alle Organismen, in größeren Konzentrationen sind sie jedoch stark toxisch (siehe z.B. MOHAN, 1998). Um festzustellen, inwieweit das gefundene Photobiontenspektrum der auf schwermetallhaltigem Substrat wachsenden Flechten (chalkophile Flechten) durch die in dem Substrat vorhandenen Schwermetalle bedingt ist, wurden ausgewählte Algenklone auf eine möglicherweise vorhandene Schwermetallresistenz hin untersucht. Hierbei wurden die meisten Experimente mit einem Vertreter des in den Alpen am häufigsten auftretenden Genotyps von *Trebouxia simplex* [gt A] durchgeführt, einem aus *Lecidea silacea* isoliertem Klon aus dem Salzburger Land (Standort: Schwarze Wand; AB97.017A2). Weiterhin wurde ein Klon von *Asterochloris irregularis* aus *Porpidia macrocarpa* (Standort: Öztaler Alpen; AB97.070B2) auf seine Resistenz gegenüber Cu untersucht. Als Vergleich diente die Typuskultur von *Trebouxia jamesii*, isoliert aus *Schaereria tenebrosa* von einem nicht mit Schwermetallen belasteten Standort in Wales. Diese steht nach morphologischen Gesichtspunkten *T. simplex* nahe, allerdings zeigte die molekulare Analyse der ITS-Sequenz, dass der Klon nicht in dieselbe Gruppe gehört, wie alle bisher untersuchten Klone von *T. simplex*, sondern näher mit der *Trebouxia arboricola*-Gruppe verwandt ist. Es ist noch unklar, worauf dieses Ergebnis zurückzuführen ist (siehe Erläuterungen in Kapitel „Phycobionten der Gattung *Trebouxia* PUYM.“; Seite 77). Auf jeden Fall ist davon auszugehen, dass dieser Algenklon nicht von schwermetallhaltigem Substrat stammt, denn Flechten dieser Standorte wurden bisher nicht auf ihre Algenpartner hin untersucht, geschweige denn deren Photobionten isoliert. Daher kann dieser Klon in jedem Fall als Vergleich zu den aus dem *Acarosporium sinopicae* isolierten Photobionten herangezogen werden.

Um die hohen Konzentrationen von Schwermetallen, denen die chalkophilen Flechten ausgesetzt sind, tolerieren zu können, ist es für Organismen notwendig, diese zu entgiften. Eine Möglichkeit der Entgiftung zur Verhinderung anderer – unerwünschter – Reaktionen ist die Komplexbildung durch Bindung der Schwermetalle an eigens gebildete Liganden. Es wird davon ausgegangen, dass Algen, ebenso wie höhere Pflanzen, Phytochelatine bilden, um damit Schwermetalle zu binden und das Zellmilieu zu entgiften (AHNER & MOREL, 1999; siehe auch Kapitel „Phytochelatine als schwermetallentgiftendes Prinzip in Pflanzen“; Seite 10). Flechtenalgen wurden diesbezüglich jedoch noch nicht untersucht, weshalb im folgenden neben den Resistenzversuchen auch Untersuchungen zum Vorkommen von Phytochelatinen in Flechtenalgen dargestellt werden.

3.5.1 Wachstum der Flechtenalgen bei Schwermetallbelastung

In diesem Kapitel werden die Reaktionen der Flechtenalgen auf die Zugabe von Schwermetallionen zum Kulturmedium dargestellt. Die Resultate der Analyse des Substrats, von dem die Flechtenalgen isoliert wurden, ist in Tabelle 28 zusammengefasst.

3.5.1.1 Vergleich der verschiedenen Wachstumsmessungen

Die Ergebnisse der verschiedenen Methoden der Wachstumsmessungen, Zählung der Zellzahl in der Thoma-Kammer, Messung der optischen Dichte im Photometer bei 800 nm (OD_{800}) und die Bestimmung des Trockengewichtes korrelierten gut miteinander und

zeigen eine lineare Beziehung (Abb. 26 und 27). Aufgrund des linearen Anstiegs der Absorption bezogen auf den Anstieg der Zellzahl bzw. des Trockengewichts führen die Wachstumsmessungen mit jedem dieser Parameter zu dem gleichen Ergebnis. Daher wurde das Wachstum während des Versuchs in der Regel durch die Messung der – am schnellsten bestimmbar – OD_{800} und am Versuchsanfang und -ende durch Trockengewichtsbestimmung quantifiziert.

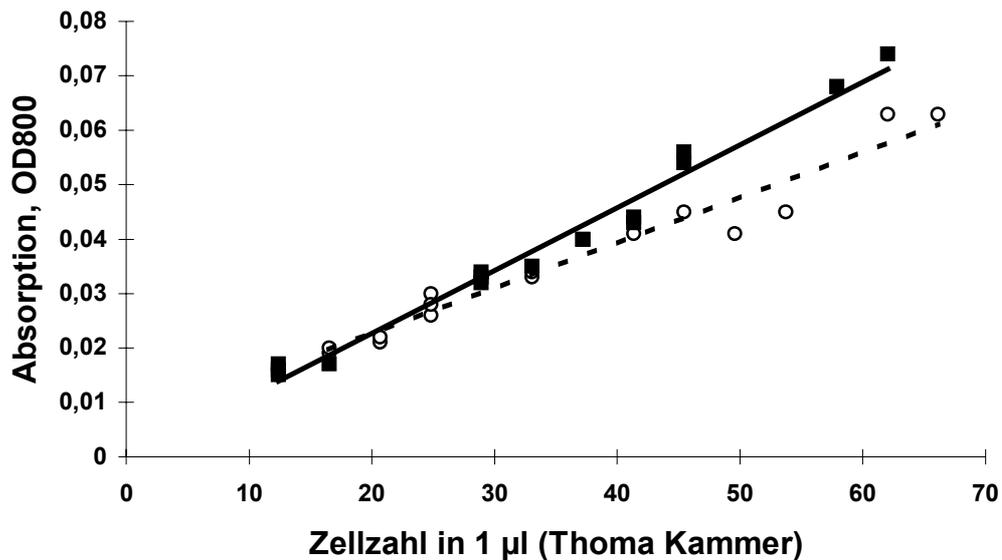


Abb. 26: Korrelation zwischen der Messung der Absorption bei 800 nm und der Zellzählung in einer Thomakammer für die Klone AB97.017A2 (durchgezogene Regressionskurve) und UTEX 2233 (gestrichelte Regressionskurve).



Abb. 27: Korrelation zwischen der Messung der Absorption bei 800 nm und der Bestimmung des Trockengewichts für den Klon AB97.017A2.

3.5.1.2 Belastung durch Eisen

Da Eisen das charakteristische Schwermetall des *Acarosporium sinopicae* ist, wurde die Reaktion von AB97.017A2 und UTEX 2233 auf erhöhte Fe-Konzentrationen untersucht. Fe ist das Schwermetall, das von den Organismen in der höchsten Konzentration benötigt wird und daher zwischen den Makro- und den Mikronährelementen steht (RICHTER, 1988). Beim englischen Weidelgras (*Lolium perenne* L.) ist es das am wenigsten toxische Schwermetall (WONG & BRADSHAW, 1982) und auch DUXBURY (1985) führt es als für Mikroorganismen unkritisches Schwermetall. Es ist notwendig für die Chlorophyllsynthese (Chlorose ist das erste Anzeichen eines Eisenmangels) und hat eine Funktion in vielen enzymatischen Reaktionen (MEHRA & FARAGO, 1994).

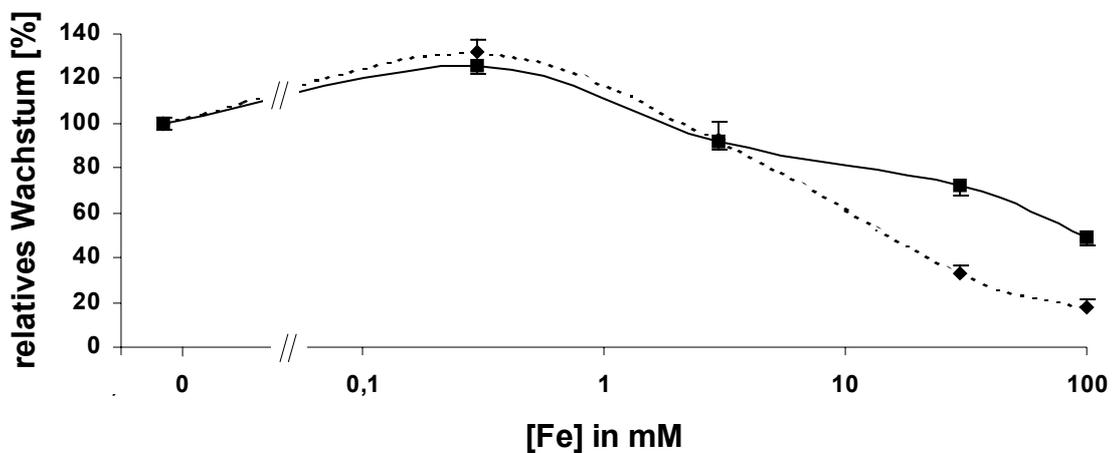


Abb. 28: Wachstum von AB97.017A2 (durchgezogene Kurve) und UTEX 2233 (gestrichelte Kurve) in Abhängigkeit von der eingesetzten Fe-Konzentration, bezogen auf das Wachstum der jeweils unbelasteten Kontrolle. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit der Standardabweichung ($n = 3$). Die Versuchsdauer lag bei drei Wochen.

Abbildung 28 zeigt, dass zusätzliches Fe^{2+} bis zu einer Konzentration von etwa 2 mM bei beiden Algenklonen das Wachstum verbessert. Bei dem nicht aus dem *Acarosporium sinopicae* stammenden Klon sogar mehr als bei dem Klon AB97.017A2. Höhere Fe-Konzentration werden aber von AB97.017A2 besser toleriert, was sich in einem deutlichen Unterschied (fast Faktor 5) in den EC_{50} -Werten widerspiegelt. Beträgt der EC_{50} -Wert nach 21 Tagen Kultur bei UTEX 2233 ca. 22,5 mM, so liegt er bei AB97.017A2 um 100 mM Fe (entsprechen 1,3‰ bzw. 5,6‰). Allerdings sind diese Eisen-Konzentrationen dermaßen hoch, dass sie in den von Regenwasser gebildeten Lösungen am Standort der Flechten nicht vorliegen dürften und Eisen in der Natur wohl nicht der wachstumshemmende Faktor ist. Die Experimente gestalteten sich schwierig, da bei den hohen Eisenkonzentrationen ein Teil des Eisens präzipitiert ist. Dieses Problem konnte gelöst werden, indem aus dem Überstand der Lösung mittels AAS der Fe-Gehalt bestimmt wurde und dieser als die effektive Fe-Konzentration betrachtet wurde. Aufgrund der aufwendigen Konzentrationsbestimmungen wurden keine weiteren Experimente mit Fe durchgeführt.

3.5.1.3 Belastung durch Kupfer

Da Kupfer – neben Eisen – das in den untersuchten Proben am häufigsten vorkommende Schwermetall darstellt (siehe Tab. 28) wurden die Algenklone auf ihre Resistenz gegenüber Kupfer untersucht. Kupfer ist ein essentielles Element und besitzt eine wesentliche Funktion in vielen Stoffwechselprozessen, z.B. Photosynthese, Respiration, Stickstoffreduktion, Stickstofffixierung und Proteinmetabolismus (MEHRA & FARAGO, 1994). Zu hohe Cu-Konzentrationen sind dagegen stark toxisch. Für Algen ist es nach Quecksilber das zweit-giftigste Schwermetall (REED & GADD, 1990) und damit das toxischste der im Substrat der untersuchten Flechten in höheren Konzentration vorkommenden Schwermetalle (vgl. Tab. 28). Aufgrund dieser Toxizität werden Kupfersulfat-Lösungen häufig zur Vermeidung von Algenwachstum als Algizid eingesetzt (0,0013–10 ppm, entsprechen 0,02–160 μM ; Pesticide Management Education Program at Cornell University: <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/herb-growthreg/cacodylic-cymoxanil/copper-sulfate/herb-prof-copper-sulfate.html>).

Trebouxia simplex [gt A] (AB97.017A2)

Die unbelastete Kontrolle von Klon AB97.017A2 vermehrte innerhalb von drei Wochen ihr Anfangsgewicht um den Faktor 14. Die Zugabe von 100 μM Cu führte zu einer leichten Zunahme des Trockengewichtszuwachses, alle höheren getesteten Cu-Konzentrationen verringerten den Gewichtszuwachs. Selbst bei 10 mM Cu wurde noch eine Gewichtszunahme beobachtet (8% der Kontrolle), die nicht mit zunehmender Versuchsdauer kleiner wurde, sondern über die gesamte Versuchszeit konstant blieb. Der EC_{50} -Wert betrug ca. 2,5 mM Cu, die das Wachstum gänzlich inhibierende Konzentration wurde nicht erreicht. Ein typisches Versuchsergebnis ist in Abbildung 29 dargestellt. In Langzeitversuchen wurde getestet, ob die Algenzellen derart hohe Schwermetallkonzentrationen nur kurzzeitig tolerieren können. Auch nach zwölf Monaten in LS-Medium mit 1 mM Cu, bei einem Überimpf-Intervall von zwei Monaten, wurden keine Veränderungen der Wachstumsfähigkeit der Algen-Zellen beobachtet. Folglich können die Zellen des Klones AB97.017A2 auch ein langanhaltendes Wachstum in Lösungen mit hohem Cu-Gehalt tolerieren.

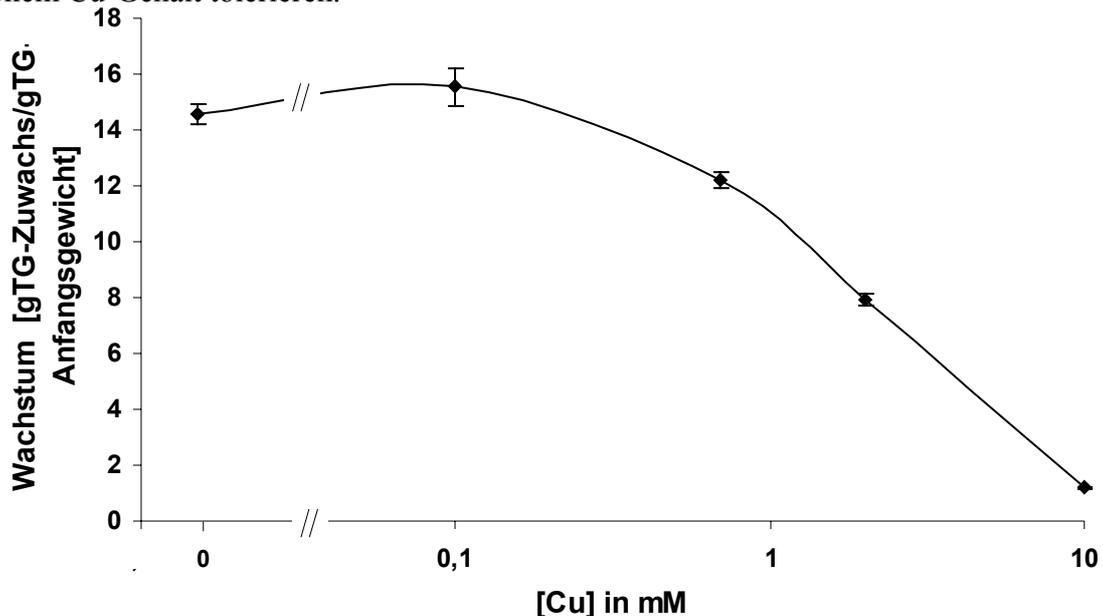


Abb. 29: Wachstum von AB97.017A2 in Abhängigkeit von der eingesetzten Cu-Konzentration. Das Anfangsgewicht betrug 1,8 mg in 750 ml LS-Medium. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit der Standardabweichung (n = 3). Die Versuchsdauer lag bei drei Wochen.

***Asterochloris irregularis* AB97.070B2**

Die unbelastete Kontrolle von Klon AB97.070B2 vermehrte innerhalb von drei Wochen ihr Anfangsgewicht um den Faktor 11. Das Wachstum der Zellen war also sehr ähnlich dem der Zellen von AB97.017A2. Die Zugabe von 100 μM Cu führte zu einer leichten Zunahme des Trockengewichtszuwachses, alle höheren getesteten Cu-Konzentrationen verringerten den Gewichtszuwachs. Auch bei 10 mM Cu wurde noch eine Gewichtszunahme beobachtet (2% der Kontrolle), allerdings erfolgte dieses nur in den ersten beiden Wochen. In der dritten Woche wurde – im Gegensatz zum Klon AB97.017A2 – kein weiteres Wachstum bei dieser Cu-Konzentration beobachtet. Der EC_{50} -Wert betrug ca. 1,2 mM Cu, die das Wachstum gänzlich hemmende Konzentration wurde nicht erreicht, dürfte aber sehr nahe bei 10 mM liegen, da bei diesem Wert nur ein sehr geringes, auf die ersten beiden Wochen beschränktes, Wachstum auftrat. Ein typisches Versuchsergebnis ist in Abbildung 30 dargestellt. In Langzeitversuchen wurde getestet, ob die Algenzellen derart hohe Schwermetallkonzentrationen nur kurzzeitig tolerieren können. Nach sechs Monaten in LS-Medium mit 1 mM Cu, bei einem Überimpf-Intervall von zwei Monaten, wurde kein Wachstum der Algen-Zellen mehr beobachtet und die Zellen starben ab.

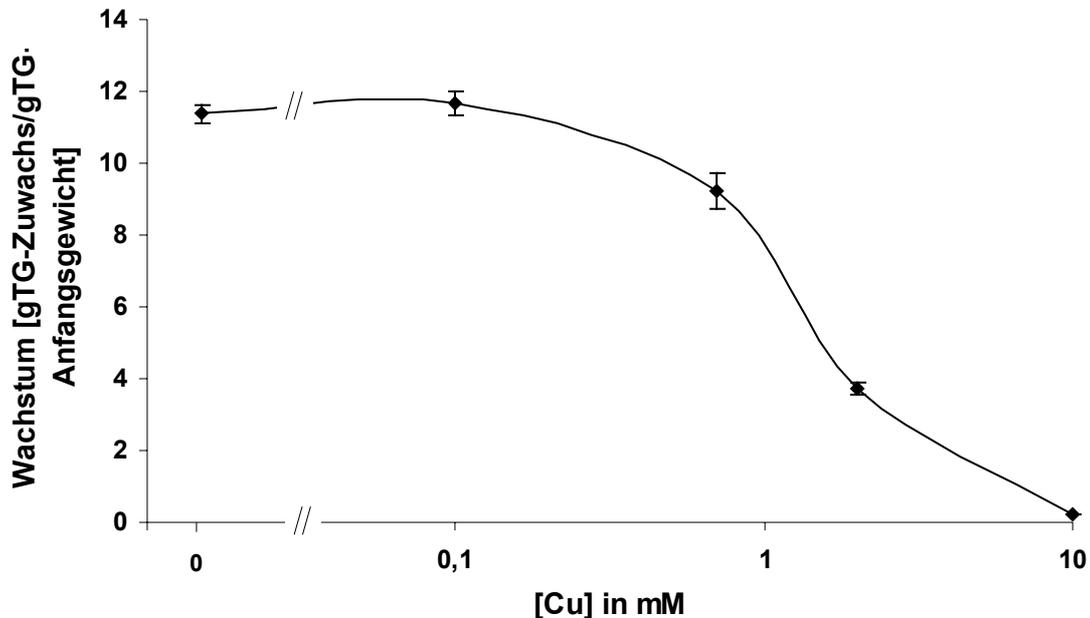


Abb. 30: Wachstum von AB97.070B2 in Abhängigkeit von der eingesetzten Cu-Konzentration. Das Anfangsgewicht betrug 24,4 mg in 750 ml LS-Medium. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit der Standardabweichung ($n = 3$). Die Versuchsdauer lag bei drei Wochen.

***Trebouxia jamesii* UTEX 2233**

Die Zellen von UTEX 2233 zeigten das langsamste Wachstum. Es lag mit etwas mehr als einer Verdopplung des Gewichts nach drei Wochen um etwa den Faktor zehn unter dem der anderen Klone. Die Zugabe von 100 μM Cu führte auch bei diesem Klon zu einer leichten Zunahme des Trockengewichtszuwachses, alle höheren getesteten Cu-Konzentrationen verringerten den Gewichtszuwachs. Bei 10 mM Cu wurde eine Gewichtsabnahme beobachtet, was auf ein Absterben von Zellen im Laufe des Versuches zurückzuführen ist. Der EC_{50} -Wert betrug ca. 0,6 mM Cu, die das Wachstum gänzlich hemmende Konzentration betrug 3 mM Cu. Ein typisches Versuchsergebnis ist in Abbildung 31 dargestellt.

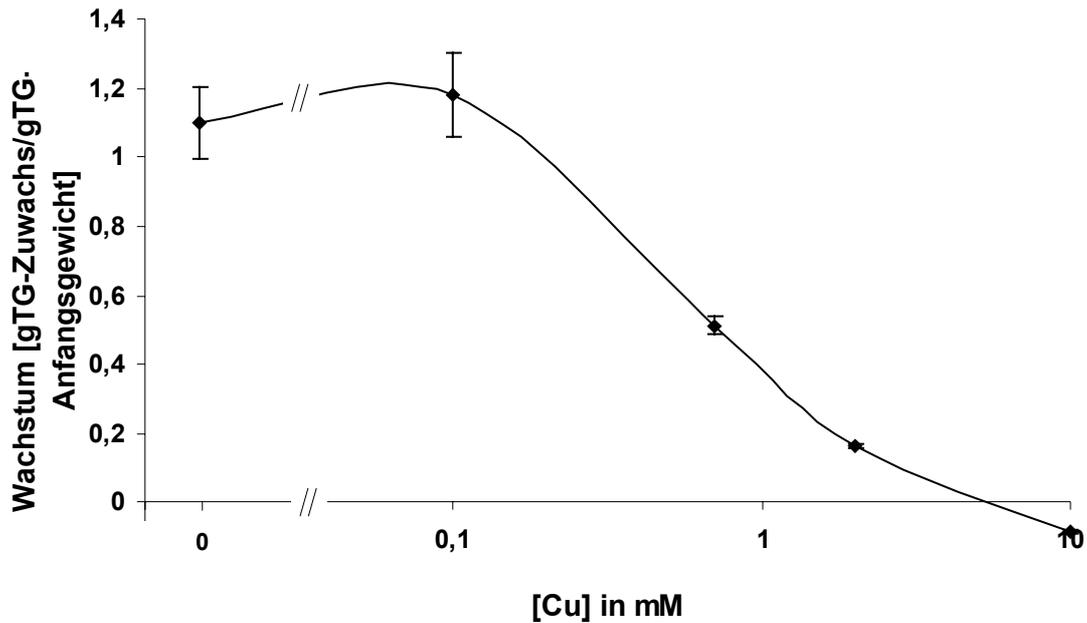


Abb. 31: Wachstum von UTEX 2233 in Abhängigkeit von der eingesetzten Cu-Konzentration. Das Anfangsgewicht betrug 4,5 mg in 750 ml LS-Medium. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit der Standardabweichung ($n = 3$). Die Versuchsdauer lag bei drei Wochen.

Vergleich der Werte für die drei Klone

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Cu-Resistenzversuche ist in Abbildung 32 dargestellt. Um die unterschiedlichen Wachstumsraten der Klone auszugleichen, wurde das Wachstum der Kontrolle gleich 100% gesetzt und alle anderen Werte ein und desselben Experiments auf diesen Wert bezogen. Es sind von jedem Klon mindestens zwei unabhängige Experimente dargestellt. Diese bestätigen die Unterschiede zwischen den Klonen. Der Klon von *Trebouxia simplex* [gt A], AB97.017A2, ist am tolerantesten gegenüber Cu, während der Klon *T. jamesii* UTEX 2233 am sensitivsten reagiert. Dies spiegeln auch die unterschiedlichen EC_{50} -Werte wider. Diese betragen 2,5 mM Cu für AB97.017A2, 1,2 mM Cu für AB97.070B2 und 0,6 mM Cu für UTEX 2233 (entsprechen 159, 76 bzw. 38 ppm). Damit unterscheiden sich die EC_{50} -Werte um jeweils den Faktor zwei.

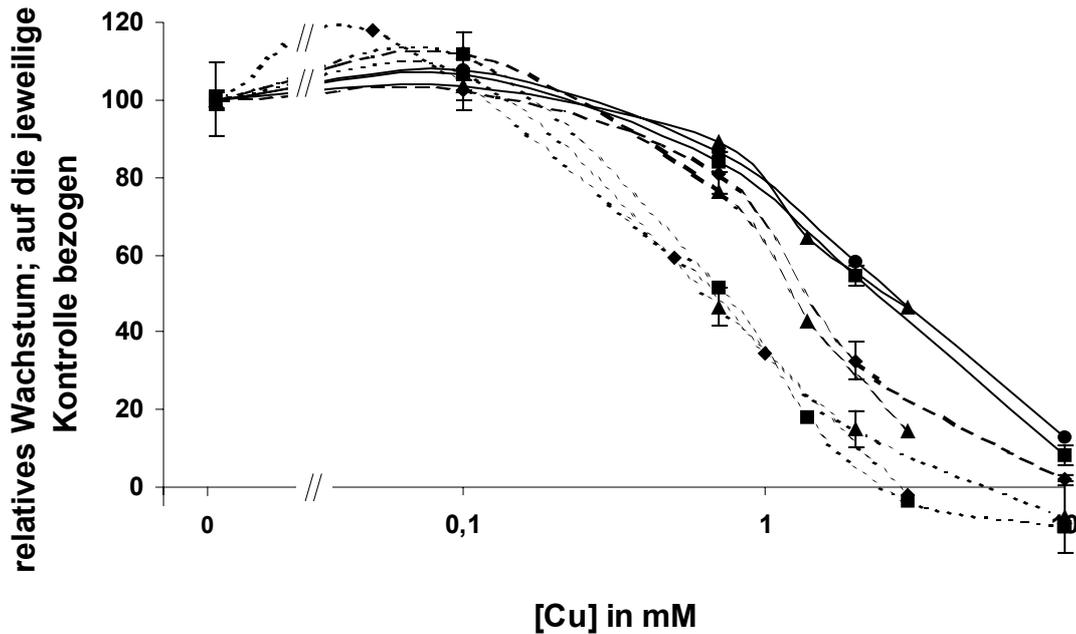


Abb. 32: Relatives Wachstum von AB97.017A2 (durchgezogene Kurven), AB97.070B2 (gestrichelte Kurven) und UTEX 2233 (punktierte Kurven) in Abhängigkeit von der eingesetzten Cu-Konzentration. Die Gewichtszuwächse sind jeweils auf das Wachstum der Kontrolle des entsprechenden Versuches bezogen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit der Standardabweichung ($n = 3$), ist keine Standardabweichung dargestellt, handelt es sich um Versuchsreihen mit nur einer Probe je Konzentrationsstufe. Die Versuchsdauer lag bei drei Wochen.

3.5.1.4 Belastung durch Cadmium

Obwohl nur in sehr geringen Mengen im Substrat der Flechten zu finden wurde Cd benutzt, um zum einen zu überprüfen, ob eine mögliche Resistenz sich auch auf andere Schwermetalle erstreckt. Außerdem sollte getestet werden, ob *Trebouxia* in der Lage ist, Phytochelatine zu bilden. Denn Phytochelatine – die wichtigsten pflanzlichen schwermetallentgiftenden Peptide – werden bei Belastung mit Cu und Cd (und vielen anderen Schwermetallen) gebildet, aber von Cd am stärksten induziert (GRILL, 1987).

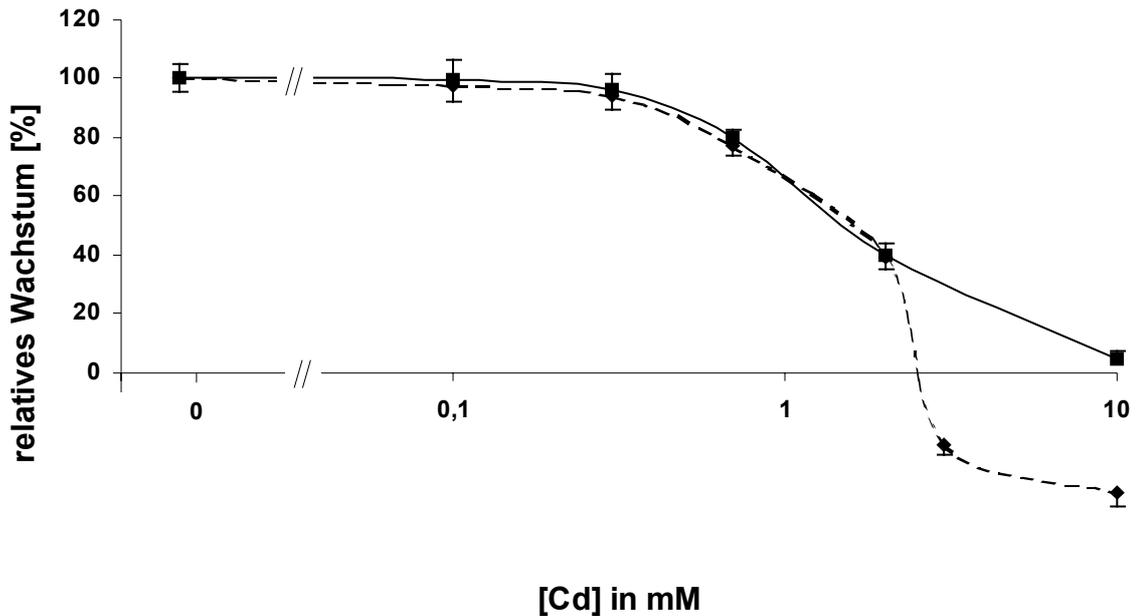


Abb. 33: Wachstum von AB97.017A2 und UTEX 2233 in Abhängigkeit von der eingesetzten Cd Konzentration, bezogen auf das Wachstum der jeweils unbelasteten Kontrolle. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit der Standardabweichung ($n = 3$). Die Versuchsdauer lag bei drei Wochen.

Abbildung 33 zeigt sowohl bei AB97.017A2 als auch bei UTEX 2233 eine Wachstumshemmung ab ca. 300 μM Cd. Der EC_{50} -Wert liegt bei beiden Klonen bei 1,5 mM. Ein Unterschied zwischen den beiden Klonen trat erst bei hohen Cd-Konzentrationen auf. Während die Zellen des aus dem *Acarosporium sinopicae* isolierten Klons selbst bei 10 mM Cd auch nach drei Wochen noch in unveränderter (bzw. leicht erhöhter) Zahl lebten, waren die Zellen von UTEX 2233 nach dieser Zeit nicht nur in ihrer Zahl reduziert, sondern auch nicht mehr lebensfähig, was durch anschließende Kulturversuche auf Agarplatten ohne Schwermetalle gezeigt werden konnte. Allerdings ist auch in diesem Fall, wie schon beim Fe, unwahrscheinlich, dass bei den im natürlichen Substrat vorhandenen Cd-Mengen (siehe Tab. 28) derart hohe, das Wachstum der untersuchten Klone unterschiedlich einschränkende, Cd-Konzentrationen erreicht werden.

Durch SH-Gruppen spezifische HPLC-Analyse von Schnellaufschlüssen konnte die Phytochelatin-Produktion sowohl beim UTEX 2233 Klon, als auch bei den Klonen AB97.070B2 und AB97.017A2 bei Belastung mit Cd nachgewiesen werden. Abbildung 34 zeigt einen Vergleich der HPLC-Chromatogramme von Zellextrakten aus belasteten und unbelasteten Zellen des Klons AB97.017A2 mit einer Referenz, die gereinigte Phytochelatine aus *Rauvolfia serpentina* enthielt (PC-Mix).

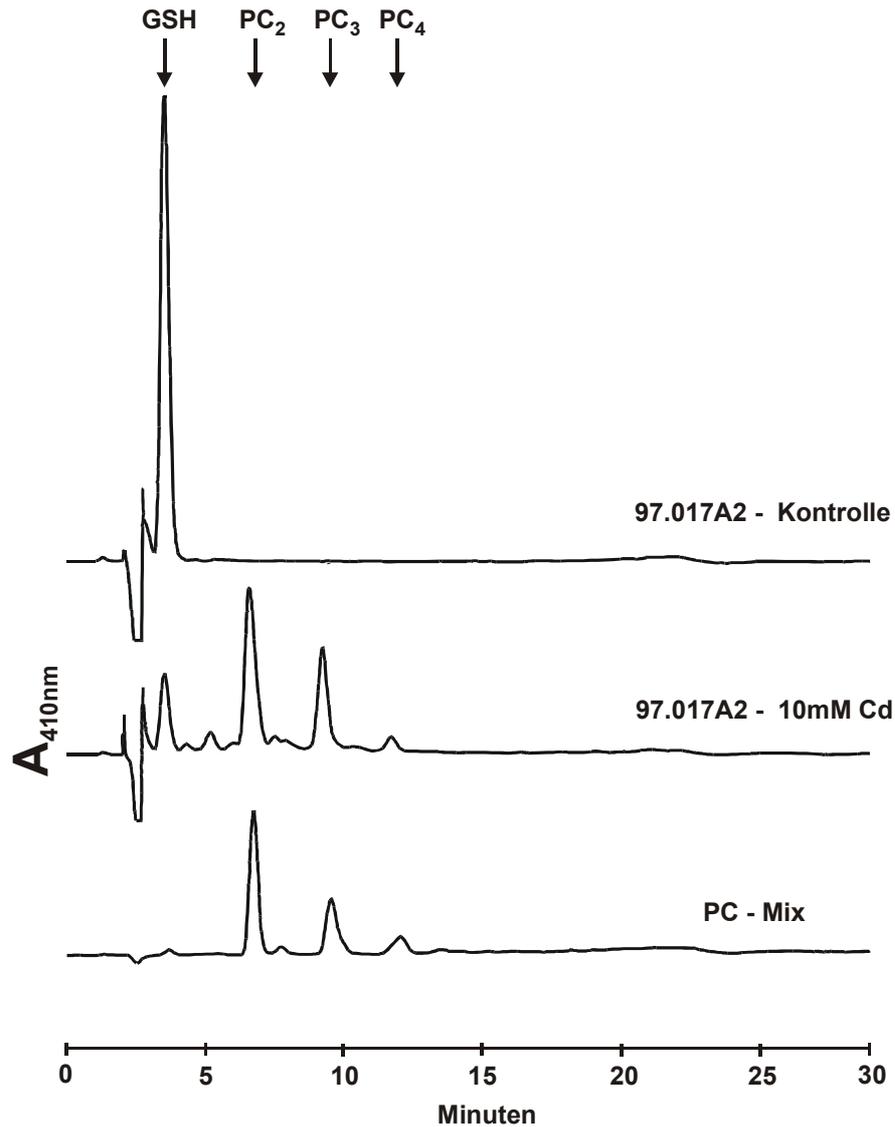


Abb. 34: Thiol-Analyse von Zellextrakten des Klon AB97.017A2. Das mittlere HPLC-Chromatogramm zeigt einen Extrakt aus Zellen, die für drei Wochen mit 10 mM Cd belastet worden sind. Das obere Chromatogramm zeigt die unbehandelte Kontrolle, das unterste eine Phytochelatinsreferenz-Lösung.

Die Produktion von Phytochelatinen wurde nur für den Klon AB97.017A2 aus dem *Acarosporium sinopicae* quantifiziert. Abbildung 35 zeigt, dass PC₂ das am häufigsten vorkommende Phytochelatins-Molekül ist, gefolgt von PC₃ und PC₄, wie es für die meisten der bisher untersuchten Algen gilt (GEKELER et al., 1988). Phytochelatine konnten ab der kleinsten untersuchten Konzentration von 0,1 mM Cd nachgewiesen werden, also bevor eine Wachstumsinhibition durch Cd eintrat.

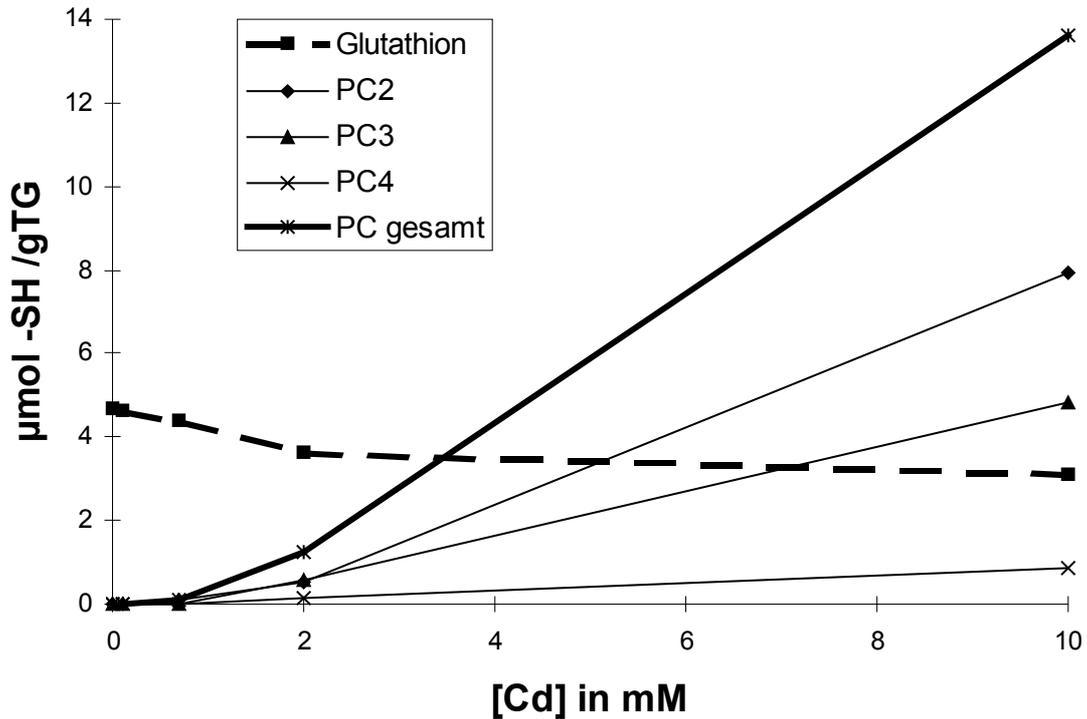


Abb. 35: Thiole (Glutathion und Phytochelatine) in AB97.017A2, belastet mit unterschiedlichen Cd-Konzentrationen. Die Zellen wurden drei Wochen bei den jeweils angegebenen Konzentrationen kultiviert und anschließend ihr Thiolgehalt durch RP-HPLC bestimmt.

Die in den Zellen vorhandene Menge an Glutathion lag mit ca. 4,5 μM pro g Trockengewicht in derselben Größenordnung wie bei den bisher untersuchten Pflanzen (0,4–4,1 μM / gTG; GEKELER et al., 1989). Die induzierte Menge an Phytochelatinen lag mit ca. 0,1 bis 14 μM SH-Gruppen pro g Trockengewicht (bei 0,1 bis 10 mM Cd) ebenfalls im Rahmen der bisher für Pflanzen gefundenen Werte (0,1–22,1 μM / gTG; GEKELER et al., 1989). Auch wenn ein direkter Vergleich der Werte für die Phycobionten und die Pflanzenzellsuspensionskulturen aufgrund der unterschiedlichen Kulturbedingungen schwierig ist, so kann doch davon ausgegangen werden, dass der untersuchte Klon AB97.017A2 aus dem *Acarosporium sinopicae* keine stark erhöhte Produktion von Phytochelatinen bei Schwermetallbelastung zeigt, verglichen mit belasteten Pflanzenzellsuspensionskulturen.

Durch Vergleich der Gelfiltrationen von Extrakten aus unbelasteten Algenzellen, denen das Cd erst nach dem Zellaufschluss zugesetzt worden ist (Abb. 36 oben) und aus mit 2 mM Cd für zwei Wochen belasteten Zellen (Abb. 36 unten) wurde eine Komplexbildung des Cd durch die induzierten Phytochelatine gezeigt. Während bei der Gelfiltration der unbelasteten Zellen das gesamte Cd mit den Proteinen eluierte (zwischen 40 und 60 ml Elutionsvolumen) und durch RP-HPLC keine Phytochelatine nachgewiesen werden konnten, so waren bei der Gelfiltration der belasteten Zellen drei Cd-Peaks zu beobachten. Ein erster Peak, der in etwa dem auch in der Kontrolle auftretendem Cd-Peak entsprach (allerdings geringfügig [2ml] später auftretend) und 49% des gesamten Cd enthielt, ein zweiter Peak bei 80 ml Elutionsvolumen mit 21% des Cd und ein dritter Peak bei 120 ml

mit 28% des Cd. Auch im UV-Profil waren die beiden neuen Cd-Peaks durch zusätzlich auftretende Schultern zu erkennen.

Die RP-HPLC-Analyse der Fraktionen des mittleren Cd-Peaks ergab ein gleichzeitiges Auftreten von PC₂ und Cadmium. Allerdings sind die in diesem Bereich auftretenden Phytochelatine (6,8 nmol) mengenmäßig zu gering, um das ganze mit ihnen eluierende Cd (60,4 nmol) zu komplexieren. Berücksichtigt man aber das gleichzeitig eluierende Glutathion mit, so errechnet sich ein Verhältnis von 2,3 SH-Gruppen je Cd-Atom, was in guter Näherung zu dem erwarteten Verhältnis von mindestens 2 SH-Gruppen je Cd²⁺-Ion steht. Der Einschluss von Glutathion in Phytochelatin-Cd-Komplexe wurde z.B. von PLOCKE & KÄGI (1992) berichtet, allerdings nicht in einem so großen Maße wie hier beobachtet. Durch RP-HPLC Analyse der übrigen Fraktionen konnte ein weiterer Phytochelatin-Peak nachgewiesen werden, der früher eluiert (um 50 ml) und sehr gut mit dem ersten Cd-Peak korreliert. Dieser ist bei der verwendeten Gelmatrix nicht vom Peak der großen Zellproteine getrennt, die zwischen 40 und 60 ml eluieren, sondern überlappt mit dessen letzten Hälfte. Vermutlich ist die im Bezug zur Kontroll-Gelfiltration auftretende Verschiebung des zuerst eluierenden Cd-Peaks auf die Komplexierung mit den gleichzeitig eluierenden Phytochelatinen zurückzuführen. In diesem Peak sind neben PC₂- auch die längeren PC₃- und PC₄-Moleküle sowie Glutathion vorhanden. Außerdem ist vermutlich noch Sulfid vorhanden, da sich beim Ansäuern der Proben ein deutlicher Geruch nach H₂S entwickelte. Das Auftreten von verschiedenen Komplexen von Phytochelatinen mit Schwermetallen, die durch Gelfiltration getrennt werden können und das Auftreten von Sulfid in den schwereren dieser Komplexe ist bereits von KNEER (1993) für *Rauvolfia serpentina* berichtet worden. Das Sulfid macht die Komplexe nicht nur stabiler, es erhöht auch die Effizienz der Cd-Komplexierung. Diese schweren Komplexe sind, im Gegensatz zu den leichteren (entsprechend kleineren) Komplexen des Cytoplasmas, in der Vakuole lokalisiert (SANITÀ DI TOPPI & GABBRIELLI, 1999). Bemerkenswert ist das Auftreten eines dritten Cd-Peaks im Bereich um 120 ml. Es erscheint unwahrscheinlich, dass es sich hierbei um freies Cd handelt, da im Falle der Kontrolle mit zugesetztem Cd niemals freies Cd beobachtet wurde, sondern dies immer mit dem Zellprotein-Peak eluierte. Daher scheint eine Komplexierung mit einer organischen Säure wahrscheinlicher. Für diese Interpretation sprechen auch Beobachtungen von KROTZ et al. (1989), nach denen bei Zellsuspensionskulturen von Tabak das Cd in der sauren Vakuole aus dem Cd-PC-Komplex freigesetzt wird und von organischen Säuren (Citrat, Malat, Oxalat) komplexiert wird.

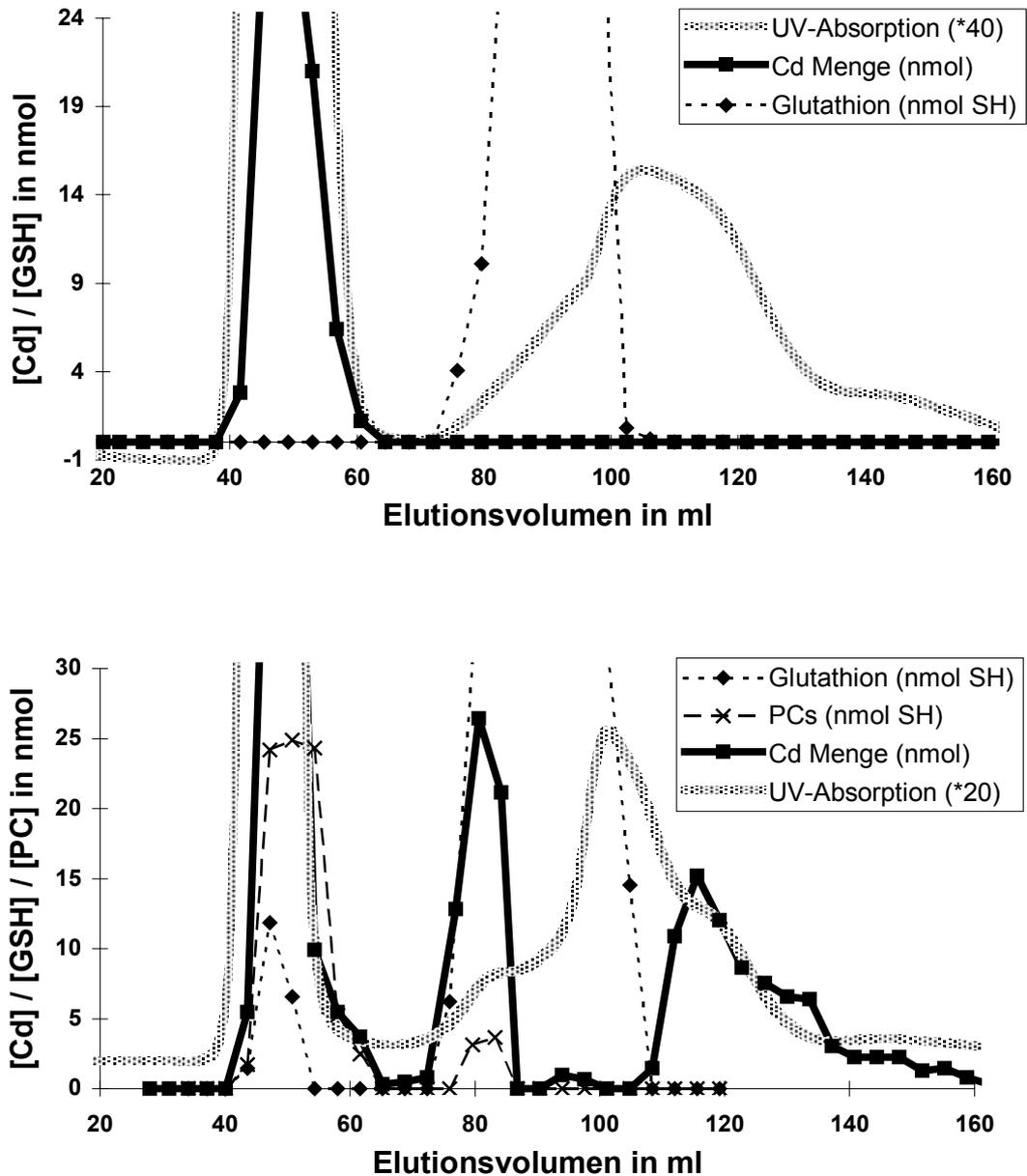


Abb. 36: Gelfiltrationen von Zellextrakten aus Zellen des Klons AB97.017A2. Die Zellen wurden mit 10 mM Tris-Cl (pH 8,0) extrahiert, der Extrakt (6 ml) auf eine Saphadex G25-Säule aufgetragen und mit 100 mM NaCl in 10 mM Tris-Cl (pH 8,0) eluiert. Aliquote der Fraktionen wurden mittels RP-HPLC auf Thiole und mit AES auf Cd untersucht.

Oben: Extrakt aus unbelasteten Zellen, dem 1,5 μmol Cd²⁺ zugesetzt wurde.

Unten: Extrakt aus Zellen, die drei Wochen mit 2 mM Cd²⁺ belastet wurden.

Ein Indiz für die Lagerung von Schwermetallen in der Vakuole ist das Auftreten von lichtmikroskopisch deutlich sichtbaren Vakuolen bei mit Schwermetallen belasteten *Trebouxia*-Zellen, während bei den unbelasteten Zellen unter gleichen Bedingungen keine Vakuole erkennbar ist. Dieser Sachverhalt findet auch eine Bestätigung im steigenden Wassergehalt der Zellen, der in einem größerem Wert des Frisch- zu Trockengewichtsverhältnisses zum Ausdruck kommt (Abb. 37).

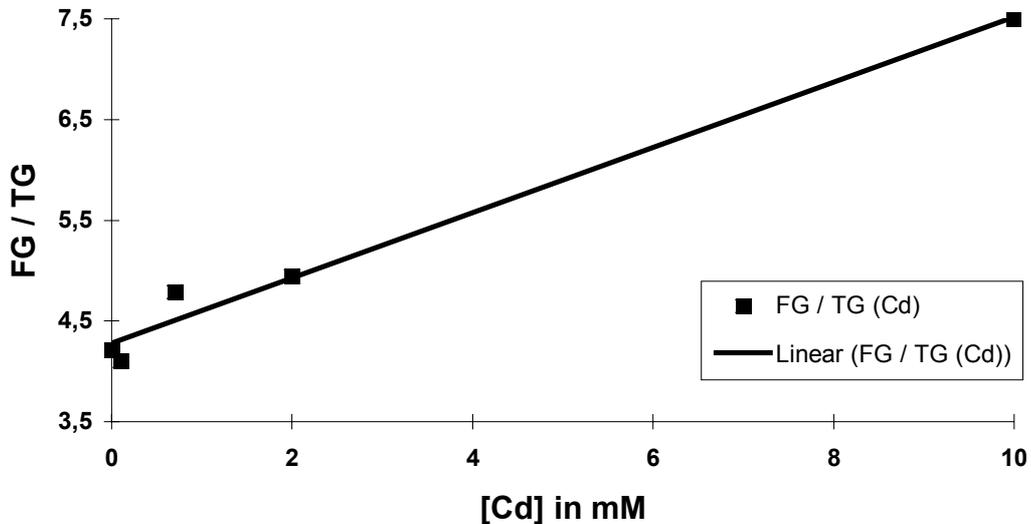


Abb. 37: Mit zunehmender Cd-Belastung steigt bei dem Klon AB97.017A2 auch das Verhältnis von Frisch- zu Trockengewicht. Die Zellen wurden jeweils für drei Wochen mit den angegebenen Mengen an Schwermetallen belastet.

3.5.2 Auswirkungen der Schwermetalltoleranz der Photobionten auf die Substratwahl und das Vorkommen der Flechten

Bei den bisherigen Untersuchungen chalkophiler Flechten wurde den Photobionten im allgemeinen kaum eine Rolle bei der Schwermetalltoleranz der Flechten beigemessen. Der Hauptgrund hierfür ist die Tatsache, dass im Flechtenthallus die Algenschicht einen geringen Gehalt an Schwermetallen aufweist, während diese z.B. im Mark gehäuft auftreten (LANGE & ZIEGLER, 1963; PURVIS et al., 2000). Allerdings wird hierbei vernachlässigt, dass – zumindest bei sich nicht vegetativ vermehrenden Flechten – eine Relichenisierung auf dem Substrat erfolgen muss und die Flechtenalgen also eine gewisse Zeit auf dem Substrat überleben müssen. Außerdem gibt es zunehmend Hinweise, dass Flechtenalgen durch Luftverschmutzung auch im Flechtenthallus geschädigt werden und dass neben SO₂ auch schwermetallreiche (Ni und Cu) Staubpartikel zu diesen Schädigungen führen können (TARHANEN et al., 2000).

3.5.2.1 Analyse des Schwermetallgehalts des Substrats

Von sämtlichen untersuchten Herbarbelegen wurde ein Teil des Gesteins für die Analyse der Schwermetallgehalte verwendet. Um zu untersuchen, inwieweit sich die Werte für die äußere und innere Gesteinsfläche unterscheiden wurde für den Herbarbeleg AB 030 von beiden Seiten eine Probe genommen. Die Werte für beide Proben waren sehr ähnlich, wobei die höheren Werte im Inneren des Gesteins gemessen wurden (AB 030 in). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die nach außen gerichtete Gesteinsfläche schon Schwermetalle ans Regenwasser abgegeben hat also etwas ausgelaugt worden ist. Um exemplarisch den Schwermetallgehalt von Flechten und ihres Substrats vergleichen zu können wurde auch *Lecidea inops* untersucht.

Um zu untersuchen, ob das Vorkommen von bestimmten Flechtenalgen mit dem Schwermetallgehalt des Substrats korreliert, wurde der Schwermetallgehalt des Substrats in Beziehung zu den auftretenden Flechten und deren Algenpartner gesetzt. Dabei fällt auf, dass Flechten mit *Asterochloris*-Photobionten erst bei einem Cu-Gehalt von deutlich unter 1 mg/g auftreten. Sämtliche Flechten, die auf Substraten von über 1mg/g wuchsen, hatten entweder *Trebouxia* oder *Chlorella saccharophila* als Algenpartner (vergleiche Tab. 28 mit der Liste der Herbarbelege im Kapitel „Herbarmaterial“; Seite 18).

Tab. 28: Schwermetallgehalte von *Lecidea inops* und des Gesteins, auf dem die Flechten des jeweiligen Herbarbelegs gewachsen sind. Die Tabelle ist nach steigender Cu-Konzentration geordnet. Auf den Steinen mit den neun höchsten Cu-Konzentrationen (oberhalb der dünnen Linie) wuchsen nur Flechten mit *Trebouxia* oder *Chlorella* Algenpartner. *Asterochloris* als Phycobiont trat erst bei Belegen mit weniger als 400 ppm Cu auf.

Herbarbeleg	Fe [mg/g]	Cu [ppm]	Zn [ppm]	Pb [ppm]	Cd [ppm]	Ni [ppm]	Co [ppm]	As [ppm]	P [ppm]
AB144b	142	29570	25	0	0	<14	175	<26	23
AB144a	109	16720	58	0	0	15	66	0	13
<i>L. inops</i> (AB144a)	13	12910	0	0	3	0	<9	0	10
AB265	19	5730	23870	13370	70	930	70	120	720
AB33	197	4480	60	<24	<2	n. best.	82	<12	n. best.
AB30 innen	135	4010	69	<28	<1	n. best.	56	<16	n. best.
AB30 außen	126	3070	64	<13	<4	n. best.	43	<13	n. best.
AB140	373	2910	44	<4	0	<2	35	<9	2
AB262	9	1780	40740	17300	100	880	30	20	670
AB143	66	1160	87	0	0	<5	36	0	970
AB261	11	720	59940	16890	110	630	20	0	410
AB38a	48	337	425	0	1	<18	48	0	1
AB145	174	328	0	0	0	0	55	0	352
AB141	122	282	34	0	0	14	21	0	260
AB260	11	250	8950	14590	30	600	20	20	340
AB179	44	240	139	0	2	0	56	0	2
AB46	89	240	458	<15	0	87	37	<38	<187
AB36	66	198	214	<25	<5	<25	<26	<7	<191
AB171	57	189	250	0	0	<3	<14	<17	<154
AB176	60	184	79	60	0	17	15	<31	194
AB142	79	178	104	0	0	0	30	0	162
AB56	18	163	157	0	1	0	21	0	467
AB55	28	155	200	0	0	0	<10	0	<170
AB178	69	117	149	49	0	0	22	<28	<28
AB61	125	113	90	0	0	<15	<24	<11	<103
AB149	41	105	189	0	0	27	26	0	<80
AB173	58	101	144	0	1	0	17	0	1
AB60	76	92	218	0	0	<7	<30	0	<136
AB64	20	83	67	0	1	0	12	0	704
AB53	64	82	63	0	0	<4	<18	<19	<55
AB177	129	76	184	<20	0	0	<14	<42	<55
AB172	72	75	342	<1	0	69	22	<20	<62
AB174	67	63	63	<8	0	28	<13	0	<50
AB45	54	62	162	<18	<1	135	37	<1	<43
JE 43014a	21	58	17	0	2	0	4	0	946
AB31	64	40	849	<28	<6	87	18	<18	<26
AB175	54	39	74	<9	1	28	17	0	425
AB63	86	39	176	<4	0	0	<17	<26	<53
AB 244	7	36	418	0	4	0	37	0	642
AB68	46	35	97	0	1	0	18	0	836
AB67	61	29	142	0	0	<2	<17	0	<8
AB152	41	24	107	0	1	0	31	0	1
AB54	62	20	56	0	0	<1	<12	<44	<36
AB236	30	16	139	0	2	5	35	0	314
JE 43014b	39	14	72	0	<1	0	5	0	342
AB235	22	8	102	0	<1	7	26	0	243
AB128	16	<19	74	0	1	<1	14	0	368
AB69	25	<10	79	<8	0	<1	<7	<22	0
HH 34159	99	<9	94	<8	0	10	16	<3	<9
AB47	9	<6	95	0	<2	<10	<10	<39	<5
AB65	45	<6	112	<10	<6	<4	14	<10	0
AB151	85	<1	183	<3	0	17	34	<6	0
AB126	18	<0	74	<1	1	11	18	0	77
AB148	155	<0	17	0	0	<13	26	0	<4

Lecidea inops besitzt mit 1,3% Kupfer im Thallus fast dieselbe Kupferkonzentration wie ihr Substrat (B144a; 1,7% Cu). Dies ist bemerkenswert, da bei der Präparation die untere Hälfte des Mark verworfen wurde, um sicherzustellen, dass kein Substrat mit abpräpariert wurde. Diese Kupfer-Menge liegt also nicht in Form von umwachsenen Substratpartikeln, sondern vermutlich hauptsächlich in der Form von Kupfer-Oxalat im Flechtenthallus von *L. inops* vor (vergleiche PURVIS, 1996). Diese Konzentrationen sind zudem nicht ungewöhnlich hoch, PURVIS (1996) fand bis zu 16% Kupfer im Thallus von *L. inops*. Im Gegensatz zu der beobachteten Kupfer-Akkumulation betrug der Eisenanteil des untersuchten *L. inops* Thallus mit 1,3% nur etwa ein Zehntel von dem des Substrats. Dieser Befund belegt eindeutig, dass der Kupfer-Gehalt der Flechte nicht auf eingeschlossene Gesteinspartikel zurückzuführen ist, sondern das Kupfer in anderer Form in der Flechte festgelegt ist.

3.5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Schwermetallresistenz

Die dargestellten Analysen zeigen, dass sich die untersuchten Flechtenalgen in ihrer Schwermetallresistenz unterscheiden. Am deutlichsten waren die Unterschiede bezüglich der Kupfertoleranz. Die höchsten Kupferkonzentrationen wurde von *Trebouxia simplex* [gt A] (AB97.017A2) toleriert, am sensitivsten war ein Klon von *Trebouxia jamesii* (UTEX 2233), der aus einer Flechte von nicht-schwermetallhaltigem Substrat isoliert wurde. Ebenso verhielt es sich mit Eisen (2+), allerdings waren hier sehr hohe Konzentrationen nötig, um eine Wachstumshemmung auszulösen. Eine vollständige Wachstumsinhibition konnte auch bei 100 mM Eisensulfat nicht beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten sich zwischen beiden Klonen Unterschiede im Wachstum nur bei sehr hohen Cadmiumkonzentrationen, der EC₅₀-Wert war für Cadmium bei beiden Klonen identisch. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Gehalten dieser Schwermetalle im Substrat der Flechten, von welchen sie isoliert wurden, da nur Eisen und Kupfer, nicht aber Cadmium im Substrat von *Trebouxia simplex* [gt A] in hohen Konzentrationen vorhanden waren. *Asterochloris irregularis* (AB97.070B2) wurde ebenfalls auf ihre Kupfertoleranz untersucht und zeigte eine zwischen beiden Klonen liegende Toleranz. Dieser Befund korreliert ebenfalls mit dem Kupfergehalt im Substrat, da diese Flechtenalge nur auf Gesteinen mit weniger als 400 ppm Kupfer gefunden wurde.

Durch SH-Gruppen spezifische HPLC-Analyse von Schnellaufschlüssen konnte die Phytochelatin-Produktion bei allen drei Klonen (UTEX 2233, AB97.070B2 und AB97.017A2) bei Belastung mit Cd nachgewiesen werden. Durch Gelfiltration wurde gezeigt, dass ein Komplex von Cadmium und Phytochelatinen gebildet wird, Phytochelatine also als Liganden für Cadmium dienen.

4 Diskussion

4.1 Schwermetalltoleranz-Untersuchungen

4.1.1 Schwermetalltoleranz von Photobionten und ihre Auswirkungen auf das Vorkommen von Flechten

Wie im Teil „Ergebnisse“ dargestellt, gibt es bei Flechtenalgen einen Zusammenhang zwischen der Kupfertoleranz und dem Kupfergehalt im Substrat der Flechte. Die untersuchten Algenklone von *Trebouxia simplex* [gt A] (AB97.017A2), *Asterochloris irregularis* (AB97.070B2) und *T. jamesii* UTEX 2233 zeigten eine unterschiedliche Toleranz gegenüber Kupfer, dem im Substrat nach Eisen am häufigsten vorkommenden Schwermetall. Die EC₅₀-Werte unterschieden sich um jeweils den Faktor zwei, wobei der von einem nicht schwermetallhaltigen Substrat isolierte Klon von *T. jamesii* am sensitivsten, der Klon von *T. simplex* [gt A] am tolerantesten war. Diese Reihenfolge entsprach der des Kupfergehaltes der Steine, auf denen sie wuchsen und könnte daher die unterschiedliche Fähigkeit der Algen widerspiegeln, diese Substrate zu besiedeln. Allerdings betragen die beobachteten Unterschiede der Kupfertoleranz nur den Faktor zwei, weshalb ihre Bedeutung am natürlichen Standort näher betrachtet werden soll.

Für die Wichtigkeit der Unterschiede in der Schwermetalltoleranz von Photobionten spricht, dass *Asterochloris irregularis*, der sensitivere Algenpartner von Flechten des *Acarosporium sinopicae*, nur in Flechten von Substraten mit Kupfergehalten unter 400 ppm als Photobiont vorkommt (siehe Tab. 28). Das Vorkommen der Flechten mit *Asterochloris* als Algenpartner ist folglich durch den Kupfergehalt des Substrats beschränkt. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass ebenso der Mykobiont dieser Flechten erhöhte Kupfergehalte nicht tolerieren kann, legen die Ergebnisse nahe, dass die Sensitivität des Algenpartners – zumindest anteilig – die Verbreitung dieser Flechten einschränkt. Dieses Erkenntnis ist von Bedeutung, da bisher bei den Untersuchungen zur Schwermetalltoleranz von Flechten das Augenmerk auf die – vom Mykobionten gebildeten – Schwermetall komplexierenden Substanzen gelegt und der Algenpartner nur wenig berücksichtigt wurde. Die Wichtigkeit des Algenpartners ist aber nicht verwunderlich, da auch MARTI (1983, 1985) einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Flechten und der Toleranz ihres Algenpartners bezüglich der Schadstoffe Sulfid, Sulfat, Nitrit, Nitrat und Zink zeigen konnte. Im allgemeinen erwies sich der Photobiont als der sensitivere der beiden Partner (MARTI, 1985).

Es wäre denkbar, dass der Photobiont zwar während des symbiontischen Lebensabschnitts vom Mykobionten geschützt wird, er muss aber unmittelbar vor einer Relichenisierung in der Lage sein, ohne derartigen Schutz auf schwermetallhaltigem Substrat zu überleben. Dieser Zeitraum könnte der bedeutendste limitierende Faktor für das Vorkommen des Photobionten und damit der Flechte sein. Dieser Engpass wäre für eine große Zahl der Flechten des *Acarosporium sinopicae* und *Lecideetum inopis* von Bedeutung, da die Mehrzahl dieser Flechten keine lichenisierten Diasporen bildet. Zu diesen gehören alle untersuchten Flechten mit *Asterochloris*-Photobionten. Da aber Flechten mit und ohne lichenisierte Diasporen oft sehr nahe miteinander verwandt sind (sogenannte „Artenpaare“, POELT, 1972; BUSCHBOOM, pers. Mitt. für *Porpidia melinodes* / *P. flavocaerulescens*),

scheint die Fähigkeit zur Bildung von lichenisierten Diasporen verhältnismäßig leicht erlangt werden zu können. Die Tatsache, dass dennoch keine der untersuchten Flechten mit *Asterochloris*-Photobionten lichenisierte Diasporen bildet, spricht dagegen, dass der Zeitraum ohne Schutz durch den Mykobionten der ausschlaggebende limitierende Faktor bezüglich der Verbreitung der Photobionten und damit der Flechte ist. Schließlich wäre nur schwer zu erklären, warum diese Flechten nicht in der Lage gewesen sein sollten, ihr Verbreitungsareal durch diesen „einfachen“ Mechanismus zu vergrößern. Es ist allerdings zu beachten, dass die Bildung von Soredien auch Nachteile hat, z.B. wird das Eindringen von lichenicolen Pilzen erleichtert und die Wasserhaltefähigkeit durch die unterbrochene Rinde verringert. Obwohl aufgrund der unzureichenden Datenlage zu diesen Nachteilen eine genaue Abwägung derzeit nicht möglich ist, wird aufgrund des Vorkommens von sorediösen Flechten mit *Trebouxia*-Photobionten davon ausgegangen, dass diese Nachteile keine allzu großen Hindernisse darstellen.

Wenn der aposymbiontische Zeitabschnitt nicht der für das Vorkommen des Photobionten ausschlaggebende limitierende Faktor ist, muss davon ausgegangen werden, dass auch der symbiontische Lebensabschnitt wichtig ist, der Algenpartner also auch im Flechtenthallus hohen Schwermetallkonzentrationen ausgesetzt ist. Bezüglich der Toxizität von Schwermetallen spielt weniger deren Gesamtkonzentration als vielmehr ihre verfügbare Menge eine Rolle. Da Kupferionen bei den niedrigen pH-Werten des *Acarosporium* besser in Lösung bleiben als Eisenionen, die zuerst oxidiert werden und ausfallen, sind sie verfügbar (PURVIS & HALLS, 1996). Von den Flechten wird Eisen akkumuliert, das Kupfer aber bleibt in Lösung und kann durchaus wachstumshemmend wirken, gerade weil es unter diesen Bedingungen im Thallus nicht festgelegt (und daher auch nicht akkumuliert) wird. Wenn durch die Entgiftungsstrategien des Mykobionten eine Festlegung der Schwermetalle im Flechtenthallus erfolgt (z.B. durch Komplexierung der Schwermetalle mittels Oxalat oder sekundäre Flechtenstoffe und deren Kristallisation in algenfreien Bereichen), sind auch die Photobionten Schwermetallen ausgesetzt. Flechten können aus, z.B. auf ihrer Rinde, abgelagerten Partikeln die Schwermetalle herauslösen und an anderer Stelle, z.B. im Thallus und den Apothecien, in anderer Form gebunden speichern (PURVIS et al., 2000). Zumindest in der Übergangsphase sind die Schwermetalle dann auch den Algen zugänglich, selbst wenn die abschließende Fällung in der Regel außerhalb der Algenschicht stattfindet. So wird Blei in der Medulla (bei *A. smaragdula*; PURVIS et al., 2000) oder im Primärthallus (bei *Stereocaulon vesuvianum*; JONES et al., 1982) festgelegt.

Es ist also davon auszugehen, dass die im Labor beobachteten Unterschiede in der Schwermetalltoleranz der Photobionten auch am natürlichen Standort von Bedeutung sind. Im folgenden soll diskutiert werden, ob auch Daten anderer Arbeiten diese Befunde stützen.

Vergleich mit Daten anderer Autoren

SCHWAB (1986) ordnete die von ihm untersuchten Flechten nach ihrer Toleranz gegenüber dem Eisengehalt im Substrat, wobei allerdings keine Messungen, sondern Beobachtungen der Gesteinsoberflächen zugrundegelegt wurden. Bezieht man die in dieser Arbeit nachgewiesenen Photobionten in die Betrachtungen mit ein, so stellt man fest, dass die drei tolerantesten Flechtenarten von SCHWAB's Reihung, *Lecidea silacea*, *Miriacidia atrofulva* und *Tremolecia atrata*, mit *Trebouxia* lichenisiert sind (vgl. Abb. 38). Erst danach folgen Flechten mit *Asterochloris*-Photobionten wie *Porpidia flavocaerulescens* und *P. macrocarpa*. Bedenkt man, dass Kupfersulfid oft mit Eisensulfid vermischt vorkommt

(PURVIS & HALLS, 1996), so könnte in dieser Reihung, die nach dem Eisengehalt im Substrat erfolgte, auch die mangelnde Kupfer-Toleranz des benötigten Photobionten für das Fehlen der Flechten verantwortlich sein.

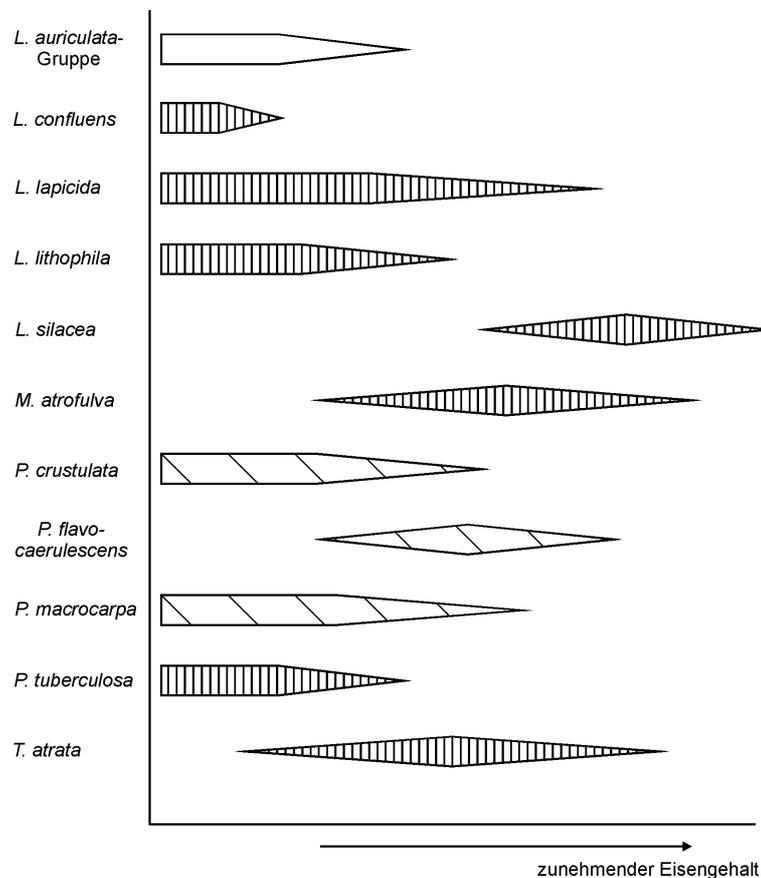


Abb. 38: Schematische Übersicht über den Eisengehalt des Substrats, auf dem Arten der Gattungen *Lecidea*, *Miriquidica*, *Porpidia* und *Tremolecia* wachsen (nach SCHWAB, 1986, verändert). Die Schraffuren bezeichnen die in dieser Arbeit nachgewiesenen Photobionten-Gattungen der Flechten: vertikale Linien: *Trebouxia*, schräge Linien: *Asterochloris*.

Ein weiterer Hinweis auf die Wichtigkeit der beobachteten Unterschiede in der Schwermetalltoleranz von Photobionten ist die Tatsache, dass bisher keine Flechte mit *Asterochloris*-Photobionten bekannt ist, die auf kupferreichem Gestein wächst und Kupfereinschlüsse aufweist. In einer Aufstellung aus 13 Publikationen werden von PURVIS & HALLS (1996) 16 Flechtenarten mit Kupfereinschlüssen genannt. Von diesen wurden in der vorliegenden Arbeit *Acarospora rugulosa*, *A. smaragdula*, *Bellemeria alpina*, *B. subsorediza*, *Lecanora polytropa*, *Lecidea inops*, *L. lapicida* var. *pantherina* und *Psilolechia leprosa* untersucht, und bei keiner dieser Flechten *Asterochloris* als Photobiont gefunden. Obwohl *Buellia aethalea* (ACH.) TH.FR., *Hypotrachyna lecanoraceae*, *Lecanora cascadiensis* H.MAGN., *L. galactiniza* NYL., *L. ludwigii* ACH., *Lecidella bullata* KÖRB., *Miriquidica lulensis* (HELLB.) HERTEL & RAMBOLD und *Tephromela testaceoatra* (VAIN.) HERTEL & RAMBOLD noch nicht untersucht wurden, erscheint es unwahrscheinlich, dass eine dieser Flechten mit *Asterochloris* assoziiert ist, da dieser Photobiont in den Physciaceae und Lecanoraceae (zu denen alle genannten Flechten mit Ausnahme von *Hypotrachyna* gehören) bisher nicht gefunden wurde. Aus den Parmeliaceae, zu denen *Hypotrachyna* gehört, liegen zwar einige wenige Nachweise von *Asterochloris* als Algenpartner vor (FRIEDL, 1989b), RAMBOLD et al. (1998) empfehlen jedoch, diese

aufgrund ihrer Seltenheit noch einmal zu verifizieren. Daher kann davon ausgegangen werden, dass keine Flechte mit Kupfereinschlüssen *Asterochloris* als Algenpartner besitzt, während die schwermetalltolerante Art *Trebouxia simplex* [gt A] in dieser Arbeit in mehreren Flechten nachgewiesen wurde.

Aufgrund der Vielzahl an Belegen für das eingeschränkte Vorkommen von Flechten mit *Asterochloris*-Photobionten auf schwermetallreichem Gestein wird davon ausgegangen, dass die beobachteten Unterschiede in der Schwermetalltoleranz von Algenpartnern einen Anteil an dieser Einschränkung haben. Ebenso kann das Fehlen von Flechten mit Cyanobionten auf die größere Sensitivität der Cyanobionten als der Phycobionten gegenüber Schwermetallen (zumindest auf Zn, Cd und Cu; BROWN & BECKETT, 1983) zurückgeführt werden. Inwieweit auch die Mykobionten dieser Flechten – und nicht nur ihre Algenpartner – auf die weniger schwermetallhaltigen Substrate beschränkt sind, lässt sich derzeit nicht beurteilen, da Versuche hierzu wegen des sehr geringen Wachstums der Mykobionten nicht durchgeführt werden konnten.

4.1.2 Die Schwermetalltoleranz von Flechtenalgen beeinflusst die Photobiontenwahl von Mykobionten nicht

Aufgrund der, gegenüber dem häufigsten Photobionten-Klon *Trebouxia simplex* [gt A], geringeren Schwermetalltoleranz von *Asterochloris irregularis* und des Fehlens von *Trebouxia jamesii* im *Acarosporium* liegt es nahe anzunehmen, dass das Photobiontenspektrum wegen der Toxizität des Substrats eingeschränkt sei. Ein eingeschränktes Photobiontenspektrum könnte Einfluss auf die Photobiontenwahl von Mykobionten ausüben, da letztere bei der Wahl eines alternativen Photobionten ihr Verbreitungsgebiet ausdehnen könnten. Wenn diese Annahme gelten würde, wären diese Mykobionten – je nach Schwermetallgehalt der Substrate – mit unterschiedlichen Photobionten assoziiert. Diese Hypothese soll im folgenden näher betrachtet werden.

Nur *Asterochloris* scheint in seinem Vorkommen durch den Schwermetallgehalt des Substrats beschränkt zu sein (siehe oben), eine hohe Schwermetallkonzentration im Substrat schließt das Vorkommen von Photobionten-Arten aus anderen *Trebouxia*-Gruppen als der *T. simplex*-Gruppe jedoch nicht aus. So wurden Vertreter aus der *Trebouxia arboricola*-Gruppe sowohl in Australien im *Acarosporium sinopicae* als auch im Harz im *Lecideetum inopis* gefunden. Anscheinend besitzen Vertreter der Gattung *Trebouxia* entweder ein genetisch festgelegtes hohes Maß an Schwermetalltoleranz, wie dies auch für schwermetalltolerante Pilze postuliert wurde (GADD, 1993), oder die beobachtete Schwermetalltoleranz konnte schnell erworben werden und ging mit nur wenigen anderen genetischen Änderungen einher. Dies folgt aus der Beobachtung, dass sich die ITS- und 1512-Intron-Sequenzen von *Trebouxia simplex* [gt A] im *Acarosporium sinopicae* nicht von der aus einigen Vertretern dieser Art von nicht schwermetallbelasteten Substraten unterscheiden (AB98.120A1, AB98.121B1, AB99.085B1, AB99.088B2, AB99.089A3; vgl. Tab. 20 und 23). Auch die aus vom Harz stammenden Material isolierten Klone der Art *T. incrustata* unterscheiden sich in der ITS-Region nur durch zwei Basenunterschiede vom Typusklon dieser Art (der aus einer auf nicht schwermetallhaltigen Substrat wachsenden *Lecanora dispersa* isoliert wurde). Die Tatsache, dass genetisch sehr ähnliche Photobionten als Algenpartner in Flechten sowohl schwermetallhaltiger als auch unbelasteter Substrate vorkommen, spricht gegen eine Beeinflussung der Photobiontenwahl der Mykobionten durch das Substrat. Wenn nämlich der Schwermetallgehalt des Substrats

steigt, so fehlen die Flechtenarten mit den weniger toleranten Photobionten (z.B. *Porpidia macrocarpa*), wechseln aber nicht ihren Algenpartner.

4.1.3 Einfluss der Versuchsbedingungen auf die Schwermetalltoleranz

Da die Kulturbedingungen einen Einfluss auf die Schwermetalltoleranz von Organismen haben, sollen im Folgenden mögliche Effekte diskutiert werden. Dies scheint auch aufgrund der zwischen den Klonen nur um den Faktor zwei verschiedenen EC_{50} -Werte für Kupfer erforderlich.

Die Toxizität von Schwermetallen wird auch durch den pH des Mediums beeinflusst. Im stärker sauren Milieu ist die Toxizität reduziert, da die Aufnahme der Metallionen in die Zelle vermindert ist (PETERSON et al., 1984, SKOWROŃSKI et al., 1991). Daher wäre es möglich, dass die beobachteten Unterschiede in der Schwermetalltoleranz durch eine verschieden starke Ansäuerung des Mediums durch die Algen bedingt ist. Bei pH-Messungen wurde festgestellt, dass die Algen durch ihr Wachstum das Medium ansäuern, wobei das Maß der Ansäuerung mit der Größe des Wachstums korrelierte. Zu dem vorhandenen Phosphat-Puffer sollte kein weiterer Puffer zugesetzt werden, da dieser die Schwermetallionen zum Teil komplexiert und folglich einen Einfluss auf die Verfügbarkeit der Schwermetallionen ausgeübt hätte. Daher wurde der pH des Mediums in wöchentlichen Abständen überprüft und die aufgetretene Ansäuerung durch Zugabe von Natronlauge ausgeglichen. Die Unterschiede in der Schwermetalltoleranz (gemessen durch den EC_{50} -Wert) sind also nicht in der unterschiedlichen Ansäuerung des Mediums begründet. Dies ist auch daraus ersichtlich, dass der Klon von *A. irregularis* das Medium am stärksten ansäuert, er aber nicht der toleranteste Klon ist. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Ansäuerung des Mediums aufgrund des Wachstums auftritt (durch den Antiport von Protonen mit den aufgenommenen Kationen) und nicht ursächlich die Schwermetalltoleranz bedingt. Die untersuchten Photobionten können selbst bei niedrigen pH-Werten (bis pH 2,5) wachsen. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass am natürlichen Standort durch die Verwitterung des Eisensulfid zu Schwefelsäure und Eisensulfat ein saurer pH-Wert von 3–4 vorliegt (WIRTH, 1972). Bei Versuchen ohne pH-Korrektur würde dieser erst nach ca. drei Wochen von der am schnellsten wachsenden Kultur (Kontrolle und 0,1 mM Cadmium / Kupfer) erreicht.

Algen reagieren im allgemeinen sehr empfindlich auf Kupferlösung, weshalb Kupfersulfat als effektives Algizid in Konzentrationen von 0,0013–10 ppm (entsprechend 0,02–160 μ M) eingesetzt wird (Pesticide Management Education Program at Cornell University: <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/herb-growthreg/cacodylic-cymoxanil/copper-sulfate/herb-prof-copper-sulfate.html>). Die bei den Algenklonen beobachteten EC_{50} -Werte für Kupfer liegen zwischen 0,6 und 2,5 mM und sind damit in allen Fällen sehr hoch. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass aufgrund der gewählten Kulturbedingungen (10°C) kein direkter Vergleich dieser Werte möglich ist, da die Algizidanwendungen meist bei deutlich höheren Temperaturen erfolgen. Es ist bekannt, dass niedrige Temperaturen und pH-Werte den Transport von Cd in die Zellen verringern (z.B. von *Stichococcus bacillaris*; SKOWROŃSKI, 1986), und dies dürfte auch für andere Schwermetallionen gelten. Dennoch können diese Faktoren nicht die alleinige Erklärung für die hohe beobachtete Kupfertoleranz sein, denn der Versuchszeitraum wurde als Kompensation für einen eventuell verringerten Transport deutlich größer gewählt (3 Wochen statt 4 Stunden wie bei SKOWROŃSKI, 1986). Die starke Induktion von

Phytochelatinen bei Cd-Belastung und die Demonstration eines Phytochelatin-Cd-Komplexes sind eindeutige Indizien, dass Cadmium in die Zellen aufgenommen wurde und daher die Kulturbedingungen nicht den Transport von Schwermetallen in die Zellen verhindern. Darüber hinaus sind die gewählten Kulturbedingungen mit Temperaturen um 10°C für alpine Organismen nicht ungewöhnlich niedrig, vielmehr entsprechen sie in etwa den Bedingungen, die auch am natürlichen Standort anzutreffen sind. Ein weiterer Hinweis hierauf ist auch die Tatsache, dass die Algen bei Kultur bei 23°C innerhalb von zwei Monaten abgestorben sind, sie benötigen also niedrigere Temperaturen für ihr Überleben. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Schwermetalltoleranzen auch am natürlichen Standort auftreten.

4.1.4 Mechanismen der Schwermetalltoleranz von Flechtenalgen

In dieser Arbeit konnte erstmals für Vertreter der wichtigen Flechtenalgengattung *Trebouxia* am Beispiel des Cadmium gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, bei Schwermetallexposition Phytochelatine zu bilden, mit diesen Schwermetallionen zu komplexieren und so in einen weniger schädlichen Zustand zu überführen. Hierin besteht für sie eine Möglichkeit, Schwermetallbelastungen zu tolerieren. Weitere Experimente an mehreren isolierten Klonen sind nötig, um einen besseren Überblick über mögliche unterschiedliche Potentiale der Phytochelatinbildung und ihrer Bedeutung bei der Schwermetalltoleranz von Flechtenalgen und Flechten im ganzen zu erhalten. Über Phytochelatinbildung von Flechten bei Schwermetallstress wurde von PAWLIK-SKOWROŃSKA et al. (2001) in einem Symposiums-Abstrakt für corticole Laubflechten des *Physcietum adscendentis* berichtet.

Die Mechanismen der festgestellten Kupfertoleranz konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht werden. Als mögliche Resistenzmechanismen kommen verschiedene Faktoren in Betracht: eine verringerte Aufnahme in die Zelle (z.B. durch Immobilisierung außerhalb der Zelle, oder einen erniedrigten Transport in das Zellinnere), die Bindung der Metallionen an intrazelluläre Komplexbildner (z.B. Phytochelatine) oder eine generelle cytoplasmatische Toleranz. Für manche dieser Faktoren sind bereits Beispiele aus den Grünalgen bekannt. So scheiden Algen Substanzen in das sie umgebende Medium aus, die Schwermetalle komplexieren können und daher die Konzentration an freien Metallionen herabsetzen. Beispiele dafür sind organische Säuren und substituierte Kohlenhydrate (z.B. RAUSER, 1999, LOMBARDI & VIEIRA, 2000). In einer Untersuchung von Phytoplankton konnten PISTOCCHI et al. (2000) zeigen, dass diejenigen Diatomeen am tolerantesten gegenüber Kupfer und Cadmium sind, die die meisten substituierten Kohlenhydrate in das Medium abgeben. An *Chlorella vulgaris* BEIJ. var. *vulgaris* konnte FOSTER (1977) zeigen, dass die verringerte Aufnahme von Schwermetallionen in die Zelle eine Möglichkeit ist, höhere Schwermetallkonzentrationen im Medium zu tolerieren. Die Unterschiede in der Kupfertoleranz von zwei Stämmen von *C. vulgaris* waren auf die unterschiedliche Kupferaufnahme der Zellen zurückzuführen. Wurden die Wachstumsraten der Stämme statt mit der Kupferkonzentration im Medium mit dem Trockengewichtsanteil an Kupfer in den Zellen korreliert, so zeigte sich kein Unterschied zwischen den Stämmen. Phytochelatine als intrazelluläre schwermetallbildende Peptide sind von einigen Grünalgen bekannt (z.B. GEKELER et al., 1988) und konnten in dieser Arbeit auch für *Trebouxia* bei Cadmium-Belastung nachgewiesen werden. Zusätzlich zu den enzymeschädigenden Wirkungen durch die Reaktionen mit deren SH-Gruppen muss bei Kupferbelastung auch der durch die Bildung von aktiven Sauerstoffspezies ausgelöste oxidative Stress

berücksichtigt werden (z.B. NAGALAKSHMI & PRASAD, 2001). An der Bewältigung des oxidativen Stress sind ebenfalls Enzyme aus dem Glutathionzyklus beteiligt, da Glutathion das wichtigste Antioxidans der Zelle ist und damit eine weitere wichtige Funktion bei der Kupfertoleranz besitzt – neben seiner Funktion als Edukt bei der Phytochelatinbildung. Künftige Analysen der Kupfertoleranz sollten daher auch diese Enzyme mit einschließen.

4.2 Identität, Selektivität, Spezifität und Koevolution von Flechtenbionten

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Vielzahl der bearbeiteten Flechtenbionten nicht nur morphologisch, sondern auch molekular charakterisiert. Diese Ergebnisse sollen im Folgenden unter dem Aspekt der Interaktion beider Partner diskutiert werden.

4.2.1 Phylogenetische Position der Flechtenalgen

Die morphologischen und molekularen Untersuchungen zeigen, dass offensichtlich noch bei weitem nicht alle als Photobionten vorkommenden Algenarten bekannt sind. Neben den vier neuen Arten in der *Trebouxia simplex*-Gruppe konnte für *Apatococcus lobatus* und *Chlorella saccharophila* erstmals eindeutig ihr Vorkommen als Flechtenalgen nachgewiesen werden. Ob die aufgrund morphologischer und molekularer Kriterien zu *Chlorella saccharophila* gestellten Photobionten-Klone in der Tat zu derselben Art wie *C. saccharophila* SAG 211-9a gehören, oder eine Schwester-Art bilden, lässt sich durch die 18S nrDNA-Untersuchungen allein nicht beantworten. Die Sequenzen der Photobionten-Klone gruppieren zusammen und bilden in den Stammbaumberechnungen die Schwesterngruppe zu *C. saccharophila* SAG 211-9a. Um zu klären, ob sie ein eigenes Taxon repräsentieren, müssen mehrere Genorte untersucht werden, die zudem variabler als die 18S nrDNA sein sollten.

4.2.2 Lateraler Gentransfer eines Introns der 18S nrDNA

Das im folgenden kurz 1512-Intron genannte group I-Intron ist an der Position der 18S nrDNA inseriert, die der Position 1512 der 16S rDNA von *Escherichia coli* entspricht. Um einen weiteren Genort zur näheren Charakterisierung der *Trebouxia*-Klone schwermetallhaltiger Substrate zu untersuchen, wurden für 44 Klone die Sequenzen dieses Introns bestimmt, phylogenetisch analysiert und die erhaltenen Stammbäume mit denen der ITS nrDNA-Sequenzen verglichen. FRIEDL et al. (2000) konnten zeigen, dass die Phylogenie dieses Introns nicht bei allen Taxa mit der ITS nrDNA-Phylogenie übereinstimmt. Dies lässt darauf schließen, dass diese Introns, die sich selbst aus der preRNA entfernen können (das sogenannte ‚Splicing‘), nicht nur von der Mutterzelle auf die Tochterzelle weitergegeben, sondern auch lateral zwischen zwei Zellen transferiert werden können. Letzteres scheint innerhalb der Gattung *Trebouxia* relativ häufig stattgefunden zu haben, denn bei drei der 18 untersuchten *Trebouxia*-Klone waren die Phylogenien der Intron- und ITS nrDNA-Sequenzen nicht kongruent (FRIEDL et al., 2000). Als einen möglichen Grund für diese ungewöhnliche Häufigkeit lateraler Transfers von Introns bei *Trebouxia* nennen die Autoren heterogene Photobionten-Populationen in Flechten. Die räumliche Nähe dieser unterschiedlichen Photobionten in einem sich neu

bildenden Flechtenthallus wäre dem lateralen Transfer von Introns besonders förderlich, welcher zudem durch Übertragung mittels Viren erleichtert werden könnte.

Bei den 44 in dieser Arbeit untersuchten *Trebouxia*-Klonen wurde nur in einem Fall ein lateraler Transfer eines 1512-Introns gefunden, bei dem ein Klon einer Art der *Trebouxia simplex*-Gruppe (*T. australis*) ein Intron aus der *T. corticola*-Gruppe besaß. Dies ist erstaunlich, da FRIEDL et al. (2000) eine deutlich größere Zahl von lateralen Intron-Transfers gefunden haben. Eine Erklärung wäre, dass nur eine begrenzte Zahl von *Trebouxia*-Arten untersucht wurde (aus der *T. simplex*- und *T. arboricola*-Gruppe) und deren Introns – aufgrund fehlender ‚Selbst-Splicing‘-Funktion – möglicherweise nicht mehr lateral übertragen werden können. Die Introns bleiben auf die sie besitzende Art beschränkt, da ihr Einbau vermutlich durch den umgekehrten Splicing-Vorgang (‚Reverse Splicing‘) erfolgt (FRIEDL et al., 2000) und für diesen Prozess ist die ‚Selbst-Splicing‘-Funktion nötig (ROMAN & WOODSON, 1998). Dies könnte zwar erklären, warum nur manche der untersuchten Arten ein 1512-Intron besitzen, nicht aber andere, die am selben Standort vorkommen (z.B. *T. angustilobata*). Dagegen bietet sie keine ausreichende Erklärung, warum nur ein 1512-Intron von anderen *Trebouxia*-Gruppen, die funktionstüchtige Introns besitzen (z.B. aus den *T. impressa*- / *T. corticola*-Gruppen), gefunden wurde. Ein möglicher Grund hierfür wäre, dass eine andere Voraussetzung für den lateralen Intron-Transfer bei den untersuchten Flechten nicht gegeben ist, nämlich heterogene Flechtentalgenpopulationen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die untersuchten Thalli jeweils nur eine Photobionten-Art (und sogar nur einen Photobionten-Klon) als Algenpartner enthielten. Vorausgesetzt, dass die group I-Introns in vivo Selbst-Splicing-Aktivität besitzen, ist das fehlende Auftreten von lateralen Intron-Transfer also – neben der Analyse vieler Photobionten-Klone aus ein und demselben Thallus – ein weiterer, indirekter, Hinweis auf homogene Flechtentalgenpopulationen in den untersuchten Flechtenthalli. Außerdem wäre das Auftreten von Photobionten mit lateral transferiertem Intron kein Beleg für eine heterogene Photobionten-Population in dem untersuchten Flechtenthallus, da der laterale Intron-Transfer schon vor der letzten Relichenisierung stattgefunden haben kann. Dies war vermutlich auch bei dem einzigen gefundenen lateralen Intron-Transfer der Fall, bei dem Photobionten *T. australis* aus *Lecanora farinacea*. Das Intron dieses Klons fällt in die *T. corticola*-Gruppe, aus der kein Algenpartner in den Flechten der Gesellschaft anwesend war (dieser hätte auch durch morphologische Untersuchungen erkannt werden können). Daher erscheint es wahrscheinlicher, dass der beobachtete Intron-Transfer schon vor der Lichenisierung mit *L. farinacea* stattgefunden hat.

4.2.3 Relichenisierung der Flechten

Da die meisten Flechten des *Acarosporium sinopicae* keine vegetativen Diasporen bilden, stellt sich die Frage, woher sie ihren Algenpartner erhalten. Eine Möglichkeit wäre, dass die Arten mit vegetativen Diasporen die Pionierflechten der Gesellschaft sind und die anderen Arten erst dann hinzukommen können, wenn sich die nötigen Photobionten an diesem Standort befinden. Dies trifft aber für viele Standorte des *Acarosporium sinopicae* nicht zu, denn die zuerst auftretenden Arten sind *Acarospora sinopica* und *Lecidea silacea* (siehe Aufnahmen 7 und 8), welche keine vegetativen Diasporen bilden. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die Photobionten dieser Flechten entweder aus dissoziierten lichenisierten Diasporen anderer Flechten, die auf für sie suboptimales Substrat gefallen sind (hoher Schwermetallgehalt!), oder von mittels Luftströmungen transportierter,

freilebender Flechtenalgen-Populationen stammen. Ein „Regen“ von Luftalgen und lichenisierten Diasporen von Flechten wird durch deren Nachweis in Pollenfallen bestätigt (TORMO et al., 2001).

Für die Partizipierung am bereits etablierten Photobionten-Pool eines Standortes ist es nicht nötig, durch lichenicoles Wachstum den Algenpartner direkt von anderen Flechten zu übernehmen. Die Flechtenalgen können durch den Zerfall von Thalli (BOWLER & RUNDEL, 1975, ARMSTRONG, 1988), oder Zoosporenbildung unter feuchten Bedingungen, freigesetzt und auf dem Substrat verteilt werden (TSCHERMAK-WOESS, 1978a, SLOCUM et al., 1980). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden des öfteren Zoosporen in Thallus-Quetschpräparaten beobachtet. Untersuchungen der Areolenbildung bei *Rhizocarpon geographicum* lieferten ebenfalls Hinweise, dass am natürlichen Standort Zoosporen aus dem Flechtenthallus entweichen und zur Bildung neuer Areolen bereitstehen (ARMSTRONG & SMITH, 1987). Auf Zoosporen zurückgehende, freilebende Flechtenalgen stehen auch entfernt von ihrem Ursprungsthallus zur Flechtenbildung zur Verfügung – neben möglicherweise existierender freilebender Kolonien (TSCHERMAK-WOESS, 1978a, MUKHTAR et al., 1994). Dies erklärt, warum Flechten genetisch identische Photobionten besitzen können, obwohl kein physikalischer Kontakt und folglich auch kein parasymbiontisches Verhältnis zwischen ihnen besteht. Ganz im Gegenteil ist diese weitere Verbreitung des nötigen Photobionten auch für die Flechte von Vorteil, aus der der Algenpartner ursprünglich stammt, denn mit dem größeren Photobionten-Pool steht auch ihr selbst der Algenpartner vermehrt und innerhalb eines größeren Areals zur Verfügung. Dies ist vor allem für Mykobionten von Bedeutung, die nach der Keimung ihrer (Asco-) Sporen kein ausgedehntes Hyphennetzwerk bilden können, wie es von OTT (1987) für *Xanthoria parietina* beschrieben wurde. Sie benötigen schon bald einen kompatiblen Algenpartner. Ein Beispiel hierfür ist *Rhizocarpon lecanorinum*, das kein Myzel ähnlich einem Prothallus bildet und dessen Keimschläuche kurz bleiben (CLAYDEN, 1998). Das Vorhandensein eines Photobionten-Pools für neu hinzukommende Mykobionten-Sporen ist von großer Bedeutung für das Spektrum der Flechtenarten eines Standortes. Denn für diese Zusammensetzung ist bei Flechten auf stabilen Substraten die Reihenfolge der Kolonisierung ausschlaggebend. Es kommt nur selten zu einer Verdrängung von bereits etablierten Individuen, wie sie bei Phanerogamen während der Sukzession oft beobachtet werden kann (LAWREY, 1991).

Verglichen mit dieser generellen Verfügbarkeit von Flechtenalgen für Relichenisierungsvorgänge spielt die Algenübernahme aus anderen Flechten im *Acarosporium sinopicae* offensichtlich allenfalls eine untergeordnete Rolle. So wurde bei zwei Belegen (A. BECK 63a und 141) ein lichenicoles Wachstum von *Rhizocarpon norvegicum* auf *Acarospora sinopica* beobachtet und die Photobionten von beiden Flechtenarten untersucht. In allen Fällen waren die Photobionten beider Flechten morphologisch identisch, bei Beck 63a besaßen sie auch identische ITS nrDNA-Sequenzen (nur diese wurden molekular untersucht). Dennoch kann aufgrund dieser Ergebnisse nicht zweifelsfrei geschlossen werden, dass eine Übernahme des Algenpartners der Wirtsflechte durch die lichenicole Flechte stattgefunden hat. Beide Photobionten-Klone gehören zu dem häufigsten Taxon alpiner Standorte, *T. simplex* [gt A], und diese Art war auch in allen anderen benachbarten, aber nicht lichenicol wachsenden Flechten vorhanden (*Bellemeria alpina*, *Lecanora handelii*, *L. subaurea*, *Lecidea silacea*, *Porpidia tuberculosa*). Des weiteren gilt es zu bedenken, dass viele lichenicole Flechten einen Algenpartner besitzen, der sich von dem ihrer Wirtsflechte unterscheidet (BECK, 2000). D.h. sie können

unabhängig von dieser einen Algenpartner akquirieren. Da die Algenpartner von *R. norvegicum* und *A. sinopica* an dem untersuchten Standort häufig vertreten waren, könnten sie folglich unabhängig von einander erworben worden sein. Die morphologischen Beobachtungen von sich gelb-färbenden roten und flachen *A. sinopica* Areolen lassen jedoch eine Algenübernahme wahrscheinlich erscheinen.

Die Tatsache, dass in ein und demselben Flechtenthallus nur ein Photobionten-Genotyp gefunden wurde (siehe Abschnitt „Phylogenetische Analyse der ITS nrDNA-Sequenzen“) steht im Einklang mit der Annahme eines einmaligen Erwerbs des Photobionten. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzlich weitere, genetisch identische Flechtenalgen aus dem Photobionten-Pool der Flechtengesellschaft in den Thallus eingebunden werden. Diese können mit den verwendeten Methoden nicht von den ursprünglich vorhandenen Flechtenalgen unterschieden werden.

4.2.4 Selektivität der Flechtenbionten

Die meisten der in dieser Arbeit untersuchten Flechtenpilze zeigen eine ausgeprägte Selektivität auf Photobionten der *T. simplex*-Gruppe (siehe Kapitel „Selektivität der Flechtenpartner“; Seite 122). Als sehr eingehend untersuchte Taxa seien *Acarospora sinopica* (13 Belege), *Bellemeria alpina* (neun Belege), *Lecanora polytropa* (neun Belege), *Lecidea silacea* (zwölf Belege) und *Tremolecia atrata* (14 Belege) erwähnt. Alle besaßen stets einen Algenpartner der *Trebouxia simplex*-Gruppe. Eine ganz ähnlich Selektivität wurde für *Acarospora bullata* nachgewiesen (von dieser wurden fünf Belege untersucht), allerdings besitzt diese Flechte einen Algenpartner aus der *Trebouxia arboricola*-Gruppe. Schon diese begrenzte Auswahl aus den in dieser Arbeit untersuchten Flechten macht deutlich, dass trotz hoher Selektivität der Mykobionten näher verwandte Arten nicht zwangsläufig näher verwandte Photobionten wählen. So zeigen die beiden *Acarospora*-Arten eine Selektivität bezüglich unterschiedlicher Photobionten-Gruppen innerhalb *Trebouxia*, während *A. sinopica* und die nur entfernt verwandte *Lecanora polytropa* Algen mit identischer ITS nrDNA-Sequenz besitzen, sich also denselben Photobionten-Pool teilen.

Einige Flechten, z.B. *Rhizocarpon norvegicum* und *Lecanora subaurea*, besaßen an allen untersuchten Standorten (Italien, Schweiz, Schweden) dieselbe Photobionten-Art als Algenpartner (*T. simplex* [gt A]). In diesen Fällen sind sicherlich die ökologischen Ansprüche der Flechtenpartner von herausragender Bedeutung. *R. norvegicum* kommt nur im Hochgebirge vor, *L. subaurea* wurde nur im Hochgebirge untersucht und *T. simplex* [gt A] weist ebendort ihren Verbreitungsschwerpunkt auf. Vor allem *R. norvegicum* ist also ein Beispiel für eine hohe Selektivität in der Photobiontenwahl des Mykobionten, die durch ähnliche ökologische Ansprüche der Symbionten verstärkt oder sogar verursacht worden sein könnte (siehe schematische Darstellung in Abb. 6 in der Einleitung). Weitere Untersuchungen dieser Flechtenart sind nötig um zu klären, ob auch die anderen dort vorkommenden Arten der *T. simplex*-Gruppe von diesem Mykobionten als Algenpartner gewählt werden (z.B. *T. angustilobata*) oder ob die symbiontischen Beziehungen auf *T. simplex* [gt A] beschränkt sind. Da *L. subaurea* auch aus den deutschen Mittelgebirgen bekannt ist, könnten Untersuchungen dortiger Standorte ihre Selektivität noch umfassender beleuchten.

Da die untersuchten Flechten von schwermetallhaltigen Substraten gesammelt wurden, wäre es möglich, dass dieses spezielle Substrat die Wahl des Algenpartners beeinflusst. Aus diesem Grund wurden fünf Flechtenarten zum Vergleich zusätzlich auch von nicht schwermetallhaltigen Substraten auf ihren Algenpartner hin untersucht. Alle Belege wurden in den Alpen gesammelt. *Lecidea lapicida*, *L. confluens* und *Sporastatia testudinea* haben auch dann *T. simplex* als Algenpartner, wenn sie nicht im *Acarosporium sinopicae* wachsen. Die ITS nrDNA-Sequenz dieser Algenklone war identisch mit der im *A. sinopicae* am häufigsten angetroffenen Sequenz von *T. simplex* [gt A]. Der untersuchte Thallus von *Porpidia macrocarpa* von nicht schwermetallhaltigem Substrat besaß ebenso *Asterochloris irregularis* als Algenpartner wie die Belege dieser Art aus dem *A. sinopicae*. Das untersuchte *Pleopsidium chlorophanum* von nicht schwermetallhaltigem Substrat besaß zwar einen Klon mit bisher „einzigartiger“ ITS-Sequenz als Algenpartner, dieser Klon gehört aber – wie morphologische und ITS nrDNA-Sequenzanalysen bestätigten – zur *T. simplex*-Gruppe. Diese Resultate legen nahe, dass die Wahl des Algenpartners – zumindest bei diesen Flechten – nicht durch das Substrat, sondern durch eine hohe Selektivität bedingt war. Dies wird auch durch die Ergebnisse der Experimente zur Schwermetalltoleranz unterstützt.

Innerhalb der monophyletischen Gruppe der Lecideaceae / Porpidiaceae wurde eine Korrelation zwischen den Photobionten *Trebouxia* und *Chlorella* einerseits und *Asterochloris* andererseits mit dem Auftreten von mit Lugol'scher Lösung färbbaren Polysacchariden (amyloide Substanzen) in den Zellwänden des Mykobionten festgestellt (siehe Abb. 39).

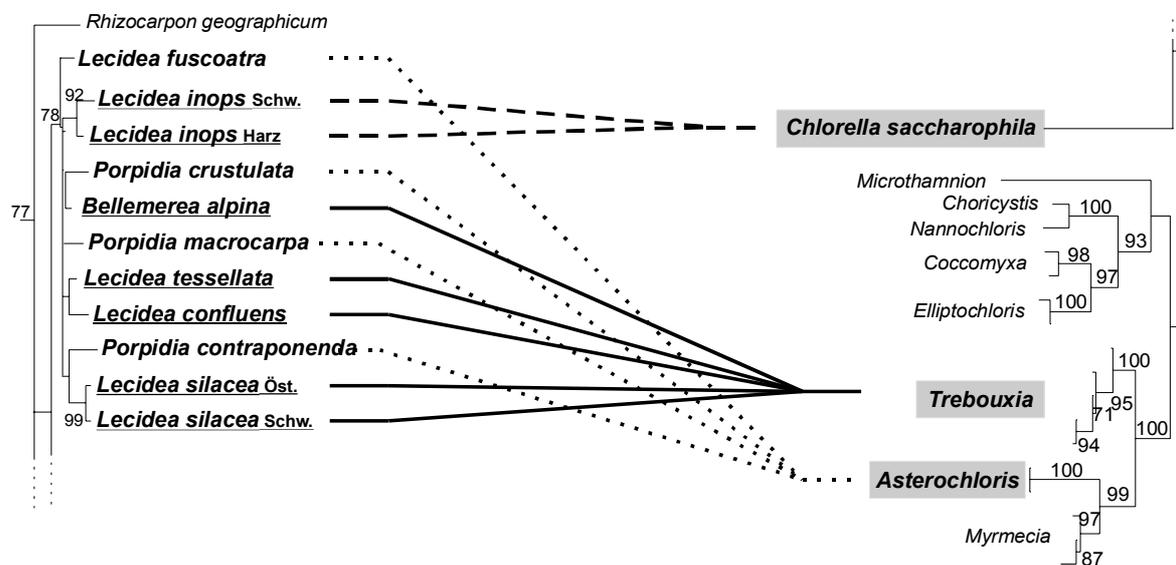


Abb. 39: Photobionten der Lecideaceae und Porpidiaceae (Vertreter durch Fettdruck hervorgehoben), dargestellt an den durch Analyse der 18S nrDNA-Sequenzen erhaltenen Stammbäumen (Abb. 25 für Mykobionten und Abb. 16 für Photobionten). Unterstrichen sind die Mykobionten dieser Familien, die eine positive Reaktion mit Lugol'scher Lösung im Mark zeigen. Ihre phylogenetische Stellung zueinander ist nicht mit Sicherheit aufgelöst (fehlende statistische Unterstützung).

Asterochloris wurde als Algenpartner nur in den Vertretern der Gruppe gefunden, deren Markhyphen eine negative Reaktion mit Lugol'scher Lösung zeigten. Die Analyse der 18S nrDNA-Sequenzen zeigt eine zu geringe Auflösung um klären zu können, ob die Gruppen mit bzw. ohne amyloide Substanzen im Mark monophyletische Schwesterngruppen sind,

oder ob dieses Merkmal bei den untersuchten Taxa mehrfach unabhängig auftritt, also konvergent entstanden ist. Die morphologischen Daten legen jedoch nahe, dass das Auftreten von amyloiden Substanzen im Mark kein geeignetes Merkmal darstellt, um monophyletische Gruppen abzugrenzen, denn dieses Merkmal ist selbst auf Artniveau nicht einheitlich ausgeprägt. So finden sich z.B. bei *Porpidia melinodes* sowohl Belege, die dieses Merkmal zeigen, als auch solche, die es nicht zeigen (siehe Kapitel „Beschreibung der bearbeiteten Flechtenarten“; Seite 53). Daher ist davon auszugehen, dass die Arten der Lecideaceae / Porpidiaceae ohne amyloide Substanzen in ihrem Mark nicht zu einer monophyletischen Gruppe zusammengefasst werden können. Das Vorkommen der verschiedenen Photobionten (*Asterochloris* versus *Trebouxia* bzw. *Chlorella*) ist nicht auf verwandtschaftliche Beziehungen zurückzuführen, sondern auf die unterschiedlichen Verhältnisse im Flechtenthallus, die durch die Mykobionten verursacht werden. Die ‚Mykobiontenadaptationshypothese‘ findet damit eine Bestätigung. Dieser Sachverhalt ist in Abb. 40 halbschematisch dargestellt. Dies ist der erste Fall, in dem innerhalb einer monophyletischen Gruppe von Flechten die Korrelation der Verteilung der Photobionten mit Merkmalen des Flechtenthallus festgestellt wurde. Eingehendere phylogenetische Studien werden zeigen, welcher Merkmalszustand der ursprüngliche ist. Das Vorkommen von unterschiedlichen Photobionten bei Flechten mit amyloiden Substanzen im Mark ließe sich mit der Annahme erklären, dass dieses der abgeleitete Zustand ist und es den Mykobionten ermöglicht mit einem anderen Photobionten als *Asterochloris* (*Chlorella* oder *Trebouxia*) einen Flechtenthallus zu bilden. Andernfalls müsste man annehmen, dass ein Verlust der amyloiden Substanzen stets denselben Effekt mit sich brachte, nämlich eine Assoziation mit *Asterochloris*, während entweder schon ursprünglich verschiedene Algenpartner vorhanden waren (*Chlorella* oder *Trebouxia*) oder ein weiterer Photobiontenwechsel ohne Verlust der mit Lugol’scher Lösung färbaren Polysaccharide im Mark stattgefunden hat. Auch aus dem Blickwinkel der Mykobionten scheinen amyloide Substanzen in den Hyphen den abgeleiteten Zustand zu repräsentieren, da dieser im wesentlichen auf gesteinsbesiedelnde Vertreter beschränkt ist. Welchen Einfluss die amyloiden Substanzen besitzen ist bisher noch unbekannt. Als erster Ansatzpunkt wäre an einen Einfluss auf die Wasserversorgung des Photobionten zu denken, der sich durch unterschiedliche Wasserhaltungs- oder Wasserleitungskapazitäten der Hyphen des Mykobionten ergeben könnte.

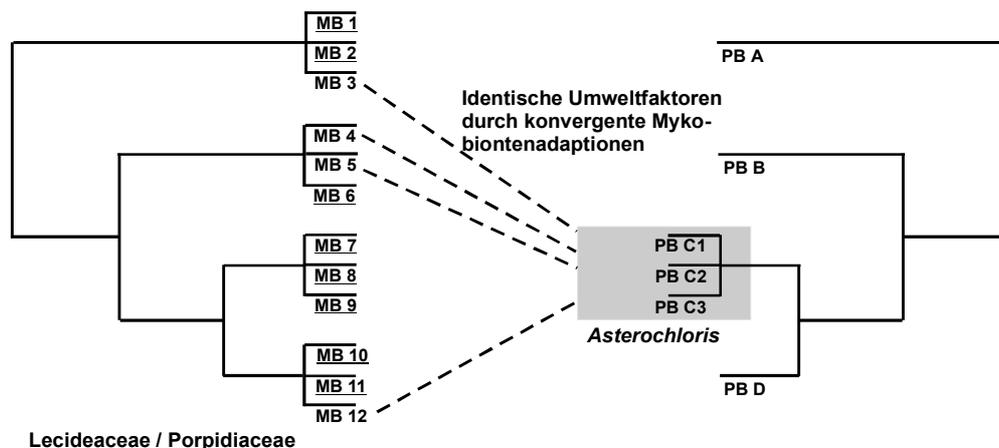


Abb. 40: Die Partnerwahl in Flechten der Lecideaceae / Porpidiaceae scheint aufgrund ähnlicher ökologischer Bedingungen für den Photobionten durch konvergente Adaption der Mykobionten bedingt sein (schematische Darstellung). Unterstrichen sind die Mykobionten dieser Familien mit einer positiven Reaktion mit Lugol’scher Lösung im Mark.

Sekundäre Flechtenstoffe bilden eine weitere Gruppe von Stoffen, die ökologische Bedingungen von Photobionten im Flechtenthallus beeinflussen. Folglich übt der Mykobiont durch diese einen Einfluss auf seinen Algenpartner aus. Dies kann zum einen Schutz für die Algen bedeuten, wie z.B. durch Parietin, das in *Xanthoria parietina* den Photobionten vor zu hohen Strahlendosen schützt (SOLHAUG & GAUSLAA, 1996). Zum anderen können die Photobionten aber auch in ihrem Wachstum gehemmt werden, wie z.B. der Algenpartner von *Cladonia mitis* durch Usninsäure und – in noch stärkerem Maße – durch Vulpinsäure (BAČKOR et al., 1998b). Wenn Photobionten unterschiedlich auf sekundäre Flechteninhaltsstoffe reagieren, läge hierin eine Möglichkeit, sensitive Flechtenalgen aus der symbiontischen Beziehung zu verdrängen bzw. sogar auszuschließen oder durch Schutz zu fördern. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Flechten trat jedoch keine Korrelation zwischen Flechteninhaltsstoffen und Photobionten auf. Dies kann insbesondere an *Lecidea lapicida* gezeigt werden, von der es einen Chemotyp mit Stictinsäure und einen anderen mit Norstictinsäure als Hauptinhaltsstoff gibt. Diesen Chemotypen wurde früher Artrang zuerkannt (siehe Kapitel „Beschreibung der bearbeiteten Flechtenarten“; Seite 53). Unabhängig von den sekundären Flechtenstoffen besitzen beide Chemotypen jedoch immer einen Vertreter der *T. simplex*-Gruppe als Photobiont (siehe Tab. 27 im Kapitel „Flechtenalgen der Familien Lecideaceae und Porpidiaceae“; Seite 124). Offensichtlich üben weder Stictinsäure noch Norstictinsäure einen Einfluss auf die Photobiontenwahl des Mykobionten von *L. lapicida* aus.

Eine wesentliche, bisher aber noch nicht geklärte Frage ist, ob die Artbildung von Mykobionten durch die Wahl unterschiedlicher Photobionten unterstützt oder gar ausgelöst werden kann. Es wäre denkbar, dass verschiedene Photobionten unterschiedliche Anpassungen beim Mykobionten bedingen. Da Hybride von Individuen aus derart unterschiedlich adaptierten Mykobionten-Populationen an keinen Photobionten optimal angepasst sind, hätten sie einen Selektionsnachteil. Es liegt nahe anzunehmen, dass die Anpassungen an verschiedene Photobionten größer sind, je größer die genetische Distanz zwischen den Flechtenalgen ist. In solch einem Fall wäre auch der Selektionsnachteil von Hybriden größer. *Lecidea inops* könnte ein geeignetes Beispiel für eine mögliche Artbildung von Mykobionten durch die Wahl unterschiedlicher Photobionten sein, denn sie besitzt *Chlorella saccharophila* als Algenpartner, während die anderen bisher untersuchten Arten der Lecideaceae / Porpidiaceae die relativ nahe verwandten Gattungen *Trebouxia* bzw. *Asterochloris* als Photobionten besitzen. Eingehendere Untersuchungen dieses Verwandtschaftskreises werden zeigen, ob die Artbildung von Mykobionten durch die Wahl unterschiedlicher Photobionten ausgelöst werden kann.

4.2.5 Geographische Verbreitung der Photobionten der *Trebouxia simplex*-Gruppe

Die aus den Flechten isolierten Photobionten zeigen eine klare klimatische bzw. geographische Verteilung. Die Photobionten der Flechten alpiner Standorte unterscheiden sich von denen der niedriger gelegenen Lokalitäten (siehe Tab. 26). So wurden die an Schwedens Ostseeküste auftretenden *T. simplex* [gt D] (vier Klone) und *T. suecica* (28 Klone) weder in den Alpen noch in den Gebirgen Schwedens oder Amerikas gefunden (83 Klone wurden von dort molekular untersucht). Andererseits wurde der häufigste Klon der alpinen Bereiche, *T. simplex* [gt A] nicht an der Ostseeküste gefunden, obwohl mehrere Flechtenarten von beiden Fundorten untersucht wurden (z.B. *Acarospora sinopica*, *Lecanora polytropa*, *Lecidea lapicida*, *Lecidea silacea*, *Rhizocarpon geographicum* und

Tremolecia atrata). Dass trotz der Vielzahl untersuchter Photobionten-Klone keine Überlappungen festgestellt wurden, spricht für die Signifikanz der Unterschiede. Es ist naheliegend anzunehmen, dass unterschiedliche physiologische Optima der Photobionten für diese Verteilung verantwortlich sind, da die Ausbreitung der Flechtenalgen – zumindest nordhemisphärisch – offensichtlich möglich ist. Letzteres ist aus der Verbreitung von *T. simplex* [gt A] zu erkennen, die sowohl in den Alpen als auch in den Gebirgen Schwedens und den Rocky Mountains nachgewiesen werden konnte.

Sehr gut zu der Annahme unterschiedlicher physiologischer Optima der Flechtenalgenarten passen Befunde von KROKEN & TAYLOR (2000) an *Letharia vulpina* in Kalifornien mit *T. ,vulpinae‘* als Algenpartner, die mit *T. suecica* sehr nahe verwandt ist. *L. ,vulpinae‘* besiedelt die wärmeren Küstenberge nahe des Pazifiks, während die kühleren, landeinwärts gelegenen Berge von anderen *Letharia*-Arten, die mit anderen Photobionten assoziiert sind, besiedelt werden. Allerdings können in Europa Lager von *L. vulpina* mit *T. ,vulpinae‘* als Algenpartner auch in den Alpen vorkommen (KROKEN & TAYLOR, 2000; zwei Thalli wurden untersucht). Es wäre denkbar, dass aufgrund günstiger lokaler Gegebenheiten und der Vermehrung von *L. vulpina* durch lichenisierte Diasporen *T. ,vulpinae‘* auch an den Standorten in den Alpen vorkommen kann, an denen *T. suecica* nicht nachgewiesen werden konnte. Dies kann durch weitere Studien, die nach Möglichkeit auch mikroklimatische Messungen und Untersuchungen zu den physiologischen Optima der Flechten und einzelnen Flechtenalgenklone beinhalten sollten, geklärt werden.

Ein Beispiel für eine regionale geographische Verbreitungen der Flechtenalgen der *T. simplex*-Gruppe ist die am australischen Standort häufige Art *T. australis*, die in keinem der nordhemisphärischen Belege gefunden wurde. Andererseits wurden keine nordhemisphärische Vertreter dieser Gruppe in dem australischen Material gefunden. Die nordhemisphärische Verbreitung (sei es als aposymbiotische Algen oder mittels lichenisierter Diasporen) von *T. simplex* [gt A] kann für die Nordhemisphäre durch die vorherrschenden Westwinde erklärt werden. Eine Ausbreitung der Algen über den Äquator hinweg zur Südhemisphäre ist offensichtlich – falls sie überhaupt vorkommt – wesentlich seltener. Sie könnte jedoch durch den Transport im Federkleid von Zugvögeln dennoch möglich sein.

Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Flechten mit *Trebouxia*-Phycobionten wurde von PAULSRUD et al. (2000) für Flechten mit *Nostoc* als Algenpartner kein Zusammenhang zwischen der geographischen Herkunft der Flechte und der Wahl ihres Cyanobionten gefunden. Dies könnte aber darauf zurückzuführen sein, dass diese Autoren nur nordhemisphärische Vertreter untersucht haben. Der geographische Faktor bei der Zusammensetzung von Flechtensymbiosen, wie sie in dieser Arbeit nachgewiesen wurden, ist vor allem hinsichtlich der beiden Hemisphären zu beobachten.

4.2.6 Kospeziation und Koevolution bei Flechten

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es bei den untersuchten Flechten keine Kospeziation zwischen den Flechtenpilzen und ihren Algen auf Artniveau gibt, die ‚Kospeziationshypothese‘ also nicht zutrifft. Wie weiter oben dargestellt, ist der Mykobiont zwar selektiv bezüglich seines Photobionten, was aber nicht für den Photobionten bezüglich seines Mykobionten gilt. Statt einer Korrelation des Auftretens verwandter Photobionten mit verwandten Mykobionten gibt es einen Zusammenhang

zwischen den in der Gesellschaft gefundenen Photobionten und geographischen bzw. klimatischen Verhältnissen (siehe oben). Genetisch zumindest sehr ähnliche Photobionten (Identität der ITS-Region und des 1512-Introns) können durchaus in Symbiosen mit nur sehr entfernt verwandten Mykobionten vorkommen (z.B. in *Chaenotheca subroscida* / *Lecanora polytropa*). Diese Tatsache macht deutlich, dass es für Kospeziations-Untersuchungen unumgänglich ist, auch weit entfernt stehende Flechten mit einzubeziehen, um unterscheiden zu können, ob ein möglicherweise auftretendes Muster der Symbiontenverteilung aufgrund der Selektivität beider oder nur eines der Bionten (in diesem Fall des Mykobionten) zustande kommt. So zeigen die Studien von KROKEN und TAYLOR (2000) an *Letharia* zwar eine bevorzugte Interaktion zwischen einzelnen Myko- und Photobionten-Arten, daraus kann aber nicht geschlossen werden, dass eine hohe Spezifität vorläge, da das Spektrum an möglichen Partnern für die Photobionten nicht geklärt ist. Einige Algenpartner der von KROKEN und TAYLOR (2000) abgegrenzten, phylogenetischen *Letharia*-Arten wurden bisher noch in keiner anderen Flechtengattung nachgewiesen (die Arten des *Trebouxia* ‚*letharii*‘-Komplex), hier könnte also Spezifität vorliegen. Eine andere Art jedoch, *Trebouxia* ‚*vulpinae*‘, besitzt als nächsten Verwandten *T. suecica*, ein Photobiont der in ganz anderen Flechtengattungen vorkommt (siehe Tab. 13). Dies macht deutlich, wie gering die bisherigen Kenntnisse bezüglich der Verbreitung von Flechtenalgen und wie dringend erforderlich weitere Untersuchungen sind. Da die Identität der Photobionten einer Flechte nicht makroskopisch aufgrund ihres Habitus festgestellt werden kann, ist derzeit ein möglichst breit angelegtes Screening der erfolgversprechendste Weg, mehr über Flechtenalgen und deren organismische und geographische Verteilung zu erfahren.

Bisher sind nur wenige Beispiele für strikte Koevolution bekannt, so z.B. zwischen Blattläusen der Gattung *Uroleucon* und deren bakteriellen Endosymbionten der Gattung *Buchnera* (CLARK et al., 2000). Diese Symbiose ist prädestiniert für Kospeziation, da die Endosymbionten vertikal, d.h. maternal, vererbt werden und für die Fortpflanzung der Blattläuse aufgrund der von ihnen überproduzierten und an die Blattläuse abgegebenen essentiellen Aminosäuren unbedingt nötig sind. Ein ähnliches Beispiel ist die Koevolution zwischen Klaffmuscheln und ihren energieliefernden, chemoautotrophen bakteriellen Endosymbionten an Hydrothermal-Quellen (PEEK et al., 1998). Dagegen konnten vermutete Kospeziationsereignisse bei Symbiosen ohne vertikale Vererbung des Symbionten bisher nicht nachgewiesen werden. Dies gilt z.B. für die Symbiosen zwischen energieliefernden, chemoautotrophen bakteriellen Endosymbionten von Bartwürmern der Ordnung Vestimentifera (NELSON & FISHER, 2000), zwischen Arten der Leguminosengattung *Leonardoxa* und den mit ihnen assoziierten Ameisen (CHENUIL & MCKEY, 1996) und zwischen Knöllchenbakterien und den sie beherbergenden Pflanzen (DOYLE, 1998). Auch bei der Mykorrhiza konnte bis heute keine Kospeziation zwischen den beteiligten Pilzen und Pflanzen nachgewiesen werden. CAIRNEY (2000) vermutet, dass nach einer anfänglichen Etablierung der Mykorrhiza bei den Wirtspflanzen eine parallele Entwicklung eintrat, die einen Austausch von Mykorrhizapilzen ermöglichte. Daher findet man heute keine Korrelation in den Stammbäumen der Symbionten. Allerdings gibt es durchaus Unterschiede in der Effizienz der Mykorrhiza, weshalb einige Pflanzenarten bestimmte Pilzarten bevorzugen (RONSHEIM & ANDERSON, 2001). Eine ausgeprägte Selektivität bezüglich ihres Mykorrhiza-Pilzes wurde von BIDARTONDO und BRUNS (2002) für Arten der Monotropoideae (Unterfamilie der Ericaceae), die aus nicht photosynthetisch aktiven Arten besteht, berichtet. Diese erhalten den benötigten Kohlenstoff von ihrem Mykorrhiza-Pilz. Da diese Mykorrhiza-Pilze zugleich mit anderen Pflanzen im symbiontischer

Beziehung stehen, liegen hier ähnliche Verhältnisse vor, wie sie für die untersuchten Flechten gelten. Der die Kohlehydrate beziehende Partner (mykotrophe Pflanze bzw. Mykobiont) ist selektiver als der die Kohlehydrate liefernde Partner (Mykorrhiza-Pilz bzw. Photobiont). Bei Flechten mit Cyanobakterien der Gattung *Nostoc* als Photobionten wurde ebenfalls eine hohe Selektivität auf Seiten der Mykobionten festgestellt, da in der Regel nur ein *Nostoc*-Genotyp (basierend auf 18S rDNA oder trnL^{Leu}(UAA) Intron-Untersuchungen) in einem Thallus oder in Cephalodien eines Thallus gefunden wurde (MIAO et al., 1997; PAULSRUD & LINDBLAD, 1998; PAULSRUD et al., 1998). Dies wird auch eindrucksvoll durch Studien von PAULSRUD et al. (2001) an *Peltigera aphthosa* (L.) WILLD. belegt. Die Autoren entfernten alle Cephalodien der Flechtenthalli und inokulierten letztere mit bekannten Klonen von Cyanobakterien. Dennoch enthielten alle neu gebildeten Cephalodien *Nostoc*-Klone mit demselben Genotyp wie die zuvor entfernten Cephalodien, die inokulierten Klone wurden nicht in diese Strukturen mit einbezogen. Aber auch bei Flechten mit Cyanobionten gibt es Abweichungen von dieser Regel, da zumindest bei *Peltigera venosa* (L.) HOFFM. in verschiedenen Cephalodien von ein und demselben Thallus verschiedene *Nostoc*-Genotypen enthalten sein können (PAULSRUD et al., 2000). Diese Übersicht verdeutlicht, wie gut die in dieser Arbeit nachgewiesenen Verhältnisse zwischen Flechtensymbionten (hohe Selektivität eines Bionten, aber fehlende Kospeziation) zu denen von anderen Symbiosen passen.

Die fehlende Kospeziation bei Flechten schließt aber keineswegs Koevolution zwischen den beteiligten Bionten aus. Die beobachtete Selektivität der Mykobionten legt eine charakteristische Interaktion der Symbiosepartner nahe. Allerdings findet diese nicht zwischen nur zwei Partnern statt, sondern zwischen zahlreichen Organismen. Die wechselseitigen Beziehungen sind asymmetrisch, da eine Mykobionten-Art in der Regel nur mit nahe verwandten Photobionten-Arten interagiert, während die Flechtenalgen mit vielen verschiedenen Mykobionten Flechten bilden können. Durch diese Vielzahl an Interaktionspartnern ist es sehr schwer, die einzelnen Beziehungen aufzuspüren, und es kommt zur diffusen Koevolution (THOMPSON, 1999). In diesem Zusammenhang schlägt THOMPSON (1999) vor, die in der Natur vorhandenen geographischen Mosaik in die Untersuchungen zur Koevolution mit einzubeziehen („geographic mosaic theory of coevolution“). Dies erfordert allerdings einen wesentlich größeren Untersuchungsansatz als er in dieser Arbeit verfolgt werden konnte und bietet breiten Raum für zukünftige Arbeiten.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Selektivität der Symbionten schwermetalltoleranter Flechten dargestellt und ein Beitrag zur Kenntnis der verwandtschaftlichen Verhältnisse der involvierten Flechtenalgen geleistet. Die Basis hierfür bilden lichtmikroskopische Untersuchungen an isolierten und axenisch kultivierten Algenklonen sowie Charakterisierungen ausgewählter Vertreter mittels molekularer Methoden (Sequenzierung der nrDNA). Algenpartner derselben Flechtenart von nicht schwermetallhaltigen Substraten wurden untersucht, um festzustellen, ob das schwermetallhaltige Substrat einen Einfluss auf die Selektivität ausübt. Des Weiteren wurden physiologische Experimente zur Schwermetalltoleranz von Flechtenalgen durchgeführt. Das auf diese Weise erhaltene Spektrum von Photobionten der Gemeinschaften wurde in Bezug auf die geographische Verbreitung, die Vermehrungsweise der Flechten und die verwandtschaftliche Stellung der Flechtenpilze analysiert und diskutiert.

- Zwölf Arten aus fünf Gattungen der Trebouxiophyceae T.FRIEDL (1995) wurden als Algenpartner der 62 untersuchten Flechtenarten nachgewiesen: *Apatococcus lobatus*, *Asterochloris irregularis*, *A. magna*, *Chlorella ellipsoidea*, *C. saccharophila*, *Coccomyxa* spec., *Trebouxia angustilobata* (A.BECK) A.BECK comb. nov., *T. australis* A.BECK spec. nov., *T. brindabellae* A.BECK spec. nov., *T. incrustata*, *T. simplex* und *T. suecica* A.BECK spec. nov. 56 dieser Flechtenarten wurden das erste Mal untersucht. Hierfür wurden 1625 Algenklone aus 176 Flechtenproben lichtmikroskopisch untersucht. Die Zuordnung der Photobionten zu den Flechten kann den Tabellen 12 bis 19 entnommen werden.
- Drei Arten der Gattung *Trebouxia* (*T. australis*, *T. brindabellae* und *T. suecica*) wurden aufgrund ihrer eigenständigen Morphologie und ITS nrDNA-Sequenz neu beschrieben, eine Unterart von *T. jamesii* wird nun als eigene Art betrachtet (*T. angustilobata*).
- Erstmals als Algenpartner nachgewiesen wurden die häufigen Bodenalgen *Apatococcus lobatus* (bisher nur unsichere Nachweise) und *Chlorella saccharophila*.
- Die molekulargenetischen Analysen von 113 ITS nrDNA-Sequenzen bestätigten die morphologischen Untersuchungen und erlaubten größtenteils eine noch genauere Unterscheidung der isolierten Flechtenalgenklone.
- Die Gattung *Trebouxia* kann in vier Gruppen eingeteilt werden, deren Stellung zueinander unklar ist. Jede dieser Gruppen besteht aus mehreren, morphologisch abgrenzbaren Arten. Als Photobionten von Flechten schwermetallreicher Substrate wurden nur Klone von Arten der Gruppen 1 (*T. arboricola*-Gruppe) und 4 (*T. simplex*-Gruppe) nachgewiesen.
- Um korrelierte Basenaustausche in konservierten Bereichen zu finden, wurde als weiteres mögliches Merkmal zur Unterscheidung von Arten die Verteilung der Mutationen an der ITS2 nrRNA-Sekundärstruktur untersucht. Dieser Merkmalsbereich kann bei der Gattung *Trebouxia* jedoch nicht zur Unterscheidung von Arten herangezogen werden.
- Die Analyse des 1512-Introns in der 18S nrDNA von 44 Photobionten-Klonen erlaubte eine weitere Charakterisierung der Photobionten-Klone, da innerhalb einer Gruppe mit einheitlicher ITS nrDNA-Sequenz (*T. simplex* [gt A]) fünf verschiedene 1512-Intron-Sequenzen gefunden wurden. Durch den Vergleich der ITS nrDNA-

- Phylogenie mit der Phylogenie der 1512-Intron-Sequenzen konnte gezeigt werden, dass das Intron von *T. australis* durch horizontalen Gentransfer erworben worden sein muss.
- Nahezu alle untersuchten Flechten zeigten eine ausgeprägte Selektivität bezüglich der Zugehörigkeit ihres Photobionten zu einer der vier Gruppen innerhalb von *Trebouxia*. Welcher Algenpartner gefunden wurde, hing nicht von der Flechtenart sondern von deren Standort – und damit von klimatischen und geographischen Faktoren – ab. Kospeziation tritt folglich bei diesen Flechtensymbionten nicht auf.
 - Bemerkenswert ist weiterhin die Verteilung von Photobionten der Gattung *Asterochloris* in den Flechtenfamilien Lecideaceae und Porpidiaceae. Durch die Analyse von 10 neu gewonnenen 18S nrDNA-Sequenzen von Mycobionten mit bereits bekannten Sequenzen konnte gezeigt werden, dass beide Familien eine monophyletische Gruppe innerhalb der Lecanorales bilden. Dennoch besaßen nicht alle Vertreter einen Algenpartner aus derselben Gattung. Nur Vertreter mit negativer Lugol-Reaktion im Mark waren mit *Asterochloris* assoziiert, während Vertreter mit positiver Lugol-Reaktion im Mark *Trebouxia* oder *Chlorella* enthielten. Dies ist das erste Beispiel für die Korrelation zwischen einem morphologisch-chemischen Merkmal des Mykobionten und der Wahl des Photobionten innerhalb einer monophyletischen Gruppe von Flechten.
 - Die untersuchten Flechtenalgen unterscheiden sich in ihrer Schwermetallresistenz, am deutlichsten bezüglich Kupfer. Die höchsten Kupferkonzentrationen wurde von *Trebouxia simplex* [gt A] (AB97.017A2) toleriert, am sensitivsten war ein Klon von *Trebouxia jamesii* (UTEX 2233). Diese Ergebnisse korrelieren mit dem Kupfergehalt im Substrat der Flechten.
 - Durch SH-Gruppen-spezifische HPLC-Analyse von Schnellaufschlüssen konnte die Phytochelatin-Produktion bei allen drei Klonen (UTEX 2233, AB97.070B2 und AB97.017A2) bei Belastung mit Cd nachgewiesen werden. Durch Gelfiltration wurde gezeigt, dass ein Komplex von Cadmium und Phytochelatinen gebildet wird, Phytochelatine also als Liganden für Cadmium dienen.
 - Die Tatsache, dass genetisch sehr ähnliche Photobionten als Algenpartner in Flechten sowohl schwermetallhaltiger als auch unbelasteter Substrate vorkommen, spricht gegen eine Beeinflussung der Photobiontenwahl der Mykobionten durch das Substrat. Es zeigte sich, dass bei erhöhtem Schwermetallgehalt des Substrats die Flechtenarten mit den weniger toleranten Photobionten fehlen (z.B. *Porpidia macrocarpa*), aber nicht ihren Algenpartner wechseln.

6 Abstract

The selectivity of lichen symbionts growing on heavy-metal-rich substrate was investigated and the phylogenetic relationship of the photobionts was analysed in detail by light microscopical observation of axenically cultured algal clones as well as by molecular characterisation (nrDNA sequence analysis) of selected clones. Photobionts of the same lichen species not growing on heavy-metal-rich substrate were investigated to study the influence of the substrate on the selectivity of the symbionts. In addition, physiological experiments focussing on the heavy metal tolerance of lichen algae were conducted. The spectrum of photobionts in the investigated lichen communities was analysed with respect to geography, reproduction strategies of the lichens and phylogenetic position of the mycobionts.

- Twelve species from five genera of the Trebouxiophyceae T.FRIEDL (1995) were shown to be the photobionts of the 62 investigated lichen species: *Apatococcus lobatus*, *Asterochloris irregularis*, *A. magna*, *Chlorella ellipsoidea*, *C. saccharophila*, *Coccomyxa* spec., *Trebouxia angustilobata* (A.BECK) A.BECK comb. nov., *T. australis* A.BECK spec. nov., *T. brindabellae* A.BECK spec. nov., *T. incrustata*, *T. simplex* and *T. suecica* A.BECK spec. nov. The photobionts of 56 lichen species were investigated for the first time. During the study 1625 algal clones from 176 lichen samples were analysed. The assignment of the photobionts to the lichen species can be seen in tables 12 to 19.
- Three species of the genus *Trebouxia* (*T. australis*, *T. brindabellae* and *T. suecica*) were described as new to science based on morphological and ITS nrDNA-sequence peculiarities, a subspecies of *T. jamesii* was treated as a new species (*T. angustilobata*).
- The common soil algae *Apatococcus lobatus* (only uncertain reports) and *Chlorella saccharophila* were recognized to be lichen photobionts for the first time.
- Molecular analysis of 113 ITS nrDNA sequences confirmed the morphological observations and allowed a more detailed differentiation between the isolated photobiont clones.
- The genus *Trebouxia* can be divided into four groups, the phylogenetic relationship of which remained unclear. Each group comprises several, morphologically distinct, species. The photobionts of lichens from heavy-metal-rich substrate belonged to group 1 (*T. arboricola*-group) and 4 (*T. simplex*-group).
- To investigate correlated base changes in conserved regions of ITS2 for the differentiation of species, the distribution of base changes was mapped on the ITS2 nrDNA secondary structure. This character, however, can not be used for the differentiation of species in the genus *Trebouxia*.
- The analysis of the 1512-introns in the 18S nrDNA of 44 photobiont clones allowed a further characterisation of the photobiont clones, because within a group of clones with homogenous ITS nrDNA sequence (*T. simplex* [gt A]) five different 1512 intron sequences were found. Due to differences in the ITS nrDNA and 1512 intron sequence phylogeny it could be concluded, that the intron of *T. australis* has been acquired by horizontal gen-transfer.
- Almost all lichens exhibited a pronounced selectivity of photobiont choice, only algae of one of the four groups of *Trebouxia* were acceptable photobionts. Which clone within that group was selected as photobiont did not depend on the

- phylogenetic position of the mycobiont but on the locality – and therefore on climatic and geographic factors. Cospeciation was therefore not observed.
- The occurrence of photobionts in the families Lecideaceae and Porpidiaceae is noteworthy. Based on the analysis of 10 new 18S nrDNA sequences of mycobionts it could be shown, that both families form a monophyletic group in the Lecanorales. Nevertheless only species without a Lugol reaction in the medulla were lichenised with *Asterochloris*, whereas the species with Lugol reaction in the medulla were lichenised with *Trebouxia* or *Chlorella*. This is the first known example of a correlation between a morphological-chemical character of the mycobiont and its photobiont choice within a monophyletic group of lichens.
 - The photobionts differed in their heavy-metal resistance, most notably with respect to copper. *Trebouxia simplex* [gt A] (AB97.017A2) tolerated the highest copper concentrations, a clone of *Trebouxia jamesii* (UTEX 2233) was the most sensitive. These results correlated with the copper concentration in the substrate of the lichens.
 - Using SH-group specific HPLC-analysis phytochelatin production could be detected in all clones (UTEX 2233, AB97.070B2 and AB97.017A2) during Cd challenge. These phytochelatins were ligands for the cadmium and a complex between these compounds could be demonstrated using gel-filtration.
 - The finding of genetically very similar photobionts in lichens growing on substrates with and without heavy-metals argues against an influence of the heavy-metals in the substrate on the photobiont choice of the mycobiont. In cases where the heavy-metal content of the substrate was very high, the lichens with the less tolerant photobiont were lacking (e.g. *Porpidia macrocarpa*), but did not change their photobiont.

7 Literaturverzeichnis

- ACHARIUS, E. (1799): Lichenographiae suecicae prodromus. – D.G. Björn, Linköping, 66 pp.
- AHMADJIAN, V. (1960a): Some new and interesting species of *Trebouxia*, a genus of lichenized algae. – Amer. J. Bot. **47**: 677–683.
- AHMADJIAN, V. (1960b): The lichen association. – Bryologist **63**: 250–254.
- AHMADJIAN, V. (1967): A guide to the algae occurring as lichen symbionts. Isolation, culture, cultural physiology and identification. – Phycologia **6**: 129–160.
- AHMADJIAN, V. (1982): Algal/fungal symbioses. – In: ROUND, F.E. & CHAPMAN, D.J. (eds.): Progress in Phycological Research, Vol. 1: 179–233. – Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- AHMADJIAN, V. (1988): The lichen alga *Trebouxia*: does it exist free living? – Pl. Syst. Evol. **158**: 243–247.
- AHMADJIAN, V. (1993): The lichen symbiosis. – John Wiley & Sons, Inc., New York, 250 pp.
- AHNER, B.A. & MOREL, F.M.M. (1999): Phytochelatins in microalgae. – Progress in Phycological Research **13**: 1–31.
- ARCHIBALD, P.A. (1975): *Trebouxia* DEPUYMALY (Chlorophyceae, Chlorococcales) and *Pseudotrebouxia* gen. nov. (Chlorophyceae, Chlorosarcinales). – Phycologia **14**: 125–137.
- ARMALEO, D. & CLERC, P. (1991): Lichen chimeras: DNA analysis suggests that one fungus forms two morphotypes. – Exp. Mycol. **15**: 1–11.
- ARMSTRONG, R.A. (1988): Substrate colonization, growth, and competition. – In: GALUN, M. (ed.): CRC Handbook of lichenology. Vol. II: 3–16. – CRC Press Boca Raton, Florida.
- ARMSTRONG, R.A. & SMITH, S.N. (1987): Development and growth of the lichen *Rhizocarpon geographicum*. – Symbiosis **3**: 287–300.
- ARNHEIM, N., KRYSAL, M., SCHMICKEL, R., WILSON, G., RYDER, O. & ZIMMER, E. (1980): Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on nonhomologous chromosomes in man and apes. – Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **77**: 7323–7327.
- BAČKOR, M., HUDÁK, J. & BAČKOROVÁ, M. (1998a): Comparison between growth responses of autotrophic and heterotrophic populations of lichen photobiont *Trebouxia irregularis* (Chlorophyta) on Cu, Hg and Cd chlorides treatment. – Phytion (Horn) **38**: 239–250.
- BAČKOR, M., HUDÁK, J., PEPČÁK, M., ZIEGLER, W. & BAČKOROVÁ, M. (1998b): The influence of pH and lichen metabolites (vulpinic acid and (+)unsic acid) on the growth of the lichen photobiont *Trebouxia irregularis*. – Lichenologist **30**: 577–585.
- BEARD, K.H. & DEPRIEST, P.T. (1996): Genetic variation within and among mats of the reindeer lichen, *Cladina subtenuis*. – Lichenologist **28**: 171–182.
- BECK, A. (1999): Photobiont inventory of a lichen community growing on heavy-metal-rich rock. – Lichenologist **31**: 501–510.
- BECK, A. (2000): Where does the lichen photobiont come from? I. Photobionts of lichenicolous lichens. – In: ANONYMUS (ed.): The fourth IAL Symposium, progress and problems in lichenology at the turn of the millennium: 27. – Universitat de Barcelona, Barcelona.

- BECK, A., FRIEDL, T. & RAMBOLD, G. (1998): Selectivity of photobiont choice in a defined lichen community: inferences from cultural and molecular studies. – *New Phytol.* **139**: 709–720.
- BECK, A., KASALICKY, T. & RAMBOLD, G. (2002): Myco-photobiontal selection in a mediterranean cryptogam community with *Fulgensia fulgida*. – *New Phytol.* **153**: 317–326.
- BECK, A. & KOOP, H.-U. (2001): Analysis of the photobiont population in lichens using a single-cell manipulator. – *Symbiosis* **31**: 57–67.
- BECKETT, R.P. & BROWN, D.H. (1983): Natural and induced zinc and copper resistance in the lichen genus *Peltigera*. – *Ann. Bot. (London)* **52**: 43–50.
- BHATTACHARYA, D., FRIEDL, T. & DAMBERGER, S. (1996): Nuclear-encoded rDNA group I introns: Origin and phylogenetic relationships of insertion site lineages in the green algae. – *Molec. Biol. Evol.* **13**: 978–989.
- BIDARTONDO, M.I. & BRUNS, T.D. (2002): Fine-level mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): specificity for fungal species groups. – *Molec. Ecol.* **11**: 557–569.
- BISCHOFF, H.W. & BOLD, H.C. (1963): Phycological studies IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. – *Univ. Texas Publ.* **6318**: 1–95.
- BOLD, H.C. & WYNNE, M.J. (1985): Introduction to the algae. Structure and reproduction. – Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 720 pp.
- BOWLER, P.A. & RUNDEL, P.W. (1975): Reproductive strategies in lichens. – *Bot. J. Linn. Soc.* **70**: 325–340.
- BRADFORD, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. – *Analytical Biochem.* **72**: 248–254.
- BROWN, D.H. & BECKETT, R.P. (1983): Differential sensitivity of lichens to heavy metals. – *Ann. Bot. (London)* **52**: 51–57.
- BRUNNER, V. (1985): Ultrastrukturelle und chemische Zellwanduntersuchungen an Flechtenphycobionten aus 7 Gattungen der Chlorophyceae (Chlorophytina) unter besonderer Berücksichtigung sporopollenin-ähnlicher Biopolymere. – Inaugural-Dissertation, University of Zürich, Zürich, 144 pp.
- BÜDEL, B. & SCHEIDEGGER, C. (1996): Thallus morphology and anatomy. – In: NASH III, T.H. (ed.): *Lichen biology*: 37–64. – Cambridge University Press, Cambridge.
- CAIRNEY, J.W.G. (2000): Evolution of mycorrhiza systems. – *Naturwissenschaften* **87**: 467–475.
- CALATAYUD, V. & RAMBOLD, G. (1998): Two new species of the lichen genus *Immersaria* (Porpidiaceae). – *Lichenologist* **30**: 231–244.
- CECH, T.R. (1988): Conserved sequences and structures of group I introns: building an active site for RNA catalysis. – *Gene* **73**: 259–271.
- CHENUIL, A. & MCKEY, D.B. (1996): Molecular phylogenetic study of a Myrmecophyte symbiosis: did *Leonardoxa* / ant associations diversify via cospeciation? – *Molecular Phylogenetics and Evolution* **6**: 270–286.
- CHODAT, R. (1913): Monographies d'algues en culture pure. – *Beitr. Kryptogamenfl. Schweiz* **4**: 1–266.
- CLARK, M.A., MORAN, N.A., BAUMANN, P. & WERNEGREEN, J. (2000): Cospeciation between bacterial endosymbionts (*Buchnera*) and a recent radiation of aphids (*Uroleucon*) and pitfalls of testing for phylogenetic congruence. – *Evolution* **54**: 517–525.

- CLAYDEN, S.R. (1998): Thallus initiation and development in the lichen *Rhizocarpon lecanorinum*. – *New Phytol.* **139**: 685–695.
- CLEMENS, S., KIM, E.J., NEUMANN, D. & SCHROEDER, J.I. (1999): Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. – *E. M. B. O. J.* **18**: 3325–3333.
- COLEMAN, A.W. (2000): The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. – *Protist* **151**: 1–9.
- COPPINS, B.J. & PURVIS, O.W. (1987): A review of *Psilolechia*. – *Lichenologist* **19**: 29–42.
- CULBERSON, C.F. & AMMANN, K. (1979): Standardmethode zur Dünnschichtchromatographie von Flechtensubstanzen. – *Herzogia* **5**: 1–24.
- CZEHURA, S.J. (1977): A lichen indicator of copper mineralisation, Lights Creek District, Plumas County, California. – *Economic Geology* **72**: 796–803.
- DEBARY, A. (1879): Die Erscheinung der Symbiose. – Verlag Karl J. Trübner, Straßburg, 30 pp.
- DEPRIEST, P.T. (1995): Phylogenetic analyses of the variable ribosomal DNA of the *Cladonia chlorophaea* complex. – *Cryptog. Bot.* **5**: 60–70.
- DIERBEN, K. (1990): Einführung in die Pflanzensoziologie (Vegetationskunde). – Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, 241 pp.
- DOYLE, J.J. (1998): Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. – *Trends in Plant Science* **3**: 473–478.
- DUXBURY, T. (1985): Ecological aspects of heavy metal responses in microorganisms. – *Advances in Microbial Ecol.* **8**: 185–235.
- ELIX, J.A. (1994a): Parmeliaceae. – *Flora of Australia* **55**: 1–11.
- ELIX, J.A. (1994b): *Neofuscelia*. – *Flora of Australia* **55**: 68–85.
- ELLMAN, G.L. (1959): Tissue sulfhydryl groups. – *Arch. Biochem. Biophys.* **82**: 70–77.
- ERIKSSON, O.E., BARAL, H.-O., CURRAH, R.S., HANSEN, K., KURTZMAN, C.P., RAMBOLD, G. & LAESSØE, T. (eds.) (2001): Outline of Ascomycota. – *Myconet* **7**: 1–88.
- ETTL, H. (1988): Über Definitionen und Terminologie der asexuellen Fortpflanzungszellen bei Grünalgen (Chlorophyta). – *Arch. Protistenk.* **135**: 17–34.
- ETTL, H. & GÄRTNER, G. (1984): Über die Bedeutung der Cytologie für die Algntaxonomie, dargestellt an *Trebouxia* (Chlorellales, Chlorophyceae). – *Pl. Syst. Evol.* **148**: 135–147.
- ETTL, H. & GÄRTNER, G. (1995): Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen. – Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 721 pp.
- FARRIS, J.S., ALBERT, V.A., KÄLLERSJÖ, M., LIPSCOMB, D. & KLUGE, A.G. (1996): Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. – *Cladistics* **12**: 99–124.
- FELFÖLDY, L. (1941): A debreceni Nagyerdő epiphyta vegetációja. – *Acta Geobot. Hung.* **4**: 35–73.
- FEUERER, T. (1978): Zur Kenntnis der Flechtengattung *Rhizocarpon* in Bayern. – *Ber. Bayer. Bot. Ges.* **49**: 59–135.
- FEUERER, T. (1991): Revision der europäischen Arten der Flechtengattung *Rhizocarpon* mit nichtgelbem Lager und vielzelligen Sporen. – *Biblioth. Lichenol.* **39**: 1–218.
- FOGARTY, R.V. & TOBIN, J.M. (1996): Fungal melanins and their interactions with metals. – *Enzyme and Microbial Technology* **19**: 311–317.
- FOSTER, P.L. (1977): Copper exclusion as a mechanism of heavy metal tolerance in a green alga. – *Nature* **269**: 322–323.
- FRIEDL, T. (1987): Thallus development and phycobionts of the parasitic lichen *Diploschistes muscorum* (COP.) ANT. – *Lichenologist* **19**: 183–191.

- FRIEDL, T. (1989a): Comparative ultrastructure of pyrenoids in *Trebouxia* (Microthamniales, Chlorophyta). – Pl. Syst. Evol. **164**: 145–159.
- FRIEDL, T. (1989b): Systematik und Biologie von *Trebouxia* (Microthamniales, Chlorophyta) als Phycobiont der Parmeliaceae (lichenisierte Ascomyceten). – Inaugural-Dissertation, Universität Bayreuth, Bayreuth, 218 pp.
- FRIEDL, T. (1993): New aspects of the reproduction by autospores in the lichen alga *Trebouxia* (Microthamniales, Chlorophyta). – Arch. Protistenk. **143**: 153–161.
- FRIEDL, T. (1995): Inferring taxonomic positions and testing genus level assignments in coccoid green lichen algae: a phylogenetic analysis of 18S ribosomal RNA sequences from *Dictyochloropsis reticulata* and from members of the genus *Myrmecia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). – J. Phycol. **31**: 632–639.
- FRIEDL, T. (1996): Evolution of the polyphyletic genus *Pleurastrum* (Chlorophyta): inferences from nuclear-encoded ribosomal DNA sequences and motile cell ultrastructure. – Phycologia **35**: 456–469.
- FRIEDL, T. (1998): Die Systematik und Stammesgeschichte der Grünalgen – eine Herausforderung für die Molekularbiologie. – Biologie in unserer Zeit **28**: 246–258.
- FRIEDL, T., BESENDAHL, A., PFEIFFER, P. & BHATTACHARYA, D. (2000): The distribution of group I introns in lichen algae suggests that lichenization facilitates intron lateral transfer. – Molecular Phylogenetics and Evolution **14**: 342–352.
- FRIEDL, T. & GÄRTNER, G. (1988): *Trebouxia* (Pleurastrales, Chlorophyta) as a phycobiont in the lichen genus *Diploschistes*. – Arch. Protistenk. **135**: 147–158.
- FRIEDL, T. & ROKITTA, C. (1997): Species relationships in the lichen alga *Trebouxia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae): molecular phylogenetic analyses of nuclear-encoded large subunit rRNA gene sequences. – Symbiosis **23**: 125–148.
- FRYDAY, A. & COPPINS, B. (1997): Keys to sterile, crustose saxicolous and terricolous lichens occurring in the British Isles. – Lichenologist **29**: 301–332.
- GADD, G.M. (1993): Interaction of fungi with toxic metals. – New Phytol. **124**: 25–60.
- GALLÉ, L. (1968): The xerothermic lichen species *Cladonia magyarica* Vain. – Móra Ferenc Múz. Évk.: 237–268.
- GALUN, M. & BUBRICK, P. (1984): Physiological interactions between the partners of the lichen symbiosis. – In: LINSKENS, H.F. & HESLOP-HARRISON, J. (eds.): Encyclopedia of plant physiology. Cellular interactions: 362–401. – Springer Verlag, Berlin.
- GARGAS, A. & TAYLOR, J.W. (1992): Polymerase chain reaktion (PCR) primers for amplifying and sequencing nuclear 18S rDNA from lichenized fungi. – Mycologia **84**: 589–592.
- GÄRTNER, G. (1985a): Die Gattung *Trebouxia* PUYMALY (Chlorellales, Chlorophyceae). – Arch. Hydrobiol., Suppl. **71**: 495–548.
- GÄRTNER, G. (1985b): Taxonomische Probleme bei den Flechtenalgengattungen *Trebouxia* und *Pseudotrebouxia* (Chlorophyceae, Chlorellales). – Phyton (Horn) **25**: 101–111.
- GAUSLAA, Y. & SOLHAUG, K.A. (2001): Fungal melanins as a sunscreen for symbiotic green algae in the lichen *Lobaria pulmonaria*. – Oecologia **126**: 462–471.
- GEITLER, L. (1942): Morphologie, Entwicklungsgeschichte und Systematik neuer bemerkenswerter atmophytischer Algen aus Wien. – Flora **136**: 1–29.
- GEITLER, L. (1955): *Clavaria mucida*, eine extratropische Basidiolichene. – Biol. Zentralbl. **74**: 145–159.
- GEITLER, L. (1956): *Botrydina*, keine Symbiose einer Alge mit einem Moosprotonema. – Österr. Bot. Z. **103**: 469–474.
- GEKELER, W., GRILL, E., WINNACKER, E.-L. & ZENK, M.H. (1988): Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. – Arch. Microbiol. **150**: 197–202.

- GEKELER, W., GRILL, E., WINNACKER, E.-L. & ZENK, M.H. (1989): Survey of the plant kingdom for the ability to bind heavy metals through phytochelatin. – *Z. Naturf.* **44**: 361–369.
- GOWAN, S.P. (1989): The lichen genus *Porpidia* (Porpidiaceae) in North America. – *Bryologist* **92**: 25–59.
- GOWAN, S.P. & AHTI, T. (1993): Status of the lichen genus *Porpidia* in eastern Fennoscandia. – *Ann. Bot. Fenn.* **30**: 53–75.
- GOYAL, R. & SEAWARD, M.R.D. (1981): Metal uptake in terricolous lichens. 1. Metal localization within the thallus. – *New Phytol.* **89**: 631–645.
- GRAHAM, L.E. & WILCOX, L.W. (2000): *Algae*. – Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, 640 pp.
- GREUTER, W., MCNEILL, J., BARRIE, F.R., BURDET, H.-M., DEMOULIN, V., FILGUEIRAS, T.S., NICOLSON, D.H., SILVA, P.C., SKOG, J.E., TREHANE, P., TURLAND, N.J. & HAWKSWORTH, D.L. (eds.) (2000): *International Code of Botanical Nomenclature (St Louis Code)*. Regnum Vegetabile 131 – Koeltz Scientific Books, Königstein.
- GRILL, E. (1987): *Phytochelatine die schwermetall-bindenden Peptide der höheren Pflanzen*. – Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 201 pp.
- GRILL, E., WINNACKER, E.-L. & ZENK, M.H. (1985): Phytochelatin: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. – *Science* **230**: 674–676.
- HA, S.-B., SMITH, A.P., HOWDEN, R., DIETRICH, W.M., BUGG, S., O'CONNELL, M.J., GOLDSBROUGH, P.B. & COBBETT, C.S. (1999): Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. – *Pl. Cell* **11**: 1153–1163.
- HAFELLNER, J., HERTEL, H., RAMBOLD, G. & TIMDAL, E. (1993): A new outline of the Lecanorales. – Handout distributed at the First International Workshop on Ascomycete Systematics (Paris, Mai 1993): 14 pp.
- HARTMANN, S., NASON, J.D. & BHATTACHARYA, D. (2001): Extensive ribosomal DNA genetic variation in the columnar cactus *Lophocereus*. – *J. Molec. Evol.* **53**: 124–134.
- HASEGAWA, M., KISHINO, H. & YANO, T. (1985): Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. – *J. Molec. Evol.* **21**: 160–174.
- HELMS, G., FRIEDL, T., RAMBOLD, G. & MAYRHOFER, H. (2001): Identification of photobionts from the lichen family Physciaceae using algal-specific ITS rDNA sequencing. – *Lichenologist* **33**: 73–86.
- HERTEL, H. (1995): Schlüssel für die Arten der Flechtenfamilie Lecideaceae in Europa. – *Biblioth. Lichenol.* **58**: 137–180.
- HERTEL, H. & RAMBOLD, G. (1987): *Miriquidica* genus novum Lecanoracearum (Ascomycetes lichenisati). – *Mitt. Bot. Staatssamml. München* **23**: 377–392.
- HILDRETH, K.C. & AHMADJIAN, V. (1981): A study of *Trebouxia* and *Pseudotrebouxia* isolates from different lichens. – *Lichenologist* **13**: 65–86.
- HOLTAN-HARTWIG, J. & TIMDAL, E. (1987): Notes on some parasitic *Rhizocarpon* species. – *Lichenologist* **19**: 335–338.
- HONEGGER, R. (1996): Morphogenesis. – In: NASH III, T.H. (ed.): *Lichen biology*: 65–87. – Cambridge University Press, Cambridge.
- HONEGGER, R. (2001): The symbiotic phenotype of lichen-forming ascomycetes. – In: HOCK, B. (ed.): *The Mycota IX. Fungal associations*: 165–188. – Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- HUNECK, S., BOTHE, H.-K. & RICHTER, W. (1990): Über den Metallgehalt von Flechten von Kupferschieferhalden der Umgebung von Mansfeld. – *Herzogia* **8**: 295–304.

- HUSS, V.A.R., FRANK, C., HARTMANN, E.C., HIRMER, M., KLOBOUCEK, A., SEIDEL, B.M., WENZELER, P. & KESSLER, E. (1999): Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). – *J. Phycol.* **35**: 587–598.
- JAAG, O. (1933): *Coccomyxa* SCHMIDLE, Monographie einer Algengattung. – *Beitr. Kryptogamenfl. Schweiz* **8**: 1–132.
- JAMES, P.W. & HENSSEN, A. (1976): The morphological and taxonomic significance of cephalodia. – In: BROWN, D.H., HAWKSWORTH, D.L. & BAILEY, R.H. (eds.): *Lichenology: Progress and Problems*: 22–77. – Academic Press, London, New York.
- JANZEN, D.H. (1980): When is it coevolution? – *Evolution* **34**: 611–612.
- JOHN, E.A. (1989): An assessment of the role of biotic interactions and dynamic processes in the organization of species in a saxicolous lichen community. – *Canad. J. Bot.* **67**: 2025–2037.
- JONES, D., WILSON, M.J. & LAUNDON, J.R. (1982): Observations on the location and form of lead in *Stereocaulon vesuvianum*. – *Lichenologist* **14**: 281–286.
- JORGENSEN, R.A. & CLUSTER, P.D. (1988): Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. – *Ann. Missouri Bot. Gard.* **75**: 1238–1247.
- KANTVILAS, G. & ELIX, J.A. (1994): *Ramboldia*, a new genus in the lichen family Lecanoraceae. – *Bryologist* **97**: 296–304.
- KAPPEN, L. (1993): Flechten. Algen als Partner oder Opfer. – *Naturwiss. Rundschau (Stuttgart)* **46**: 260–267.
- KAPPEN, L. (1994): The lichen, a mutualistic system – some mainly ecophysiological aspects. – *Cryptog. Bot.* **4**: 193–202.
- KESSLER, E. (1987): Separation of *Chlorella ellipsoidea* from *C. saccharophila* (Chlorophyceae): no growth on mannitol and cadmium sensitivity. – *Pl. Syst. Evol.* **157**: 247–251.
- KNEER, R. & ZENK M.H. (1997): The formation of Cd-phytochelatin complexes in plant cell cultures. – *Phytochemistry* **44**: 69–74.
- KNEER, R. (1993): Phytochelatine – Analytik, Komplexstruktur, Schwermetalltoleranz, Verbreitung ins Pilzreich und präparative, enzymatische Synthese. – Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 164 pp.
- KNOPH, J.-G., RAMBOLD, G. & TRIEBEL, D. (1994): Lecanoraceae: *Carbonea*. – In: LIAS: A Global Information System for Lichenized and Non-Lichenized Ascomycetes. – Botanische Staatssammlung München: <http://141.84.65.150/descr/Lecanoraceae/index.html>. – München.
- KÖHL, K.I. & LÖSCH, R. (1999): Experimental characterization of heavy metal tolerance in plants. – In: PRASAD, M.N.V. & HAGEMeyer, J. (eds.): *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems*: 371–389. – Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- KROKEN, S. & TAYLOR, J.W. (2000): Phylogenetic species, reproductive mode, and specificity of the green alga *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. – *Bryologist* **103**: 645–660.
- KROTZ, R.M., EVANGLIOU, B.P. & WAGNER, G.J. (1989): Relationships between cadmium, zinc, Cd-Peptide, and organic acids in tobacco suspension cells. – *Pl. Physiol. (Lancaster)* **91**: 780–787.
- LANGE, O.L. & ZIEGLER, H. (1963): Der Schwermetallgehalt von Flechten aus dem *Acarosporium sinopicae* auf Erzschlackenhalde des Harzes. 1. Eisen und Kupfer. – *Mitt. Florist.-Soziol. Arbeitsgem.* **10**: 156–183.
- LAUNDON, J.R. (1992): *Lepraria* in the British Isles. – *Lichenologist* **24**: 315–350.

- LAWREY, J.D. (1991): Biotic interactions in lichen community development: a review. – *Lichenologist* **23**: 205–214.
- LESSA, E.P. & APPLEBAUM, G. (1993): Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. – *Molec. Ecol.* **2**: 119–129.
- LEUCKERT, C., KÜMMERLING, H. & WIRTH, V. (1995): Chemotaxonomy of *Lepraria* ACH. and *Leproloma* NYL. ex CROMBIE, with particular reference to Central Europe. – *Biblioth. Lichenol.* **58**: 245–259.
- LINSMAIER, E.M. & SKOOG, F. (1965): Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. – *Physiol. Pl. (Copenhagen)* **18**: 100–127.
- LOKHORST, G.M., SEGAAR, P.J. & STAR, W. (1989): An ultrastructural reinvestigation of mitosis and cytokinesis in cryofixed sporangia of the coccoid green alga *Friedmannia israelensis* with special reference to septum formation and the replication cycle of basal bodies. – *Cryptog. Bot.* **1**: 275–294.
- LOMBARDI, A.T. & VIEIRA, A.A.H. (2000): Copper complexation by Cyanophyta and Chlorophyta exudates. – *Phycologia* **39**: 118–125.
- LONG, E.O. & DAWID, I.B. (1980): Repeated genes in eukaryotes. – *Annual Rev. Biochem.* **49**: 727–764.
- MAI, J.C. & COLEMAN, A.W. (1997): The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants. – *J. Molec. Evol.* **44**: 258–271.
- MARTI, J. (1983): Sensitivity of lichen phycobionts to dissolved air pollutants – *Canad. J. Bot.* **61**: 1647–1653.
- MARTI, J. (1985): Die Toxizität von Zink, Schwefel- und Stickstoffverbindungen auf Flechten-Symbionten. – *Biblioth. Lichenol.* **21**: 1–129.
- MATTOX, K.R. & STEWART, K.D. (1984): Classification of the green algae: a concept based on comparative cytology. – In: IRVINE, D.E.G. & JOHN, D.M. (eds.): *Systematics of green algae*: 29–72. – Academic press, London, Orlando.
- MEDLIN, L., ELWOOD, H.J., STICKEL, S. & SOGIN, M.L. (1988): The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. – *Gene* **73**: 491–499.
- MEHRA, A. & FARAGO, M.E. (1994): Metal ions and plant nutrition. – In: FARAGO, M.E. (ed.): *Plants and the chemical elements*: 31–66. – VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- MEISCH, J.P. (1981): Beiträge zur Isolation, Kultur und Systematik von Flechtenalgen. – Inaugural-Dissertation, Leopold-Franzens-Universität in Innsbruck, Innsbruck, 160 pp.
- MIAO, V.P.W., RABENAU, A. & LEE, A. (1997): Cultural and molecular characterization of photobionts of *Peltigera membranacea*. – *Lichenologist* **29**: 571–586.
- MOHAN, M.P. (1998): Metal toxicities and resistance in fungi. – In: VARMA, A. (ed.): *Microbes: for health, wealth and sustainable environment*: 433–465. – Malhotra Publishing House, New Delhi.
- MUKHTAR, A., GARTY, J. & GALUN, M. (1994): Does the lichen alga *Trebouxia* occur free-living in nature: further immunological evidence. – *Symbiosis* **17**: 247–253.
- NAGALAKSHMI, N. & PRASAD, M.N.V. (2001): Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. – *Pl. Sci. (Elsevier)* **160**: 291–299.
- NAKANO, T. & IGUCHI, K. (1994): Photobionts isolated from some Japanese species of *Cladonia* (Lichens). – *Symbiosis* **17**: 65–73.

- NASH III, T.H. (1975a): Influence of effluents from a zinc factory on lichens. – *Ecol. Monogr.* **45**: 183–198.
- NASH III, T.H. (1975b): Simplification of the Blue Mountain lichen communities near a zinc factory. – *Bryologist* **75**: 315–324.
- NASH III, T.H. (1989): Metal tolerance in lichens. – In: SHAW, A.J. (ed.): Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects: 119–131. – CRC Press, Boca Raton.
- NELSON, K. & FISHER, C.R. (2000): Absence of cospeciation in deep-sea vestimentiferan tube worms and their bacterial endosymbionts. – *Symbiosis* **28**: 1–15.
- NIEBOER, E. & RICHARDSON, D.H.S. (1980): The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. – *Environm. Pollut.* **1**: 3–26.
- NIEBOER, E., RICHARDSON, D.H.S. & TOMASSINI, F.D. (1978): Mineral uptake and release by lichens: an overview. – *Bryologist* **81**: 226–246.
- NOESKE, O., LÄUCHLI, A., LANGE, O.L., VIEWEG, G.H. & ZIEGLER, H. (1970): Konzentration und Lokalisierung von Schwermetallen in Flechten der Erzschlackenhalde des Harzes. – *Deutsche Botanische Gesellschaft, Neue Folge* **4**: 67–79.
- OBERWINKLER, F. (1984): Fungus-alga interactions in basidiolichens. – *Beih. Nova Hedwigia* **79**: 739–774.
- O'DONNELL, K. & CIGELNIK, E. (1997): Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* **7**: 103–116.
- ORANGE, A. (1995): The british species of *Lepraria* and *Leproloma*: chemistry and identification. – *Bull. Brit. Lichen Soc.* **76**: 1–9.
- OTT, S. (1987): Sexual reproduction and developmental adaptations in *Xanthoria parietina*. – *Nordic J. Bot.* **7**: 219–228.
- PAULSRUD, P. & LINDBLAD, P. (1998): Sequence variations of the tRNA Leu intron as a marker for genetic diversity and specificity of symbiotic Cyanobacteria in some lichens. – *Appl. Environm. Microbiol.* **64**: 310–315.
- PAULSRUD, P., RIKKIREN, J. & LINDBLAD, P. (1998): Cyanobiont specificity in some *Nostoc*-containing lichens and in a *Peltigera aphthosa* photosymbiodeme. – *New Phytol.* **139**: 517–524.
- PAULSRUD, P., RIKKINEN, J. & LINDBLAD, P. (2000): Spatial patterns of photobiont diversity in some *Nostoc*-containing lichens. – *New Phytol.* **146**: 291–299.
- PAULSRUD, P., RIKKINEN, J. & LINDBLAD, P. (2001): Field investigations on cyanobacterial specificity in *Peltigera aphthosa*. – *New Phytol.* **152**: 117–123.
- PAWLIK-SKOWROŃSKA, B., SANITÁ DI TOPPI, L., FAVALI, M.A., FOSSATI, F. & SKOWROŃSKI, T. (2001): Response of lichens to heavy metal stress by phytochelatin production. – *Acta Physiologiae Plantarum* **23**: 80.
- PEEK, A.S., FELDMAN, R.A., LUTZ, R.A. & VRIJENHOEK, R.C. (1998): Cospeciation of chemoautotrophic bacteria and deep sea clams. – *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 9962–9966.
- PERŠOH, D. & RAMBOLD, G. (2002): *Phacopsis* – a lichenicolous genus of the family Parmeliaceae. – *Mycological Progress* **1**: 43–55.
- PETERSON, H.G., HEALY, F.P. & WAGEMANN, R. (1984): Metal toxicity to algae: a highly pH dependent phenomenon. – *Canad. J. Fish. Aquatic Sci.* **41**: 974–979.
- PEVELING, E. & GALUN, M. (1976): Electron-microscopical studies on the phycobiont *Coccomyxa* SCHMIDLE. – *New Phytol.* **77**: 713–718.

- PIERCEY–NORMORE, M.D. & DEPRIEST, P.T. (2001): Algal switching among lichen symbioses. – *Amer. J. Bot.* **88**: 1490–1498.
- PISTOCCHI, R., MORMILE, A.M., GUERRINI, F., ISANI, G. & BONI, L. (2000): Increased production of extra- and intracellular metal-ligands in phytoplankton exposed to copper and cadmium. – *J. Appl. Phycol.* **12**: 469–477.
- PLESSL, A. (1963): Über die Beziehungen von Haustorientypus und Organisationshöhe bei Flechten. – *Österr. Bot. Z.* **110**: 194–269.
- PLOCKE, D.J. & KÄGI, J.H.R. (1992): Spectral characteristics of cadmium-containing phytochelatin complexes isolated from *Schizosaccharomyces pombe*. – *Eur. J. Biochem.* **207**: 201–205.
- POELT, J. (1959): Eine Basidiolichene in den Hochalpen. – *Planta* **52**: 600–605.
- POELT, J. (1969): Bestimmungsschlüssel europäischer Flechten. – Verlag J. Cramer, Berlin, Stuttgart, 757pp.
- POELT, J. (1972): Die taxonomische Behandlung von Artenpaaren bei den Flechten. – *Bot. Not.* **125**: 77–81.
- POELT, J. & VĚZDA, A. (1977): Bestimmungsschlüssel europäischer Flechten. Ergänzungsheft I. – *Biblioth. Lichenol.* **9**: 1–258.
- POELT, J. & VĚZDA, A. (1981): Bestimmungsschlüssel europäischer Flechten. Ergänzungsheft II. – *Biblioth. Lichenol.* **16**: 1–390.
- PRINTZ, H. (1927): Chlorophyceae. – In: ENGLER, A. & PRANTL, K. (eds.): Die natürlichen Pflanzenfamilien 3. – Engelmann, Leipzig.
- PURVIS, O.W. (1984): The occurrence of copper oxalate in lichens growing on copper sulphide-bearing rocks in Scandinavia. – *Lichenologist* **16**: 197–204.
- PURVIS, O.W. (1996): Interactions of lichens with metals. – *Sci. Progr. (London)* **79**: 283–309.
- PURVIS, O.W., COPPINS, D.L., HAWKSWORTH, D.L., JAMES, P.W. & MOORE, D.M. (eds.) (1992): The lichen flora of Great Britain and Ireland. – Natural History Museum Publications, London, 710 pp.
- PURVIS, O.W., ELIX, J.A., BROOMHEAD, J.A. & JONES, G.C. (1987): The occurrence of copper-norstictic acid in lichens from cupriferous substrata. – *Lichenologist* **19**: 193–203.
- PURVIS, O.W., ELIX, J.A. & GAUL, K.L. (1990): The occurrence of copper-psoromic acid in lichens from cupriferous substrata. – *Lichenologist* **22**: 345–354.
- PURVIS, O.W. & HALLS, C. (1996): A review of lichens in metal-enriched environments. – *Lichenologist* **28**: 571–601.
- PURVIS, O.W., WILLIAMSON, B.J., BARTOK, K. & ZOLTANI, N. (2000): Bioaccumulation of lead by the lichen *Acarospora smaragdula* from smelter emissions. – *New Phytol.* **147**: 591–599.
- PYATT, F.B. (1969): Studies of the periodicity of spore discharge and germination in lichens. – *Bryologist* **72**: 48–53.
- PYATT, F.B. (1973): Lichen propagules. – In: AHMADJIAN V. & HALE ME. (eds.): The lichens. 117–145. – Academic press, New York.
- RAMBOLD, G. (1989): A monograph of the saxicolous lecideoid lichens of Australia (excl. Tasmania). – *Biblioth. Lichenol.* **34**: 1–345.
- RAMBOLD, G., FRIEDL, T. & BECK, A. (1998): Photobionts in lichens: possible indicators of phylogenetic relationships? – *Bryologist* **101**: 392–397.
- RAMBOLD, G., SCHUHWERK, F. & TRIEBEL, D. (1992): Die großsystematischen Einheiten der Ordnung Lecanorales (Ascomycetes) und ihre ökologischen Präferenzen. – *Mitt. Bot. Staatssamml. München* **30**: 385–400.

- RAMBOLD, G. & SCHWAB, A.J. (1990): Rusty coloured species of the lichen genus *Miriquidica* (Lecanoraceae). – *Nordic J. Bot.* **10**: 117–121.
- RAMBOLD, G. & TRIEBEL, D. (1992): The inter-lecanoralean associations. – *Biblioth. Lichenol.* **48**: 1–201.
- RAUSER, W.E. (1999): Structure and function of metal chelators produced by plants. – *Cell Biochemistry and Biophysics* **31**: 19–48.
- REED, R.H. & GADD, G.M. (1990): Metal tolerance in eukaryotic and prokaryotic algae. – In: SHAW, A.J. (ed.): *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*: 105–118. – CRC Press Boca Raton, Florida.
- RICHTER, G. (1988): *Stoffwechselfysiologie der Pflanzen*. – Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 639 pp.
- ROGERS, S.O. & BENDLICH, A.J. (1985): Extraction of DNA from mg amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. – *Pl. Molec. Biol.* **5**: 69–76.
- ROMAN, J. & WOODSON, S.A. (1998): Integration of the *Tetrahymena* group I intron into bacterial rRNA by reverse splicing in vivo. – *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 2134–2139.
- RONSHEIM, M.L. & ANDERSON, S.E. (2001): Population-level specificity in the plant-mycorrhizae association alters intraspecific interactions among neighboring plants. – *Oecologia* **128**: 77–84.
- RUNEMARK, H. (1956): Studies in *Rhizocarpon*. II. Distribution and ecology of the yellow species in Europe. – *Opera Bot.* **2**: 1–150.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STEFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R. & HORN, G. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. – *Science* **239**: 487–491.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. (1989): *Molecular cloning. A laboratory manual*. 3 Volumes. – Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. – *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463–5467.
- SANTÀ DI TOPPI, L. & GABBRIELLI, R. (1999): Response to cadmium in higher plants. – *Environm. Exp. Bot.* **41**: 105–130.
- SCHMITT, I. & LUMBSCH, H.T. (2001): Identification of the photobionts in *Trapeliopsis* and *Pertusaria* using SSU ribosomal DNA sequences obtained from PCR amplification with a non-green-algal primer. – *Mycotaxon* **78**: 407–411.
- SCHMÖGER, M. (2000): *Phytochelatine – Komplexierung von Metallen und Metalloiden – Untersuchungen zur Phytochelatin-Synthase*. – Inaugural-Dissertation, TU München München, 182 pp.
- SCHWAB, A. (1986): Rostfarbene Arten der Sammelgattung *Lecidea* (Lecanorales). Revision der Arten Mittel- und Nordeuropas. – *Mitt. Bot. Staatssamml. München* **22**: 221–476.
- SCHWENDENER, S. (1869): *Die Algentypen der Flechtengonidien*. Programm für die Rectoratsfeier der Universität. – Universitätsbuchdruckerei von C. Schultze, Basel, 42 pp.
- SCOTT, G.D. (1971): *Plant symbiosis*. – Edward Arnold Ltd., London, 58 pp.
- SKOWROŃSKI, T. (1986): Influence of some physicochemical factors on cadmium uptake by the green alga *Stichococcus bacillaris*. – *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 423–425.
- SKOWROŃSKI, T., SZUBINSKA, S., PAWLIK, B., JAKUBOWSKI, M., BILEWICZ, R. & CUKROŃSKA, E. (1991): The influence of pH on Cd speciation and toxicity to the green alga *Stichococcus bacillaris*. – *Environm. Pollut.* **74**: 89–100.

- SLOCUM, R.D., AHMADIJAN, V. & HILDRETH, K.C. (1980): Zoosporogenesis in *Trebouxia gelatinosa*. Ultrastructural potential for zoospore release and implications for the lichen association. – *Lichenologist* **12**: 173–187.
- SMITH, D.C. & DOUGLAS, A.E. (1987): The biology of symbiosis. – Richard Clay Ltd., Bungay, Suffolk, 302 pp.
- SOLHANG, K.A. & GAUSLAA, Y. (1996): Parietin, a photoprotective secondary product of the lichen *Xanthoria parietina*. – *Oecologia* **108**: 412–418.
- STENROOS, S.K. & DEPRIEST, P.T. (1998): Small insertions at a shared position in the SSU rDNA of Lecanorales (lichen forming Ascomycetes). – *Curr. Genet.* **33**: 124–130.
- SUZUKI, D.T., GRIFFITHS, A.J.F., MILLER, J.H. & LEWONTIN, R.C. (1991): Genetik. – VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 695 pp.
- SWOFFORD, D.L. (2000): PAUP*. Phylogenetic analysis using Parsimony (*and other Methods). – Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- TAKESHITA, S., HANDA, S., NAKANO, T. & IWATSUK, Z. (1991): Two species of *Trebouxia* (Chlorophyceae) isolated from *Cladia aggregata* (Lichenes). – *Hikobia* **11**: 1–4.
- TARHANEN, S., POIKOLAINEN, J., HOLOPAINEN, T. & OKSANEN, J. (2000): Severe photobiont injuries of lichens are strongly associated with air pollution. – *New Phytol.* **147**: 579–590.
- THELL, A. & MIAO, V. (1999): Phylogenetic analysis of ITS and group I intron sequences from European and North American samples of cetrarioid lichens. – *Ann. Bot. Fenn.* **35**: 275–286.
- THOMPSON, J.N. (1999): Specific hypotheses on the geographic mosaic of coevolution. – *Amer. Naturalist* **153**: S1–S14.
- TIBELL, L. (1980): The lichen genus *Chaenotheca* in the northern hemisphere. – *Symb. Bot. Upsal.* **23**: 1–65.
- TIBELL, L. (1987): Australasian Caliciales. – *Symb. Bot. Upsal.* **27**: 1–279.
- TIBELL, L. (1996): Caliciales – Fl. Neotrop. Monogr. **69**: 1–79.
- TIBELL, L. & BECK, A. (2002): Morphological variation, photobiont association and ITS phylogeny of *Chaenotheca phaeocephala* and *C. subroscida* (Coniocybaceae, lichenized ascomycetes). – *Nordic J. Bot.* **21**: 651–660.
- TOBLER, F. (1925): Biologie der Flechten. Entwicklung und Begriff der Symbiose. – Gebrüder Borntraeger, Berlin, Leipzig, 253 pp.
- TORMO, R., RECIO, D., SILVA, I. & MUNOZ, A.F. (2001): A quantitative investigation of airborne algae and lichen soredia obtained from pollen traps in south-west Spain. – *European J. Phycol.* **36**: 385–390.
- TSCHERMAK-WOESS, E. (1948): Über wenig bekannte und neue Flechtengonidien I. *Chlorella ellipsoidea* GERNECK, als neue Flechtenalge. – *Österr. Bot. Z.* **95**: 341–343.
- TSCHERMAK-WOESS, E. (1978a): *Myrmecia reticulata* as a phycobiont and free-living – free living *Trebouxia* – the problem of *Stenocybe septata*. – *Lichenologist* **10**: 69–79.
- TSCHERMAK-WOESS, E. (1978b): Über die Phycobionten der Sektion Cystophora von *Chaenotheca*, insbesondere *Dictyochloropsis splendida* und *Trebouxia simplex*, spec. nova. – *Pl. Syst. Evol.* **129**: 185–208.
- TSCHERMAK-WOESS, E. (1978c): Über den *Chlorella*-Phycobionten von *Trapelia coarctata*. – *Pl. Syst. Evol.* **130**: 253–263.
- TSCHERMAK-WOESS, E. (1980): *Chaenothecopsis consociata* – kein parasitischer Pilz, sondern lichenisiert mit *Dictyochloropsis symbiontica*, spec. nova. – *Pl. Syst. Evol.* **136**: 287–306.
- TSCHERMAK-WOESS, E. (1988a): The algal partner. – In: GALUN, M. (ed.): CRC Handbook of lichenology. Vol. I: 39–92. – CRC Press, Boca Raton, Florida.

- TSCHERMAK-WOESS, E. (1988b): New and known taxa of *Chlorella* (Chlorophyceae). Occurrence as lichen phycobionts and observations on living dictyosomes. – *Pl. Syst. Evol.* **159**: 123–139.
- TSCHERMAK-WOESS, E. (1989): Developmental studies in trebouxoid algae and taxonomical consequences. – *Pl. Syst. Evol.* **164**: 161–195.
- TSCHERMAK-WOESS, E. (1995): *Dictyochloropsis splendida* (Chlorophyta), the correct phycobiont of *Phlyctis argena* and the high degree of selectivity or specificity involved. – *Lichenologist* **27**: 169–187.
- VATAMANIUK, O.K., BUCHER, E.A., WARD, J.T. & REA, P.A. (2001): A new pathway for heavy metal detoxification in animals. – *Journal of Biological Chemistry* **276**: 20817–20820.
- VATAMANIUK, O.K., MARI, S., LU, Y.-P. & REA, P.A. (1999): AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: Isolation and in vitro reconstitution. – *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 7110–7115.
- VISCHER, W. (1960): Reproduktion und systematische Stellung einiger Rinden- und Bodenalgen. – *Schweiz. Z. Hydrol.* **22**: 330–349.
- WÄGELE, J.-W. (2000): Grundlagen der phylogenetischen Systematik. – Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München, 315 pp.
- WAGENITZ, G. (1996): Wörterbuch der Botanik. – Gustav Fischer Verlag, Jena, 531 pp.
- WANG-YANG, J.R. (1970): Some species of *Trebouxia*, a genus of lichenized algae, from Taiwan fruticose lichens. – *Taiwania* **15**: 181–188.
- WARÉN, H. (1920): Reinkultur von Flechtengonidien. – *Oefvers. Förh. Finska Vetensk.-Soc.* **61**: 1–79.
- WATANABE, S., NAKANO, T. & DEGUCHI, H. (1997): Photobionts isolated from maritime lichens. – *Journal of Marine Biotechnology* **5**: 103–112.
- WEBER, W. (1962): Environmental modification and the taxonomy of the crustose lichens. – *Svensk Bot. Tidskr.* **56**: 293–333.
- WEDIN, M. & DÖRING, H. (2000): The phylogenetic relationship of the Sphaerophoraceae, *Austropeltum* and *Neophyllis* (lichenized Ascomycota) inferred by SSU rDNA sequences. – *Mycol. Res.* **103**: 1131–1137.
- WEDIN, M., DÖRING, H., NORDIN, A. & TIBELL, L. (2000): Small subunit rDNA phylogeny shows the lichen families Caliciaceae and Physciaceae (Lecanorales, Ascomycotina) to form a monophyletic group. – *Canad. J. Bot.* **78**: 246–254.
- WETMORE, C.M. (1960): The lichen genus *Nephroma* in North and Middle America. – *Publ. Mus. Michigan State Univ., Biol. Ser.* **1**: 369–452.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S. & TAYLOR, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. – In: INNES, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J. & WHITE, T.J. (eds.): *PCR Protocols: A guide to methods and applications*: 315–322. – Academic press, New York.
- WIRTH, V. (1972): Die Silikatflechten-Gemeinschaften im außeralpinen Zentraleuropa. – *Diss. Bot.* **17**: 1–325.
- WIRTH, V. (1980): Flechtenflora. – Ulmer Verlag, Stuttgart, 552 pp.
- WIRTH, V. (1983): Phytosoziologie, Ökologie und Systematik bei Flechten. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **96**: 103–115.
- WIRTH, V. (1995): Die Flechten Baden-Württembergs. Teil 1 und 2. – Ulmer-Verlag, Stuttgart, 1006 pp.
- WONG, H.M. & BRADSHAW, A.D. (1982): A comparison of the toxicity of heavy metals, using root elongation of the rye grass, *Lolium perenne*. – *New Phytol.* **91**: 255–261.

- YAMAMOTO, Y., KINOSHITA, Y., TAKAHAGI, T., KROKEN, S., KUROKAWA, T. & YOSHIMURA, I. (1998): Factors affecting discharge and germination of lichen ascospores. – *J. Hattori Bot. Lab.* **85**: 267–278.
- ZAUG, A.J., GRABOWSKI, P.J. & CECH, T.R. (1983): Autocatalytic cyclization of an excised intervening sequence RNA is a cleavage-ligation reaction. – *Nature* **301**: 578–583.
- ZEHNDER, A. (1949): Über den Einfluß von Wuchsstoffen auf Flechtenbildner. – *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **59**: 201–267.
- ZUKER, M., MATHEWS, D.H. & TURNER, D.H. (1999): Algorithms for RNA secondary structure prediction: a practical guide. – In: BARCISZEWSKI, J. & CLARK, B.F.C. (eds.): *RNA Biochemistry and Biotechnology*: 11–43. – NATO Advanced Science Institutes Series, Plenum Press, New York.

8 Anhang

8.1 Anhang A: Sekundärstrukturvergleiche der ITS2 nrRNA

Es sollte geklärt werden, ob sich die morphologisch abgrenzbaren Arten der Gattung *Trebouxia* durch korrelierte Basenaustausche in der ITS2 nrRNA unterscheiden. Hierfür wurde die Sequenz von *T. simplex* [gt A] (AB97.017A2) als Referenz für Vergleiche innerhalb der *Trebouxia simplex*-Gruppe und von *Trebouxia arboricola* SAG 219-1b, dem Typusstamm der Gattung *Trebouxia*, als Referenz für Vergleiche innerhalb der Gattung *Trebouxia* gewählt. Ist eine Base mutiert, so ist dies durch einen kleineren Kästchen daneben, kam es zu einer Deletion fehlt dieses Kästchen. Korrelierte Basenaustausche sind durch Pfeile markiert.

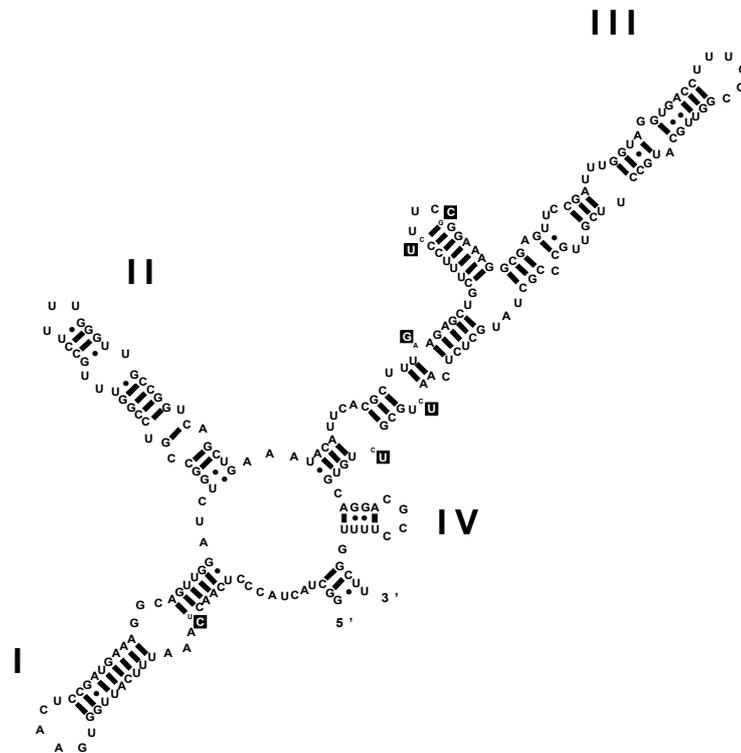


Abb. 41: Sequenzunterschiede in der ITS2 nrRNA zwischen den Algenklonen *T. simplex* [gt G] (TF86.132E1) und *T. simplex* [gt A] (AB97.017A2), gezeigt an der Sekundärstruktur der ITS2 nrRNA des Klons AB97.017A2.

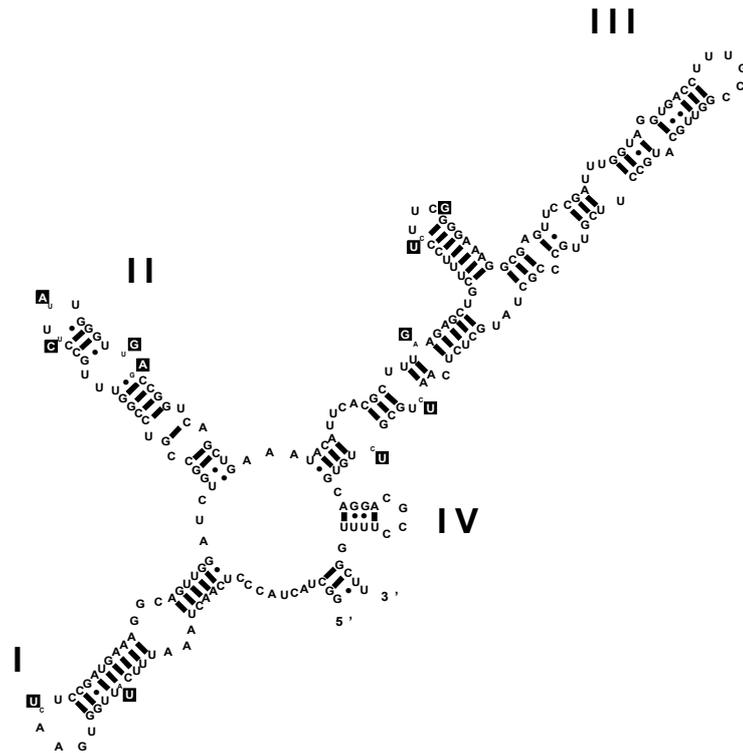


Abb. 44: Sequenzunterschiede in der ITS2 nrRNA zwischen den Algenklonen *T. brindabellae* (AB99.028C2) und *T. simplex* [gt A] (AB97.017A2), gezeigt an der Sekundärstruktur der ITS2 nrRNA des Klons AB97.017A2.

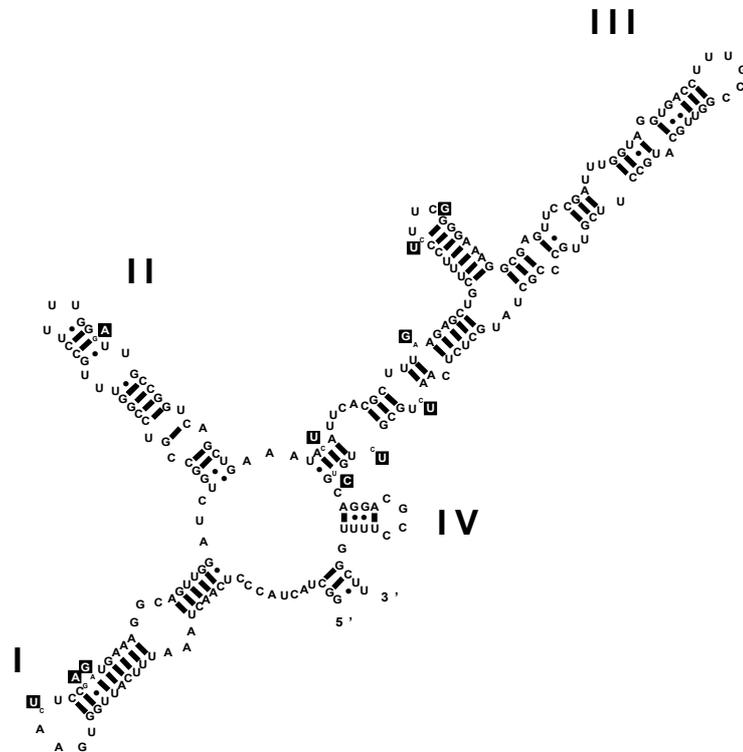


Abb. 45: Sequenzunterschiede in der ITS2 nrRNA zwischen den Algenklonen *T. australis* (AB99.026B4) und *T. simplex* [gt A] (AB97.017A2), gezeigt an der Sekundärstruktur der ITS2 nrRNA des Klons AB97.017A2.

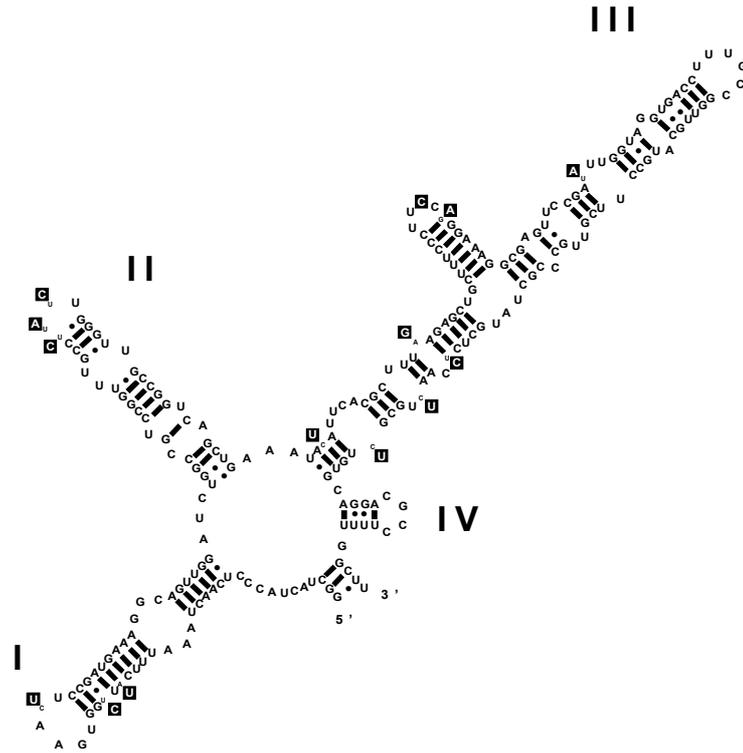


Abb. 46: Sequenzunterschiede in der ITS2 nrRNA zwischen den Algenklonen *T. simplex* [gt C] (AB98.123B2) und *T. simplex* [gt A] (AB97.017A2), gezeigt an der Sekundärstruktur der ITS2 nrRNA des Klons AB97.017A2.

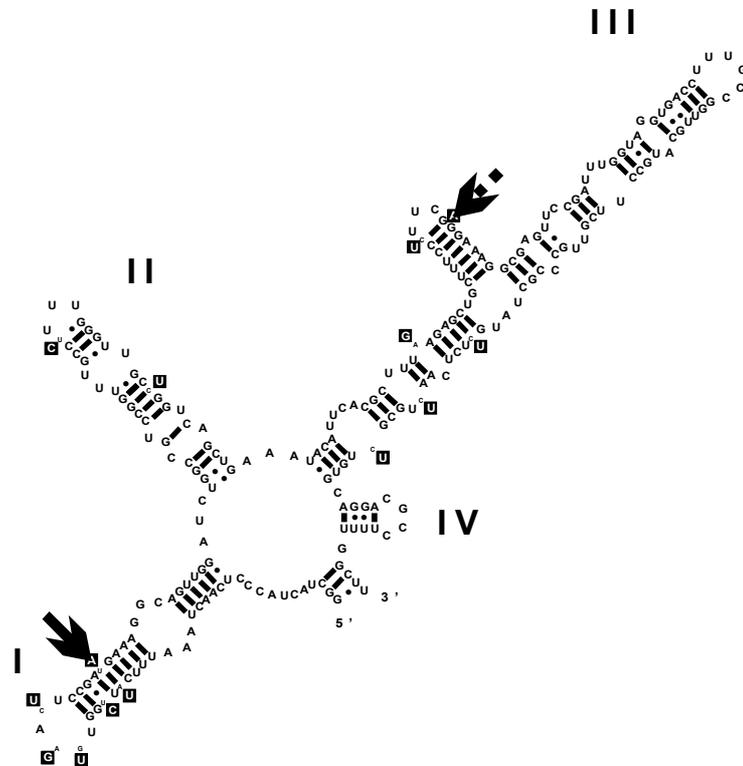


Abb. 47: Sequenzunterschiede in der ITS2 nrRNA zwischen den Algenklonen *T. simplex* [gt D] (AB98.143B4) und *T. simplex* [gt A] (AB97.017A2), gezeigt an der Sekundärstruktur der ITS2 nrRNA des Klons AB97.017A2.

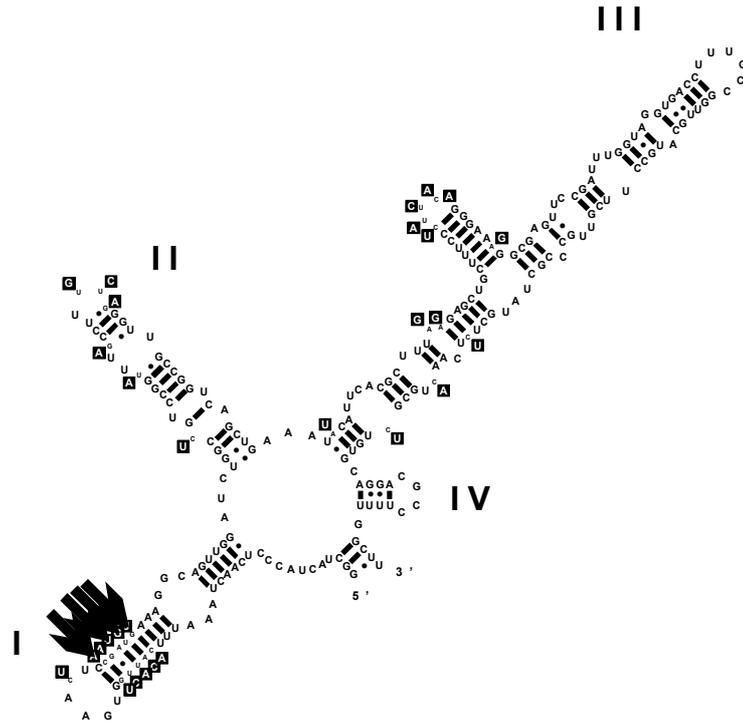


Abb. 50: Sequenzunterschiede in der ITS2 nrRNA zwischen den Algenklonen *T. letharii* sp. 1 und *T. simplex* [gt A] (AB97.017A2), gezeigt an der Sekundärstruktur der ITS2 nrRNA des Klons AB97.017A2.

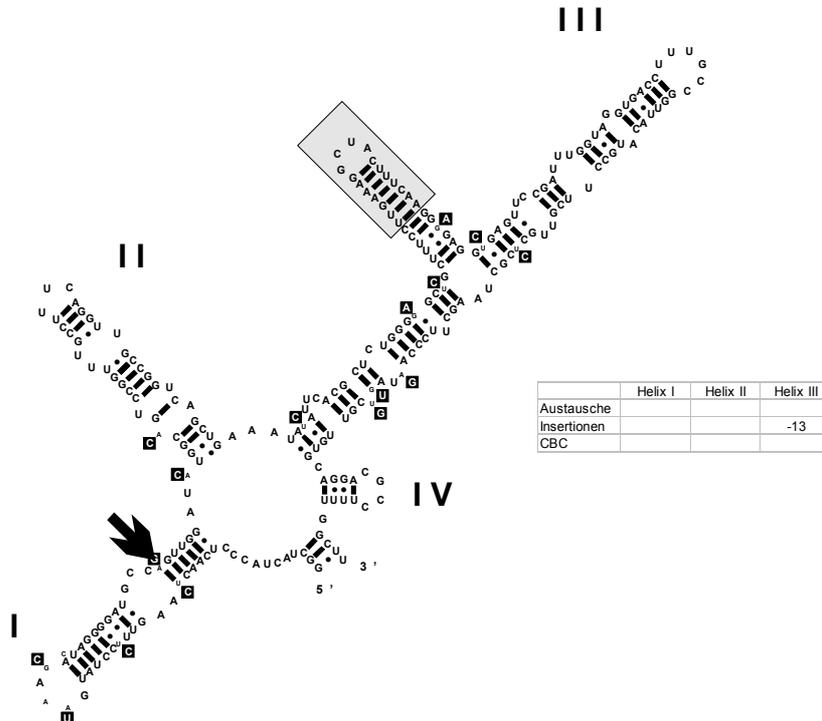


Abb. 51: Sequenzunterschiede in der ITS2 nrRNA zwischen *Trebouxia asymmetrica* SAG 48.88 und *Trebouxia arboricola* SAG 219-1b, gezeigt an der Sekundärstruktur der ITS2 nrRNA von *T. arboricola* SAG 219-1b. Die nicht dargestellten Unterschiede (im unterlegten Kasten) sind in der eingefügten Tabelle zusammengefasst.

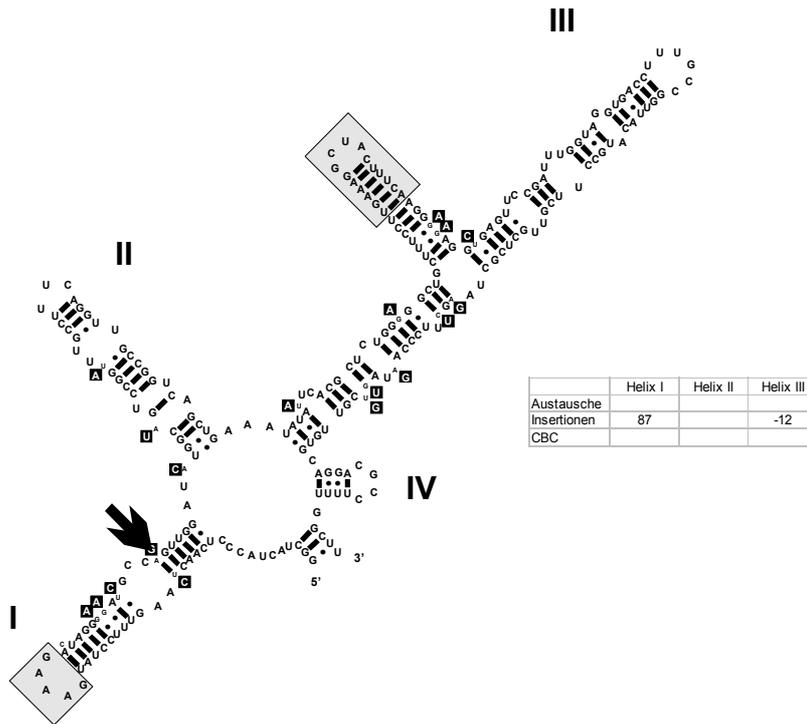


Abb. 52: Sequenzunterschiede in der ITS2 nrRNA zwischen *Trebouxia gigantea* UTEX 2231 und *Trebouxia arboricola* SAG 219-1b, gezeigt an der Sekundärstruktur der ITS2 nrRNA von *T. arboricola* SAG 219-1b. Die nicht dargestellten Unterschiede (im unterlegten Kasten) sind in der eingefügten Tabelle zusammengefasst.

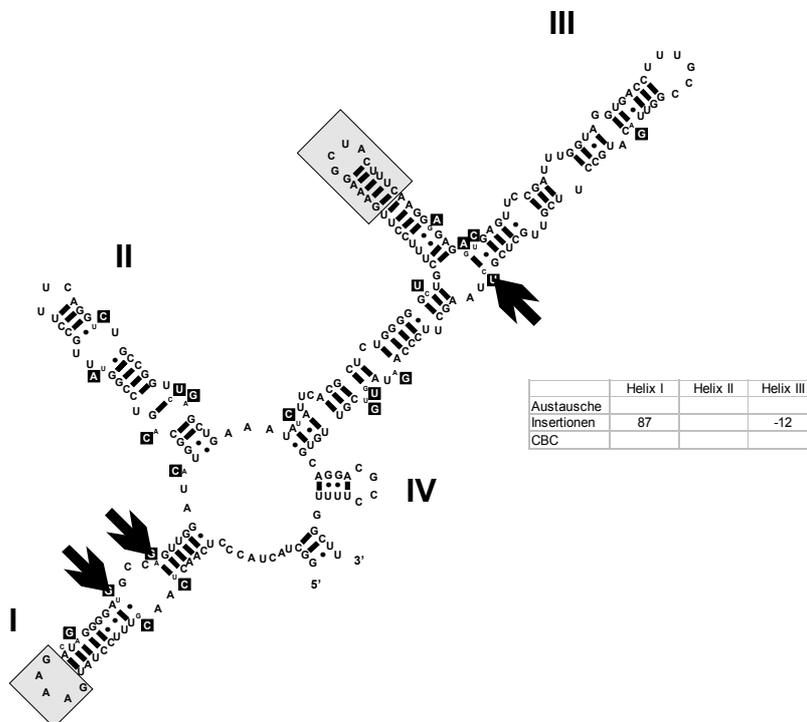


Abb. 53: Sequenzunterschiede in der ITS2 nrRNA zwischen *Trebouxia incrustata* UTEX 784 und *Trebouxia arboricola* SAG 219-1b, gezeigt an der Sekundärstruktur der ITS2 nrRNA von *T. arboricola* SAG 219-1b. Die nicht dargestellten Unterschiede (im unterlegten Kasten) sind in der eingefügten Tabelle zusammengefasst.

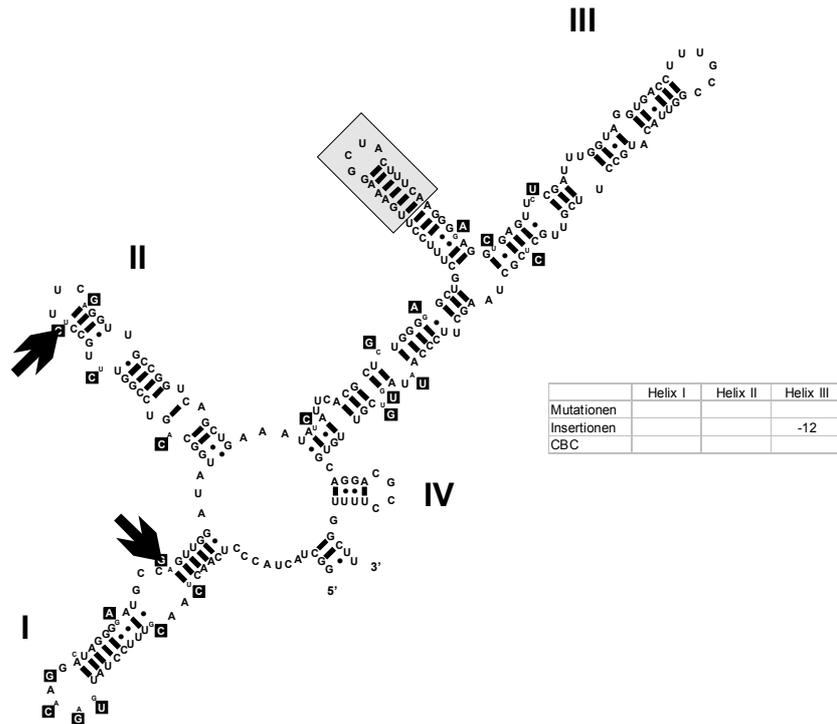


Abb. 54: Sequenzunterschiede in der ITS2 nrRNA zwischen *Trebouxia jamesii* UTEX 2233 und *Trebouxia arboricola* SAG 219-1b, gezeigt an der Sekundärstruktur der ITS2 nrRNA von *T. arboricola* SAG 219-1b. Die nicht dargestellten Unterschiede (im unterlegten Kasten) sind in der eingefügten Tabelle zusammengefasst.

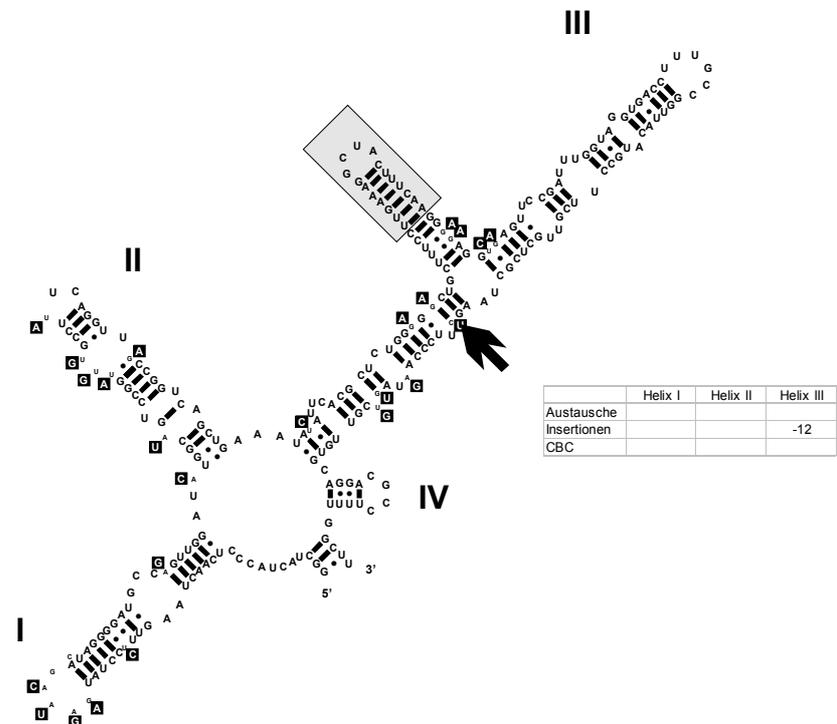


Abb. 55: Sequenzunterschiede in der ITS2 nrRNA zwischen *Trebouxia showmanii* UTEX 2234 und *Trebouxia arboricola* SAG 219-1b, gezeigt an der Sekundärstruktur der ITS2 nrRNA von *T. arboricola* SAG 219-1b. Die nicht dargestellten Unterschiede (im unterlegten Kasten) sind in der eingefügten Tabelle zusammengefasst.

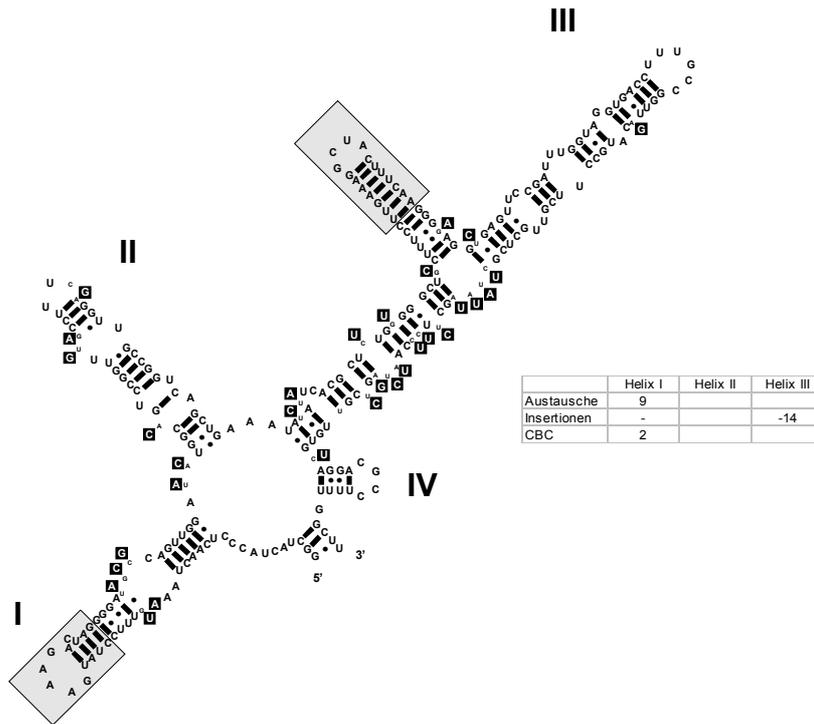


Abb. 56: Sequenzunterschiede in der ITS2 nrRNA zwischen *Trebouxia corticola* UTEX 909 und *Trebouxia arboricola* SAG 219-1b, gezeigt an der Sekundärstruktur der ITS2 nrRNA von *T. arboricola* SAG 219-1b. Die nicht dargestellten Unterschiede (im unterlegten Kasten) sind in der eingefügten Tabelle zusammengefasst.

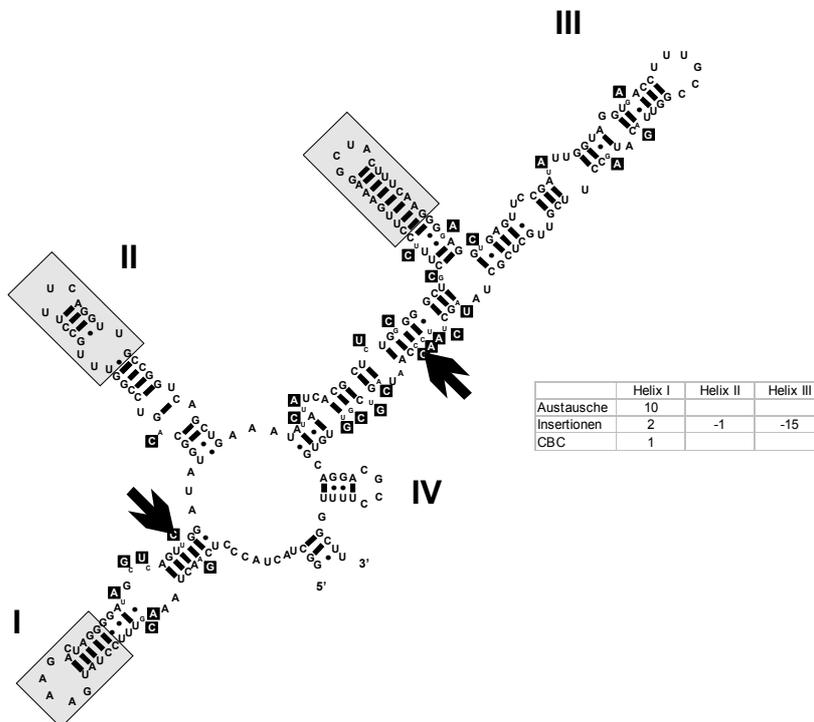


Abb. 57: Sequenzunterschiede in der ITS2 nrRNA zwischen *Trebouxia higginsiae* UTEX 2232 und *Trebouxia arboricola* SAG 219-1b, gezeigt an der Sekundärstruktur der ITS2 nrRNA von *T. arboricola* SAG 219-1b. Die nicht dargestellten Unterschiede (im unterlegten Kasten) sind in der eingefügten Tabelle zusammengefasst.

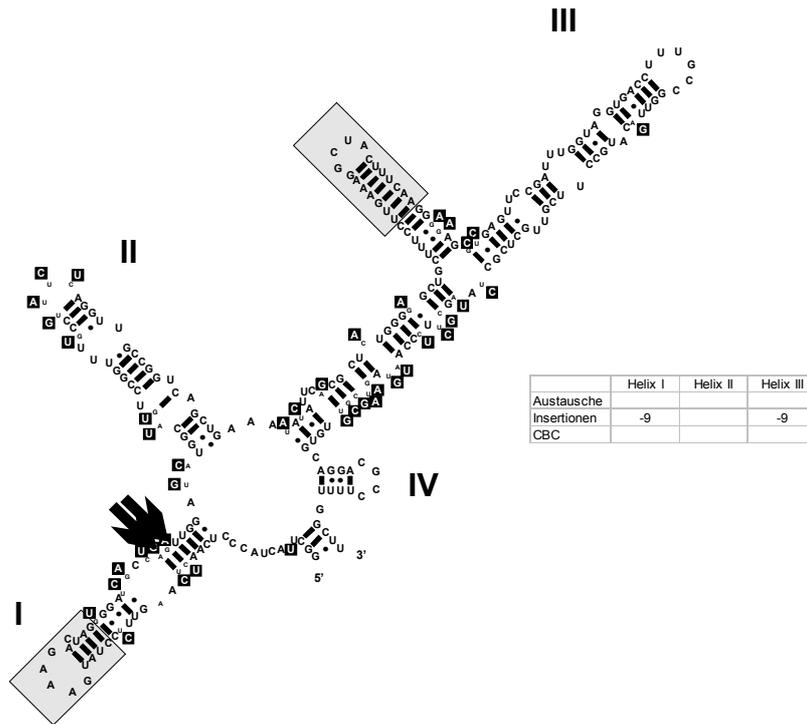


Abb. 58: Sequenzunterschiede in der ITS2 nrRNA zwischen *Trebouxia impressa* (AB96.012A2) und *Trebouxia arboricola* SAG 219-1b, gezeigt an der Sekundärstruktur der ITS2 nrRNA von *T. arboricola* SAG 219-1b. Die nicht dargestellten Unterschiede (im unterlegten Kästen) sind in der eingefügten Tabelle zusammengefasst.

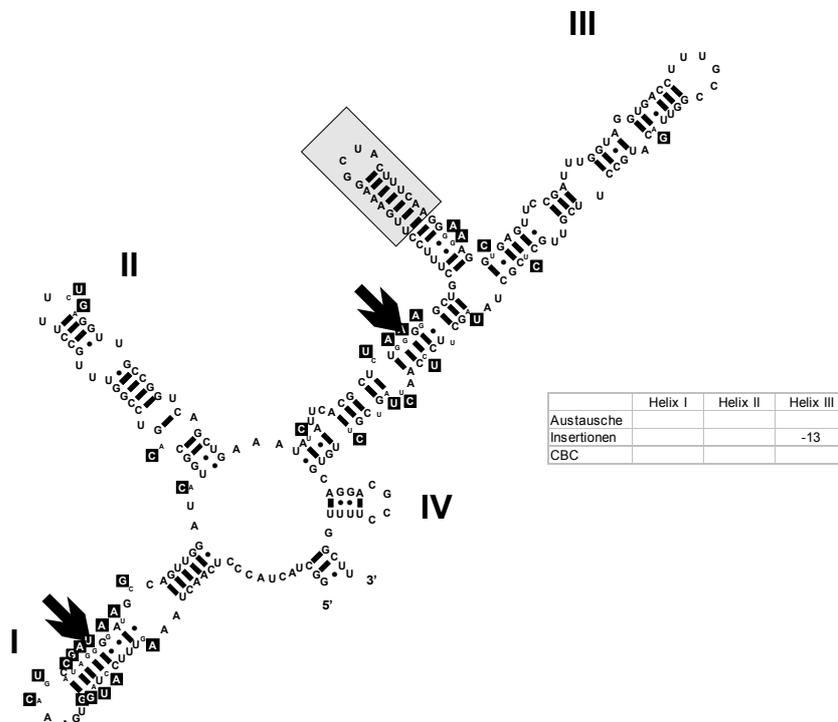


Abb. 59: Sequenzunterschiede in der ITS2 nrRNA zwischen *Trebouxia simplex* [gt A] (AB97.017A2) und *Trebouxia arboricola* SAG 219-1b, gezeigt an der Sekundärstruktur der ITS2 nrRNA von *T. arboricola* SAG 219-1b. Die nicht dargestellten Unterschiede (im unterlegten Kästen) sind in der eingefügten Tabelle zusammengefasst.

8.2 Anhang B: Photographien der Flechten und Photobionten

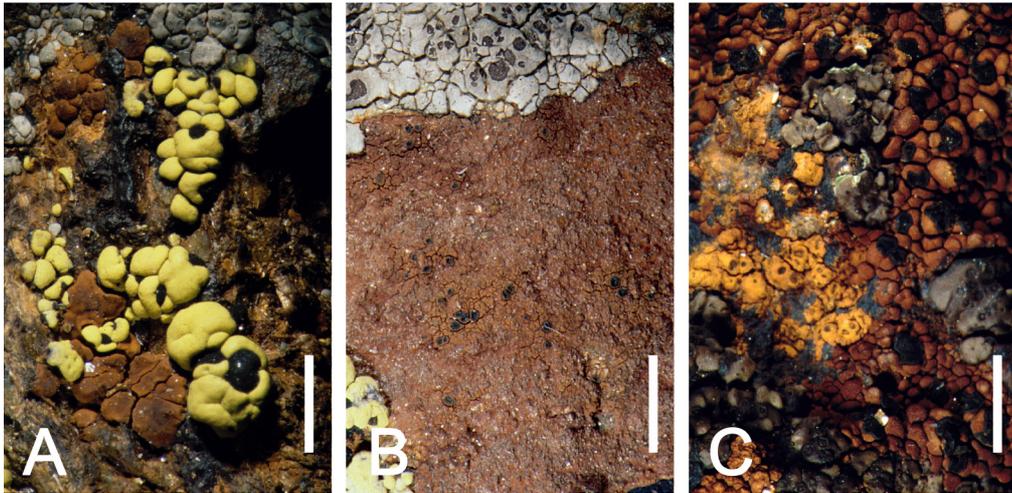


Abb. 60: Charakteristische Flechten des *Acarosporium sinopicae*. A) *Acarospora sinopica* (rot) mit *Rhizocarpon norvegicum* (gelb). B) *Tremolecia atrata* (Bildmitte) mit *Bellemerea alpina* (oben). C) *Lecidea silacea* (dunkelrot), mit *Bellemerea cinereorufescens* (orange) und *Acarospora rugulosa* (braun). Maßstab: 5 mm.

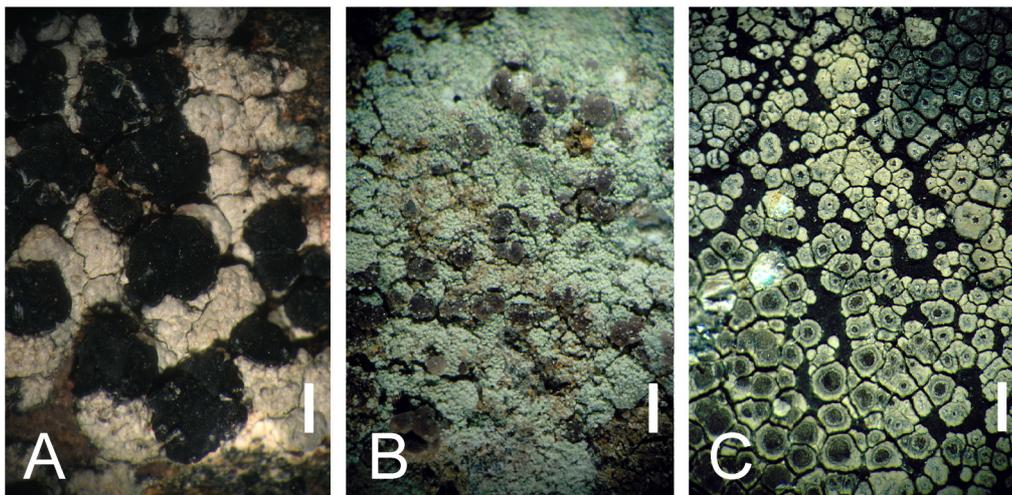


Abb. 61: Charakteristische Flechten des *Lecideetum inopis*. A) *Lecidea inops*. B) *Psilolechia leprosa*. C) *Bellemerea alpina*, mit Kupfereinlagerungen im Thallus. Maßstab: 1 mm.

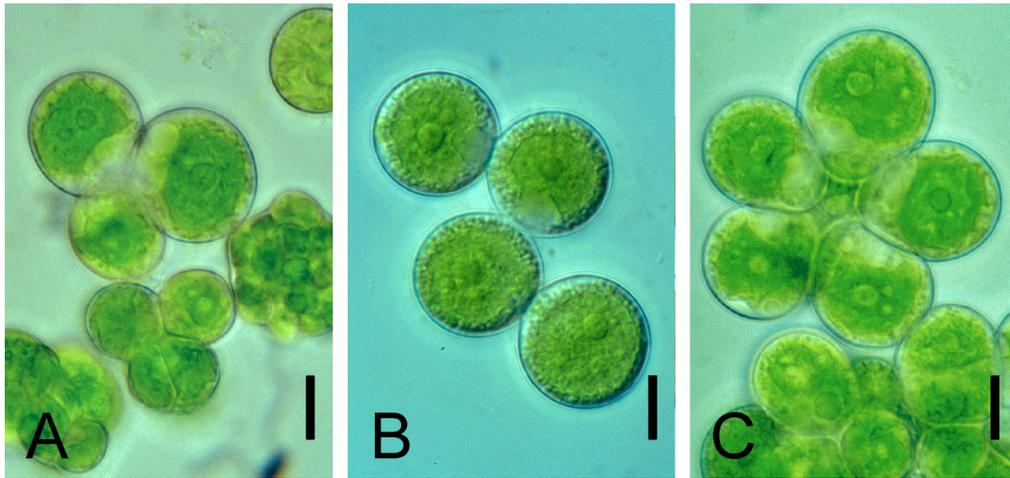


Abb. 62: *Trebouxia incrustata*; optischer Schnitt, median, Chloroplast mit sehr feinen Loben. A) *Trebouxia incrustata* (AB00.010B1). B) *Trebouxia incrustata* [gt A] (AB99.029B3). C) *Trebouxia incrustata* [gt B](AB00.004B5). Maßstab: 10 μ m.

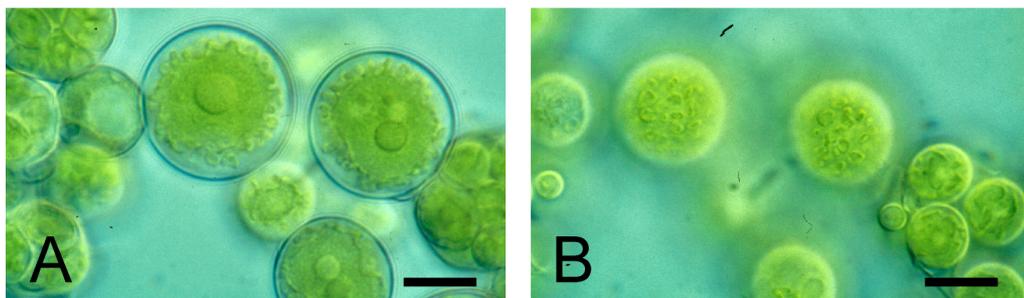


Abb. 63: *Trebouxia angustilobata* (AB97.027A5). A) Optischer Schnitt, median. B) Aufsicht auf den Chloroplasten, dessen Loben ein Muster aus kleinen Feldern bilden. Maßstab: 10 μ m.

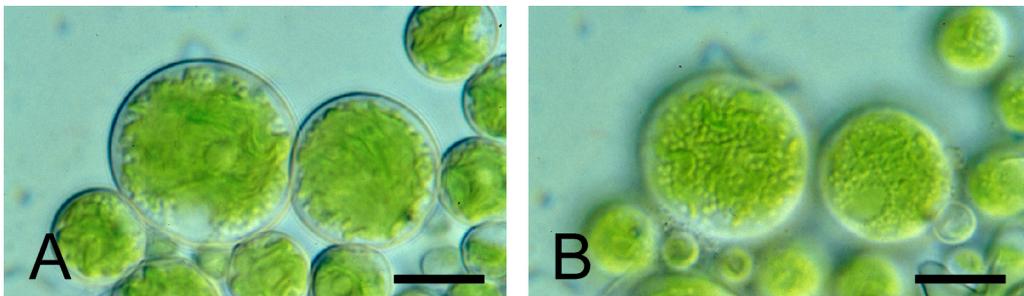


Abb. 64: *Trebouxia australis* (AB99.026B4). A) Optischer Schnitt, median. B) Aufsicht auf den Chloroplasten, dessen Loben ein Muster aus sehr kleinen oder schmalen Feldern bilden. Maßstab: 10 μ m.

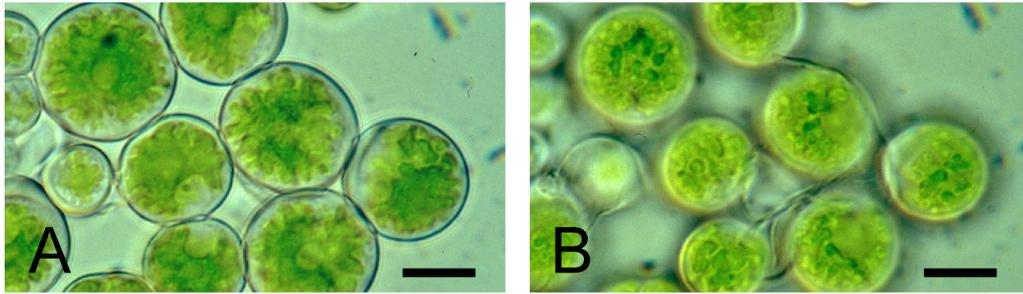


Abb. 65: *Trebouxia brindabellae* (AB99.028C2). A) Optischer Schnitt, median. B) Aufsicht auf den Chloroplasten, dessen Loben ein Muster aus breiten Feldern bilden. Maßstab: 10 μm .

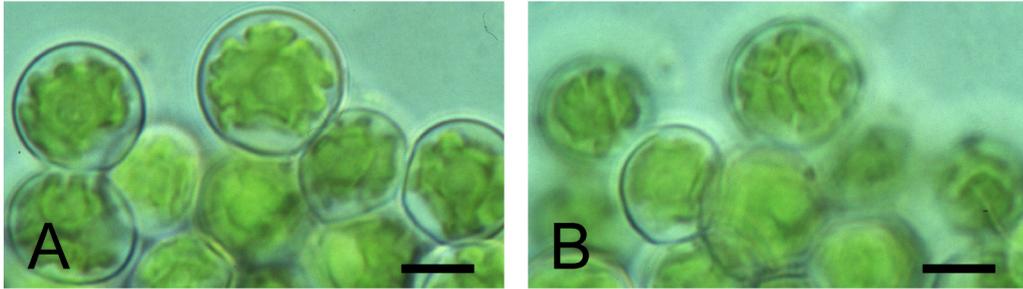


Abb. 66: *Trebouxia simplex* [gt A] (AB97.017A2). A) Optischer Schnitt, median. B) Aufsicht auf den Chloroplasten, dessen Loben ein Muster aus breiten Feldern bilden. Maßstab: 10 μm .

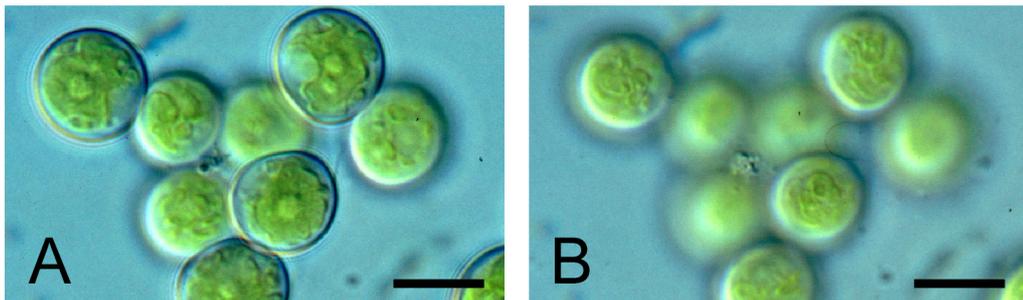


Abb. 67: *Trebouxia suecica* (AB98.140B3). A) Optischer Schnitt, median. B) Aufsicht auf den Chloroplasten, dessen Loben ein Muster aus breiten Feldern bilden. Maßstab: 10 μm .

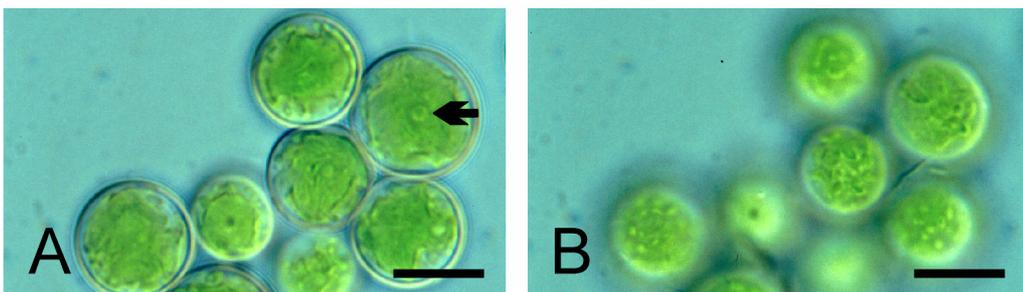


Abb. 68: *Trebouxia jamesii* (UTEX2233). A) Optischer Schnitt, median. Das Pyrenoid (durch den Pfeil markiert) ist – im Verhältnis zur Zellgröße – deutlich kleiner als bei den Zellen der Klonen der *T. simplex*-Gruppe. B) Aufsicht auf den Chloroplasten, dessen Loben ein Muster aus breiten Feldern bilden. Maßstab: 10 μm .

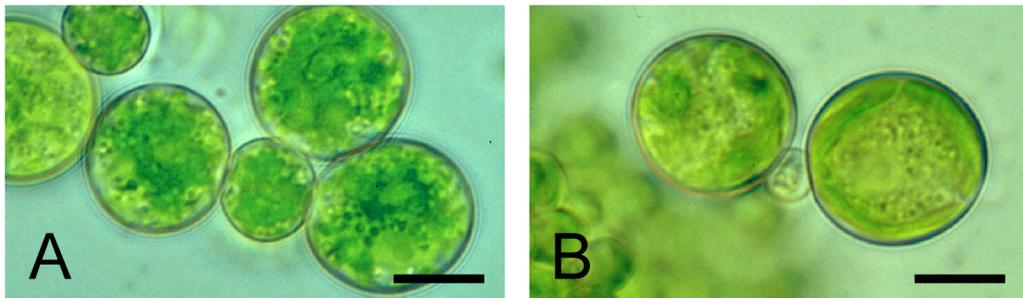


Abb. 69: Photobionten der Gattung *Asterochloris*. A) *Asterochloris irregularis*. B) *Asterochloris magna* (Chloroplast wandständig). Maßstab: 10 μ m.

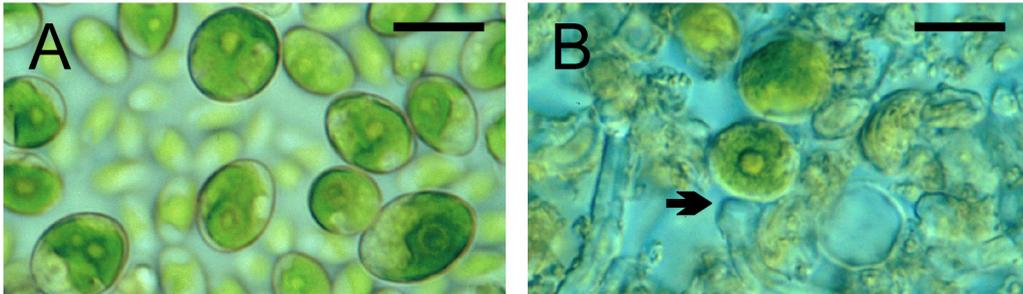


Abb. 70: *Chlorella saccharophila*. A) Klon AB98.017A3 in Kultur. B) Quetschpräparat des Lagers von *Psilolechia leprosa*, mit Lugol'scher Lösung gefärbt. Der Pfeil markiert ein Appressorium. Maßstab: 10 μ m.

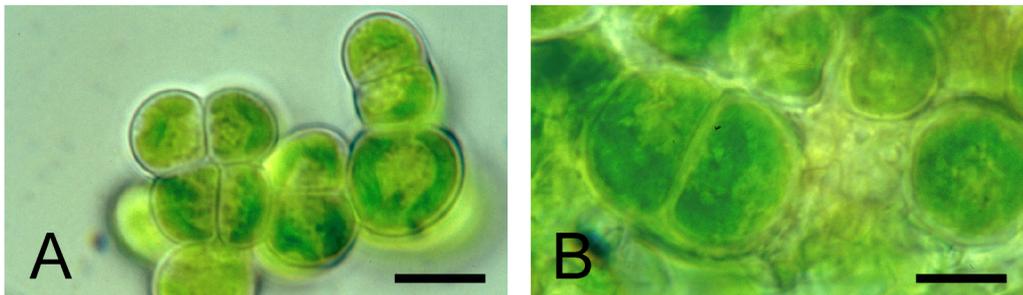


Abb. 71: *Apatococcus lobatus*. A) Klon AB98.017A3 in Kultur. B) Quetschpräparat des Lagers von *Scoliciosporum umbrinum* mit dem charakteristischen Zellteilungsstadium (Diade) mit wandständigem Chloroplasten (links), gefärbt mit Lugol'scher Lösung. Maßstab: 10 μ m.

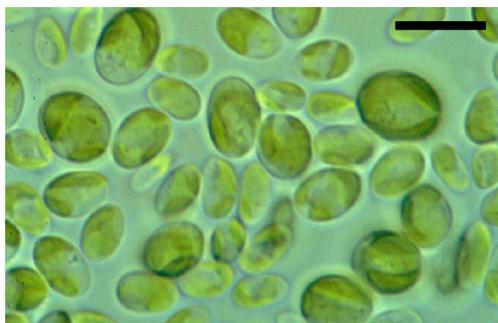


Abb. 72: *Coccomyxa* spec. aus *Dibaeis baeomyces* isoliert (AB98086B1). Maßstab: 10 μ m.

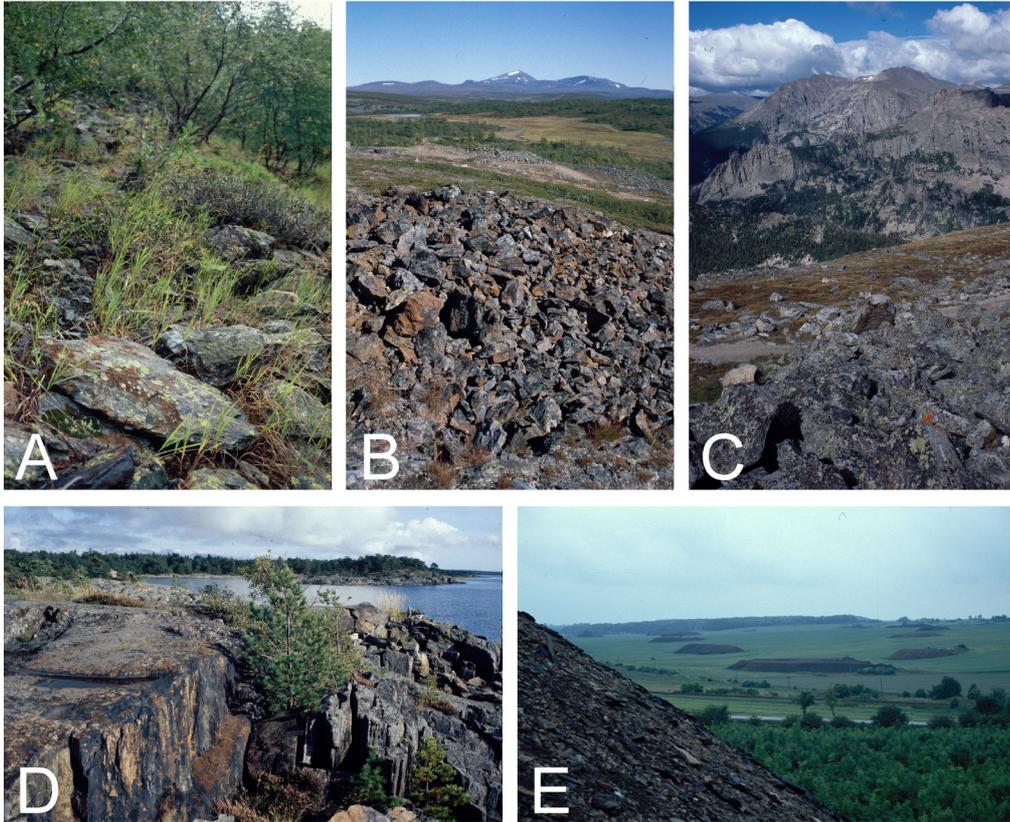


Abb. 73: Sammelstellen. A) Österreich, Schwarze Wand. B) Schweden, Ramundberget. C) USA, Flattop Mountain. D) Schweden, Utön. E) Deutschland, Mansfelder Land.

9 Danksagung

Meinem Betreuer Prof. Dr. G. RAMBOLD (Bayreuth) danke ich für die Überlassung des Themas und seine hervorragende Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit, allem voran seine stete Diskussionsbereitschaft, ganz herzlich. Er weckte mein Interesse an der Lichenologie.

Die Studienstiftung des Deutschen Volkes gewährte mir ein Promotionsstipendium zur Durchführung der Arbeit und finanzielle Unterstützung für Kongressbesuche und einen USA-Aufenthalt. Meinem Vertrauensdozenten Prof. Dr. R. LORENZ (München) danke ich besonders für die sehr gute Betreuung.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. T. FRIEDL (Göttingen), der nicht nur Stammkulturen zur Verfügung stellte, sondern auch in zahlreichen anregenden Diskussionen großen Anteil an dieser Arbeit nahm, und Prof. Dr. D. BHATTACHARYA (Iowa City), in dessen Labor ich meine Kenntnisse zur molekularen Evolution und Sekundärstrukturen von RNA-Molekülen erweitern konnte. Ihnen und ihren Mitarbeitern danke ich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und gewährte Gastfreundschaft.

Prof. Dr. E. GRILL (München) und seinen Mitarbeitern Dr. MEV. SCHMÖGER (München) und Dr. M. OVEN (London) danke ich für ihre Unterstützung bei den Versuchen zur Schwermetalltoleranz ganz herzlich.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. H-U. KOOP, Prof. Dr. R. AGERER, Prof. Dr. G. WANNER und Prof. Dr. J. GRAU (alle München), die durch die zur Verfügungstellung ihrer Labors wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. RAMBOLD und Dr. D. TRIEBEL (München) sowie Dr. F. SCHUHWERK (München) danke ich für die außerordentlich gute Zusammenarbeit. C. STADTKUS (München) und A. KIRPAL (Bayreuth) danke ich besonders für ihre ausgezeichnete Hilfe bei technischen Arbeiten vor allem beim Sequenzieren der Proben.

Prof. Dr. J. ELIX (Canberra) und Prof. Dr. H. HERTEL (München) danke ich für die Bereitstellung von Aufsammlungen und Unterstützung bei der Bestimmung einiger Flechten. B. OWE-LARSSON (Stockholm), Dr. P. SCHOLZ (Schkeuditz), Dr. L. TIBELL (Uppsala) und Prof. Dr. B. WEBER (Boulder) begleiteten mich auf Exkursionen und stellten mir ihre wertvollen Ortskenntnisse zur Verfügung.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und meinen Eltern bedanken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

München, den

Lebenslauf

von: Andreas Beck
geboren am: 16.09.1969 in München; Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet, ein Kind

Ausbildung:

1975 – 1979: Grundschule Gauting
1979 – 1989: Feodor-Lynen-Gymnasium, Planegg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1989 – 1990: Zivildienst an der Jugendherberge Berchtesgaden
11.1990: Aufnahme des Biologie-Studiums (Diplom) an der LMU München
11.1992: Vordiplom
1992 – 1996: Hauptstudium mit Schwerpunkt Botanik
08.1993 – 08.1994: Stipendiat des DAAD an der Universidad de Concepción in Chile
04.1996 – 02.1997: Diplomarbeit am Institut für Systematische Botanik der LMU München unter Anleitung von PD Dr. G. Rambold; Thema: “Das Artenspektrum der Photobionten in *Trentepohlia umbrina*-dominierten Rindenflechtengemeinschaften”
05.02.1997: Hauptdiplom
seit 09.1997: Beginn der Promotion unter Anleitung von PD Dr. G. Rambold, heute Professor für Mykologie und Lichenologie an der Universität Bayreuth

Berufspraxis:

03. – 12.1997: Wissenschaftliche Hilfskraft am Botanischen Institut der LMU München (Prof. Dr. H-U. Koop) und der Botanischen Staatssammlung, München (Frau Dr. D. Triebel)
09.1997 – 02.1998: Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Botanik (Prof. Dr. E. Grill) der Technischen Universität München
03.1998 – 02.2001: Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes
03.2001 – 04.2001: Wissenschaftlicher Angestellter an der Botanischen Staatssammlung, München (Frau Dr. D. Triebel)
05.2001 – 02.2002: Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Botanik (Prof. Dr. E. Grill) der Technischen Universität München
seit 03.2002: Wissenschaftlicher Angestellter an der Botanischen Staatssammlung, München (Frau Dr. D. Triebel)

Offsetdruck Fischer GmbH
Akazienweg 6
85551 Kirchheim
Tel: 089 / 904 41 83

ISBN-Nr.: 3 – 9808102 – 0 -8