

Reaktionsmuster und morphogenetisches Potential isolierter
Mycobionten (Flechtenpilze) und die Bedeutung für den
Symbioseorganismus Flechte

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Sabine Etges
aus Mönchengladbach

Düsseldorf
2001

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin: Prof. Dr. Sieglinde Ott

Koreferent: Prof. Dr. Martin Jahns

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Dezember 2001

... denn eigentlich sind die verwickelten Fälle die interessantesten.

Johann Wolfgang von Goethe
(Die Wahlverwandtschaften)

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1	Material	11
2.1.1	Auswahl des Flechtenmaterials	11
2.1.2	Verbrauchsmaterial	13
2.1.2.1	Membranfilter	13
2.1.2.2	Kulturmedien	13
2.2	Methoden	14
2.2.1	Isolierung der Flechtenbionten	14
2.2.1.1	Isolierung der Mycobionten	14
2.2.1.2	Isolierung der Photobionten	16
2.2.2	Kulturbedingungen	16
2.2.2.1	Photobionten	16
2.2.2.2	Mycobionten	16
2.2.3	Veränderungen der Kulturbedingungen	16
2.2.4	Untersuchung der radialen Zuwachsrates der Mycelien	17
2.2.5	Untersuchung chemotropischer Reaktionen	17
2.2.6	Zugabe von Photobionten	18
2.2.7	Parietin-Nachweis	18
2.2.8	Probenpräparationen	18
2.2.8.1	Lichtmikroskopie	18
2.2.8.2	Elektronenmikroskopie	19
3	ERGEBNISSE	21
3.1	Keimung der Ascosporen und Mycelbildung unter axenischen Bedingungen	23
3.1.1	Versuche zur Isolation von Mycobionten aus Flechten der Ordnung der Peltigerales	23
3.1.1.1	Die Gattung <i>Solorina</i>	25
3.1.1.2	Die Gattung <i>Peltigera</i>	28
3.1.2	Versuche zur Isolation des Mycobionten <i>Rhizocarpon geographicum</i>	33
3.1.3	Isolation der Mycobionten von <i>Xanthoria parietina</i> , <i>Physcia tenella</i> , <i>Physconia distorta</i> , <i>Anaptychia ciliaris</i> und <i>Baeomyces rufus</i>	33
3.1.3.1	Sporulations- und Keimverhalten, Mycelbildung	34
3.1.3.2	Vergleich des Sporulations- und Keimverhaltens der verschiedenen Arten	36
3.2	Wachstumsmuster und Morphogenese axenisch wachsender Mycobionten	38
3.2.1	Reaktionsmuster isolierter Mycobionten unter axenischen Bedingungen	38
3.2.1.1	Chemotropismus	39
3.2.1.2	Verzweigungshäufigkeit der Hyphenfilamente	39
3.2.1.3	Entwicklung der Mycelien	41

3.2.1.4	Zell-Zell-Kontakte	45
3.2.1.5	Radiale Zuwachsraten der Mycelien	47
3.2.1.6	Phasenwechsel: Umschalten des Verzweigungsmodus in Abhängigkeit von der Nährstoffkonzentration	49
3.2.1.7	Vitalität der Mycelien	51
3.2.1.9	Beeinflussung des Wachstums durch die physikalische Beschaffenheit der Substrate	52
3.2.2	Besonderheiten der polysporen Mycelien	55
3.2.2.1	Ausbildung von Hyphenbrücken und Verschmelzung von Mycelien	55
3.2.2.2	Heterogenität der Mycelcluster	57
3.2.2.3	Konkurrenzfähigkeit der Mycelien	57
3.2.3	Unterschiede in der Entwicklung der verschiedenen Mycobionten	58
3.2.3.1	<i>Xanthoria parietina</i>	58
3.2.3.2	<i>Physcia tenella</i>	60
3.2.3.3	<i>Physconia distorta</i>	62
3.2.3.4	<i>Anaptychia ciliaris</i>	64
3.2.3.5	<i>Baeomyces rufus</i>	65
3.2.3.6	<i>Peltigera didactyla</i>	67
3.2.4	Einfluß verschiedener Substanzen auf das Wachstumsverhalten der Mycobionten	67
3.2.4.1	Wirkung der Kohlenhydrate Ribitol und Glukose	68
3.2.4.2	Phytohormone	71
3.2.4.3	Substanzkombinationen	74
3.3	Einflüsse von Photobionten auf die Morphogenese und intrazelluläre Struktur der isolierten Mycobionten	76
3.3.1	Reaktion der Mycobionten auf angebotene Algen unter Laborbedingungen	76
3.3.1.1	Reaktion der Mycobionten auf ihre arteigenen Photobionten	76
3.3.1.2	Algenspezifität	78
3.3.2	Ultrastruktur: concentric bodies	79
3.4	Überleben unlichenisierter Mycobionten am natürlichen Standort und Möglichkeiten der Relichenisierung	80
3.4.1	Charakterisierung des Standortes	80
3.4.2	Beobachtungen nach 1 Jahr	82
3.4.3	Beobachtungen am Mycobionten von <i>Physcia tenella</i>	84
3.4.4	Kolonisierung der Mycobionten von <i>Anaptychia ciliaris</i> , <i>Physconia distorta</i> und <i>Xanthoria parietina</i> durch vegetative Diasporen	79
3.4.5	Befall der Mycobionten durch Fremdpilze	90

4	DISKUSSION	91
4.1	Isolation der Mycobionten	91
4.1.1	Peltigerales	93
4.1.1.1	Die Gattung <i>Solorina</i>	93
4.1.1.2	Die Gattung <i>Peltigera</i>	94
4.1.2	Erfolgreiche Isolation des Mycobionten von <i>Peltigera didactyla</i>	98
4.1.3	Erfolgreiche Resynthese der Flechte <i>Peltigera venosa</i> aus Ascosporen	99
4.1.4	<i>Rhizocarpon geographicum</i>	100
4.1.5	Isolation der Mycobionten aus <i>Baeomyces rufus</i> , <i>Xanthoria parietina</i> , <i>Physcia tenella</i> , <i>Physconia distorta</i> und <i>Anaptychia ciliaris</i>	100
4.1.5.1	Sporulationsverhalten	100
4.1.5.2	Keimverhalten	101
4.1.6	Zusammenfassung I	103
4.2	Reaktionsmuster der Hyphenfilamente	104
4.2.1	Tropismen	105
4.2.1.1	Chemotropismus	105
4.2.1.2	Interaktionen der Bionten	105
4.2.2	Verzweigungsfrequenz der Hyphenfilamente	106
4.2.3	Reaktionen bei Zell-Zell-Kontakt	109
4.2.3.1	Bildung Interner Hyphen	109
4.2.3.2	Anastomosenbildung	111
4.2.4	Penetrationsfähigkeit der Mycobionten	113
4.2.4.1	Abhängigkeit der Penetration vom Material und der Porengröße des Membranfilters	113
4.2.4.2	Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Nährmediums	114
4.2.4.3	Artspezifische Unterschiede	115
4.2.4.4	Bedeutung für die Kolonisierung natürlicher Substrate	116
4.2.5	Bedeutung der concentric bodies	116
4.2.6	Zusammenfassung II	118
4.3	Mycelentwicklung und Reaktionspotential	119
4.3.1	Radiäre Ausdehnung und Polarität des Wachstums	119
4.3.2	Radiale Ausdehnungsgeschwindigkeit	120
4.3.2.1	Vergleiche mit Literaturwerten	123
4.3.2.2	Änderung der Ausdehnungsgeschwindigkeit	123
4.3.3	Nährstoffversorgung des Mycobionten	123
4.3.4	Phasenwechsel	125
4.3.5	Intraspezifische Kompatibilität und Verschmelzung von Mycelien	126
4.3.6	Zusammenfassung III	128

4.4	Morphologie der Mycelien und ihre Besonderheiten	129
4.4.1	Die Bedeutung des Substrates	129
4.4.2	Artabhängigkeit der Morphologie	130
4.4.2.1	<i>Xanthoria parietina</i> (Telochistales)	130
4.4.2.2	<i>Anaptychia ciliaris</i> und <i>Physconia distorta</i> (Lecanorales)	130
4.4.2.3	<i>Phycia tenella</i> (Lecanorales)	131
4.4.2.4	<i>Baeomyces rufus</i>	132
4.4.3	Warum wird in axenischer Kultur kein Flechtenthallus gebildet?	133
4.4.4	Zusammenfassung IV	134
4.5	Sekundärmetabolismus	135
4.5.1	Bildung von Parietin durch den Mycobionten von <i>Xanthoria parietina</i>	135
4.5.2	Bildung gelatinöser Substanzen	136
4.5.3	Zusammenfassung V	137
4.6	Morphogenetische Beeinflussung der isolierten Mycobionten	138
4.6.1	Einfluß von arteigenen Photobionten und Fremdalgen auf die Mycelien	138
4.6.2	Einfluß verschiedener Substanzen auf die Mycelien	139
4.6.2.1	Die Phytohormone Naphthalinessigsäure (NAA) und Kinetin	140
4.6.2.2	Die Kohlenhydrate Ribitol und Glukose	141
4.6.3	Zusammenfassung VI	142
4.7	Mycobionten im natürlichen Biotop	143
4.7.1	Überlebensfähigkeit der Mycelien	144
4.7.2	Kolonisierungsprozesse an den Mycobionten, insbesondere Interaktionen mit vegetativen Diasporen freilebender Flechten	145
4.7.3	Relichenisierung	146
4.7.4	Zusammenfassung VII	149
5	SCHLUSSBETRACHTUNGEN	152
	LITERATURVERZEICHNIS	153
	ANHANG	165
	I. Abkürzungsverzeichnis	165
	II. Tabellarische Auflistung der Kulturansätze mit den Flechten <i>Baeomyces rufus</i> , <i>Xanthoria parietina</i> , <i>Phycia tenella</i> , <i>Physconia distorta</i> und <i>Anaptychia ciliaris</i>	166

1 EINLEITUNG

Die Flechtensymbiose kann als das Ergebnis eines langen co-evolutionären Prozesses von Pilzen (Mycobionten), meist Ascomyceten, und photosynthetisch aktiven Grünalgen und/oder Cyanobakterien (Photobionten) angesehen werden. Da die lichenisierten Pilze und Photobionten einer Vielzahl taxonomischer Gruppen angehören, wird gefolgert, daß die Flechten phylogenetisch zu verschiedenen Zeiten entstanden sind und die Flechten polyphyletischen Ursprungs sind (HAWKSWORTH 1973, 1988; HENSSEN & JAHNS 1973; JAMES & HENSSON 1976; LUTZONI et al. 2001; SANTESSON 1967; SMITH 1975). Die Partnerschaft der Bionten führt zu einer Transformation des Pilzes, so daß vollständig neue, z.T. hoch differenzierte morphologisch-physiologische Einheiten entstehen. Die Flechtenloben unterscheiden sich normalerweise habituell stark von den nicht-lichenisierten Einzelorganismen und zeichnen sich zusätzlich durch ihre Langlebigkeit aus (JAHNS 1989).

Der Thallus einer Flechte ist meist aus oberer Rinde, Algenschicht, Mark und einer unteren Rinde, die auch fehlen kann, aufgebaut. Ein solcher als heteromer bezeichneter Thallus erinnert an den Bau eines bifacialen Laubblattes. Die Zellen der Photobionten sind in der Algenschicht derart angeordnet, daß das Sonnenlicht optimal ausgenutzt werden kann (AHMADJIAN 1993) und die Rindenschicht schützt sie u.a. vor schneller Austrocknung und intensiver Bestrahlung. In der als mutualistisch angesehenen Gemeinschaft versorgen die Photobionten den Pilzpartner mit Photosyntheseprodukten, wobei Grünalgen und Cyanobakterien unterschiedliche Kohlenstoffverbindungen abgeben: In der Symbiose sekretieren alle Cyanobakterien Glukose, Grünalgen geben verschiedene Zuckeralkohole in Abhängigkeit von ihrer Gattungszugehörigkeit an den Mycobionten ab. Werden die Bionten getrennt, hört die Abgabe der Kohlenhydrate nach kürzester Zeit auf (GALUN 1988a).

Traditionell werden die Flechten in verschiedene Wuchsformen eingeteilt: in Krustenflechten, Blattflechten und Strauchflechten, zwischen den einzelnen Formen gibt es fließende Übergänge. Die Krustenflechten sind mit ihrem Thallus so eng mit dem Substrat verbunden, daß man sie kaum von diesem abtrennen kann, ohne sie zu verletzen. Die Blattflechten zeichnen sich durch foliose, dorsiventral gebaute Loben aus, die dem Substrat mehr oder minder fest anliegen. Strauchflechten wachsen entweder als aufrechte Polster auf Erde oder Gestein, oder sie hängen als sogenannte Bartflechten an Bäumen, Felsen u.ä.. Diese Einteilung ist jedoch artifiziell und hat keinen taxonomischen Rang. Obwohl die Zahl der spezialisierten Zelltypen und der determinierten Gewebe vergleichsweise gering ist, wird ein morphologischer Differenzierungsgrad erreicht, der zumindest den Strukturen der Moose gleichwertig ist (HENSSEN & JAHNS 1974; JAHNS 1988a). Sehr hoch organisierte Flechtenthalli zeigen sogar eine bemerkenswerte Konvergenz zu Organen Höherer Pflanzen, z.B. Strauchflechten mit blättchenförmigen Phyllocladien. Darüber hinaus haben Flechten vielfältige Wachstumsstrategien, die sich u.a. in der Anatomie des Thallus ausdrücken (z.B. Strukturen zur Biege- und Zugfestigkeit), und Verbreitungsmechanismen entwickelt. Die sexuelle Reproduktion, bei der nur der Mycobiont verbreitet wird, erfolgt meist über Asco-

sporen, wobei die Ascocarprien meist sehr langlebig sind und über Jahre hinweg Sporen produzieren können. Durch die Entwicklung vegetativer Diasporen, wie Soredien, Isidien und anderer spezifischer Strukturen ist zusätzlich eine Möglichkeit gefunden worden, beide Bionten gleichzeitig zu verbreiten. Auf physiologischer Ebene zeichnen sich viele lichenisierte Mycobionten durch ihre sekundären Metaboliten aus. Den sogenannten "Flechtstoffen" werden vielfältige biologisch-ökologische Funktionen zugeschrieben, z.B. antimikrobielle Aktivität, Schutz vor Fraßfeinden oder Strahlungsschutz. Insgesamt führt die Symbiose dazu, daß die geographische und ökologische Amplitude der integrierten Organismen stark erweitert ist. Auf verschiedenen Substraten auch extremer Habitate zählen Flechten zu den Pionierorganismen.

Die Ausdifferenzierung eines charakteristischen Flechtenthallus wird unter geeigneten Bedingungen durch den morphogenetischen Einfluß des Photobionten induziert, dessen „permanente physische Anwesenheit“ unerläßlich ist (AHMADJIAN 1992, JAHNS 1988a). Es ist jedoch nicht bekannt, welcher Art der Stimulus ist und ob er bei allen Flechtengemeinschaften der gleiche ist (AHMADJIAN & JACOBS 1987). Bei der Auswahl des photosynthetisierenden Partners verhalten sich die Mycobionten (graduiert) selektiv, so daß mit der Thallusmorphogenese ein Erkennungsprozess verbunden ist. Nach AHMADJIAN (1993) muß dieser Prozess in Flechten kontinuierlich stattfinden. Gleichzeitig ist es erforderlich, das Wachstum der integrierten Bionten zu koordinieren. Die Photobiontenpopulation wird z.B. derart reguliert, daß bei ihr sexuelle Fortpflanzungsvorgänge innerhalb eines Flechtenthallus vollständig unterdrückt werden. Vegetative Teilungsprozesse finden verstärkt in den Wachstumszonen der Loben statt und werden in anderen Thallusbereichen ebenfalls so beeinflusst, daß eine homogene Algenschicht entsteht (HILL 1985; HONEGGER 1987). Insgesamt wird deutlich, daß die komplexen Interaktionen, die die Morphogenese eines Flechtenthallus und die Aufrechterhaltung des symbiotischen Gleichgewichtes ermöglichen, geregelte Steuerungsmechanismen benötigen.

Bis heute liegen jedoch nur wenige Erkenntnisse über physiologische Interaktionen zwischen den Bionten und über die Steuerung von Entwicklungsprozessen bei Flechten vor. In ihrer Gesamtheit ergeben die existierenden Literaturdaten nur ein lückenhaftes Bild. Dies ist u.a. darauf zurückzuführen, daß die Balance zwischen den Bionten, die für eine positive Adaptation notwendig ist, extrem sensibel reagiert und durch externe Einflüsse sehr leicht gestört werden kann (weshalb Flechten als Bioindikatoren dienen können). Deshalb sind experimentelle Untersuchungen an dieser Organismengruppe sehr diffizil. Resynthesversuche und Kulturexperimente mit ganzen Loben, Thallusfragmenten und vegetativen Diasporen haben wichtige Informationen über den Einfluß von Einzelfaktoren wie Licht oder Feuchtigkeit auf Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse der Symbioseorganismen erbracht (u.a. AHMADJIAN 1980, 1987a; JAHNS 1993; KLÖCKNER 1998). Die sogenannte Urease-Theorie beschreibt eine mögliche „Feedback-Regulation“ des Kohlenhydrattransfers

zwischen Photo- und Mycobiont über eine Steuerung der Harnstoff-Hydrolyse innerhalb der Photobionten (LEGAZ & VINCENTE 1981, 1989; PEREZ-URRIA 1989). Verschiedene Autoren (EPSTEIN et al. 1986; SCHIELEIT 1997; SCHIELEIT & OTT 1996; OTT et al. 2000) diskutierten die funktionelle Rolle von Phytohormonen bei der Thallusdifferenzierung und der Aufrechterhaltung des Symbiosegleichgewichtes.

Lectine scheinen ebenfalls an der Morphogenese und gleichzeitig an der Zirkulation der Nährstoffe zwischen den Bionten beteiligt zu sein (AHMADJIAN 1992; GALUN & KARDISH 1995). Diese Proteine sind u.a. dadurch charakterisiert, daß sie spezifische Bindungsstellen für Kohlenhydrate besitzen. Die Funktion der Lectine in der Zell-Zell-Erkennung bei der Rhizobium-Leguminosen Symbiose konnte nachgewiesen werden (DIAZ et al. 1989). Lectine, die aus verschiedenen Flechten isoliert wurden, unterschieden im Laborversuch zwischen kompatiblen und inkompatiblen Photobionten (BUBRICK et al. 1985; GALUN & KARDISH 1995; KARDISH et al. 1991). Deshalb wird diskutiert, ob sie auch in der Flechtensymbiose eine Erkennungsfunktion zwischen den Bionten ausüben. Ein Teil meiner Arbeit bestand darin, dieser These nachzugehen und die Verteilung von Lectinen innerhalb von Flechtenthalli zu untersuchen. Hierfür wurden goldgebundene Antikörper gegen zwei verschiedene Lectine, die aus der Flechte *Peltigera apthosa* isoliert worden waren, an Ultradünnschnitten der Flechte getestet. Diese *Peltigera*-Art zeichnet sich dadurch aus, daß sie zu den Dreibionten-Symbiosen zählt, d.h. der Mycobiont ist sowohl mit Grünalgen, die die Algenschicht aufbauen, als auch mit Cyanobakterien assoziiert, die in abgegrenzten Thallusbereichen, den externen Cephalodien, u.a. der Stickstoffversorgung des Mycobionten dienen. Falls Lectine in den Erkennungsprozess involviert sind, ist daher eine Ungleichverteilung der verschiedenen Lectine zu erwarten. Die Bindungsspezifität der eingesetzten polyclonalen Antikörper erwies sich jedoch als relativ gering und ließ sich nicht durch verschiedenste methodische Modifikationen erhöhen. Deshalb konnte bisher noch kein exaktes Bild von der Verteilung der Glycoproteine in den einzelnen Geweben der Flechte erstellt werden, so daß die Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen in dieser Arbeit nicht weiter ausgeführt werden.

Der zentrale Aspekt meiner Arbeit folgt einem Grundgedanken, der in der wissenschaftlichen Arbeit mit Flechten traditioneller Weise wenig Berücksichtigung findet:

Einige Autoren (SANTESSON 1967; SMITH 1975) haben schon sehr früh angemahnt, die Biologie der einzelnen Bionten der Flechtensymbiose stärker zu berücksichtigen, d.h. Untersuchungen auch aus der Sicht eines Mycologen oder Phycologen durchzuführen. Nach HAWKSWORTH (1988) sei „die Entwicklung unseres Verständnisses dieser biologisch faszinierenden Symbiose limitiert worden“, weil sich die Tendenz ausgebildet habe, die Lichenologie als solche in den Vordergrund zu stellen. Dies mag ein Grund dafür sein, daß es kaum genauere Studien von Verhaltensmustern isolierter Mycobionten, insbesondere der Reaktionsmuster der Hyphenfilamente, gibt. Nach ARMALEO (1991) entstehen jedoch viele

spezifische Merkmale eines Flechtenthallus aus einer neuen Kombination von bereits bestehenden charakteristischen Fähigkeiten und Verhaltensweisen von freilebenden Pilzen und Algen. Der Autor hebt in seinem Modell zur Thallusmorphogenese der Flechten ein ontogenetisches Prinzip hervor: Wenn zwei Organismen, die evolutionär so weit voneinander entfernt sind wie eine Grünalge bzw. ein Cyanobakterium und ein Pilz, einen gemeinsamen Weg der Symbiose beschreiten, so wird jeder versuchen, so weit wie möglich seiner eigenen Biologie zu folgen. Gleichzeitig werden Brücken gebildet, die die Interaktionen über die Zeit festigen. [Solche Brücken könnten in der Flechtensymbiose z.B. ein horizontaler Gentransfer sein, wie er von einigen Autoren diskutiert, bzw. postuliert wird (OTT et al. 2000; SCHIELEIT 1997).] Die Bionten in einem Flechtenthallus reagieren folglich nach ihrem vorgegebenen Potential, so daß durch die Klärung der Funktionsweise der einzelnen Partner der Symbiose Rückschlüsse auf Interaktionen im Flechtenthallus gezogen werden können. Mechanismen, die z.B. die Hyphenentwicklung und die Richtung ihres Wachstums steuern, müssen entscheidenden Anteil an der Morphogenese eines Flechtenthallus haben, da seine Hauptmasse (ca. 90%) von Pilzhypen gebildet wird, die dem Thallus die Struktur geben.

Die Mycobionten vieler Flechten, die sich sexuell reproduzieren, können über Ascosporen kultiviert werden. Seit SCHWENDENER 1869 die Doppelnatur der Flechten erkannt hat, sind solche Isolationsversuche schon vielfach durchgeführt worden. Hierbei standen jedoch häufig Resyntheseexperimente oder die Untersuchung der Sekundärmetaboliten durch die Mycobionten im Vordergrund (AHMADJIAN 1993; YAMAMOTO et al. 1995). Es wurde u.a. festgestellt, daß axenisch wachsende Mycobionten nicht nur viele der für Flechten charakteristischen sekundären Inhaltstoffe bilden können. Ihre Produktion konnte darüber hinaus beeinflußt werden und variierte in Abhängigkeit von den zugegebenen Nährstoffen (HONEGGER & KUTASI 1990; YAMAMOTO et al. 1995). Andere Kulturexperimente konzentrierten sich auf die Wachstumsraten dieser extrem langsam wachsenden Organismen. Besonders im Zusammenhang mit der Suche nach neuen biologisch wirksamen Substanzen (Naturstoffforschung) wird seit ca. 10 Jahren verstärkt versucht, Mycobionten in einem größeren Maßstab heranzuziehen, d.h. sie zu einer schnelleren Produktion von Biomasse anzuregen (CRITTENDEN et al. 1995; GALUN & PELEG-ZURIEL 2000; YAMAMOTO et al. 1993, 1995).

Die Struktur der isolierten Flechtenpilze und ihr morphogenetisches Verhalten wird in der Literatur jedoch nur wenig differenziert beschrieben. Auf Mineralmedien wachsen die Isolate mit schlanken, kaum verzweigten Hypen, die sich flach über dem Substrat ausbreiten und auch in das Medium eindringen (AHMADJIAN & HEIKKILÄ 1970; MOLINA & CRESPO 2000; HUBER et al. 1994). Schon AM ENDE (1950) unterscheidet den schlankhyphigen „Pectintyp“ von dem gedrungenen, tonnenartigen „Saccharosetyp“. Die „knorpeligen, thallus-ähnlichen Kolonien“ mit filamentös wachsenden, gedrungenen Hypen in der Peripherie, die aposymbiotische Mycobionten auf nährstoffreichen Medien bilden, werden als typische Kulturform dieser

Organismengruppe angesehen (AHMADJIAN 1980, 1993; MOLINA & CRESPO 2000; HONEGGER 1996). Es wird vermutet, daß die Mycobionten organische Nährstoffe benötigen, um dreidimensionale Strukturen zu bilden (AHMADJIAN 1980, 1993; HUBER et al. 1994; MOLINA et al. 1997; ZEHNDER 1949). Solche Kolonien besitzen jedoch keine Ähnlichkeit mit dem symbiotischen Phänotyp (AHMADJIAN 1992, 1993; HONEGGER 1996a).

Über den Aufbau dieser Mycelien gibt es widersprüchliche Meinungen. Einige Autoren berichten von flechtenähnlichen Strukturen innerhalb der Mycelien axenisch wachsender Mycobionten, u.a. von *Xanthoria parietina*, die nur bei Kultivierung auf organischen Medien hervorgerufen werden (LALLEMANT 1985; STOCKER-WÖRGÖTTER & TÜRK 1989). HUBER et al. (1994) konnten innerhalb der Mycelien des genannten Mycobionten keine derartige „Schichtung“ feststellen. Nach AHMADJIAN (1980, 1987a, 1993) werden thallusähnliche Strukturen nur in Anwesenheit eines Photobionten gebildet. Der Autor kann keine enge Beziehung zwischen dem Aussehen von axenisch wachsenden Mycobionten in Kultur und dem Symbioseorganismus Flechte erkennen und vermutet, daß eine solche Interpretation einer oberflächlichen Betrachtung zuzuschreiben und sehr subjektiv ist. Nach seiner Meinung bilden isolierte Mycobionten auf organischen Medien generell unvariable, kompakte Mycelien.

Im Gegensatz zu den oben zitierten, unpräzisen Beschreibungen sind in der Mycologie die Reaktionsmuster und die Morphogenese von nicht-lichenisierenden, filamentös wachsenden Asco- und Basidiomyceten in Kultur gut untersucht (DEACON 1997; JENNINGS & LYSEK 1999; RAYNER et al. 1994a, b). Generell dehnen sich die Mycelien filamentöser Pilze durch apicales Wachstum der einzelnen Hyphen aus, wobei in regelmäßigen Abständen Querwände (Septen) gebildet werden, die jeweils durch einen Porus durchbrochen sind. Einer longitudinalen Achse folgend, kann eine wachsende Hyphe in vier verschiedene, fließend ineinander übergehende Zonen eingeteilt werden, die einem bestimmten Alter oder Entwicklungsgrad entsprechen: In der apikalen Wachstumszone wird das Material für die Spitzenausdehnung bereitgestellt. Diesem Bereich folgt die Absorptionszone, in der die Nährstoffaufnahme stattfindet. In der Speicherzone werden die aufgenommenen Nährstoffe in unlösliche Speicherstoffe umgewandelt, und die Vakuolisierung schreitet fort. Schließlich folgt die durch dunkle Pigmentierung charakterisierte Seneszenzzone, in der lytische Vorgänge stattfinden können. Der Protoplast wird der wachsenden Spitze kontinuierlich „hinterhergezogen“ und kann dadurch, besonders in nährstoffarmem Substrat, Material für das Wachstum bereitstellen (CARLILE 1994). Seitenhyphen können unmittelbar an der Spitze, aber auch in älteren Bereichen der Hyphen, häufig hinter einem Septum angelegt werden. Die Häufigkeit der Verzweigungsbildung steht in direkter Korrelation zur Nährstoffkonzentration (TRINCI 1984). Werden Pilze auf kohlenhydratarmen Medien kultiviert, so bilden sie wenig verzweigte Mycelien; auf kohlenhydratreichen Medien entwickeln sich reich verzweigte Kolonien. Die Hyphen der Pilze zeigen jedoch keine tropistischen Reaktionen auf organische Nährstoffe.

Obwohl auch der Thallus einer Flechte aus verzweigten Hyphenfilamenten als Grundbaustein aufgebaut ist, wurde bisher noch nie untersucht, ob diese generellen Prinzipien des Hyphenwachstums auch für das Wachstumsverhalten der Mycobionten gelten. Es wurden zwar zwei verschiedene Myceltypen im Zusammenhang mit dem Gehalt organischer Nährstoffe im Kulturmedium klassifiziert - die oben zitierten Beschreibungen lassen jedoch erkennen, daß kein Kausalzusammenhang zum Wachstumsverhalten der Grundbausteine dieser Mycelien, also einzelner Hyphenfilamente hergestellt wurde. Reaktionen von isolierten Mycobionten z.B. in Bezug auf verschiedene Kohlenhydrate wurden nur unter dem Aspekt der Zuwachsraten gemessen. Es wurde untersucht, ob die Bildung eines Flechten-thallus induzieren (AHMADJIAN 1992), und eine detaillierte morphologische Untersuchung der Mycelien wurde nicht zur Beurteilung herangezogen. Ein möglicher morphogenetischer Einfluß der in der Symbiose transferierten Kohlenhydrate (s.o.) auf die Hyphenfilamente der Mycobionten ist folglich noch nie berücksichtigt worden.

Neben physiologisch-biochemischen Untersuchungen, wie sie z.B. zur Ethylensynthese durchgeführt wurden (SCHIELEIT 1997; OTT et al. 2000), sind Kulturversuche mit den isolierten Mycobionten erforderlich, die ein Verständnis der beteiligten endogenen und exogenen Steuerungsprozesse vermitteln und den Einfluß von Einzelfaktoren auf die Entwicklung und Differenzierung erkennen lassen. Das generelle Potential der Mycobionten als filamentös wachsende Pilze bedarf einer systematischen Analyse sowohl unter axenischen als auch nicht-axenischen Bedingungen. Morphogenetische Untersuchungen isolierter Mycobionten sind nach dem zuvor zitierten Prinzip der Ontogenese von außerordentlicher Bedeutung, da sich aus den Erkenntnissen Rückschlüsse auf Regulationsmechanismen innerhalb des Symbioseorganismus Flechte ziehen lassen. Nicht zuletzt bieten Kulturversuche die Möglichkeit, die ökologische Amplitude der unlichenisierten Flechtenpilze zu testen.

Folgende Fragestellungen bedürfen deshalb dringend der Bearbeitung:

1. Welche Eigenschaften haben die Hyphenfilamente der isolierten Mycobionten?

Besitzen sie prinzipiell die gleichen dynamischen Fähigkeiten bzw. Wachstumscharakteristika wie die der nicht-lichenisierenden, filamentös wachsenden Pilze? - Schon früher vermuteten einige Autoren, daß Flechtenpilze ein ähnliches Wachstumspotential besitzen wie andere hyphenbildende Pilze (HAWKSWORTH & HILL 1984; POELT 1991). Diese z.T. auf Freilandbeobachtungen basierende, eher intuitive Annahme soll zunächst experimentell untersucht werden. Vor dem Hintergrund, daß die Flechtenpilze polyphyletischen Ursprungs sind, muß darüber hinaus geklärt werden, ob sich die Mycobionten aus verschiedenen Verwandtschaftsbereichen einheitlich verhalten. Aus diesem Grund werden die Versuche mit Mycobionten unterschiedlicher systematischer Zuordnung durchgeführt.

2. Wie lassen sich die Hyphenfilamente der isolierten Mycobionten morphogenetisch beeinflussen?

Wie schon oben ausgeführt wurde, erfahren Mycobionten durch den Photobionten einen morphogenetischen Impuls zur Bildung eines Flechtenthallus, und die Thallusorganisation wird nur unter der permanenten Anwesenheit des lebenden Photobionten aufrechterhalten. Man geht davon aus, daß die Transformation der Mycobionten durch ein multifaktorielles System gesteuert wird, an dem u.a. Phytohormone beteiligt sein können. Es soll nun getestet werden, in welcher Art sich verschiedene Substanzen (z.B. Phytohormone oder Kohlenhydrate) auf das Wachstumsverhalten der isolierten Mycobionten auswirken bzw. wie die Hyphenfilamente beeinflußt werden, um Rückschlüsse auf Regulationsmechanismen und Interaktionen im Flechtenthallus ziehen zu können. Darüber hinaus müssen Reaktionen auf Photobionten und Fremdalgen unter verschiedenen Bedingungen getestet werden.

3. Wie stark sind die Mycobionten an die Symbiose angepaßt, und sind mögliche Anpassungen fixiert?

In axenischer Kultur unterscheiden sich die Flechtenpilze mit ihrer „kompakten, knorpeligen Wuchsform“ auf organischen Medien sowohl von der lichenisierten Form als auch von nicht-lichenisierenden Pilzen. Lediglich bei einigen frei-lebenden Ascomyceten wird die Bildung kompakter, plectenchymatischer Mycelien von dauerhafter, oft harter Konsistenz beobachtet (Stroma), in die eine Vielzahl von Ascomata eingebettet sind (WEBER 1993). Flechtenpilze bilden jedoch ausschließlich im lichenisierten Zustand Fortpflanzungsorgane, so daß diese Wuchsform nicht als ontogenetische Vorstufe von Strukturen der sexuellen Reproduktion angesehen werden kann. Die Erkenntnisse über die Reaktionsmuster, die zu diesen besonderen, harten Strukturen der Kulturform führen, lassen möglicherweise Rückschlüsse auf evolutive Veränderungen der Mycobionten zu.

Im Zusammenhang mit der Anpassung der Mycobionten an die symbiotische Lebensweise ist besonders die Bearbeitung von Mycobionten aus der Gruppe der Peltigerales von Interesse. Generell gelten die Mycobionten aus dieser Gruppe als sehr schwer zu kultivieren (z.B. AHMADJIAN 1961, 1989; CRITTENDEN et al. 1995; HALE 1961; STOCKER-WÖRGÖTTER & TÜRK 1991), so daß sich für die Forschung ein äußerst interessantes Untersuchungsobjekt verschließt. Viele Arten aus diesem Verwandtschaftsbereich bilden Trippel-Symbiosen, d.h. die Mycobionten zeichnen sich dadurch aus, daß sie sowohl mit prokaryotischen Cyanobakterien als auch mit eukaryotischen Grünalgen assoziiert sind (s.o.: *Peltigera aphthosa*). Sie können also mit zwei entwicklungsgeschichtlich sehr weit entfernt stehenden Organismengruppen eine Symbiose eingehen. Das Fehlen von axenischen Kulturen der Mycobionten erschwert z.B. eine molekulare Analyse, die zum Verständnis der Interaktionen zwischen Pilz und Algen nötig ist (HONEGGER 1993). Es wird vermutet, daß die lange gegenseitige Abhängigkeit der Symbiosepartner dieser als sehr ursprünglich angesehenen Ordnung mit

ausschließlich lichenisierenden Pilzen (HAWKSWORTH 1982a) u.a. dazu geführt hat, daß die Mycobionten obligat biotroph sind (HONEGGER 1993). AHMADJIAN (1993) stellt die isolierten Mycobionten der Gattungen *Peltigera*, *Solorina* und anderer großlobiger Flechten der Peltigerales sogar in die Kategorie der nicht-wachsenden Flechtenpilze.

Da sich die Mycobionten dieses Verwandtschaftsbereichs bisher weitgehend der Bearbeitung entzogen haben, konzentriert sich ein Teilbereich meiner Arbeit auf die Isolation dieser Flechtenpilze. Bei erfolgreicher Kultivierung können sich Hinweise auf die besonderen Adaptationen in diesem Verwandtschaftsbereich und auf die damit notwendigen Stimuli für ein Wachstum des isolierten Pilzes ergeben. Diese Arten sollen deshalb ebenfalls einer Untersuchung ihrer Verhaltensmuster unterzogen werden, so daß ein Vergleich mit anderen Arten möglich ist.

4. Sind Mycobionten prinzipiell in der Lage, unlichenisiert zu überleben?

Nach JAHNS (1988a) haben sich Flechten phylogenetisch aus saprotroph lebenden Pilzen entwickelt. Es ist jedoch unklar, ob die Mycobionten noch zu dieser Lebensweise fähig sind. Nach der sexuellen Reproduktion durch Ascosporen sind die Mycobionten auf den geeigneten Symbiosepartner angewiesen, um erneut zu relichenisieren. Es ist jedoch nicht bekannt, wie lange Ascosporen oder deren Keimlinge auf oder im natürlichen Substrat ohne den passenden Symbiosepartner überleben können (CLAYDEN 1997a). Einige Autoren (CARLILE 1994; HAWKSWORTH 1988) sind der Meinung, daß Mycobionten zwingend auf den Photobionten angewiesen sind. Nach AHMADJIAN (1987b) führte die lange Periode der Coevolution dazu, daß es von den meisten Flechtenpilzen und -algen keine frei-lebenden Populationen gibt. Die evolutionären Veränderungen in der Symbiose hätten sich demnach so weit verfestigt, daß viele Mycobionten zwar physiologisch noch fakultativ biotroph sind (da sie sich unter axenischen Bedingungen kultivieren lassen), unter dem Aspekt ihrer Ökologie dagegen als obligat biotroph angesehen werden können (HONEGGER 1996a).

Freilandbeobachtungen haben jedoch gezeigt, daß einige Mycobionten über eine gewisse Periode mit einem Algenpartner überleben, mit dem sie keinen Flechtenthallus bilden können (z.B. OTT 1987a, b). SANDERS (1994) diskutierte die Möglichkeit einer fakultativen Heterotrophie, da z.B. die biologische Funktion von Rhizomorphen weit über die Verankerung im Substrat und die reine Wasserleitfunktion hinausgeht. Vielmehr können sie auch lichenisieren und der vegetativen Kolonisierung dienen. In diesem Zusammenhang ist auch die Beobachtung von Bedeutung, daß viele Flechtenarten, die auf Erde wachsen, stark rhizinisiert sind (OARD & TIFFANY 1985).

Um die Überlebensfähigkeit von unlichenisierten Mycobionten zu testen, wurden bei meinen Untersuchungen vorkultivierte Isolate verschiedener Flechten in das natürliche Habitat transplantiert und ihre Entwicklung beobachtet - ein Versuch, der mit diesem experimentellen Ansatz noch nie durchgeführt wurde.

Darüber hinaus können diese Experimente in Hinblick auf die Frage, ob Mycobionten nach längerer Zeit unter axenischen Bedingungen noch in der Lage sind zu relichenisieren, neue Hinweise geben.

5. In welcher Beziehung stehen ultrastrukturelle Veränderungen des Mycobionten (Bildung von *concentric bodies*) zum Lichenisierungsprozess?

Im lichenisierten Zustand enthalten die Hyphen der Ascomyceten *concentric bodies* - proteinhaltige Zellorganellen unbekannter Herkunft und Funktion (GALUN et al. 1974). Sie finden sich bei den Flechten im Cytoplasma aller vegetativen Zellen, in ascogenen Hyphen, Paraphysen und reifen Ascosporen (AHMADJIAN 1993). Langlebigkeit und Austrocknungstoleranz scheinen gemeinsame Merkmale der Zellen zu sein, die solche Organellen enthalten (HONEGGER 1996a), denn *concentric bodies* werden sonst nur bei einigen pflanzenpathogenen und saprotroph lebenden Pilzen extremer Habitats gefunden (BELLEMÈRE 1973; TU & COLOTELO 1973; GRANETT 1974; SAMUELSON & BEZERRA 1977). HONEGGER (1995) diskutierte die Möglichkeit, daß *concentric bodies* komprimierte Gasblasen seien, die im Cytoplasma der Flechtenpilze durch Austrocknungsstress entstehen. Dieser Theorie soll experimentell nachgegangen werden, indem axenisch wachsende Mycobionten einem Feucht-Trocken-Rhythmus unterzogen und anschließend ultrastrukturell untersucht werden.

Da diese Proteinkörper den einzigen signifikanten ultrastrukturellen Unterschied zwischen dem kultivierten Mycobionten und dem Symbioseorganismus Flechte darzustellen scheinen (AHMADJIAN 1980), bieten sie sich zusätzlich als Kriterium an, um beurteilen zu können, ob eine Struktur einer Flechte als „lichenisiert“ bezeichnet werden kann: Auskeimende Sporen der Krustenflechte *Rhizocarpon geographicum* bilden auf Felsgestein zunächst ein dunkel inkrustiertes Hyphengeflecht, den Hypothallus. Dieses ausschließlich aus Pilzgeflecht bestehende Mycel lichenisiert mit freien Algen. Der Prothallus wächst den Areolen voraus, und die Hyphen sind in der Lage, mit freien Algen neue Areolen zu bilden. Lediglich der zentrale areolierte Teil der Flechte wird als lichenisiert angesehen (LETROUIT-GALINOUE & ASTA 1994), und sowohl die Sporen der Flechte als auch die Areolenhyphen enthalten *concentric bodies*. Es ist nicht bekannt, ob die Hyphen des Prothallus, der den Areolen vorauswächst und als unlichenisiert gilt, ebenfalls diese Strukturen enthalten. Deshalb sollen sowohl diese Hyphen als auch der axenisch wachsende Mycobiont ultrastrukturell untersucht werden.

6. Zur Bearbeitung dieser umfangreichen Problematik wurden die Flechtenpilze über Ascosporen nach einem künstlich erzeugten Sporulationsvorgang isoliert, der einem sexuellen Fortpflanzungsereignis der Flechten unter natürlichen Bedingungen entspricht. Dadurch ist gewährleistet, daß die polysporen Mycelien ihren Ursprung in einem möglichst naturnahen Sporencluster haben. Diese Isolationsmethode ist zunächst von der Sporulationsfähigkeit der Apothecien und dem Keimverhalten der Sporen abhängig. Es gibt jedoch

bis heute nur für einzelne Flechtenarten (CLAYDEN 1997b; CHRISMAS 1980; PYATT 1968, 1969) detaillierte Angaben über diese Eigenschaften, z.B. über mögliche jahreszeitliche Periodizität, so daß man sich bei der Versuchsplanung nur begrenzt auf Literaturdaten stützen kann. Darüber hinaus sind diese Charakteristika entscheidend für eine Relichenisierung unter natürlichen Bedingungen. Deshalb umfaßt der erste Teil meiner Arbeit sowohl die Versuchsreihen zur Isolation der Peltigerales als auch die Beobachtungen aus den Isolationsversuchen mit den anderen bearbeiteten Arten.

Die genannten sechs Punkte zeigen, daß die Arbeit ein sehr breites Spektrum von Fragen behandelt, wobei die Experimente in einigen Fällen noch provisorischen Charakter besitzen und in Zukunft ergänzt werden müssen. Alle Aspekte verfolgen aber eine gemeinsame Zielrichtung: zu untersuchen, inwieweit Flechtenpilze in ihrem Entwicklungs- und Wachstumspotential mit nicht-lichenisierenden Ascomyceten übereinstimmen. Vor allem ist die Frage von Bedeutung, welche generellen "Pilzeigenschaften" für die besondere Situation der Flechtensymbiose relevant sind und welche eventuell modifiziert werden oder ungenutzt bleiben müssen. Dies ist das Grundthema der Arbeit. Daraus folgt, daß über den experimentellen Rahmen hinaus eine generelle und breite Diskussion der Erkenntnisse über das Wachstumsverhalten erforderlich ist. Die mannigfachen Beobachtungen werden in ihrer Bedeutung für den komplexen Symbioseorganismus Flechte beurteilt. Hierbei muß sowohl berücksichtigt werden, daß nicht jedes Charakteristikum der Mycobionten auch für die Bildung eines Flechtenthallus relevant ist, als auch, daß sich die Bionten in der Symbiose z.B. durch Interaktionen miteinander anders verhalten können, als sie es in isolierter Form im Experiment zeigen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Auswahl des Flechtenmaterials

Wie in der Einleitung gefordert wurde, gehört das verwendete Flechtenmaterial verschiedenen taxonomischen Gruppen der Ascomyceten an. Gleichzeitig wurde darauf geachtet, daß die Flechten unterschiedliche Substratspezifität und Wuchsformen aufweisen, wobei die gewählten Arten alle zur sexuellen Fortpflanzung fähig sein müssen – eine nicht selbstverständliche Eigenschaft für Flechten.

Die Flechte *Xanthoria parietina*, die häufig als Modellorganismus verwendet wird und über die folglich schon relativ viele Literaturdaten vorliegen (AM ENDE 1950; CHRISMAS 1980; HONEGGER & KUTASI 1990; HUBER et al. 1994; MOLINA et al. 1997; OTT 1987a, b), gehört zu den Telochistales. Sie wächst blattförmig und hat eine außergewöhnlich breite ökologische Amplitude in Bezug auf das Substrat und den Standort. Man findet sie sowohl auf natürlichen Substraten wie Rinde und Gestein als auch auf anthropogen geschaffenen Flächen, wie lackierten Metallteilen und sogar auf Glas.

Den Lecanorales sind die Flechten *Anaptychia ciliaris*, *Physconia distorta* und *Physcia tenella* zuzuordnen. Diese Arten siedeln sich ausschließlich auf Baumrinde an, wobei sich *A. ciliaris* durch ihre locker blattförmige bis fast strauchförmige Wuchsform auszeichnet. *P. distorta* und *P. tenella* können zu den eng anliegenden Blattflechten gerechnet werden. *P. tenella* bildet neben Apothecien zur sexuellen Reproduktion Soredien als vegetative Diasporen aus. Standortbedingungen und Faktoren des Makroklimas wirken sich auf die Fruchtkörperentwicklung aus, so daß bei dieser Flechte an manchen Standorten eine ausschließliche Verbreitung über Soredien beobachtet wird (OTT 1987d). Bis vor 1-2 Jahren wurden z.B. in der Umgebung von Düsseldorf keine fruchtenden Loben dieser Flechtenart gefunden. Die Auswahl der drei zuletzt genannten Arten erfolgte auch aus pragmatischen Erwägungen, denn diese Flechten zeichnen sich durch dunkel gefärbte, relativ große Ascosporen aus, die sich auch schon mit Hilfe eines Binokulars gut beobachten lassen.

Zu den krustenförmigen Vertretern zählt *Rhizocarpon geographicum* (Lecanorales), die besonders für ultrastrukturelle Untersuchungen herangezogen werden soll. Sie zeichnet sich ebenfalls durch auffällige, dunkel inkrustierte Sporenwände aus und weist wie viele Krustenflechten die morphologische Besonderheit auf, daß dem „eigentlichen“ Thallus (Areolen) ein algenfreier Prothallus vorauswächst.

Die systematische Stellung der schuppenförmig wachsenden Flechte *Baeomyces rufus* ist unklar – ein Aspekt, der in der Diskussion (s. Kap. 4.4.2.4) ausführlich erörtert wird. Diese Flechte ist sicher nicht eng mit den anderen bisher genannten Arten verwandt. Man findet sowohl auf Erde als auch auf Gestein, wobei sich jedoch in Abhängigkeit von der Substratbeschaffenheit und den mikroklimatischen Bedingungen verschiedene Ökotypen

ausbilden (JAHNS 1982). In meiner Arbeit fand Material Verwendung, das sich auf Erde entwickelt hatte.

Die verschiedenen Arten der Gattungen *Peltigera* und *Solorina* aus der Ordnung der Peltigerales werden auf Grund der Problematik bei der Isolation der Mycobionten in einem gesonderten Kapitel behandelt. Sie besitzen alle blattförmige Loben und können in verschiedener Weise sowohl mit Grünalgen und/oder mit Cyanobakterien assoziiert sein. Die anderen bisher genannten Arten besitzen ausschließlich Grünalgen als photosynthetisierenden Partner. Alle untersuchten Arten der Peltigerales siedeln sich auf Erde als Substrat an, wobei sie häufig mit Moosen vergesellschaftet sind.

Flechtenmaterial	Sammelort
<i>Solorina crocea</i> (L.)Ach.	1, 2, 3
<i>Solorina saccata</i> (L.)Ach.	1
<i>Solorina spongiosa</i> (Ach.)Anzi	1
<i>Peltigera venosa</i> (L.)Hoffm.	1
<i>Peltigera aphthosa</i> (L.)Willd.	1, 3, 4, 5
<i>Peltigera canina</i> (L.)Willd.	1
<i>Peltigera malacea</i> (Ach.)Funck	1
<i>Peltigera polydactyla</i> (Necker)Hoffm.	1
<i>Peltigera didactyla</i> (With. Laundon) (<i>P. spuria</i> (Ach.) DC., <i>P. erumpens</i> (Taylor)Elenkin, <i>P. leptoderma</i> auct.)	1
<i>Rhizocarpon geographicum</i> (L.)DC.(Rh. riparium Räs.)	1, 6
<i>Baeomyces rufus</i> (Hudson)Rebent.	1
<i>Xanthoria parietina</i> (L.)Th.Fr.	1, 9, 11
<i>Anaptychia ciliaris</i> (L.)Koerb.	7, 8
<i>Physconia distorta</i> (With.)Laundon	7, 8
<i>Physcia tenella</i> (Scop.)DC.	9, 10

Sammelorte:

- | | |
|----------------------------|--------------------------------------|
| (1): Österreich, Fimbartal | (7): Schweden, Mullsjö |
| (2): Norwegen, Dovrefjell | (8): Schweden, Gotland |
| (3): Norwegen, Rondane | (9): Niederlande, Schouwen Duiveland |
| (4): Norwegen, Hjølmodalen | (10): Niederlande, Schiermonnikoog |
| (5): Norwegen, Otta | (11): Deutschland, Gerolstein |
| (6): Norwegen, Jotunheimen | (12): Deutschland, Allgäu |

Die Flechten wurden nach dem Sammeln luftgetrocknet und, wenn sie innerhalb der nächsten Woche zum Ausstreuen der Sporen verwendet wurden, bei Raumtemperatur gelagert. Zur späteren Verwendung wurden entweder komplette Thalli oder abpräparierte Apothecien bei -20°C tiefgefroren (Yamamoto et al. 1998a, b). Für Versuche, die noch innerhalb des nächsten Monats durchgeführt werden sollten, wurde das Material bei einem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus [14 h Licht: $60-70 \text{ PPFD} (\text{m}^{-2}\text{s}^{-1})$] in einer Klimakammer unter konstanten Bedingungen (12°C ; 70-80 % Luftfeuchtigkeit) gelagert. Die Vitalität der

Flechten war unter diesen Bedingungen für diesen Zeitraum sichergestellt (OTT & ZWOCH 1992).

(Anm.: Alle Versuche wurden mit Material vom natürlichen Standort durchgeführt, da es bis heute nicht möglich ist, Flechten in größeren Mengen im Labor zu kultivieren. Daraus ergibt sich das Problem der Verfügbarkeit, denn einige der hier verwendeten Arten wachsen nur in kleinen, verstreut liegenden Populationen. Um diese Populationen nicht auf Dauer zu schädigen oder gar zu zerstören, war bei einigen Versuchen das zur Verfügung stehende Material limitiert.)

2.1.2 Verbrauchsmaterial

2.1.2.1 Membranfilter

- MF-Millipore Membranfilter (Millipore, Eschborn, Deutschland); Ester aus Celluloseacetat und -nitrat, Durchmesser 45 mm, verwendete Porengrößen: 0.22 µm, 0.45 µm, 0.65 µm
- Durapore Membranfilter (Millipore, Eschborn, Deutschland); Polyvenyldendifluorid, Durchmesser 45 mm, verwendete Porengrößen: 0.22 µm, 0.45 µm, 0.65 µm

2.1.2.2 Kulturmedien

Die im folgenden aufgeführten Kulturmedien wurden z.T. mit verschiedenen Zusätzen in folgenden Konzentrationen versehen (s. Anh.):

Ribitol *	1.5%, 3%
Glukose *	1.5%, 3%
Naphthylessigsäure (NAA)	0.5 mg / l
Abcisinsäure (ABA)	1 mg / l
Kinetin (6-Furfurylamino-purin)	2 mg / l
Biotin	1 mg / l
Thiamin	10 mg / l

* In Kombiotion mit anderen Substanzen wurde immer eine 1.5%-tige Konzentration eingesetzt.

Erd-Extrakt (EE)

400 g Erde vom Standort mit 2000 ml H₂O dd 1 h kochen, filtrieren und auf 1500 ml auffüllen, zentrifugieren und den Überstand erneut filtrieren.

Malz-Hefe-Extrakt Agar (MY) (AHMADJIAN 1993)

Malz Extrakt	20 g
Hefe Extrakt	2 g
Agar	20 g
mit H ₂ O dd auf 1000 ml auffüllen	
pH 5.6; enth. 6,6 µg/l Biotin (DIFCO MANUAL 1998)	

Cellulose-Aufschicht (CA) Agar

Nach dem Aushärten der Grundschrift (20 ml BG110/ Petrischale) wird eine dünne Schicht des Cellulose-Agars (5 ml BG110 + 1% unlösliche Cellulose (Avicell)) aufgegossen.

Trebouxia-Organic-Medium**(TOM)** (AHMADJIAN 1967a)

Agar *	20 g
NaCl	25 mg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	25 mg
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	75 mg
KNO ₃	500 mg
(NH ₃) ₂ HPO ₄	250 mg
H ₃ BO ₃	11.42mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1.44 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	8.82 mg
NaMoO ₄ x 2 H ₂ O	0.84 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	1.57 mg
Co(NO ₃) ₂ x H ₂ O	0.49mg
FeSO ₄ x H ₂ O	4.98 mg
NaEDTA x 2H ₂ O	6.66 mg
Thiamin	10 mg
Biotin	1 mg
B 12	0.2 mg
Nikotinsäure	0.1 mg
HEPES	715 mg
Glukose	10 g
Proteosepepton	10 g

mit H₂O dd auf 1000 ml auffüllen

pH 5.5; * nicht bei Flüssigkultur

MBV-Medium (FRIEDL 1989)

Das MBV-Medium entspricht der Zusammensetzung von TOM ohne die Zugabe von Glukose und Proteosepepton.

pH 5.5

Mineral Agar (BG110) (RIPPKA 1979)

Agar	20 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	36 mg
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	75 mg
K ₂ HPO ₄ x H ₂ O	40 mg
NaCo ₃	20 mg
H ₃ BO ₃	2.86 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1.18 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0.222 mg
NaMoO ₄ x 2 H ₂ O	0.39 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.037 mg
Co(NO ₃) ₂ x H ₂ O	0.049 mg
Ammonium Eisen III- citrat	6 mg
NaEDTA x 2H ₂ O	1 mg
Zitronensäure	6 mg

mit H₂O dd auf 1000 ml auffüllen

pH 7.4

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung der Flechtenbionten

2.2.1.1 Isolierung der Mycobionten

Die Isolierung der Mycobionten erfolgte über multispore Isolate. Die Sporenreife wurde stichprobenartig mit Hilfe von Schnitten für das Lichtmikroskop kontrolliert.

Vorbereitend wurden Petrischalen mit Agar ausgegossen, auf den nach dem Aushärten Membranfilter gelegt wurden. Zur Gewinnung von axenischen Mycobiontkulturen wurden reife Apothecien von den Loben abpräpariert und 30 Minuten unter fließendem Wasser gespült. Anschließend wurden die durchnäßten Fruchtkörper auf Filterpapier solange getrocknet, bis kein tropfbares Wasser mehr vorhanden war. Zum Ausschleudern der Ascosporen wurden die feuchten Fruchtkörper mit Vaseline auf die Deckelunterseite der präparierten Petrischalen geklebt, so daß die Sporen auf die Agar- und/oder die Filteroberfläche (Abb. 1) ausgeschleudert werden konnten. Nach erfolgter Sporulation wurden die Deckel mit den Apothecien gegen neue, sterile Deckel ausgetauscht.

Bei einigen Flechten wurden die Apothecien nach dem Spülen mit einem Skalpellmesser fein zerkleinert und die Sporen mit Hilfe einer ausgezogenen Glas-Mikropipette aus der Zellsuspension isoliert und auf das Medium übertragen. In regelmäßigen Abständen wurden die Platten kontrolliert und auftretende Kontaminationen entfernt.



Abb. 1: Sporulationsversuch mit *Xanthoria parietina* nach einer Kulturzeit von ca. 3 Mo.; es befinden sich jeweils 3 Sporulationsbereiche (sb) auf dem Agar-Medium und dem Membranfilter. 2 cm

Die oben beschriebenen Kulturversuche wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Ein Versuch mit der Flechte *Peltigera venosa* wurde im Zusammenhang mit einer parallel verlaufenden Langzeitbeobachtung, die nicht Teil der vorliegenden Arbeit ist, unter nicht-axenischen Bedingungen in einer Klimakammer angesetzt. Hierbei wurden Sporen der Flechte u.a. auf autoklavierte Erde vom Standort gestreut (Abb. 2). Die Proben wurden jeden dritten Tag mit deionisiertem Wasser besprüht und in einer Klimakammer bei 12°C unter einem Tag-Nacht-Rhythmus verwahrt [14 h Licht: 60 -70 PPFD ($\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$); 10 h dunkel].



Abb. 2: Kulturversuch mit *P. venosa* unter nicht-axenischen Bedingungen in einer Klimakammer; auf verschiedenen vorbereiteten Erdbrocken, u.a. autoklavierte Erde (ae), wurden Sporen der Flechte ausgestreut. 4 cm

2.2.1.2 Isolierung der Photobionten

Für die Isolierung der Photobionten wurden Thallusstücke für 30 Minuten unter fließendem Wasser gespült und anschließend mit einem Skalpellmesser zerkleinert. Mit Hilfe einer fein ausgezogenen Glaspipette wurden unter mikroskopischer Beobachtung (100 x) gezielt einzelne Algen entnommen und auf ein festes Kulturmedium (Grünalgen: TOM; Cyanobakterien: BG110) überführt. Nach einer ersten Vermehrungsphase, die durch Koloniebildung gekennzeichnet ist, wurden Algen der Gattung *Trebouxia* in Flüssigkultur (TOM) überführt.

Bei einigen Flechten wurden Cephalodien von den Thalli isoliert, gespült und direkt für weitere Kulturversuche verwendet.

2.2.2 Kulturbedingungen

2.2.2.1 Photobionten

	<i>Trebouxia</i> Arten	<i>Nostoc</i> Arten
Temperatur	10°C	25°C
Licht	25 – 30 PPFD ($\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	10 – 20 PPFD ($\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)
Licht-Dunkel-Rhythmus	14 h – 10 h	Dauerlicht
Schüttelgeschwindigkeit	62 Upm	-

2.2.2.2 Mycobionten

Die polysporen Isolate wurden, wie im Kap. 3.1.1 und im Anhang aufgelistet, auf verschiedenen Nährmedien und Membranfiltern unter sterilen Bedingungen kultiviert. Die Lagerung während der Kulturzeit erfolgte unter verschiedenen Licht- und Temperaturverhältnissen:

- Raumtemperatur mit einem natürlichen Hell-Dunkel-Rhythmus
- Raumtemperatur, Dunkelheit
- -4°C, Dunkelheit
- +4°C, Dunkelheit

2.2.3 Veränderungen der Kulturbedingungen

Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Mycelteile oder ganze Mycelien zusammen mit dem Filter, auf dem sie angezogen wurden, veränderten Kulturbedingungen ausgesetzt. Hierbei wurden die Mycobionten entweder zusammen mit dem Filter herausgeschnitten (Skalpellmesser) oder es wurden ganze Filter transplantiert:

- Gut ausgebildete Mycobiontkulturen verschiedenen Alters und mit unterschiedlichen Wachstumsmustern von *Physcia tenella*, *Physconia distorta*, *Anaptychia ciliaris* und *Xanthoria parietina* wurden zusammen mit dem Filter auf frische Agarmedien übertragen. Einige Kulturen wurden zuvor in sterile Petrischalen überführt, luftgetrocknet und einer Trockenphase von 2 Monaten ausgesetzt.

- Kompakte Mycobionten, die nach 2-jähriger Kultur ohne Erneuerung des Substrates kein sichtbares Wachstum mehr zeigten, wurden zerteilt und ebenfalls auf neue Nährmedien überimpft.
- Einige polyspore Mycelien von *P. tenella* und *X. parietina* wurden nach einer Vorkultur von einem Monat auf einem Durapore Membranfilter (auf MY-Agar) für weitere 2 Monate einem Feucht-Trocken-Rhythmus unterzogen, indem die Mycelien zusammen mit den Membran-filtern zwischen den Feuchtphasen (3 Tage auf Agar) für 4 Tage in leere, sterile Petrischalen überführt und luftgetrocknet wurden. Nach der Trockenphase wurden die Proben erneut auf den Agar gegeben, auf dem sich die Membranfilter innerhalb von wenigen Sekunden wieder mit Feuchtigkeit vollsogen. Nach einer Kulturdauer von insgesamt 3 Monaten wurden die Mycelien entnommen und für das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) präpariert. Die Untersuchung erfolgte an Serien von Ultradünnschnitten.
- Nach einer Kulturdauer von 12 Monaten wurden die Mycobionten *P. tenella*, *P. distorta*, *A. ciliaris* und *X. parietina* zusammen mit dem Filter auf den Ästen einer Eiche (*Quercus robur*) mit Hilfe von pilzverträglichem Silikon befestigt und für ein Jahr natürlichen Bedingungen ausgesetzt.

2.2.4 Untersuchung der radialen Zuwachsrates der Mycelien

Um die radialen Zuwachsrates der Mycelien zu untersuchen, wurde der Durchmesser der größten Mycelien von den Isolaten aus *Baeomyces rufus*, *X. parietina*, *P. tenella*, *P. distorta* und *A. ciliaris* gemessen, die sich innerhalb von 8 Wochen nach der Sporenkeimung gebildet hatten. Die Art des Nährmediums blieb unberücksichtigt. Zur genauen Bestimmung der Myceldurchmesser wurden Querschnitte angefertigt, die mit Hilfe eines Messokulars am Lichtmikroskop vermessen wurden.

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Mycelien in Abhängigkeit von der Nährstoffkonzentration wurde exemplarisch an dem Mycobionten von *P. tenella* untersucht. Hierfür wurden große Fruchtkörper der Flechte geteilt und die Hälften zum Sporulieren auf Petrischalen mit BG110- bzw. BG110 + 1.5% Glukose-Agar verteilt. Die Durchmesser von Mycelien, die sich aus Clustern von 8 Sporen entweder auf BG110 oder auf 1.5% Glukose entwickelt hatten, wurden nach einer Kulturdauer von 6 Wochen wie oben beschrieben gemessen. Dieser Test wurde mit der Flechte *P. tenella* durchgeführt, weil ihre dunkel gefärbten Sporen gut sichtbar sind, häufig in Clustern auf die Substratoberfläche entlassen werden, eine hohe Keimrate aufweisen und selten kontaminiert sind.

2.2.5 Untersuchung chemotropischer Reaktionen

Sporen der Flechten *X. parietina*, *P. tenella*, *P. distorta* und *A. ciliaris* wurden wie oben beschrieben auf eine Agaroberfläche (MY) gestreut. In der Nähe von Sporenclustern wurden mit einem sterilen Glasröhrchen Löcher ($d = 0.5 \text{ mm}$) aus dem Agar gestanzt. Diese Löcher wurden mit verschiedenen Lösungen (3 % Ribitol; 3 % Glukose; 1 mg / l NAA) gefüllt, so daß im Agar ein Konzentrationsgradient entstand. Anschließend wurde die Orientierung der Hyphen in Bezug auf den Konzentrationsgradienten mit einem Biokular (Wild Heerbrugg) über einen Zeitraum von ein Monat verfolgt.

2.2.6 Zugabe von Photobionten

Polysporen Mycelien der Mycobionten von *X. parietina* und *P. distorta* wurden nach einer Kulturdauer von 4 Wochen sowohl ihre arteigenen Photobionten als auch artfremde Grünalgen der Gattung *Trebouxia* zugeführt. Die Algen wurden wie oben beschrieben aus den Flechten *X. parietina*, *P. distorta* und *Parmelia saxatilis* isoliert. Die Durchführung der Versuche erfolgte auf den Kulturmedien BG110, MY, MY + NAA, MY + Glukose und MY + Ribitol. Nach einer Kulturdauer von weiteren 7 Wochen wurden die Proben untersucht.

2.2.7 Parietin-Nachweis

Das Antrachinon Parietin wurde durch eine Färbereaktion mit KOH (\rightarrow rot) nachgewiesen.

2.2.8 Probenpräparation

In regelmäßigen Intervallen wurden einzelne polyspore Mycelien oder Mycelstücke zusammen mit dem Filter oder nur mit einem Agarblock aus dem Kulturansatz entnommen und für die Licht- und Elektronenmikroskopie präpariert. Alle Handhabungen mit den isolierten Bionten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.2.8.1 Lichtmikroskopie

Die Anfertigung der Schnitte ($25 \mu\text{m} - 30 \mu\text{m}$) erfolgte mit Hilfe eines Gefriermikrotoms Typ MGW LAUDA (Fa. Leitz, Wetzlar) bei $-25^\circ\text{C} - 27^\circ\text{C}$ mit ungekühltem Messer. Einige Schnitte wurden zur Konservierung direkt in Lactoglycerin übertragen; zur Färbung und Konservierung wurden die Schnitte in Lactoglycerin-Baumwollblau übertragen. Der Farbstoff Lactoglycerin-Baumwollblau bewirkt eine Anfärbung des Protoplasten der Zellen. Eine intensive Einfärbung ist somit ein Hinweis für Wachstumsaktivität, da schon stark vakuolisierte oder abgestorbene Pilzhyphen kaum eingefärbt werden.

Die weitere Auswertung erfolgte mit Hilfe des Lichtmikroskops DIALUX 20 EB (40x, 63x, 100x, 250x, 400x und 1000x) und wurde fotografisch mit einem Tageslicht-Diafilm dokumentiert (Kamerakörper: Wild MPS 51; Fotoautomat: MPS 45).

2.2.8.2 Elektronenmikroskopie

I. Präparation für das Rasterelektronenmikroskop (REM)

Für die Untersuchung mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) wurden die Proben mit Hilfe von Silicagel getrocknet und mit einer Leit-Tab-Trägerfolie auf REM-Objekträgern befestigt. Die Leitfähigkeit der Proben wurde im einem Sputter (Agar Sputter Coater, Agar Scientific Ltd.; 35 mA, 180 s) durch Aufbringen einer Goldschicht hergestellt. Die Untersuchung erfolgte mit einem Cambridge Elektronenmikroskop (Stereoscan 200) bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV.

II. Präparation für das Transmissionselektronenmikroskop (TEM)

Mycelien und Flechten wurden für die Untersuchung mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) präpariert. Die Fixierung der Proben erfolgte in 2 % Glutaraldehyd über Nacht in 0.1 M Cacodylatpuffer (pH 7.2) bei Raumtemperatur. Nach 6-fachem Spülen mit 0.1 M Cacodylatpuffer wurden die Proben 2 h im Dunkeln in 1 % Osmiumtetroxyd nachfixiert. Dem erneuten Waschen in destilliertem Wasser folgte eine Färbung in wässriger Lösung mit 1 % Uranyl Acetat im Dunkeln. Nach 5 Waschungen mit destilliertem Wasser wurden die Proben in einer abgestuften Acetonreihe in Schritten von je 10 min. (25%, 50%, 70%, 95% Aceton) und drei weiteren Schritten in 100 % Aceton entwässert. Anschließend wurden die Proben in Epoxy-Harz (SPURR 1969) eingebettet.

Semidünnschnitte (150 nm – 300 nm) wurden mit einem Glasmesser an einem Ultramikrotom (Reichert, UM U3; Leica Nußloch) angefertigt, auf einen Objekträger übertragen und mit Toluidin-Blau angefärbt. Diese Schnitte wurden mit dem Lichtmikroskop untersucht.

Ultradünnschnitte (65 nm – 80 nm) wurden mit einem Diamantmesser (Diatome 45 °, MS) am gleichen Mikrotom hergestellt und auf ein mit Formvar beschichtetes Kupfergrid übertragen. Die Kontrastierung der Schnitte erfolgte mit Bleicitrat (REYNOLDS 1963) bei Raumtemperatur für 3-5 min., dann folgte eine erneute Waschung mit destilliertem Wasser. Die Untersuchungen wurden mit einem Philips Elektronenmikroskop (EM 301) bei einer Spannung von 80 kV durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

Wie in der Einleitung ausführlich dargelegt wurde, gibt es zu den grundlegenden Verhaltensweisen und dem Potential von axenisch wachsenden Flechtenpilzen eine Vielzahl offener Fragen. Darüber hinaus sind vorhandene Angaben in der Literatur nur sehr ungenau und z.T. widersprüchlich. Eine Untersuchung der Reaktionsmuster isolierter Mycobionten ist insbesondere deshalb dringend erforderlich, weil durch die Klärung der Funktionsweise der einzelnen Partner der Symbiose Rückschlüsse auf Interaktionen im Flechtenthallus gezogen werden können. Somit kann ein wichtiger Beitrag zum Verständnis ontogenetischer Zusammenhänge geleistet werden. Durch verschiedene Eigenheiten der Mycobionten, u.a. Anpassungen der Mycobionten an die symbiotische Lebensweise, ergibt sich bei der Bearbeitung eine Einteilung der Experimente in vier Themenkomplexe:

I. Keimung der Ascosporen und Mycelbildung unter axenischen Bedingungen

(Ergebnisse in Kapitel 3.1)

Für eine morphogenetische Untersuchung müssen die Mycobionten der verschiedenen Arten zunächst isoliert werden. Flechtenpilze, die in Pilotstudien und laut Literatur (u.a. BELANDRIA et al. 1987; CRITTENDEN et al. 1991; MOLINA & CRESPO 2000; HONEGGER & KUTASI 1990; HUBER et al. 1994; MOLINA et al. 1997; OLIVER et al. 1989) schon erfolgreich in Kultur genommen werden konnten, wurden deshalb in Versuchsserien auf verschiedenen Nährmedien als polyspore Isolate herangezogen. Während bisher nur bekannt war, daß diese Pilzarten unter axenischen Bedingungen wachsen, wurden zusätzlich vergleichende Experimente zum Sporulations- und Keimverhalten durchgeführt. Um ein breites ökologisches und taxonomisches Spektrum abzudecken, fanden mehrere Vertreter der Lecanorales mit verschiedenen Wuchs- und Reproduktionsformen und mit *Xanthoria parietina* ein Vertreter der Telochistales Verwendung. Mit der schuppenförmig wachsenden Flechte *Baeomyces rufus* wurde eine Flechtenart untersucht, deren systematische Stellung unklar ist (HAWKSWORTH et al. 1995; OTT & LUMBSCH 2001; Platt & SPATAFORA 1999; 2000).

Die Bearbeitung der Krustenflechte *Rhizocarpon geographicum* (Lecanorales) ist im Zusammenhang mit dem Problem der Wechselwirkung zwischen Pilz und Alge von Bedeutung (s.u. III).

Die Abhängigkeit der Mycobionten von der Symbiose scheint in einigen Fällen so weit gegangen zu sein, daß ihre Isolation in axenischer Kultur bisher kaum gelungen ist. Hierbei kann es sich um die Besonderheit bestimmter Taxa handeln, und möglicherweise spiegelt sich darin der Grad der wechselseitigen symbiotischen Adaptation und die Länge des evolutionären Prozesses wider. Eine weitere Versuchsserie hatte deshalb zum Ziel, Mycobionten aus Flechten zu isolieren, bei denen dies laut Literatur bisher nur selten oder noch nie gelungen ist. Zu dieser Gruppe gehören insbesondere Flechtenarten aus der Ordnung der Peltigerales

(z.B. AHMADJIAN 1989, STOCKER-WÖRGÖTTER 1991, STOCKER-WÖRGÖTTER & TÜRK 1991, CRITTENDEN et al. 1995). Primäres Ziel der Versuche war herauszufinden, welche Parameter die Keimung der Sporen und das Wachstum der Mycobionten beeinflussen können und somit auch Einfluß auf die sexuelle Reproduktion durch Ascosporen haben. Mycobionten, die erfolgreich kultiviert werden konnten, sollten anschließend ebenfalls auf ihre morphogenetischen Reaktionen getestet und mit den anderen Arten verglichen werden.

II. Wachstumsmuster und Morphogenese axenisch wachsender Mycobionten (Ergebnisse in Kapitel 3.2)

Mycobionten, die in axenischer Kultur wachsen, entsprechen mit ihrer kompakten Wuchsform weder dem Flechtenthallus noch scheinen sie dem normalen, flächig ausgebreiteten Hyphenwachstum nicht-lichenisierender Pilze zu gleichen. Einen Schwerpunkt der Arbeit stellte die Untersuchung isolierter Flechtenpilze in Bezug auf ihr Wachstumsverhalten dar. Darüber hinaus wurde der Einfluß von verschiedenen Substanzen und Substraten auf die Morphogenese getestet. Die Reaktionsmuster der isolierten Mycobionten vermitteln Verständnis für die Mechanismen, die die Thallusmorphogenese und die Aufrechterhaltung des Symbiosegleichgewichtes ermöglichen.

Der Vergleich mit dem Wachstumsverhalten nicht-lichenisierender Pilze läßt zusätzlich Rückschlüsse auf evolutive Anpassungen von Mycobionten zu, denn möglicherweise sind evolutive Veränderungen im Mycobionten genetisch fixiert und zumindest einige davon in der axenischen Kultur sichtbar.

III. Einflüsse von Photobionten auf die Morphogenese und intrazelluläre Struktur der isolierten Mycobionten (Ergebnisse in Kapitel 3.3)

Mycobionten bilden bei einer unterschiedlich graduierten Selektivität nur in Verbindung mit einem geeigneten Photobionten bestimmte Strukturen, bei denen es sich einerseits um die typischen morphologischen Formen, Gewebe und Reproduktionsorgane handelt und andererseits auch intrazelluläre Strukturen eine Rolle spielen können. Unter Laborbedingungen wurden den isolierten Mycobionten Algen (arteigene Photobionten und Fremdalgen) zugeführt. Ziel dieser Experimente war nicht die Resynthese eines Flechtenthallus, sondern herauszufinden, wodurch ein erster Kontakt zwischen den Bionten beeinflußt wird und welche direkte Wirkung auf die Morphogenese des isolierten Mycobionten zu beobachten ist.

Einflüsse der Lichenisierung können sich auch auf die Ultrastruktur der Pilzzellen beziehen. Entsprechende Vergleiche zwischen den Hyphen der Flechten und dem isolierten Mycobionten werden hier beschrieben. Zwischen dem Flechtenthallus mit den integrierten Bionten einerseits und dem isoliert wachsenden Mycobionten andererseits, nehmen diejenigen Flechten eine Zwischenstellung ein, die mit einem deutlich entwickelten, unlichenisierten Prothallus wachsen. Dieser Prothallus steht möglicherweise nicht unter dem

unmittelbaren Einfluß der Algen, was sich in Wuchsform und intrazellulären Strukturen niederschlagen kann, bzw. könnte. Die Krustenflechte *Rhizocarpon geographicum* besteht aus einem lichenisierten Bereich, den Areolen, denen ein derartiger algenfreier Prothallus vorauswächst. Um die Ultrastruktur des Prothallus mit der von nicht-lichenisierten Hyphen dieser Flechte vergleichen zu können, wurde versucht, den Mycobionten dieser Krustenflechte aus Ascosporen zu kultivieren (s.o.).

IV. Überleben unlichenisierter Mycobionten am natürlichen Standort und Möglichkeiten der Relichenisierung (Ergebnisse in Kapitel 3.4)

Isolierte Mycobionten wurden nach Vorkultur unter axenischen Bedingungen im Labor in das natürliche Biotop transplantiert, und ihre Entwicklung im natürlichen Lebensraum wurde beobachtet. Durch diesen Versuch wurde die Frage, ob unlichenisierte Mycobionten in der Natur überleben und potentiell als frei-lebende Population Teil der Mycoflora natürlicher Substrate sein können, erstmalig experimentell geprüft. Wie schon in der Einleitung angesprochen wurde, wurden darüber hinaus im Zusammenhang mit der Relichenisierungsfähigkeit kultivierter Mycobionten neue Erkenntnisse gewonnen. Außerdem konnten wichtige Beobachtungen zur Kompatibilität der Mycobionten mit verschiedenen freilebenden Flechtenarten gemacht werden.

3.1 Keimung der Ascosporen und Mycelbildung unter axenischen Bedingungen

3.1.1 Versuche zur Isolation von Mycobionten aus Flechten der Ordnung der Peltigerales

Die Flechten dieses Verwandtschaftsbereichs zeichnen sich dadurch aus, daß ihre Mycobionten nur schwer oder gar nicht in axenische Kultur genommen werden können. Dies könnte sowohl auf mangelnde Keimfähigkeit als auch auf fehlendes Hyphenwachstum zurückzuführen sein.

Pro Petrischale wurden jeweils 5 Apothecien präpariert und unter Verwendung eines Membranfilters (Cellulose, Porendurchmesser 0.65 µm) so verteilt, daß die Sporen von 3 Fruchtkörpern auf die Filtermembran und die von 2 Fruchtkörpern auf die Agaroberfläche gelangten (s. Abb. 1). Die Präparation der Peltigerales wurde auf verschiedene Weise variiert: Zur Verringerung von Kontaminationen durch Bakterien und Hefen, die bei Kulturversuchen mit Flechten aus dieser Familie häufig auftreten (CRITTENDEN et al. 1995; STOCKER-

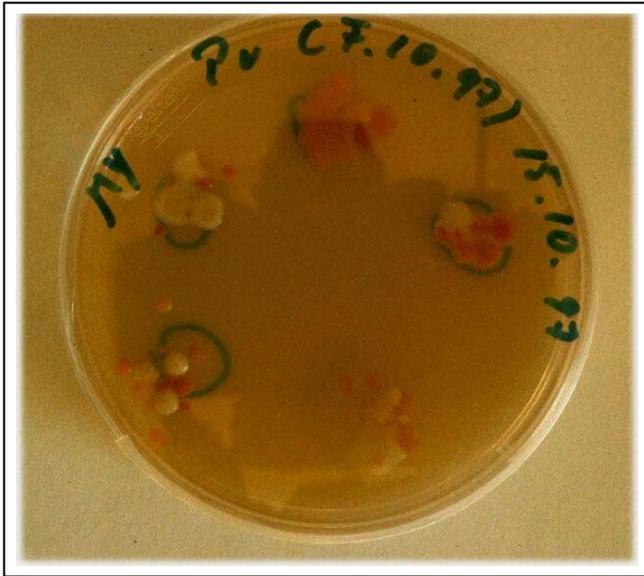


Abb. 3:
Kontaminierte Sporulationsbereiche.

1 cm

WÖRGÖTTER 1995), wurde ein Teil der Apothecien zuvor für wenige Sekunden in Ethanol gespült. Trotz dieser Behandlung waren jedoch sehr viele Sporencluster nach kurzer Zeit von Bakterienkolonien umgeben (Abb. 3). Eine Lagerung der Petrischalen mit der Agarseite nach oben für die Zeit des Sporulierens sollte verhindern, daß Verunreinigungen von den Apothecien auf die Agaroberfläche gelangten. Eine Verringerung der Kontaminationen konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Abbildung 4 zeigt eine Spore von *Solorina spongiosa*, die von Bakterien umgeben ist, ein Zeichen dafür, daß die Bakterien direkt mit den Sporen verbreitet werden.

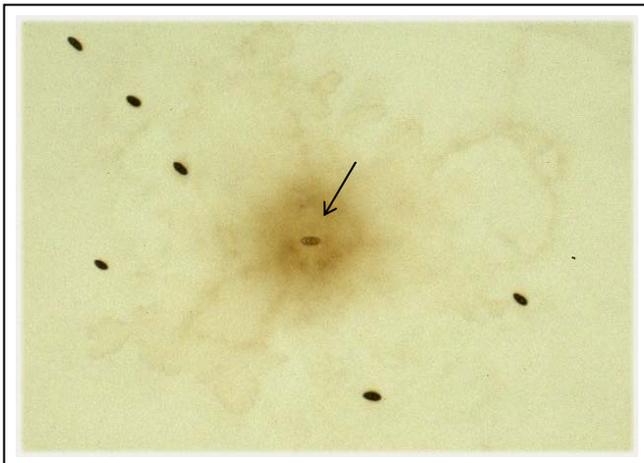


Abb. 4:
Spore als Überträger von bakteriellen Kontaminationen.

15 µm

Die Zugabe eines Antibiotikums (Ampecillin: Am, Amh) in verschieden hoher Dosierung hatte keinen sichtbaren Einfluß auf das Bakterienwachstum. Auf nährstoffarmen Medien entwickelten sich die Bakterienkolonien jedoch sehr viel langsamer als auf nährstoffreichem Agar; einige Versuchsansätze auf letzterem mußten wegen zu starker Kontamination verworfen werden.

Die folgenden Tabellen (Tab. 1-8) beinhalten die Anzahl der präparierten Apothecien, das Streuverhalten der Fruchtkörper und das Keimverhalten der Sporen. Wenn nicht anders aufgeführt, wurden die Petrischalen mit den Isolaten bei Raumtemperatur und natürlichem Hell-Dunkel-Rhythmus gelagert.

Als nährstoffreiche Medien oder Vollmedien werden im weiteren Verlauf alle Kulturmedien bezeichnet, die Malz-Hefe-Extrakt-Agar (MY) als Grundsubstanz enthalten. Im Gegensatz dazu werden alle Medien mit Mineralagar BG110 oder MBV als Grundlage, denen jedoch auch Kohlenhydrate, Phytohormone oder Vitamine zugesetzt sein können, als nährstoffarm bezeichnet.

Standorte:	Am: Ampecillinkonzentration 100 µg/ml
(1): Österreich, Fimbartal	Amh: Ampecillinkonzentration 150 µg/ml
(2): Norwegen, Dovrefjell	EE: Erdextrakt vom natürlichen Standort
(3): Norwegen, Rondane	k.A.: keine Angabe
(4): Norwegen, Hjølmodalen	KS: Keimschlauch wurde gebildet
(5): Norwegen, Otta	KSF: beschleunigtes Auskeimen auf dem Filter
	M: wenige Hyphen mit Verzweigungen
	M+: Mycelbildung aus verzweigten Hyphen
	SE: Serdolit* - Erdextrakt - Agar
	(u): Sporen z.T. unreif
	(d): Lagerung im Dunkeln

* Die Substanz „Serdolit“ (Serva) wird im Labor als Ionenaustauscher verwendet und soll bei Arten der Peltigerales die Sporenkeimung fördern (Galun, pers. Mitt.).

3.1.1.1 Die Gattung *Solorina*

Die *Solorina*-Arten sind Laubflechten mit teilweise ringförmig um die Apothecien reduziertem Lager (*Solorina spongiosa*), dessen Algenschicht die coccale Grünalge der Gattung *Coccomyxa* enthält. Zusätzlich sind diese Flechten mit dem Cyanobakterium *Nostoc* in verschiedener, artabhängiger Weise assoziiert. Das Verbreitungsgebiet der untersuchten Arten ist arktisch-alpin geprägt.

I. *Solorina crocea*

Die Apothecien der Flechte *Solorina crocea* zeigten bei dem Material, das aus Österreich (Fimbartal) stammt, zu jeder Jahreszeit eine gute Sporulationsfähigkeit. Nur bei einem Versuchsansatz (Material vom 20.06.96) konnte eine Keimung von wenigen Sporen sowohl auf Wasseragar als auch auf Vollmedium (MY) beobachtet werden, wobei die Keimschläuche nur wenige Mikrometer aus der Sporenwand herausgeschoben wurden und anschließend ihr Wachstum einstellten. Bei einem Versuch (Material vom 31.07.96) können zur Keimung der Sporen keine Angaben (k.A.) gemacht werden, da der Ansatz wegen starker Kontamination verworfen werden mußte.

Die Zugabe der spezifischen Alge *Nostoc spec.* (isoliert aus dem Thallus der Flechte) hatte keine Auswirkung auf das Keimverhalten. Der Ausgangsgedanke für dieses Experiment war die Möglichkeit, daß die Entwicklung des Mycobionten auf Stimulation durch Photobionten angewiesen sein könnte. Auch eine Anreicherung des Kulturmediums mit einem Erdextrakt vom natürlichen Standort – ein Verfahren, das bei einigen Pilzen eine Sporendormanz aufhebt (WEBER 1993), - wirkte sich ebenso wenig positiv auf die Sporenkeimung aus wie die Zugabe des Ionenaustauschers „Serdolit“ (Serva).

Das an Standort 2 (Norwegen, Dovrefjell; 31.07.96) gesammelte Material sporulierte nicht, obwohl die Asci reife Sporen enthielten. Bei einem weiteren Ansatz mit Proben von Standort 3 (Norwegen, Rondane; 28.08.99) wurden nur wenige Sporen ausgestreut, die z.T. noch unreif waren (erkennbar an der hyalinen Wandstruktur). Eine Keimung konnte in keinem Fall beobachtet werden.

Sammeldatum (Standort)	Präparation	Medium	Anzahl der Apothecien	Sporulation	Keimung
03.10.95, (1)	07.10.95	MY	25	+	-
		MY 50%	10	+	-
	20.10.95	MY + EE	20	+	-
		06.11.95	MY 50%+Amh	10	+
20.06.96, (1)	24.06.96	W	15	+	KS
		30.06.96	MY	50	+
		MY + Am	20	+	-
		MBV	20	+	-
10.10.96, (1)	14.10.96	MY	20	+	-
		MY + Am	20	+	-
		MBV+ Nostoc	20	+	-
		MBV + EE	20	+	-
15.10.97, (1)	21.10.97	SE	15	+	-
		BG110	15	+	-
		MY	10	+	-
		MY + Am	5	+	-
31.07.98, (2)	19.08.98	MBV	5	-	k.A.
		MY + Am	5	-	k.A.
28.08.99, (3)	27.09.99	MBV (d)	10	+/- (u)	-

Tab. 1: Isolationsversuche mit *Solorina crocea*

II. *Solorina saccata*

Die Proben der Flechte *Solorina saccata* wurden zu 2 verschiedenen Jahreszeiten immer am gleichen Standort (Österreich, Fimbartal) gesammelt. Alle präparierten Apothecien haben reife Sporen ausgestreut, von denen jedoch nur sehr wenige in einem Versuchsansatz (Material vom 20.06.96) sowohl auf einem Vollmedium (MY) als auch auf Wasseragar einen Keimschlauch ausgebildet haben. Wie schon zuvor bei *S. crocea* hat auch hier keine weitere Entwicklung stattgefunden. Auffällig ist jedoch, daß bei beiden Arten nur in diesem Versuchsansatz eine sichtbare Reaktion der Sporen erfolgte.

Auch bei *S. saccata* hatte weder die Zugabe eines Erdextraktes, von „Serdolit“ oder von der spezifischen Alge *Nostoc spec.* (isoliert aus Cephalodien der Flechte) positiven Einfluß auf das Keimverhalten.

Sammeldatum (Standort)	Präparation	Medium	Anzahl der Apothecien	Sporulation	Keimung
03.10.95 (1)	07.10.95	MY	25	+	-
		MY 50%	10	+	-
	20.10.95	MY + EE	20	+	-
20.06.96 (1)	24.06.96	W	15	+	KS
		W + Nostoc	10	+	-
	30.06.96	MY	50	+	KS
		MY + Nostoc	5	+	-
		MY + Am + Nostoc	20	+	-
10.10.96 (1)	14.10.96	MBV	20	+	-
		MBV + EE + Nostoc	20	+	-
15.10.97 (1)	21.10.97	SE	10	+	-
		BG110 + Nostoc	10	+	-
20.09.99 (1)	27.09.99	MBV (d)	10	+	-

Tab. 2: Isolationsversuche mit *Solorina saccata*

III. *Solorina spongiosa*

Insgesamt hat kein Versuchsansatz mit *Solorina spongiosa* zur Keimung der Sporen geführt, und auch eine Kältebehandlung der Sporen (Lagerung der Petrischalen bei -4°C für einen Monat) führte nicht zur Keimschlauchbildung. Durch diese Lagerung wurde ein Kälteschock simuliert, der bei einigen Ascomyceten eine natürliche Sporenruhe beendet (Deacon 1997).

Sammeldatum (Standort)	Präparation	Medium	Anzahl der Apothecien	Sporulation	Keimung
02.10.95 (1)	07.10.95	MY	25	+	-
		MY 50%	15	+	-
	20.10.95	MY + EE	20	+	-
	06.11.95	MY 50%+Amh	20	+	-
	20.11.95	MY + Am	20	+	-
20.06.96 (1)	24.06.96	W (-4°C)	15	+/-	-
		MY (-4°C)	50	+/-	-
	30.06.96	MY + Am	20	+/-	-
15.10.97 (1)	21.10.97	BG110	5	+	-
		SE	5	+	-
		MBV	5	+	-

Tab. 3: Isolationsversuche mit *Solorina spongiosa*

3.1.1.2 Die Gattung *Peltigera*

Die *Peltigera*-Arten werden auf Grund ihrer Lagerform unter dem deutschen Namen „Schildflechten“ zusammengefaßt. Charakterisiert sind die meist locker auf dem Substrat sitzenden Loben dieser Gattung durch ihre filzige, unberindete Unterseite, die häufig ein Netz von Adern und unterschiedliche Rhizinen-Typen trägt. Die Arten mit Grünalgen (*Coccomyxa*) in der Algenschicht als primären Photobionten enthalten zusätzlich Cyanobakterien (*Nostoc*) in externen Cephalodien oder Thallusschuppen, z.B. *Peltigera aphthosa* und *Peltigera venosa*.

I. *Peltigera venosa*

Die Apothecien der Flechte *Peltigera venosa* haben in jedem Versuchsansatz sporuliert. Die Bildung von Keimschläuchen konnte in zwei Ansätzen auf Mineralmedien (BG110; MBV) beobachtet werden. Auf dem Kulturmedium BG110 erfolgte nach der Bildung von Keimschläuchen keine weitere Entwicklung. Auf dem Medium MBV (Ansatz vom 27.09.99,

Lagerung im Dunkeln) bildeten sich erste Verzweigungen an den Keimhyphen sowohl auf dem Filter als auch auf Agar (Abb. 5). Die lichtmikroskopische Aufnahme zeigt die für *Peltigera*-Arten typischen vierzelligen, hyalinen Sporen. Zwei Sporen sind durch Hydratation aufgequollen, eine weitere ist ausgekeimt. Der polar gebildete Keimschlauch ist in vegetatives Wachstum übergegangen, was an den Verzweigungen erkennbar

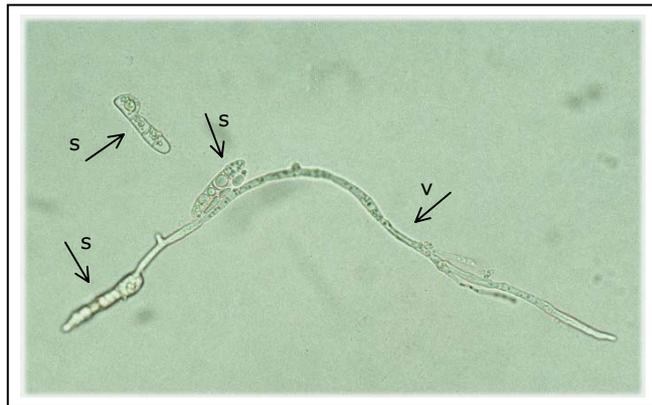


Abb. 5: Sporenkeimung; s: Spore, v: vegetative Hyphe. 50 µm

wird (s. Kap. 3.2.1). Nach ca. 4 Monaten haben diese Hyphen ihr Wachstum eingestellt. Um erneut Wachstum anzuregen, wurden sie auf ein nährstoffreiches Medium transferiert; innerhalb weniger Tage hatten sich bakterielle Kontaminationen so stark vermehrt, daß der Ansatz verworfen werden mußte.

Die Zugabe des spezifischen Photobionten von *P. venosa* (*Nostoc spec.*, isoliert aus Cephalodien der Thallusunterseite) als Algensuspension führte nicht zu einem Auskeimen der Sporen. Zugefügte Cephalodien hatten ebenfalls keinen induzierenden Effekt.

Ein Kulturversuch mit Material vom 20.09.99 wurde unter nicht-axenischen Bedingungen im Zusammenhang mit einer Langzeitstudie durchgeführt, die parallel zu dieser Arbeit verlief. Als Substrat für die Sporulation der Apothecien diente hierbei autoklavierte Erde des Naturstandorts (Abb. 6). Der Ansatz wurde in einer Klimakammer einem Hell-Dunkel-Rhythmus (14 - 10 Std.) unterworfen und regelmäßig befeuchtet. Nach einem Jahr haben

sich ohne die aktive Zugabe von Cyanobakterien oder Grünalgen kleine Primordien gebildet, die eindeutig *P. venosa* zugeordnet werden können (Abb. 7; 8).



Abb. 7: 1 mm 
Primordium von *P. venosa*.



Abb. 6: 1 cm 
Kulturansatz auf autoklavierter Erde; der Sporulationsbereich liegt innerhalb der Markierungen.

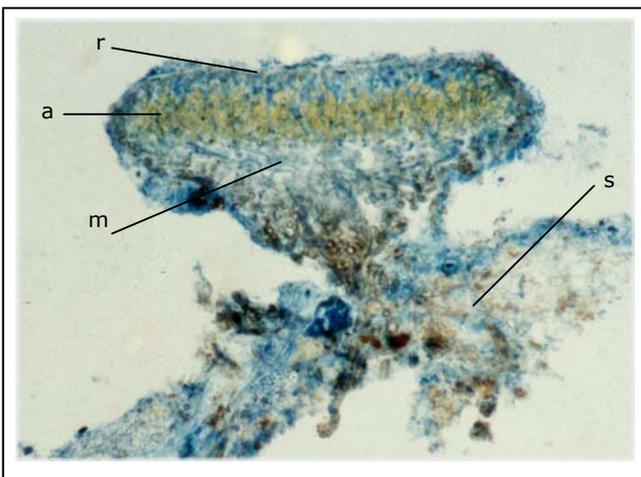


Abb. 8:
Querschnitt durch ein Primordium von *P. venosa*;
a: Algenschicht, m: Mark, s: Substrat.
100 µm 

Sammeldatum (Standort)	Präparation	Medium	Anzahl der Apothecien	Sporulation	Keimung
11.10.96 (1)	14.10.96	MY	20	+	-
		MY + Am	20	+	-
17.10.97 (1)	21.10.97	BG110 + Nostoc spec.	5	+	-
		BG110 + Cephalodien	5	+	-
		MY	10	+	-
		MY + Am	10	+	-
		BG110	5	+	KS
20.09.99 (1)	27.09.99	MY	5	+	-
		SE	5	+	-
		MBV (d) autokl. Erde(*)	5	+	M
			5	+	+

Tab. 4: Isolationsversuche mit *Peltigera venosa*

* Dieser Versuch wurde unter unsterilen Bedingungen in einer Klimakammer durchgeführt.

II. *Peltigera aphthosa*

Die Apothecien der Flechte zeigten eine gute Streufähigkeit. In einigen Fällen entstanden um einzelne Sporen bakterienfreie Höfe.

In einem Kulturversuch auf MBV (27.09.99) wurden die Petrischalen mit den Sporenclustern bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Nach einer Woche begannen die Sporen, die auf dem Membranfilter lagen, auszukeimen. Abbildung 9 zeigt die langgestreckten, vierzelligen Sporen mit jeweils einer polaren Keimhyphe von ca. 60 µm Länge. Auf der Agaroberfläche erfolgte die Keimung verzögert erst nach einem Monat.

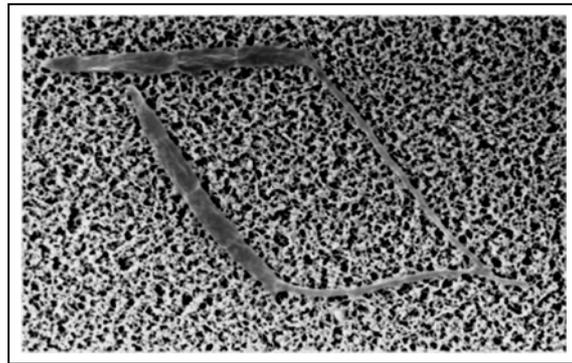


Abb. 9: Sporenkeimlinge von *P. aphthosa* auf einem Membranfilter; (REM-Aufnahme). 15 µm

Dort, wo die Sporenkonzentration sehr hoch ist – im Zentrum der Sporulationsbereiche –, konnte keine Keimschlauchbildung beobachtet werden. Nur Sporen an den Rändern der Sporencluster bildeten Keimschläuche aus. Die sehr feinen Hyphen (Durchmesser ca. 1 µm) wurden innerhalb von 2 Monaten bis zu 500 µm lang und verzweigten sich. Ein weiteres Wachstum fand jedoch nicht statt.

Der Versuch, die Mycelien durch Umsetzen auf ein nährstoffreicheres Medium zu weiterem Wachstum anzuregen, scheiterte, wie es schon für *P. venosa* beschrieben wurde, da die Isolate innerhalb weniger Tage von assoziierten Bakterien überwachsen wurden.

Sammeldatum (Standort)	Präparation	Medium	Anzahl der Apothecien	Sporulation	Keimung
20.06.96 (1)	24.06.96	MY	40	+	-
		W	5	+	-
		MBV	10	+	-
	30.06.96	MY + Am	15	+	-
		MBV	5	+	-
19.09.96 (4)	25.09.96	MY	20	+	-
		MY + Am	15	+	-
19.09.96 (3)	31.10.96	MY	15	+	-
		MY + Am	15	+	-
		MBV + EE	15	+	-
13.07.97 (5)	19.08.97	MBV	15	-	k.A.
		MY + Am	10	-	k.A.
15.10.97 (1)	21.10.97	SE	20	+	-
20.09.99 (1)	27.09.99	MBV (d)	10	+	KSF, M

Tab. 5: Isolationsversuche mit *Peltigera aphthosa*

III. *Peltigera canina*, *Peltigera malacea*, *Peltigera polydactyla*

Die Apothecien der Flechten *Peltigera canina*, *Peltigera malacea* und *Peltigera polydactyla* zeigten gutes Sporulationsverhalten. Es keimten jedoch nur die Sporen von *P. polydactyla* aus und bildeten verzweigte Hyphen. Das Hyphenwachstum wurde, wie schon zuvor für *P. venosa* und *P. apthosa* beschrieben, nach einigen Monaten eingestellt. Ein Transfer der Hyphen auf ein nährstoffreicheres Medium wurde nicht durchgeführt, da sie innerhalb von Bakterienplaques lagen und die Gefahr einer Übertragung der Kontaminationen auf das neue Medium bestand. Einige ungekeimte Sporencluster von *P. polydactyla* zeigten jedoch antibakterielle Wirkung, erkennbar an den bakterienfreien Höfen.

Sammeldatum (Standort)	Präparation	Medium	Anzahl der Apothecien	Sporulation	Keimung
P. canina					
20.09.99 (1)	27.09.99	MBV (d)	10	+	-
P. malacea					
10.10.96 (1)	14.10.96	MY	20	+	-
		MY + Am	20	+	-
		MBV + EE	20	+	-
P. polydactyla					
20.09.99 (1)	27.09.99	MBV (d)	10	+	M

Tab. 6: Isolationsversuche mit *Peltigera canina*, *Peltigera malacea*, *Peltigera polydactyla*

IV. *Peltigera didactyla*

Die Sporen von *Peltigera didactyla* sind sowohl auf Agar als auch auf dem Filter ausgekeimt, und die Keimlinge bildeten auf beiden Substraten verzweigte Hyphen. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Experimenten mit anderen *Peltigera*-Arten entwickelten sich aus den Keimschläuchen der Sporen von *P. didactyla* nicht nur einige wenig verzweigte Hyphen; vielmehr wuchsen die Mycelien in den ersten 4-6 Monaten kontinuierlich weiter. Abbildung 10 zeigt ein Detail eines flächigen, wenig verzweigten Mycels (von ca. 2 mm Größe) ohne Lufthyphen, das sich nach 4 Monaten auf Filter über dem Mineralmedium MBV entwickelt hat. Zwischen benachbarten Hyphen sind Anastomosen (s. Kap. 3.2.1.4) zu beobachten.

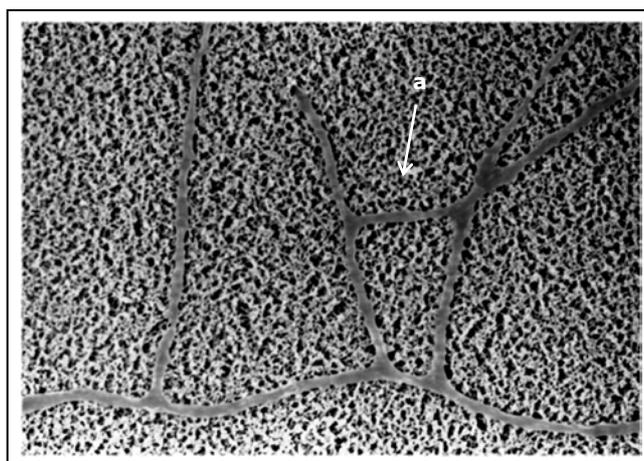


Abb. 10: Mycel von *P. didactyla* auf einem Membranfilter mit Verzweigungen und Anastomosen (a); (REM-Aufnahme). 25 µm

Auf Agar bildeten sich dreidimensionale Mycelien, die auch in das Medium eingedrungen sind (Abb. 11). Solche Wachstumsvorgänge konnten jedoch nur an den Rändern der Streubereiche beobachtet werden, in denen die Sporendichte gering ist. In Bereichen hoher Sporendichte (Abb. 12) haben sich keine Mycelien entwickelt.



Abb. 11: 350 µm 
Mycel von *P. didactyla*, dessen Hyphen tief in den Agar eingedrungen sind.



Abb. 12: 150 µm 
Sporen von *P. didactyla*, die im Zentrum des Sporulationsbereichs dicht beieinander liegen.

Sammeldatum (Ort)	Präparation	Medium	Anzahl der Apothecien	Sporulation	Keimung
20.09.99 (1)	27.09.99	MBV (d)	10	+	M+

Tab. 7: Isolationsversuch mit *Peltigera didactyla*

Zur Fortführung der Kultur wurden einige netzartige Mycelien des Mycobionten von *Peltigera didactyla* (200 µm Durchmesser), die sich auf dem reinen Mineralmedium MBV gebildet hatten, zusammen mit einem kleinen, sie umgebenden Agarblock auf ein schwach nährstoffhaltiges Medium (BG110 + 1.5 % Glukose + Biotin) übertragen. Sie entwickelten sich dort innerhalb von 4 Monaten zu kompakten, reich verzweigten Mycelclustern von ca. 800 µm Durchmesser (Abb. 13). In den Randbereichen kann die Bildung von Anastomosen beobachtet werden (Abb. 14).

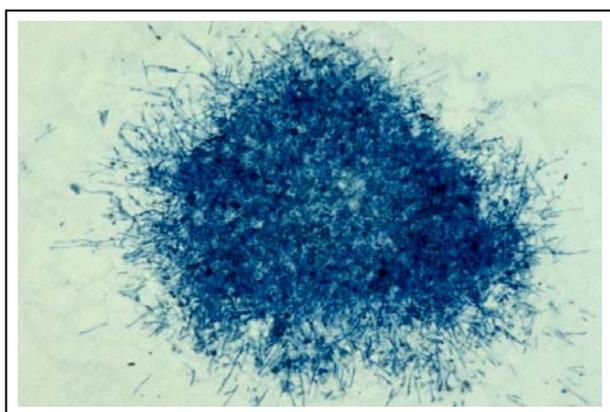


Abb. 13: 150 µm 
Querschnitt eines kompakt wachsenden Mycels von *P. didactyla*.



Abb. 14: 15 µm 
Hyphen im Randbereich des kompakten Mycels von *P. didactyla*; Anastomosenbildung.

Um die Mycobionten zu einem stärkeren Wachstum anzuregen und ihre Reaktionen bezüglich der Kohlenhydrate Glukose und Ribitol zu testen, wurden die Mycelien auf verschiedene neue Kulturmedien übertragen (MY/2 + 1.5 % Glu; MY/2 + 1.5 % Rib; BG110 + 1.5 % Glu + Bio; BG110 + 1.5 % Rib + Bio). Da für diesen Versuch nur sehr wenig Material zur Verfügung stand, mußten die Mycelien zuvor halbiert werden. Die Mycelstücke wurden zusammen mit dem Agarblock, in dem sie sich entwickelt hatten auf den neuen Agar übertragen. Auf den Malz-Hefe Medien zeigten die Mycelfragmente jedoch kein weiteres Wachstum. Die schwach nährstoffhaltigen Medien (BG110 + 1.5 % Glu + Bio; BG110 + 1.5 % Rib + Bio) führten hingegen zu einer kontinuierlichen Entwicklung des Mycobionten. Der Mycobiont der Flechte *P. didactyla* konnte somit zum ersten Mal erfolgreich isoliert werden. Für zukünftige Untersuchungen wurden einige der Mycelien in Flüssigkultur überführt.

3.1.2 Versuche zur Isolation des Mycobionten *Rhizocarpon geographicum*

Um die Ultrastruktur des isolierten Mycobionten mit der des Prothallus und der Areolen dieser Flechte vergleichen zu können, sollte der Mycobiont von *Rhizocarpon geographicum* über Ascosporen isoliert werden.

Die Flechte wurde in Norwegen (Jotunheimen, 12.07.97) direkt nach der Schneeschmelze in feuchtem Zustand (Schmelzwasser) gesammelt, und es fanden sich schon zu diesem Zeitpunkt sehr viele makroskopisch erkennbare Sporen auf den Thalli und auf dem umgebenden Gestein. Die für Streuversuche im Labor präparierten Apothecien (19.08.97) haben keine Sporen mehr entlassen, obwohl Schnitte belegt hatten, daß reife Sporen enthalten waren. Sporen, die mit einer Mikropipette aus den zerkleinerten Apothecien isoliert und auf verschiedene Substrate (BG110; MY; autoklaviertes Gestein vom Standort, das regelmäßig befeuchtet wurde) gegeben wurden, keimten nicht aus.

Bei einem weiteren Versuchsansatz (15.10.97) mit Material aus Österreich (Fimbartal 09.10.97) haben die Apothecien ebenfalls nicht sporuliert.

3.1.3 Isolation der Mycobionten von *Xanthoria parietina*, *Physcia tenella*, *Physconia distorta*, *Anaptychia ciliaris* und *Baeomyces rufus*

(unter Einbeziehung einiger Beobachtungen an den Peltigerales)

Von dem hier behandelten Verwandtschaftsbereich ist bekannt, daß sich die Bionten für axenische Kulturen eignen. Die Mycobionten der Flechten *Xanthoria parietina*, *Physcia tenella*, *Physconia distorta*, *Anaptychia ciliaris* und *Baeomyces rufus* wurden als polyspore Isolate auf verschiedenen Nährmedien herangezogen. Die Vielzahl der verschiedenen Kulturansätze wird im Anhang tabellarisch dargestellt. Die Tabellen beinhalten die Anzahl der präparierten Apothecien, ihre Streufähigkeit und die Anzahl der Apothecien, aus denen bei den Sporulationsversuchen makroskopisch sichtbare Mycelien (M+) hervorgegangen

sind. Kontaminationen mit Bakterien und Hefen traten bei diesen Versuchen im Einzelfall auf und wurden bei regelmäßigen Kontrollen entfernt. Die mit Schimmelpilz kontaminierten Streubereiche sind in Klammern gesondert aufgeführt. Sie sind bei der Berechnung der Keimungs- bzw. Mycelbildungsrate nicht berücksichtigt worden, da diese Kulturansätze verworfen werden mußten.

Die Beobachtungen aus den Isolationsversuchen mit Arten der Ordnung der Peltigerales werden in den folgenden Kapiteln einbezogen. Einigen Kapiteln ist zum besseren Verständnis eine allgemeine Erläuterung vorangestellt.

3.1.3.1 Sporulations- und Keimverhalten, Mycelbildung

In meiner Arbeit steht das Wachstumsverhalten der Mycobionten im Vordergrund, und deshalb werden zum Sporulations- und Keimverhalten der untersuchten Flechten nur Grundprinzipien erläutert, die zum Verständnis der weiteren Ergebnisse und für die spätere Diskussion relevant sind.

I. Sporulationsfähigkeit der Apothecien

Nach der Präparation der Apothecien werden die Ascosporen bei den untersuchten Arten innerhalb von 3 Tagen ausgestreut, wobei der Streubereich eines Fruchtkörpers auf der Substratoberfläche einen Durchmesser von bis zu 2 cm einnehmen kann. Apothecien, die nicht innerhalb dieser Periode Sporen ausschleuderten, sporulierten auch nicht nach längerer Exponierung. Die Sporendichte und die Anzahl der gestreuten Sporen kann zwischen den Apothecien eines Ansatzes stark variieren. An den Rändern der Sporulationsbereiche ist die Anzahl der Sporen pro Flächeneinheit generell geringer als im Zentrum.

Bei Arten aus der Ordnung der Peltigerales verhielten sich immer alle Apothecien eines Streuversuchs gleich, d.h. alle Fruchtkörper sporulierten entweder gut, mäßig oder gar nicht (s. Kap. 3.1.1). Bei *X. parietina* und den Flechten aus der Familie der *Physciaceae* sporulierten die Apothecien eines Versuchsansatzes häufig unterschiedlich. Selten gab es eine Streurrate von 100% (Abb. 18b-e), wie sie in den meisten Versuchen mit Peltigerales zu beobachten war. Von den insgesamt 41 in dieser Arbeit durchgeführten Kulturansätzen kam es jedoch nur bei 4 Versuchen zu keiner Sporulation der Apothecien.

Die Flechten *Xanthoria parietina* und *Physcia tenella* entlassen ihre Sporen meist in Clustern von bis zu 8 Sporen (Meioseprodukte eines Ascus) (Abb. 15). Bei *Physconia distorta* und *Anaptychia ciliaris* finden sich häufig Gruppierungen von 2-4 Sporen, manchmal auch einzelne Sporen auf dem Substrat. Die Sporen von *Baeomyces rufus* und den Arten aus der Ordnung der Peltigerales trennen sich nach dem Ausschleudern aus dem Ascus. Sie liegen am Rand der Sporulationsbereiche einzeln, aber dicht gedrängt in den Zentren dieser Bereiche.

II. Keimverhalten der Sporen

Als Keimung wird die Entwicklung eines Keimschlauches bezeichnet. Bei den Ascomyceten ist die Keimung mit der Bildung einer ersten Hyphenquerwand abgeschlossen, wodurch die vegetative Phase einleitet wird (Müller & Löffler 1982). Die Bildung einer Verzweigung ist ein deutliches Zeichen für eine Querwandbildung; vegetatives Wachstum kann jedoch auch ohne die Bildung von Seitenhyphen stattfinden.



Abb. 15: 15 µm 
Zweizellige Sporen von *P. tenella* in Clustern; die Keimung ist in vegetatives Wachstum übergegangen.

In Abhängigkeit vom Medium beginnt die Sporenkeimung der untersuchten Mycobionten (mit Ausnahme der Peltigerales) innerhalb einer Woche. Sie wird unabhängig von der Zusammensetzung des Kulturmediums häufig von der Ausscheidung gelatinöser Substanzen begleitet (Abb. 16). Die Lag-Phase der Sporen (Ruhephase zwischen Sporulation und Auskeimung) kann jedoch nicht nur zwischen den Flechtenarten um mehrere Tage variieren, sondern auch innerhalb einer Art und sogar zwischen den Sporen eines Apotheciums (BELANDRIA et al. 1989). Auf nährstoffarmem Medium setzt die Bildung von Keimschläuchen bei allen Arten (mit Ausnahme von *Baeomyces rufus*) früher ein als auf nährstoffreichem Medium. Bei den Arten der Gattung *Peltigera* kommt es auf einem Vollmedium lediglich zu einem Aufquellen der Sporen.

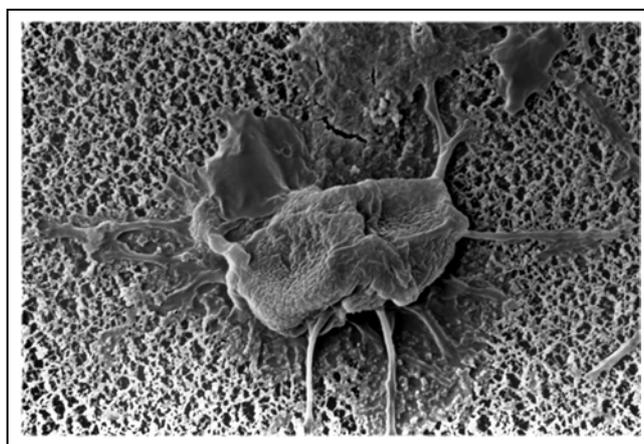


Abb. 16: 20 µm 
Auskeimende Spore von *A. ciliaris*, die von Gallerte umgeben ist.

Aus dieser Gruppe kann bei den Arten *P. venosa*, *P. aphthosa*, *P. polydactyla* und *P. didactyla* auf reinen Mineralmedien eine Keimung der Sporen beobachtet werden. Dieser Vorgang ist auf die Ränder der Streufelder eines Apotheciums mit einer geringen Sporendichte beschränkt. Im Gegensatz dazu kann bei den anderen untersuchten Arten, die nicht zu den Peltigerales gehören, im gesamten Sporulationsbereich eines Apotheciums die Keimung von Sporen beobachtet werden, wobei auch bei diesen Arten nicht immer alle Sporen eines Streufeldes auskeimten.

III. Besonderheiten einzelner Arten

Bei *P. distorta* und *A. ciliaris* findet man auf allen Medien aufgebrochene Sporen, aus denen der Zellinhalt herausdrängt (Abb. 17). In diesen Fällen wird kein Keimschlauch mehr gebildet. Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 16 eine auskeimende Spore von *A. ciliaris*, die zahlreiche Keimhyphen gebildet hat.

Die Sporen von *B. rufus* bilden unabhängig von der Art des Mediums schon nach wenigen Stunden (an beiden Enden der Sporen) Keimschläuche aus. Sie unterscheiden sich damit von den anderen untersuchten Arten, bei denen erst nach frühestens 2-3 Tagen Keimschläuche zu erkennen waren.

Sowohl bei *P. apthosa* als auch bei *X. parietina* konnte beobachtet werden, daß die Ascosporen auf der rauheren Filteroberfläche schneller auskeimten als auf der glatten Agaroberfläche.

IV. Mycelbildung

Im Gegensatz zu den Isolatn aus der Gruppe der Peltigerales geht die Sporenkeimung bei den anderen untersuchten Arten in ein kontinuierliches Hyphenwachstum über, so daß aus den Sporenclustern, in denen Keimung stattgefunden hat, auch Mycelien hervorgehen.

3.1.3.2 Vergleich des Sporulations- und Keimverhaltens der verschiedenen Arten

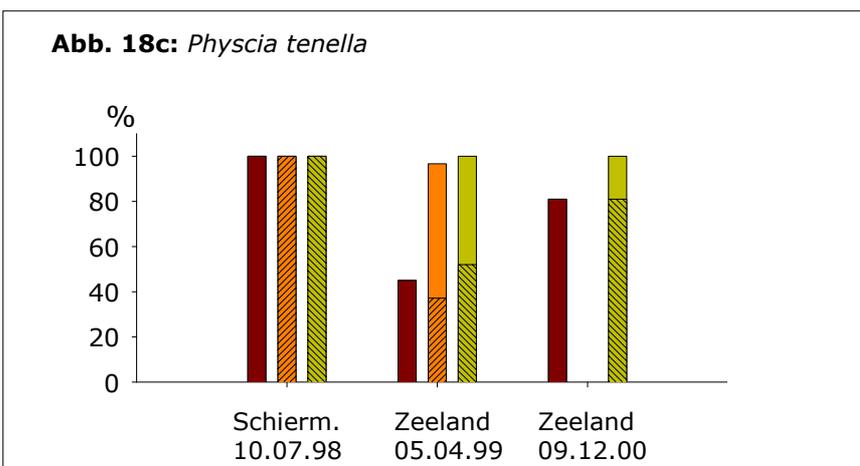
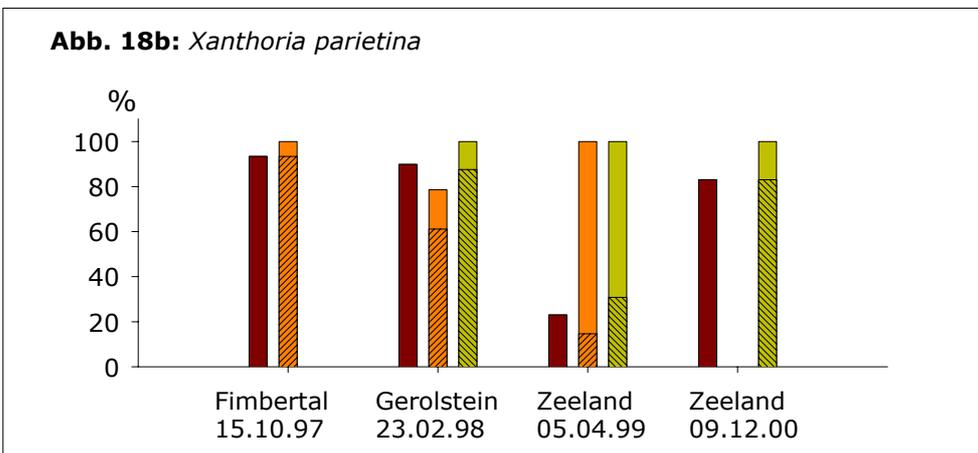
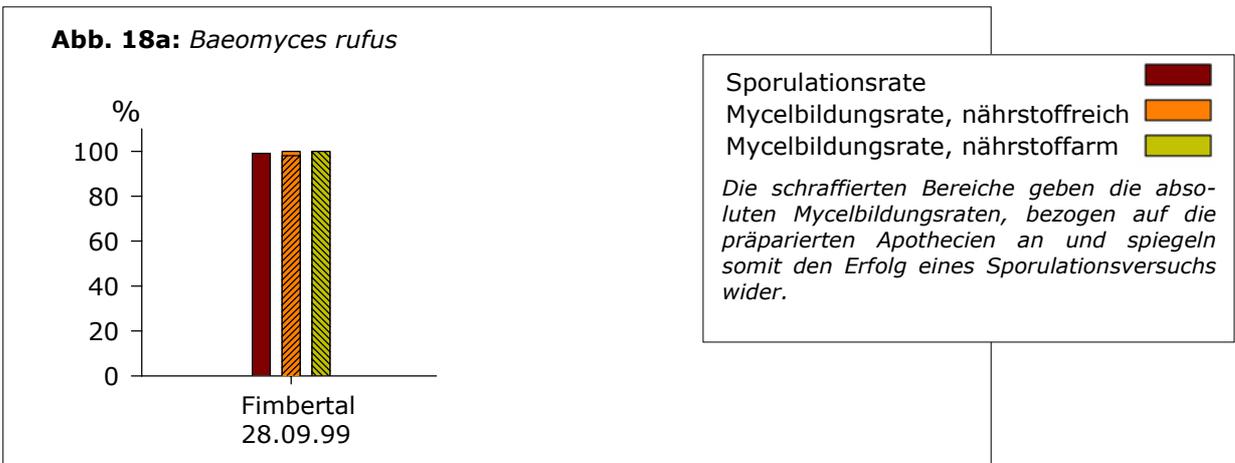
Die folgenden Diagramme (Abb. 18a-e) zeigen die Sporulations- und Mycelbildungsraten der Flechten *Baeomyces rufus*, *Xanthoria parietina*, *Physcia tenella*, *Physconia distorta* und *Anaptychia ciliaris* aus den verschiedenen im Anhang aufgeführten Kulturversuchen. Die Sporulationsrate wird als 100% bezeichnet, wenn alle präparierten Apothecien eines Ansatzes sporuliert haben, wobei die Menge der ausgestreuten Sporen pro Fruchtkörper nicht berücksichtigt wird. Zusätzlich ist der prozentuale Anteil der Sporencluster (eines Apotheciums) aufgeführt, aus denen Mycelien hervorgegangen sind (= Mycelbildungsrate), unabhängig davon, ob alle Sporen der jeweiligen Cluster daran beteiligt waren.

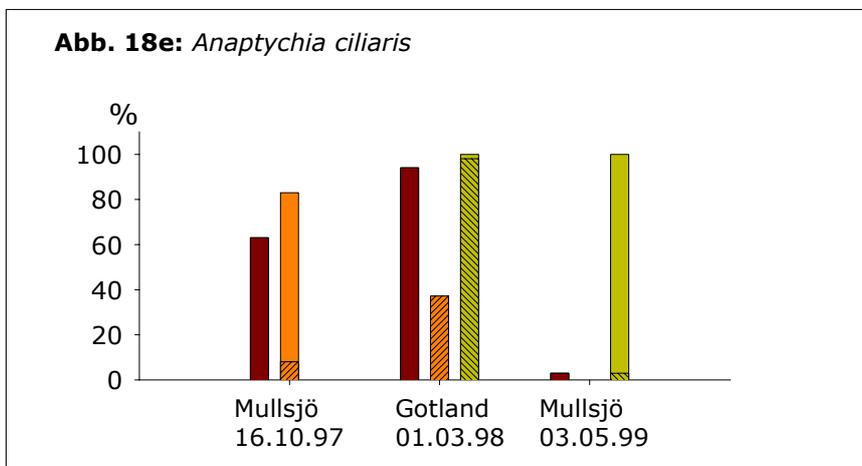
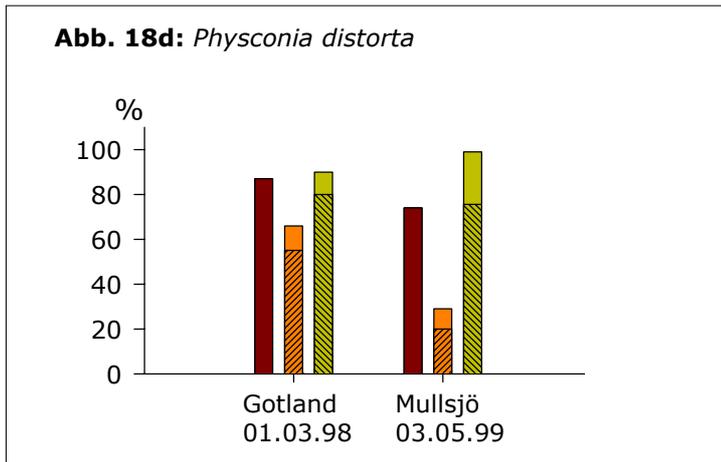
Es konnte keine Abhängigkeit der Mycelbildungsrate von einer dem Grundmedium zugesetzten Substanz beobachtet werden, d.h. die Keimung wurde bei diesen Arten nicht durch ein bestimmtes Kohlenhydrat, Phytohormon oder Vitamin in den angewendeten Konzentrationen gehemmt oder gefördert. Ausgehend von der Einteilung der Kulturmedien



Abb. 17: 20 µm 
Zweizellige Spore von *A. ciliaris* mit heraus-
quellendem Zellinhalt.

in nährstoffarm (mit BG110 als Grundsubstanz) und nährstoffreich (mit MY als Hauptbestandteil) zeigt sich jedoch häufig eine unterschiedliche Mycelbildungsrate.





3.2 Wachstumsmuster und Morphogenese axenisch wachsender Mycobionten

3.2.1 Reaktionsmuster isolierter Mycobionten unter axenischen Bedingungen

Nach HENSSEN & JAHNS (1974) sind Mycobionten in ihrer Organisation als filamentös wachsende Pilze einzuordnen. Ihre fädigen Vegetationsorgane, die Hyphen, bilden in ihrer Gesamtheit im unlichenisierten Zustand ein Mycel. Wie in der Einleitung ausgeführt wurde, wird die Morphologie der Mycelien nicht-lichenisierender Pilze u.a. von Mechanismen geprägt, die die Polarität und Richtung des Hyphenwachstums und die Verzweigungsfrequenz bestimmen. Beeinflusst wird dieses Wachstum u.a. von der Nährstoffkonzentration und -verteilung und der Substratbeschaffenheit. Ob die Grundprinzipien des Hyphenwachstums und der Koloniebildung von filamentösen Pilzen auch für die isolierten Mycobionten gelten, wurde in Kulturexperimenten getestet.

Einige der folgenden beschriebenen Beobachtungen gelten nur für die ersten Kulturmonate. Nach einer längeren Kulturdauer ohne Erneuerung des Kulturmediums kann es zu einer Änderung des Verhaltens kommen. Die Ursache mag in einer Anreicherung von sekundären Stoffwechselprodukten im Kulturmedium und/oder im Verbrauch der Mineral- und Nährstoffe liegen.

3.2.1.1 Chemotropismus

Die untersuchten Mycobionten aus den Flechten *Xanthoria parietina*, *Physcia tenella*, *Physconia distorta* und *Anaptychia ciliaris* zeigten keine chemotropistischen Reaktionen auf die zugeführten Kohlenhydrate Ribitol und Glukose und das Phytohormon NAA. Weder die Keimhyphen noch die vegetativen Pilzhypen, die dem Einfluß eines Konzentrationsgradienten dieser Substanzen ausgesetzt waren, änderten ihre Wachstumsrichtung.

Auch Photobionten (arteigene und Fremdalgen), die in die Nähe von wachsenden Mycelien überimpft wurden, zeigten keinen Einfluß auf das Hyphenwachstum im Sinne einer Umorientierung. Reaktionen der Mycobionten auf die Algen konnten erst bei einem direkten Kontakt beobachtet werden. Details werden im Kapitel 3.3 beschrieben.

3.2.1.2 Verzweigungshäufigkeit der Hyphenfilamente

Auch wenn filamentös wachsende Pilze keine chemotropistische Reaktion auf organische Nährstoffe zeigen, wird ihr Wachstumsverhalten dennoch beeinflusst, denn die Häufigkeit der Verzweigungsbildung steht in direkter Korrelation zur Konzentration organischer Nährstoffe (u.a. DEACON 1997; TRINCI 1984). Ob dieses Verhalten nicht-lichenisierender Pilze auch für Flechtenpilze gilt, wurde an den Mycobionten von zwei Flechten exemplarisch getestet: Um die Verzweigungshäufigkeit in Abhängigkeit von der Nährstoffkonzentration bei isolierten Mycobionten zu untersuchen, wurden Ascosporen von *P. tenella* und *X. parietina* auf dem Mineralmedium BG110 mit dem Zusatz von Ribitol bzw. Glukose in abgestuften Konzentrationen kultiviert (s. Anh. 2.d und 3.c). Die Mycobionten beider Flechtenarten reagierten auf ansteigende Konzentrationen der Kohlenhydrate mit einer erhöhten Verzweigungs-frequenz der Hyphen. Die folgenden Abbildungen (19 - 21) zeigen 3 Wochen alte monospore Mycelien von *P. tenella* auf dem Medium BG110 mit dem Zusatz von Glukose. Bei einer 0.05%-igen Glukosezugabe entwickeln sich aus den Keimschläuchen septierte Hyphen, die sich

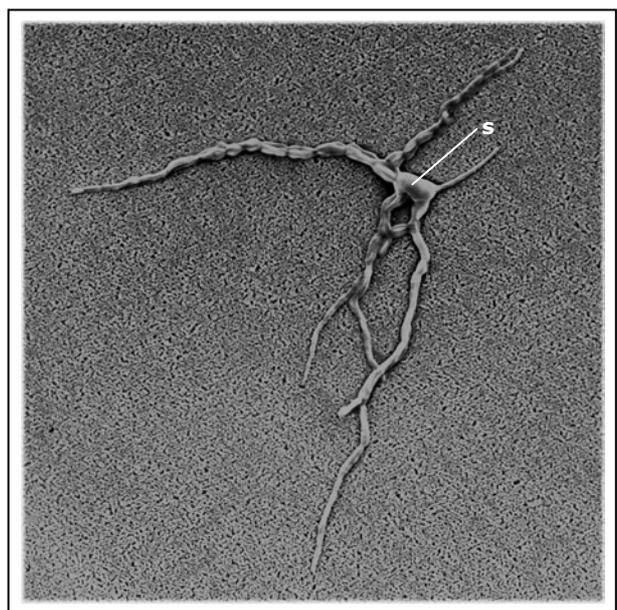


Abb. 19: Monospores Mycel des Mycobionten von *P. tenella* auf einem 0.05 %-igem Glukosemedium; s: Spore; (REM-Aufnahme).

nur wenig verzweigen (Abb. 19). Bei einer um den Faktor 4 erhöhten Glucosekonzentration (0.2%) verzweigen sich die Keimhyphen direkt nach dem Austritt aus der Sporenwand. Auch die vegetativen Hyphen bilden mehr Seitenzweige aus, so daß aus einer Spore schon nach sehr kurzer Zeit ein Mycel mit einer wesentlich größeren Anzahl wachsender Hyphenspitzen entsteht (Abb. 20). Mit ansteigender Glukosekonzentration werden immer mehr Hyphen 2. und höherer Ordnung gebildet (Abb. 21). Die vorhandenen Nährstoffe können dadurch effi-zienter genutzt werden, denn direkt hinter den Hyphenspitzen liegt die Absorbtiionszone, in der die Nährstoffe aufgenommen werden.

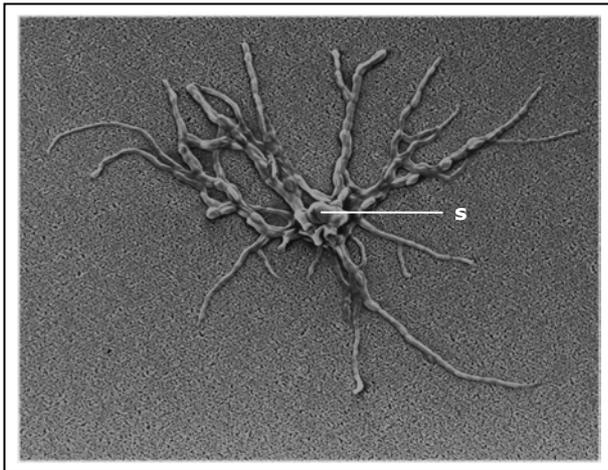


Abb. 20: Monospores Mycel des Mycobionten von *P. tenella* auf einem 0.2 %-igen Glukosemedium; s: Spore; (REM-Aufnahme). 50 µm

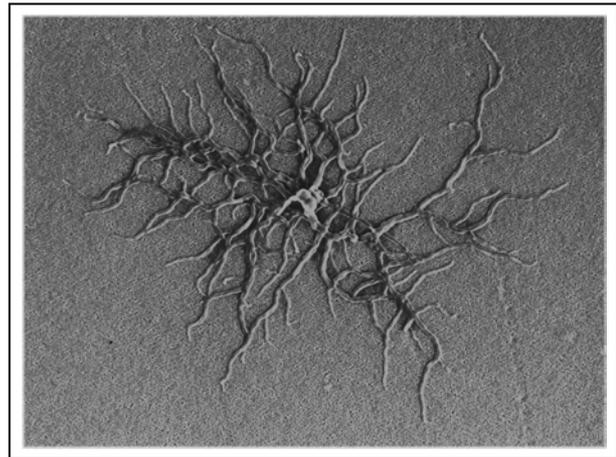


Abb. 21: Monospores Mycel des Mycobionten von *P. tenella* auf einem 0.8 %-igen Glukosemedium; (REM-Aufnahme). 75 µm

Das Polyol Ribitol hat einen ähnlichen Einfluß auf die Verzweigungsfrequenz der Hyphen wie der Einfachzucker Glukose. Die Abbildungen 22 und 23 zeigen den Vergleich junger Mycelien von *P. tenella* auf reinem BG110 bzw. auf dem gleichen Medium mit Zusatz von 0.6 % Ribitol. Auch hier reagiert der Mycobiont schon auf geringe Konzentrationen des Zuckeralkohols Ribitol mit verstärkter Bildung von Seitenzweigen.

Der Mycobiont von *X. parietina* reagiert auf die gleiche Art wie der von *P. tenella* auf eine Erhöhung der Nährstoffkonzentration.

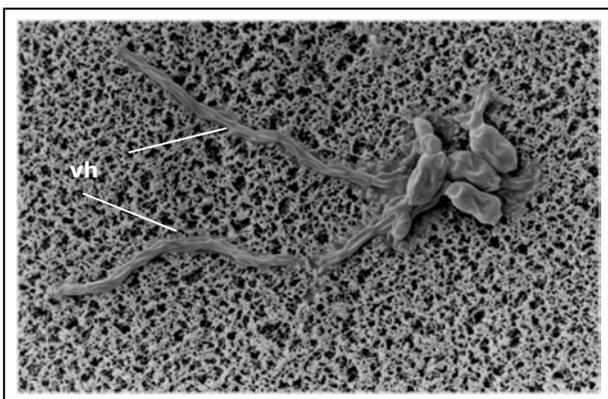


Abb. 22: Auskeimende Sporen des Mycobionten von *P. tenella* auf einem kohlenhydratfreien Medium mit unverzweigten vegetativen Hyphen (vh); (REM-Aufnahme). 30 µm

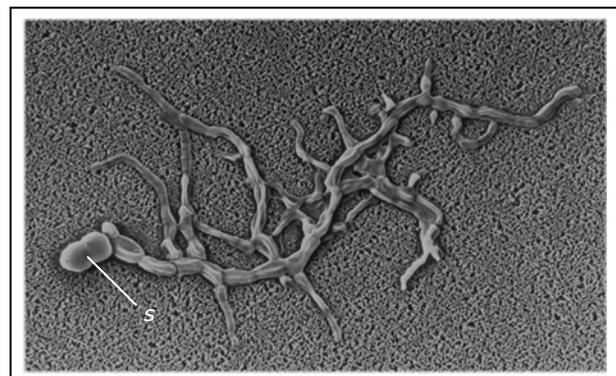


Abb. 23: Auskeimende Spore (s) des Mycobionten von *P. tenella* auf einem 0.6 %-igen Ribitolmedium mit verzweigten vegetativen Hyphen; (REM-Aufnahme). 30 µm

3.2.1.3 Entwicklung der Mycelien

Auf einem homogenen Substrat und bei geeigneter Nährstoff- und Wasserversorgung wachsen die isolierten Flechtenpilze nach der Keimung kontinuierlich weiter, wobei sie das Bestreben haben, radiäre Mycelien zu bilden (Abb. 24). Um den Umriß eines solchen „idealen“ Mycels mit einer kreisförmigen Mycelfront zu erreichen, benötigen monospore Isolate (Abb. 25) mehr Verzweigungsschritte als polyspore Isolate. Bei polysporen Isolaten entsteht eine gemeinsame radiäre Wuchsform – möglicherweise bedingt durch eine wechselseitige Beeinflussung der Sporenkeimlinge.

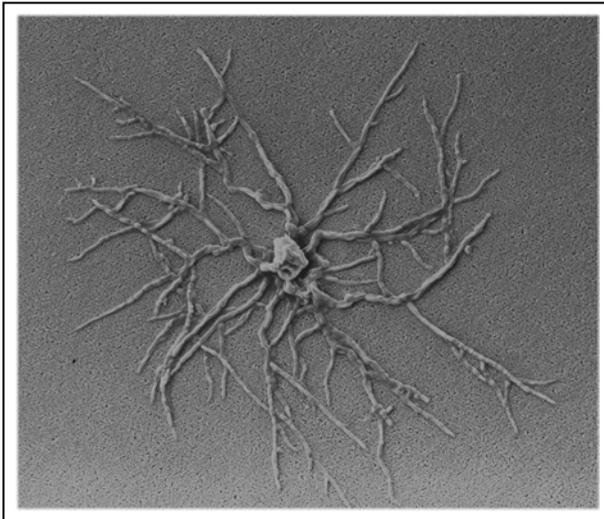


Abb. 24: Radiäres Mycel des Mycobioten von *P. tenella*, das sich aus 4 Sporen entwickelt hat; (REM-Aufnahme). 60 µm

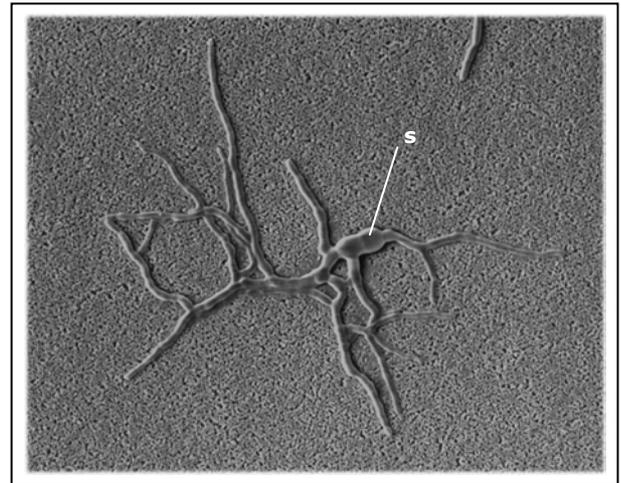


Abb. 25: Monospores Mycel des Mycobioten von *P. tenella*, das noch keine Idealform angenommen hat; s: Spore; (REM-Aufnahme). 50 µm

Die Morphologie der Mycelien wird u.a. von der Nährstoffzufuhr sowie der physikalischen Beschaffenheit und der Zusammensetzung des Substrates bestimmt. Zusätzlich können artabhängige Unterschiede beobachtet werden. Hierbei muß berücksichtigt werden, daß nach einer längeren Kulturdauer ohne Erneuerung des Mediums Änderungen im Verhalten der Mycelien auftreten können (s. Kap. 3.2.1). Diese Änderungen sind möglicherweise auf den Verbrauch der einflußgebenden Substanzen und/oder auf eine Anreicherung von Sekundärmetaboliten zurückzuführen. Dieses Kapitel behandelt zunächst die Entwicklung der Mycelien in Abhängigkeit von der Nährstoffkonzentration. Die folgenden Beobachtungen gelten für alle untersuchten Mycobionten; Besonderheiten der verschiedenen Arten werden in einem getrennten Kapitel behandelt.

I. Nährstoffarme Medien

Nährstoffarme Medien führen zur Entwicklung netzartiger, radiärer Mycelien mit wenigen Verzweigungen. Abbildung 26 zeigt den Mycobionten von *Xanthoria parietina*, der auf einem Mineralmedium kultiviert wurde. Das Animpfen des Isolates erfolgte durch ein Abklatschverfahren mit Hilfe eines Membranfilters, auf dem der Mycobiont (über dem nährstoffreichen

MY-Agar) vorkultiviert worden war. Dadurch diffundierten geringe Mengen von Nährstoffen von der Filtermembran in den Mineral-Agar. Die Hyphen haben sich kontinuierlich innerhalb und oberhalb des Agar ausgedehnt und strahlenförmig vom Bereich des Inokulums (I) entfernt. Innerhalb von 30 Monaten hat das Mycel einen Durchmesser von ca. 5,3 cm erreicht. Gemessen vom Ursprung der Hyphen (Inokulum) bis zum Mycelrand beträgt die jährliche radiale Zuwachsrates ca. 6.6 mm. Seitenzweige werden meist hinter einem Septum angelegt und können auch von älteren Hyphen weit hinter der Mycelfront gebildet werden (Abb 27). Innerhalb des netzartigen Mycels unterbrechen cytoplasmafreie Zellen den Protoplasten der Filamente. Die Hyphendicke ist für jüngere und ältere Mycelbereiche einheitlich.

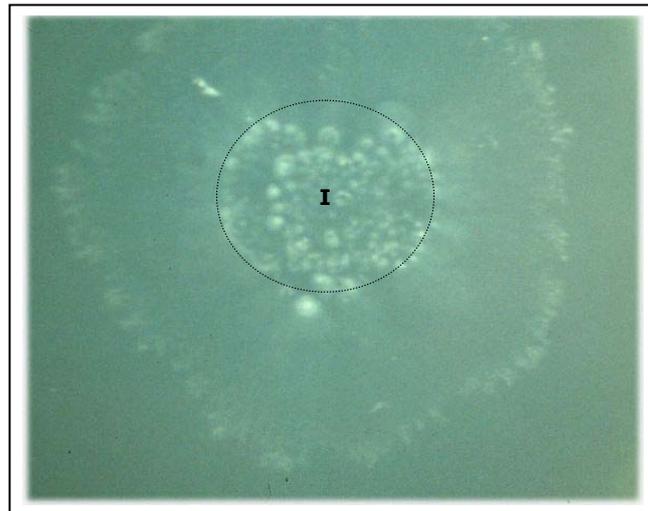


Abb. 26: 1 cm 
Mycel des Mycobionten von *X. parietina*, das sich mit wenig verzweigten Hyphen radiär in einem nährstoffarmen Medium ausgebreitet hat; I: Bereich des Inokulates.



Abb. 27: 10 µm 
Verzweigtes Hyphenfilament mit cytoplasmafreier Zelle.

Die untersuchten isolierten Mycobionten, die auf dem reinen Mineralmedium BG110, d.h. ohne den Zusatz von Kohlenhydraten und auch ohne Stickstoffquelle kultiviert werden, entwickeln dennoch aus Clustern von wenigen Sporen ausgedehnte Mycelien. Abbildung 28 zeigt ein im Durchmesser 4 mm großes Mycel des Mycobionten von *Physconia distorta*, das aus 8 Sporen hervorgegangen ist. Das bedeutet, daß Sporen einer Länge von ca. 10 µm Hyphenfilamente der ca. 200-fachen Länge hervorgebracht haben. Das Wachstum ist jedoch zeitlich begrenzt und hört nach ca. 6 Monaten auf.

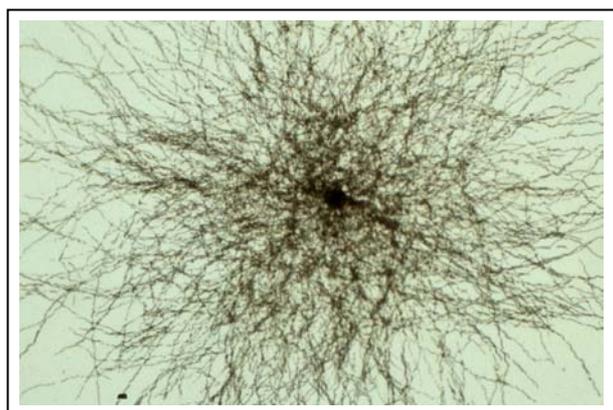


Abb. 28: 700 µm 
Polyspores Mycel des Mycobionten von *P. distorta* auf einem reinen Mineralmedium ohne Stickstoffquelle.

Unter diesen nährstoffarmen Bedingungen (BG110) kann bei allen Isolaten die Bildung von braunen bis schwarzen Pigmenten beobachtet werden, die z.T. in das Medium diffundieren. Besonders der Mycobiont von *Anaptychia ciliaris* weist häufig schon direkt nach der Keimung dunkel inkrustierte Hyphen auf (Abb. 29).



Abb. 29: Mycobiont von *A. ciliaris* mit dunkel inkrustierten Hyphen auf einem reinen Mineralmedium. 100 µm

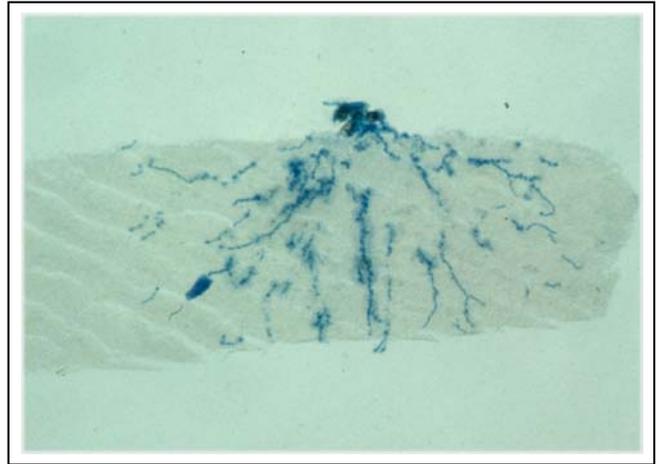


Abb. 30: Mycobiont von *P. distorta*, der mit wenig verzweigten Hyphen in einen Membranfilter eingedrungen ist. 100 µm

Diese Substanzen werden auch bei Zugabe von organischen Nährstoffen gebildet. Häufig sind solche Ablagerungen ein Zeichen für einen Mangel (DEACON 1993). Da das Kulturmedium BG110 keine Stickstoffquelle enthält, ist hier ebenfalls die Ursache zu sehen.

Werden die Flechtenpilze auf Membranfiltern herangezogen, können sie bei geeigneter Porengröße und in Abhängigkeit vom Nährmedium ebenfalls in diesen eindringen. Abbildung 30 zeigt ein 6 Wochen altes Pilzmycel von *Physconia distorta*, kultiviert auf dem reinen Mineralmedium (BG110). Der Mycobiont hat ein feines, wenig verzweigtes Hyphennetz auf und innerhalb des Filters gebildet. Die Fähigkeit der Mycobionten zur Penetration des Substrates wird in Kapitel 3.2.1.8 detailliert beschrieben.

II. Nährstoffreiche Medien

Je höher die Nährstoffkonzentration im Medium ist, desto häufiger werden Verzweigungen gebildet, so daß sich die Keimlinge auf einem hochkonzentrierten Medium wie Malz-Hefe-Extrakt Agar zu sehr kompakten Mycelien entwickeln (Abb.31). Diese Beobachtung kann an den Isolaten aller Flechtenarten gemacht werden. Eine solche Wuchsform wird als charakteristisch für isolierte Flechtenpilze in axenischer Kultur angesehen.

In den dichten Strukturen läßt sich der Verzweigungsmodus nicht mehr erkennen

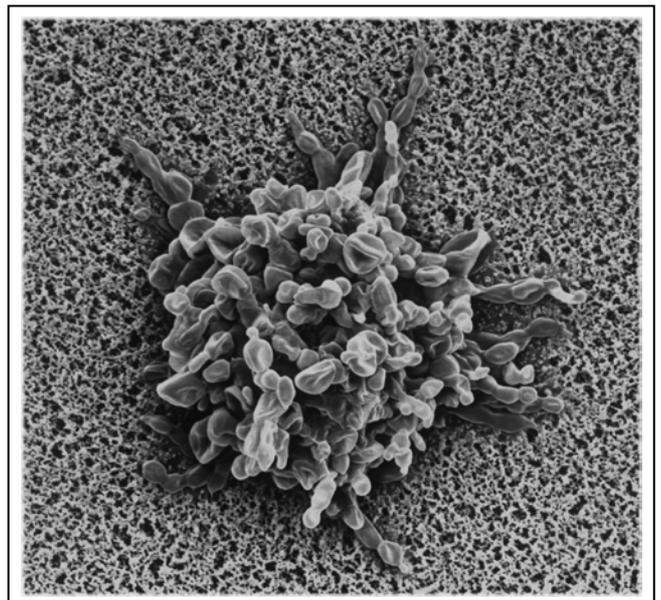


Abb. 31: Kompaktes Mycel des Mycobionten von *P. tenella* auf einem Membranfilter über nährstoffreichem Medium (MY); (REM-Aufnahme). 25 µm

(Abb. 32). Ein Semidünnschnitt zeigt Zelltypen verschiedener Durchmesser und Entwicklungsgrade (Speicherzellen und seneszente Zellen), die dicht beieinander liegen (Abb. 33).

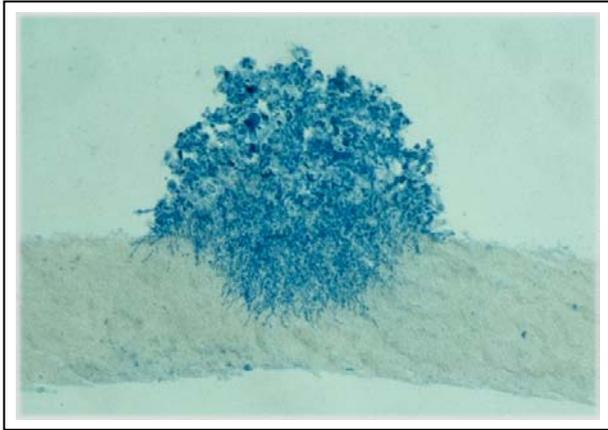


Abb. 32: 130 µm 
 Querschnitt eines kompakten Mycels des Mycobionten von *P. tenella* auf einem Membranfilter über nährstoffreichem Medium (MY).

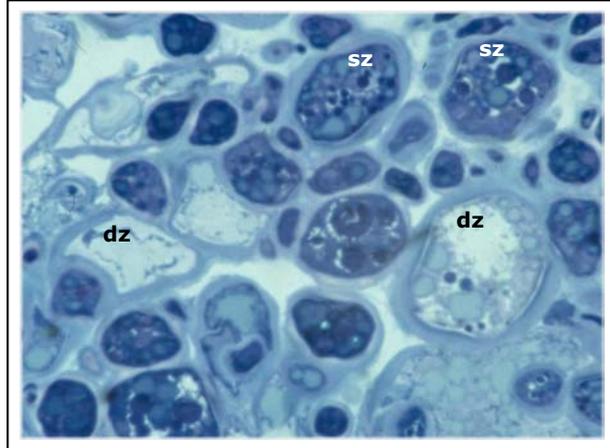


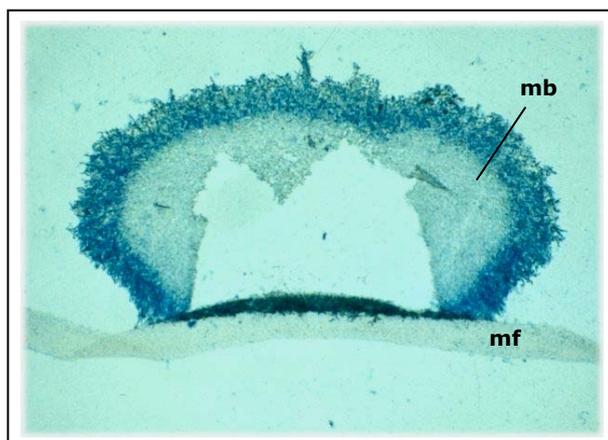
Abb. 33: 130 µm 
 Semidünnschnitt eines kompakten Mycels des Mycobionten von *P. tenella*; dz: degenerierte Zelle, sz: Speicherzelle.

Die sphärischen Mycelien (Abb. 34) können bei einigen Mycobionten einen Durchmesser von über 1 cm erreichen, wobei durch Degeneration und/oder Autolyse der älteren Hyphen im Inneren ein Hohlraum entsteht (Abb. 35). Selbst Kulturmedien, die aus dem Mineralagar BG110 mit dem Zusatz von Kohlenhydraten (+ 1.5% Glukose / Ribitol) bestehen und in dieser Arbeit als „nährstoffarm“ bezeichnet werden, stellen noch genügend Kohlenhydrate zur Verfügung, so daß kompakte Mycelien entstehen. Die Mycelien entwickeln sich jedoch nicht mit der gleichen Kontinuität wie auf einem „Vollmedium“ (MY + Zusatz), sondern stellen nach 6 – 8 Monaten ihr radiales Wachstum ein.



Abb. 34: 1 cm 
 Habitusaufnahme des Mycobionten von *P. distorta*, der sphärische Kolonien auf einem nährstoffreichen Medium gebildet hat. (An der Basis der Mycelien sind Hyphenfilamente flächig ausgewachsen; s. Kap. 3.2.1.6).

Abb. 35: 350 µm 
 Querschnitt eines sphärischen Mycels des Mycobionten von *X. parietina*; im Inneren ist durch Degeneration und/oder Autolyse ein Hohlraum entstanden; mb: Mycobiont, mf: Membranfilter.



Insgesamt wird deutlich, daß dem Wachstum aller untersuchten Mycobionten das gleiche Reaktionsmuster in Bezug auf die Nährstoffkonzentration zugrunde liegt.

3.2.1.4 Zell-Zell-Kontakte

I. Bildung Interner Hyphen (intrahyphal hyphae)

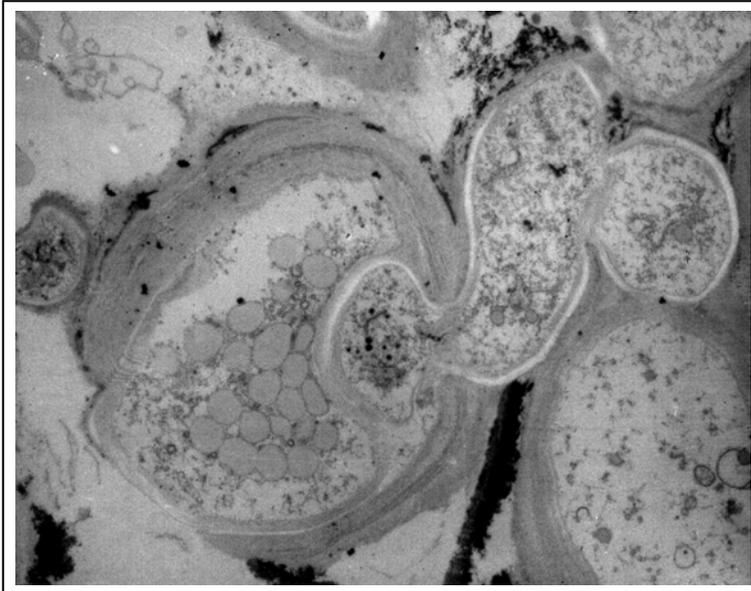


Abb. 36: Ultradünnschnitt eines kompakten Mycels des Mycobionten von *Anaptychia ciliaris*; eine wachsende Hyphenspitze ist in eine benachbarte Zelle eingedrungen; (TEM-Aufnahme). 1,5 µm

Eine hohe Verzweigungsfrequenz führt dazu, daß sich in kompakten Mycelien Hyphenzellen verschiedener Entwicklungs- bzw. Alterungsstadien dicht beieinander befinden und wachsende Apices auch auf degenerierte Zellen treffen. Die dichte Struktur der dreidimensionalen Mycelien wird dadurch verstärkt, daß die Mycobionten die eigenen, degenerierten Hyphen penetrieren (Abb. 36) und je nach Schnittebene zeigt sich ein Bild von ineinandergeschachtelten Hyphen (Abb. 37).

Diese sogenannten Internen Hyphen (intrahyphal hyphae) wurden auch schon von Peveling (1973) und Ahmadjian (1980) beschrieben. Es existierten jedoch bis heute keine detaillierten Untersuchungen über die Mechanismen ihrer Entstehung.

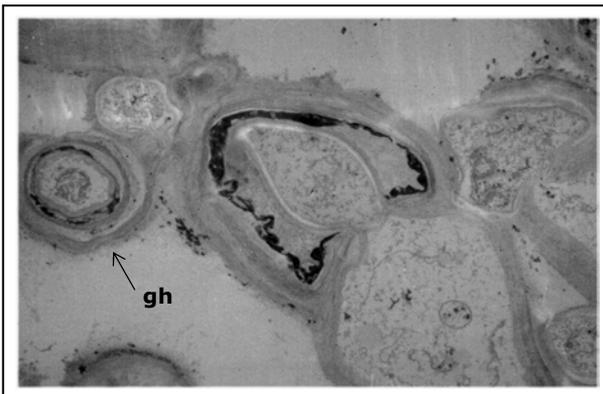


Abb. 37: Ultradünnschnitt eines kompakten Mycels des Mycobionten von *Anaptychia ciliaris* mit Internen Hyphen in verschiedenen Schnittebenen; gh: geschachtelte Hyphen; (TEM-Aufnahme). 1,5 µm

An den unter axenischen Bedingungen kultivierten Mycobionten der Flechten *X. parietina*, *P. tenella*, *P. distorta* und *A. ciliaris* wurden genauere ultrastrukturelle Untersuchungen durchgeführt. Es wurde deutlich, daß die Hyphenspitzen nach der Penetration nicht dem Lumen der alten Hyphen folgen, ein Verhalten, daß z.B. bei dem Mycoparasiten von *Fusarium culorum*, dem Oomycet *Pythium oligantum*, beobachtet wird (DEACON 1997). Vielmehr wachsen die Hyphenfilamente mit ihren Apices in andere Hyphen

hinein und wieder heraus. Abbildung (38) zeigt eine befallene Zelle mit z.T. zerstörter Zellwand, in deren Lumen sich mehrere kleinere Hyphen befinden. Die wachsende Spitze einer Internen Hyphe hat die Zellwand der „Wirts“- Hyphe von innen durchdrungen und begonnen, in eine Nachbarhyphe einzudringen. Die Penetration scheint durch eine sehr

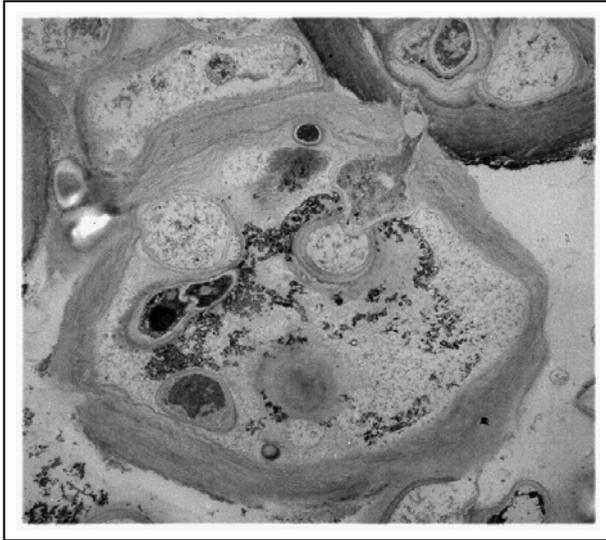


Abb. 38: 1 µm 
Ultradünnschnitt eines kompakten Mycels des Mycobionten von *Anaptychia ciliaris* mit mehreren Internen Hyphen in einer degenerierten Zelle; eine Hyphenspitze penetriert eine Nachbarzelle; (TEM-Aufnahme).

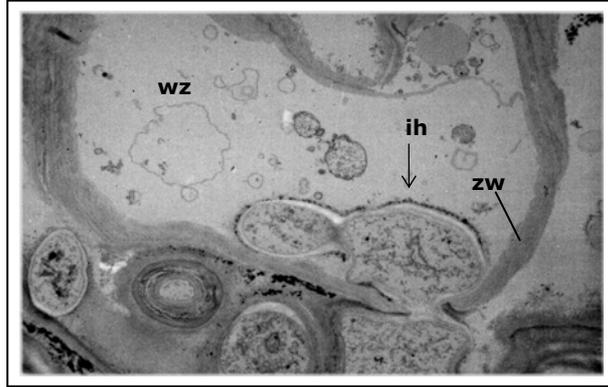


Abb. 40: 1,5 µm 
Die Interne Hyphe (ih) hat nach dem Eindringen in die Wirtszelle (wz) wieder einen größeren Durchmesser angenommen; zw: Zellwand der Wirtszelle; (TEM-Aufnahme).

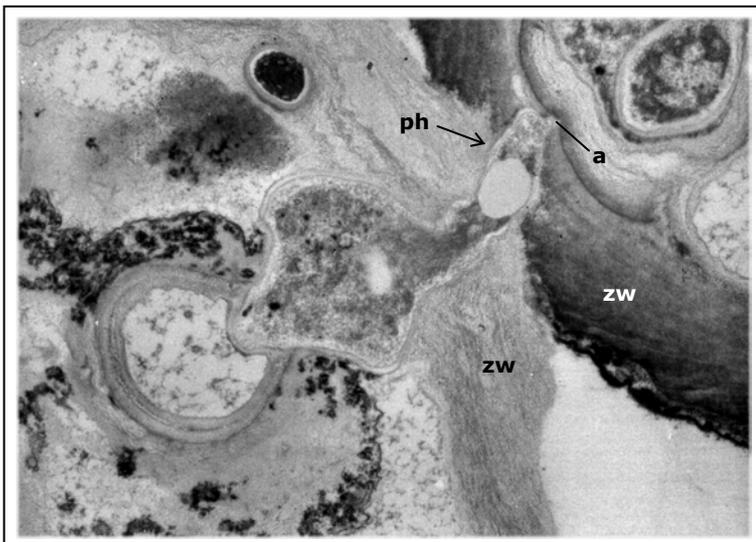


Abb. 39: 1.5 µm 
Detail von Abb. 38; Penetrationshyphe (ph) hat zwei Zellwände (zw) durchdrungen und beginnt, mit einer feinen Ausstülpung (a) in eine weitere Zelle einzudringen; (TEM-Aufnahme).

feine Ausstülpung der wachsenden Spitze vorbereitet zu werden (Abb. 39). Später schiebt sich eine im Durchmesser reduzierte

Hyphe (ca. 0.8 µm) durch die Zellwand der penetrierten Zelle. Nach Durchtritt vergrößert sich der Durchmesser der Internen Hyphe wieder (Abb. 40).

Die eindringenden Hyphen werden nicht vom Zellumen der penetrierten Zelle durch deren Plasmamembran abgegrenzt - ein deutliches Zeichen dafür, daß die penetrierte Zelle schon vor dem Eindringen abgestorben war. Auch Abwehrreaktionen der penetrierten Zelle, z.B. eine Wulstbildung an der Penetrationsstelle, können nicht beobachtet werden.

II. Anastomosenbildung

Bei filamentös wachsenden, septierten Hyphen können zwischen benachbarten lebenden Zellen Anastomosen gebildet werden. Diese sekundären Hyphenbrücken entstehen durch Lysis bzw. Umbau der Zellwände an den Kontaktstellen und führen zur Bildung eines neuen Septums zwischen den benachbarten Protoplasten (DEACON 1997, JENNINGS & LYSEK 1999). Hierdurch wird ein Stofftransport innerhalb eines Hyphengeflechtes oder Myceliums ermöglicht, und sogar Zellorganellen können über die Hyphenbrücken migrieren (WEBSTER 1980).

Abbildung 41 zeigt Hyphen des Mycobionten von *Physconia distorta*, die auf einem Membranfilter mit geringer Nährstoffzufuhr wachsen und zwischen parallel wachsenden Hyphen laterale Verbindungen gebildet haben. Solche sekundären Querverbindungen können bei allen netzförmig wachsenden Isolaten beobachtet werden (s. Abb. 14). Innerhalb kompakt wachsender Mycelien, die sich auf nährstoffreichen Medien bilden, kann eine Anastomosierung kaum beobachtet werden, weil die Zellen zu dicht gedrängt sind. In den Randbereichen mit geringerer Zelldichte ist sie gut sichtbar.

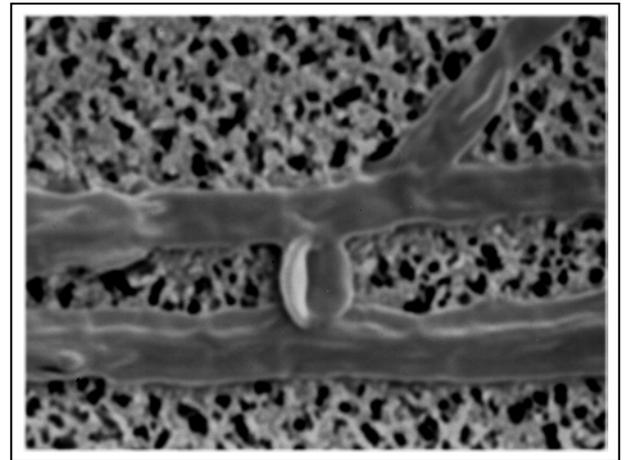


Abb. 41: Parallel wachsende Hyphenfilamente des Mycobionten von *P. distorta*, die eine sekundäre Hyphenbrücke (Anastomose) ausgebildet haben; (REM-Aufnahme). 10 µm

3.2.1.5 Radiale Zuwachsraten der Mycelien

Angaben in der Literatur über das Wachstum der Flechten, besonders der plagiotroph wachsenden Arten, und isolierter Mycobionten erfolgen häufig über die radiale Zuwachsraten (ARMSTRONG 1988; MOLINA & CRESPO 2000; HENSSEN & JAHNS 1974). In diesem Zusammenhang wird der Begriff „Wachstumsrate“ vielfach gleichbedeutend verwendet, obwohl er als die Bildung von Biomasse pro Zeiteinheit definiert ist (DEACON 1997).

In meinen Experimenten habe ich das Wachstumspotential der isolierten Flechtenpilze ebenfalls über die radialen Zuwachsraten der Mycelien erfaßt. Um eine einheitliche Größe des Inokulats sicherzustellen, wurden in jedem Versuchsansatz nach der Sporulation exemplarisch einige Sporencuster von 6 bis 8 Ascosporen, die meist in den Randzonen der Sporulationsbereiche lagen, markiert. Der Durchmesser der aus den markierten Sporencustern entstandenen Mycelien wurde in 4-wöchigem Abstand nach Beginn der Keimung gemessen. Dadurch wurde die individuell verschiedene Lag-Phase der Sporen (DEACON 1997), d.h. die Zeit zwischen der Sporulation und dem Auskeimen, berücksichtigt. Der maximal gemessene radiale Zuwachs für die einzelnen Arten in diesem Zeitraum betrug pro Monat:

Mycobiont	Zuwachs/Mo
<i>Xanthoria parietina</i>	330 µm
<i>Physconia distorta</i>	320 µm
<i>Anaptychia ciliaris</i>	230 µm
<i>Physcia tenella</i>	320 µm
<i>Baeomyces rufus</i>	480 µm

Tab. 8: Radialer Zuwachs

Hierbei gilt für jede einzelne Art, daß die maximale Zuwachsraten (mit einer Ausnahme) unabhängig von der Zusammensetzung des Nährmediums erreicht wurde. Nur auf Kulturmedien mit dem Zusatz von Kinetin blieben alle untersuchten Mycelien in ihrer radialen Ausdehnung stark zurück (s. Kap. 3.7.2). Auf allen

anderen Kulturmedien variieren die Zuwachsraten unterhalb der Maximalwerte. Die heterogene Natur der beobachteten Mycelien (Herkunft des Materials von verschiedenen Standorten, Verwendung von Apothecien unterschiedlicher Thalli) mag hierfür ursächlich sein.

Nach einer über den Zeitraum von ca. 2 Monaten hinausgehenden Kulturdauer verringern sich die radialen Zuwachsraten zunächst. Nach einer Transplantation auf ein neues Kulturmedium sind die Mycelien jedoch wieder in der Lage, sich mit maximaler Geschwindigkeit auszudehnen.

Vergleicht man die radiale Zuwachsrate von Mycelien einer Flechtenart, die sich aus Clustern einer definierten Sporenzahl auf Kulturmedien verschiedener Nährstoffkonzentration entwickeln, so stellt man fest, daß sich die Isolate mit einer vergleichbaren Geschwindigkeit über das Substrat ausbreiten. Die Abbildungen 29 und 30 zeigen Mycelien, die sich jeweils aus 8 Sporen desselben Apotheciums von *Physcia tenella* auf dem reinen Mineralmedium BG110 bzw. auf dem mit Kohlenhydraten angereicherten BG110 + 1.5% Glukose entwickelt haben. Nach 6 Wochen haben die Kolonien auf beiden Medien den gleichen Durchmesser von ca. 400 µm erreicht. Das Mycel auf dem nährstoffreicheren Agar ist stärker verzweigt und entwickelt sich zu einer kompakteren Struktur, ohne daß die Mycelfront schneller fortschreitet als die auf dem reinen Mineral-Agar.

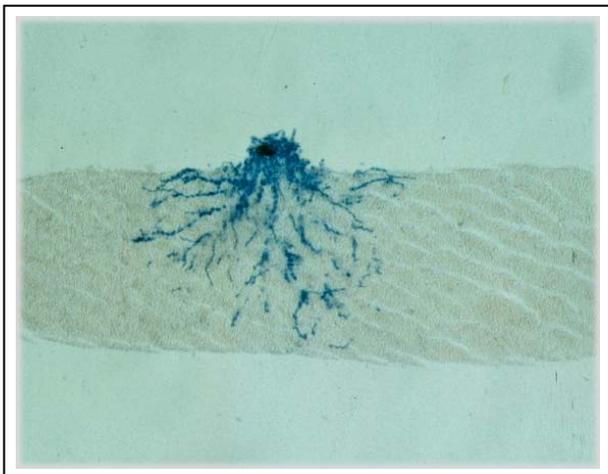


Abb. 42: Querschnitt eines netzartigen Mycels des Mycobionten von *P. tenella* auf einem reinen Mineralmedium (BG110) mit einem Durchmesser von ca. 330 µm.

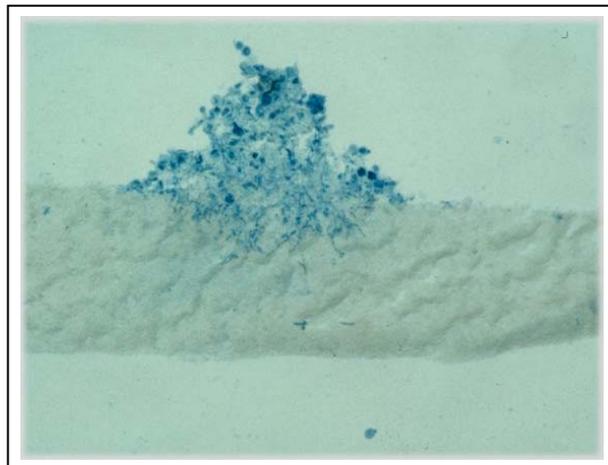


Abb. 43: Querschnitt eines kompakten Mycels des Mycobionten von *P. tenella* auf einem mit Kohlenhydraten angereicherten Mineralmedium (BG110 + 1.5 % Glu) mit einem Durchmesser von ca. 330 µm.

Nach einer Kulturdauer von ca. 4 bzw. 8 Monaten ohne Erneuerung des Nährmediums tritt bei den Mycobionten verschiedener Flechtenarten ein „Phasenwechsel“ ein (s. Kap. 3.2.1.6). Hyphen, die Kontakt zum

Mycobiont	Zuwachssteigerung
<i>Xanthoria parietina</i>	330 µm ⇒ 550 µm/Mo
<i>Physconia distorta</i>	320 µm ⇒ 900 µm/Mo
<i>Anaptychia ciliaris</i>	230 µm ⇒ 600 µm/Mo

Tab. 9: Zuwachssteigerung

Substrat haben, beginnen spontan mit wenigen Verzweigungen auszuwachsen. In diesem Fall konnte für die Isolate von *X. parietina*, *P. distorta* und *A. ciliaris* eine erhöhte maximale Ausbreitungsgeschwindigkeit gemessen werden (Tab. 9). Für die Isolate von *P. tenella* und *B. rufus* wurden keine Daten über veränderte Ausbreitungsgeschwindigkeit erhoben. Sie zeigen aber ebenfalls einen entsprechenden Phasenwechsel.

Auch wenn für den Mycobionten von *Peltigera didactyla* auf Grund der Problematik bei der Isolierung die radiale Zuwachsrate nicht auf die gleiche Art erhoben werden konnte wie für die Mycobionten der oben beschriebenen Arten, sollen doch einige Beobachtungen angesprochen werden: Ein monospores Mycel des Mycobionten von *P. didactyla* hatte auf dem reinen Mineralmedium MBV innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 4 Monaten mit nur wenigen Hyphen eine Länge von 2 mm erreicht. Setzt man für diesen Zeitraum eine lineare Entwicklung voraus, so entspräche dieser Wert einem monatlichen radiären Zuwachs von ca. 250 μm . Es muß jedoch eingeräumt werden, daß es sich hierbei um eine Einzelbeobachtung handelt. Wachstumsbeobachtungen an reicher verzweigten Mycelien, die auf Nährmedien transplantiert worden waren, ergaben lediglich radiale Zuwachsraten von 75 $\mu\text{m}/\text{Monat}$. Somit muß das Wachstum dieses Isolates im Vergleich mit den anderen Mycobionten als extrem langsam eingestuft werden.

3.2.1.6 Phasenwechsel: Umschalten des Verzweigungsmodus in Abhängigkeit von der Nährstoffkonzentration

Nach einer längeren Kulturdauer auf nährstoffhaltigen Medien ändern die Mycobionten, wie schon im vorigen Kapitel erwähnt, ihr Wachstumsmuster, wenn ihnen keine neuen Nährstoffe zugeführt werden. Abbildung 34 zeigt den einjährigen Mycobionten von *Physconia distorta* auf MY-Agar. Die dreidimensionalen, kompakten Mycelien aus reich verzweigten Hyphen haben basal radiär wachsende Hyphen entwickelt - ein Zeichen für eine Veränderung des Verzweigungsmodus. Innerhalb des flächigen, anastomisierenden Mycels (s. Abb. 41) kann in einigen Fällen eine Zonierung beobachtet werden, die durch alternierende Intensität der Verzweigung bzw. der Bildung von Querverbindungen hervorgerufen wird (Abb. 44). Konzentrische Ringe aus parallel wachsenden Hyphen mit wenigen Querverbindungen (Abb. 45) alternieren in einem Zeitintervall von 2-3 Wochen mit Bereichen, die häufiger laterale Verknüpfungen ausgebildet haben (Abb. 46).



Abb. 44: 400 μm 
Zonierung in einem flächig wachsenden Mycel des Mycobionten von *P. distorta*; Detail von Abb. 34.

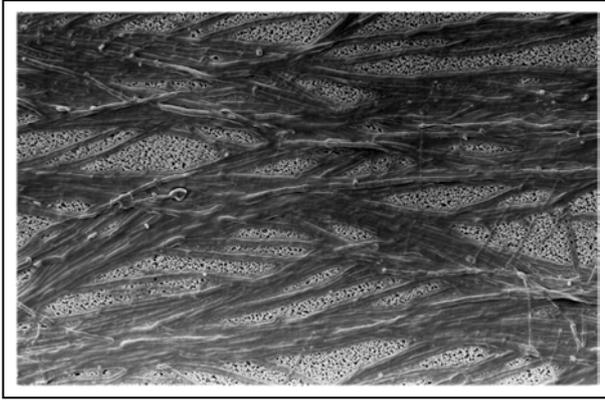


Abb. 45: 100 µm 
Detail der Zonierung von Abb. 34 u. 44; Hyphenfilamente mit wenigen Querverbindungen; (REM-Aufnahme).

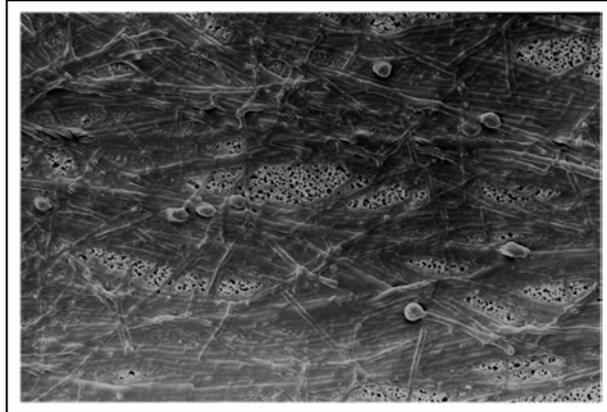


Abb. 46: 65 µm 
Detail der Zonierung von Abb. 34 u. 44; Hyphenfilamente sind durch zahlreiche Querverbindungen miteinander verbunden; (REM-Aufnahme).

Das Ausbilden eines flächigen Mycels kann bei allen untersuchten Mycobionten (mit Ausnahme von *Peltigera didactyla*) nach einer längeren Kulturdauer, in der das Substrat nicht erneuert wurde, beobachtet werden. Bei geeigneter Porengröße (s. Kap. 3.2.1.8) dringen die Hyphen des flächigen Mycels auch in die Membranfilter ein und durchwachsen sie parallel zur Oberfläche. Der zeitliche Rahmen der Wachstumsänderung ist sowohl vom Substrat, als auch von der Art des Mycobionten abhängig. Generell kann gesagt werden, daß bei einer hohen Nährstoffkonzentration zu Versuchsbeginn das Umschalten des Verzweigungsmodus später erfolgt als bei geringer Nährstoffkonzentration zu Beginn der Kulturexperimente.

Werden den netzartig wachsenden Mycobionten erneut Nährstoffe zugeführt, so reagieren sie mit intensiver Seitenzweigbildung, und es entstehen wiederum kompakte Mycelien. Abbildung 47 zeigt ein 2-jähriges Mycel von *Physconia distorta*, das sich auf BG110 + 1.5% Ribitol entwickelt hat. Im Zentrum des Isolates hat sich ein kleines kugelförmiges Konglomerat aus kompakt angeordneten Hyphen gebildet, von dessen Basis sich strahlig auswachsende Hyphen über das Substrat schieben. Die Transplantation auf MY-Agar führt zur Entwicklung von weiteren dreidimensionalen Strukturen (Abb. 48 a, b). An dieser Entwicklung sind sowohl die Apices der Mycelfront als auch Hyphen im hinteren Bereich des flächigen Mycels beteiligt.

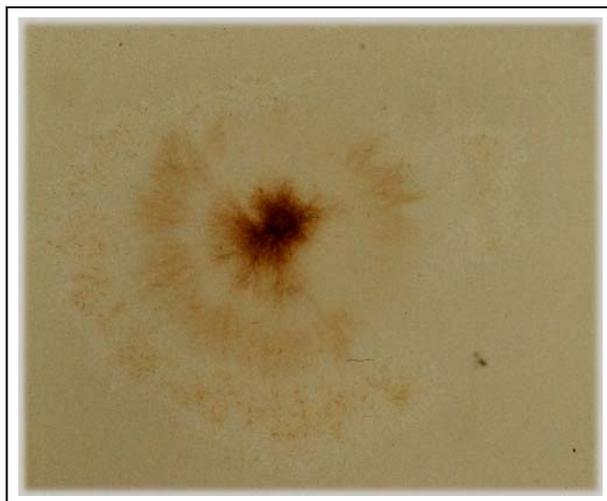


Abb. 47: 500 µm 
Mycel des Mycobionten von *P. distorta*, das sich flächig auf einem Membranfilter über einem nährstoffarmen Medium ausgebreitet hat; (Habitus-Aufnahme).

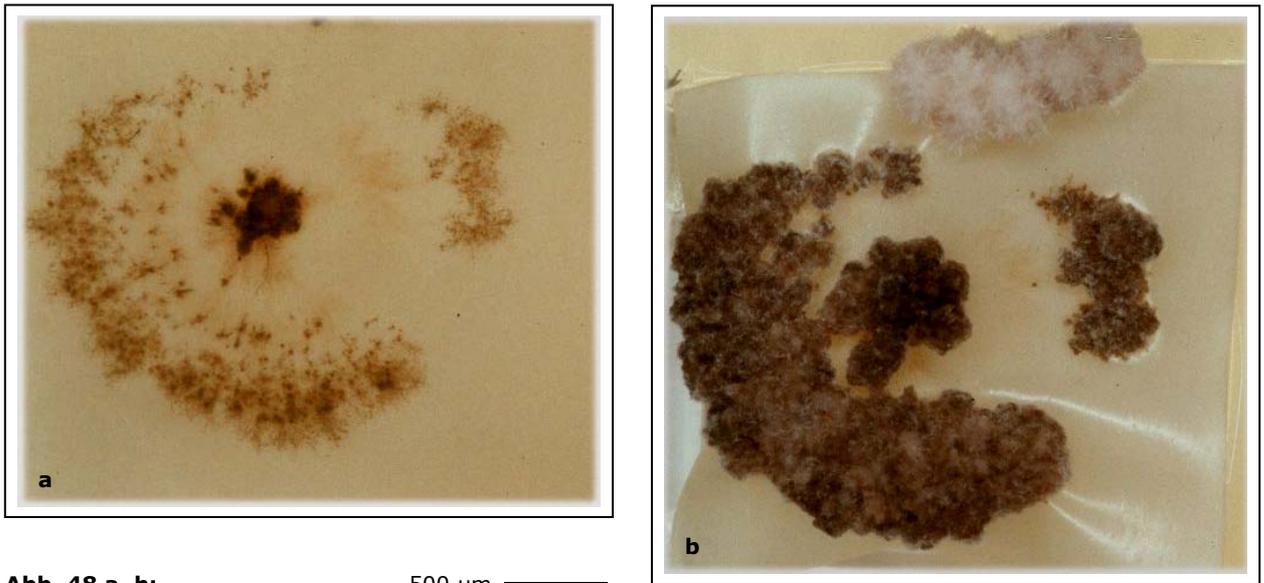


Abb. 48 a, b: 500 µm 
 Flächiges Mycel von *P. distorta* (s. Abb. 47), das nach der Transplantation auf ein nährstoffreiches Medium beginnt, intensiv Verzweigungen auszubilden, so daß kompakte, erhabene Strukturen entstehen; a: nach 1 Monat, b: nach 3 Monaten; (Habitus-Aufnahmen).

Auch Hyphenfilamente, die sich innerhalb des Substrates (Agar bzw. Membranfilter) netzartig ausgebreitet hatten, bildeten bei Nährstoffzufuhr reich verzweigte, kompakte Mycelien. Abbildung 49 zeigt den Mycobionten von *A. ciliaris*, der sich über einem nährstoffarmen Medium auf einem Membranfilter und innerhalb desselben ausgebreitet hatte. Nach der Transplantation auf ein nährstoffreiches Kulturmedium bilden die Hyphenfilamente kompakte Mycelien, die die Filteroberfläche durchbrechen.

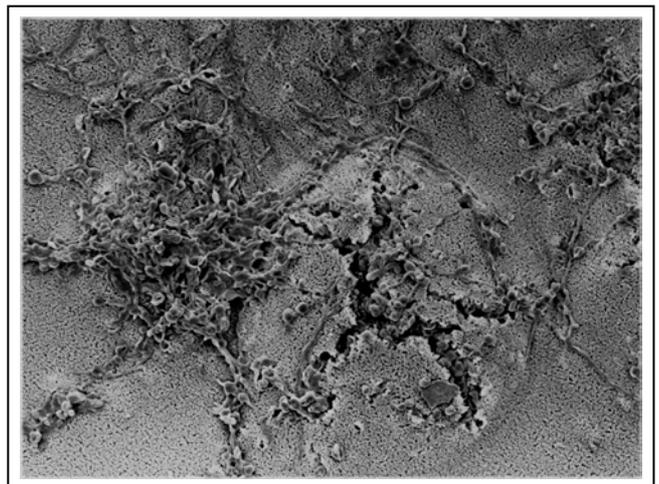


Abb. 49: 120 µm 
 Mycobiont von *A. ciliaris*, der sich auf und innerhalb eines Membranfilters ausgebreitet hat und bei Kohlenhydratzufuhr die Filteroberfläche durchbricht; (REM-Aufnahme).

3.2.1.7 Vitalität der Mycelien

Die isolierten Mycobionten haben sich in den Versuchen als sehr langlebig gezeigt, und bei ausreichender Feuchtigkeits- und Nährstoffversorgung entwickeln sich die Mycelien kontinuierlich weiter. Durch Verbrauch der Nährstoffe und/oder Austrocknung kann der Wachstumsprozess gestoppt werden. Die Hyphen verlieren dadurch jedoch nicht zwingend ihre Vitalität, und das Wachstum kann durch Befeuchtung oder Überimpfung auf ein frisches Medium erneut aktiviert werden: Der Mycobiont von *P. distorta* (s. Abb. 48 a, b) war vor der Überführung auf ein neues Substrat (s. Kap. 3.2.1.6) einer Trockenperiode von 2 Monaten unterzogen worden, in der das Wachstum eingestellt wurde.

Kompakte Mycelbereiche, die nach langer Kulturdauer (2-3 Jahre ohne Erneuerung des Kulturmediums) makroskopisch keine Wachstumsaktivität mehr zeigen, können durch Transplantation auf frische Medien oder durch Befeuchtung zu einem sichtbaren Wachstum angeregt werden.

Genauere Untersuchungen machen deutlich, daß die scheinbar abgestorbenen Bereiche alter Mycelien von Hyphen mit dünnen Zellwänden und engen Lumina durchzogen werden, die unter geeigneten

Bedingungen den Ursprung für neue Mycelien darstellen. Abbildung 50 zeigt einen Querschnitt durch die Wand eines hohlkugelförmigen Mycels, dessen Hauptmasse aus Hyphen ohne anfärbbares Cytoplasma besteht - ein Zeichen für Degeneration. Ausgehend von den oben beschriebenen Internen Hyphen entwickeln sich in einigen Bereichen bei erneuter Nährstoffzufuhr neue, aktive Konglomerate.

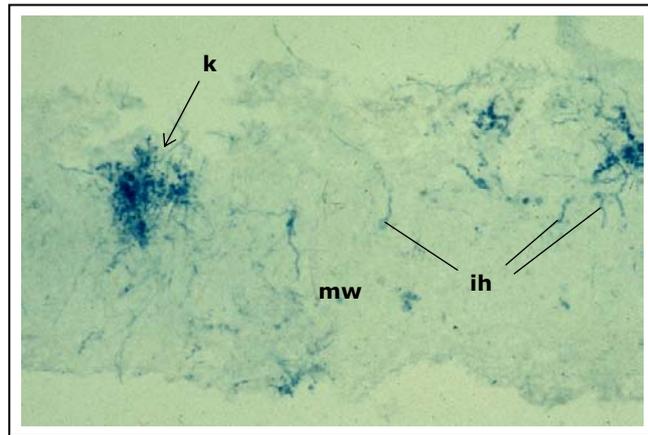


Abb. 50: Querschnitt durch die Wand (mw) eines sphärischen Mycels; ausgehend von Internen Hyphen (ih), die das alte Gewebe durchziehen, werden neue Konglomerate (k) gebildet. 150 µm

3.2.1.8 Beeinflussung des Wachstums durch die physikalische Beschaffenheit der Substrate

Die hier vorgestellten Kulturversuche wurden entweder direkt auf Agar oder auf Membranfiltern über einem Agar-Medium durchgeführt. Die Filtermembran wird unabhängig von der Porengröße und dem Material direkt durchfeuchtet, sobald sie auf eine Agaroberfläche gelegt wird, und die Mycobionten werden dadurch mit kapillarem Wasser versorgt. Im Gegensatz zu Submerskulturen werden die Mycobionten, die auf den festen Medien Agar bzw. auf Membranfiltern heranwachsen, nicht von einer homogenen Flüssigkeit umspült, sondern haben Kontakt zu einem Luftraum. Unter diesen Bedingungen bilden die Isolate oberhalb des Substrates ein „Luftmycel“ und dringen mehr oder weniger tief in das Substrat ein. Hierbei ist das Medium Agar offensichtlich kein Hindernis, und die Hyphen schieben sich kontinuierlich in das Substrat vor.

Die in diesen Versuchen verwendeten Membranfilter stellen jedoch für die Mycobionten eine semipermeable bis permeable Barriere dar, wobei die Fähigkeit und das Bestreben zur Penetration von der Porengröße und dem Filtermaterial abhängig ist. Das Wachstum wird zusätzlich von der Zusammensetzung des Agars unterhalb des Filters beeinflusst, und auch artabhängige Unterschiede können beobachtet werden.

Die folgende Tabelle zeigt die Penetrationsfähigkeit der Hyphen einzelner Mycobionten in Bezug auf die verschiedenen Filtersorten:

Mycobiont	Cellulose		Durapore	
	0.45	0.22	0.65	0.45
<i>X. arietina</i>	+	+	+	+
<i>P. tenella</i>	+	+	-	o
<i>P. distorta</i>	+	+	+	+
<i>A. ciliaris</i>	+	o	+	+

- + erfolgte Penetration
- nur oberflächliches Eindringen
- o nicht getestet

Tab. 10: Penetration der Mycobionten

Die Mycobionten von *X. parietina*, *A. ciliaris* und *P. distorta* sind bei einer Porengröße von 0.45 µm und mit einem geeigneten Nährmedium in der Lage, sowohl den Durapore- als auch den Cellulose-Membranfilter zu durchdringen, wobei sich der Hyphendurchmesser zunächst der Porengröße anpaßt (Abb. 51). Das Eindringen in einen Cellulose Membranfilter ist jedoch im Vergleich zu einem Eindringen in einen Durapore Membranfilter erleichtert, denn Filter aus Cellulose werden bei gleichem Kulturmedium (MY) von den Mycelien innerhalb einer kürzeren Kulturdauer durchwachsen (Abb. 52 a, b).

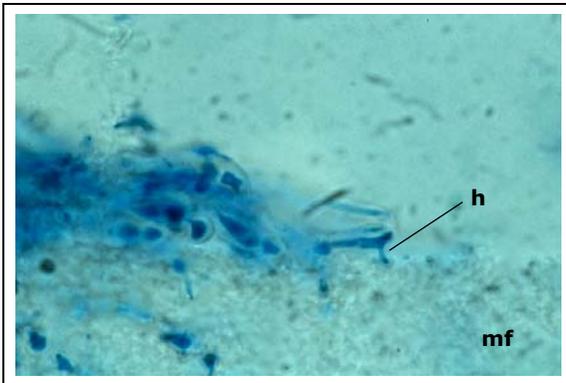


Abb. 51: 10 µm  Querschnitt eines Mycels, das mit feinen Hyphen (h) in einen Membranfilter (mf) eindringt.

auch den Cellulose-Membranfilter zu durchdringen, wobei sich der Hyphendurchmesser zunächst der Porengröße anpaßt (Abb. 51). Das Eindringen in einen Cellulose Membranfilter ist jedoch im Vergleich zu einem Eindringen in einen Durapore Membranfilter erleichtert, denn Filter aus Cellulose werden bei gleichem Kulturmedium (MY) von den Mycelien innerhalb einer kürzeren Kulturdauer durchwachsen (Abb. 52 a, b).

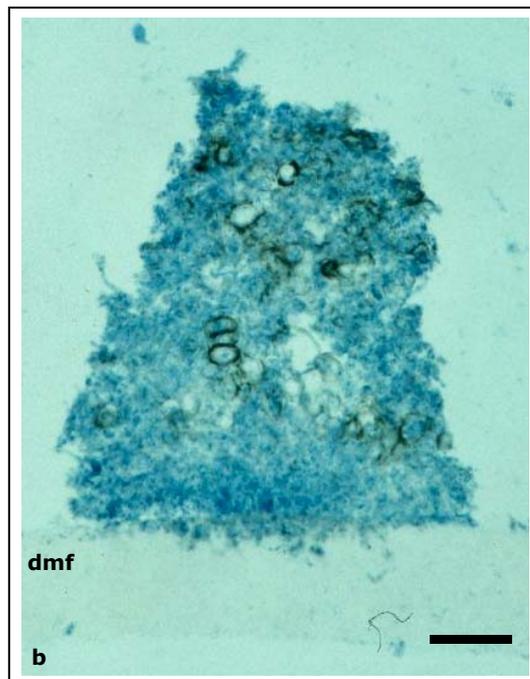
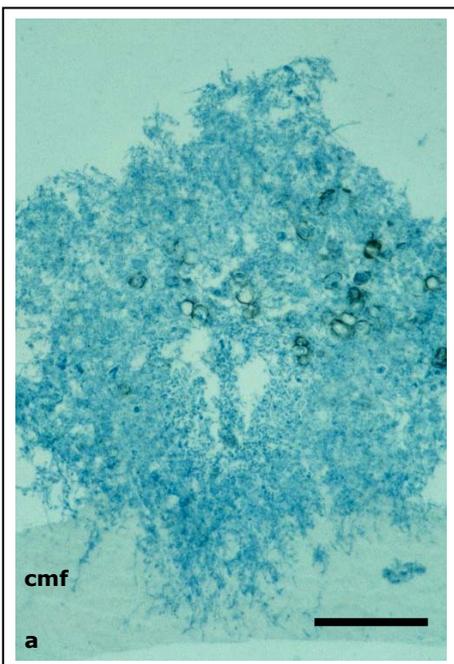


Abb. 52 a, b: Maßstab = 150 µm Querschnitt durch 8 Wochen alte Mycelien des Mycobionten von *P. distorta*, die bei gleichem Nährmedium (MY) auf Cellulose- (a: cmf) bzw. Durapore-Membranfilter (b: dmf) kultiviert wurden; der Cellulosemembranfilter wurde in der Kulturzeit vollständig penetriert.

Das Eindringen der Pilzhyphen in die Cellulosemembran führt bei diesen zu einem „Aufquellen“ der Membran. Die Abbildung (53) zeigt den Mycobionten von *X. parietina*, der die Filtermembran (Porengröße: $0.45\mu\text{m}$) vollständig durchwachsen hat. Im Bereich der Penetration hat sich die Membran ungefähr auf die doppelte Dicke ausgedehnt. Sie verliert danach ihre dichte Struktur und löst sich mit der weiteren Entwicklung des Mycobionten schließlich auf (Abb. 54).

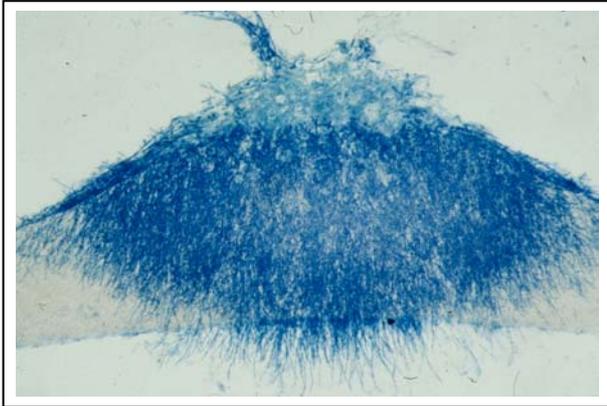


Abb. 53: 170 μm 
Querschnitt des Mycobionten (7 Wo.) von *X. parietina*, der einen Cellulose-Membranfilter ($0.45\mu\text{m}$) durchwachsen hat; Kulturmedium: MY + NAA; im Bereich der Penetration ist der Filter von einer Dicke von ca. $180\mu\text{m}$ auf ca. $330\mu\text{m}$ aufgequollen.

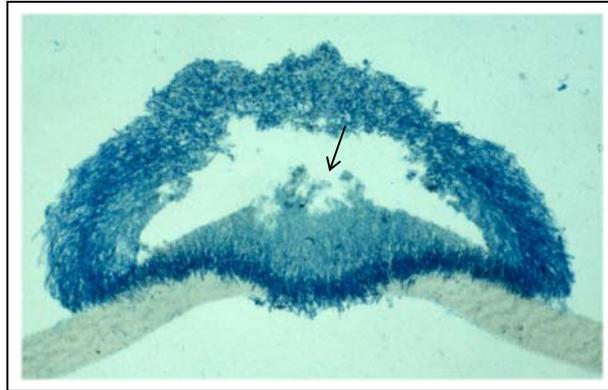


Abb. 54: 430 μm 
Querschnitt des Mycobionten (4 Mo.) von *X. parietina*, der einen Cellulose-Membranfilter durchwachsen hat; der Filter löst sich im Bereich der Penetration auf.

Bei einer Porengröße von $0.22\mu\text{m}$ erfolgt die Penetration der Filter bei gleichem Nährmedium wesentlich langsamer. Aber auch hier beginnen die Mycobionten vom Zentrum des Mycels aus, in den Filter einzudringen (Abb. 55). Die Pilzhyphen benötigen jedoch ca. 6 Monate, um diese Filtermembran vollständig zu durchdringen.

Auf nährstoffärmeren Medien kann bei einigen Kulturansätzen eine oberflächliche Verdrängung der Cellulose-Membran durch den Mycobionten von *X. parietina* beobachtet werden (Abb. 56). In diesem Fall wird die Membran nicht von einzelnen Hyphen durchwachsen, sondern mit der gesamten Mycelfront verdrängt, so daß um das Mycel ein Wulst aus Filtermaterial entsteht.

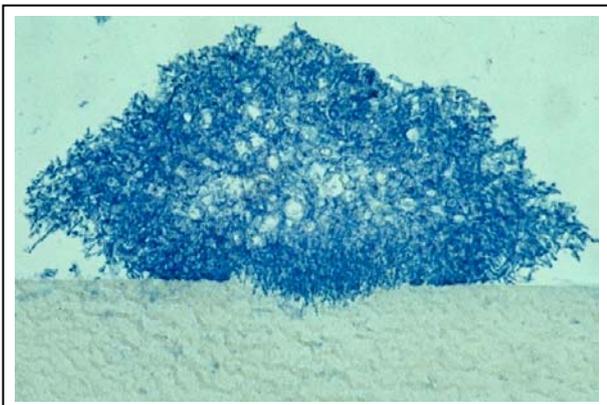


Abb. 55: 170 μm 
Querschnitt des Mycobionten (9 Wo.) von *X. parietina* auf einem Cellulose-Membranfilter mit einer Porengröße von $0.22\mu\text{m}$; die Penetration ist erschwert; Kulturmedium: MY + NAA.

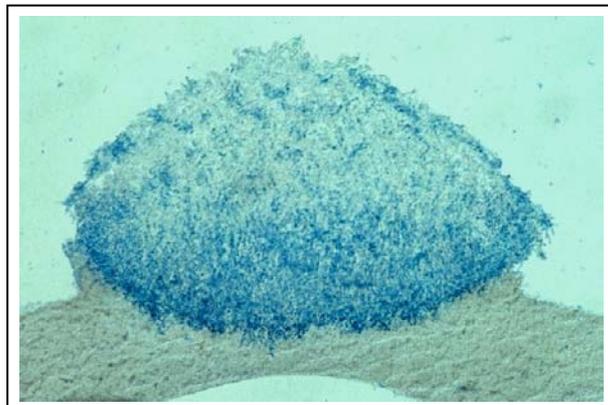


Abb. 56: 170 μm 
Querschnitt des Mycobionten (9 Wo.) von *X. parietina* auf einem Cellulose-Membranfilter ($0.45\mu\text{m}$) über einem nährstoffarmen Medium (BG110 + Rib); das Mycel verdrängt die Filtermembran.

Bei der Penetration eines Durapore-Membranfilters bleibt dessen Struktur erhalten. Es kann nie eine Auflösung oder Verdrängung beobachtet werden. Die Mycobionten können diese Filter nur mit dünnwandigen, englumigen Hyphen durchdringen, so daß eine Auflösung oder Verdrängung des Filters nicht beobachtet werden kann.

Wie sich die Mycobionten der verschiedenen Flechtenarten in ihren Fähigkeiten, in das Substrat einzudringen, unterscheiden und wie die Zusammensetzung des Agars diese Reaktion beeinflußt, wird später besprochen (s. Kap. 3.2.4).

3.2.2 Besonderheiten der polysporen Mycelien

3.2.2.1 Ausbildung von Hyphenbrücken und Verschmelzung von Mycelien

Wie schon beschrieben wurde, sind die untersuchten Mycelien in der Regel polysporer Natur, d.h. sie sind nicht aus einzelnen Sporen, sondern aus Clustern mehrerer Sporen hervorgegangen. Entwickeln sich Mycelien (entstanden jeweils aus dem Sporencluster eines Ascus) nahe beieinander, so bilden sich zwischen ihnen Hyphenbrücken aus, und die Mycelien verschmelzen miteinander (Abb. 57).

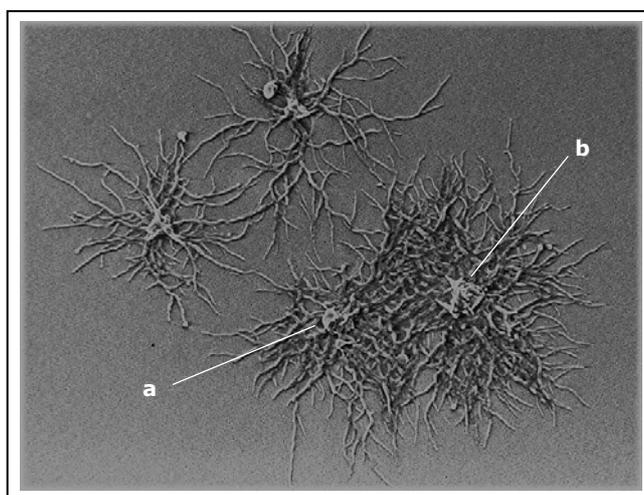


Abb. 57: 125 µm 
Mycelien des Mycobionten von *P. tenella*, die jeweils aus den Sporen eines Ascus entstanden sind; zwei Mycelien (a, b) sind miteinander verschmolzen (REM-Aufnahme).

Diese Beobachtung kann jedoch nicht nur zu Beginn der Mycelentwicklung gemacht werden, sondern auch an Mycelien in fortgeschrittenen Wachstumsstadien. Abbildung 58 zeigt den Mycobionten von *Baeomyces rufus*. Die Hyphen verschiedener Mycelien geraten in Kontakt zueinander, und im weiteren Verlauf der Entwicklung wachsen die Cluster zusammen. Größere Mycelien bestehen deshalb häufig aus einem Hyphen-gemisch, hervorgegangen aus Sporen verschiedener Asci eines Apotheciums. Die Fusionsmycelien bilden eine einheitlich fortschreitende Mycelfront.

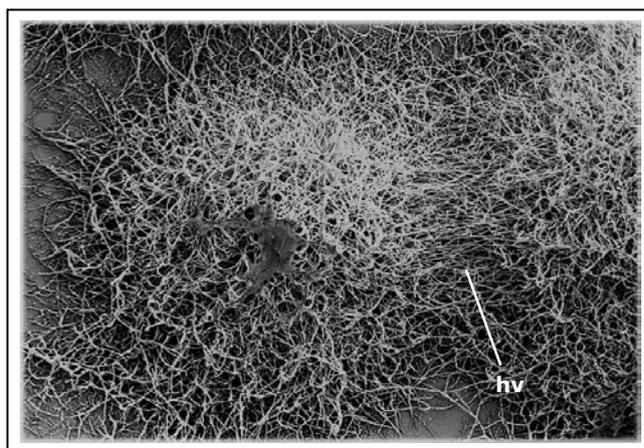


Abb. 58: 350 µm 
Mycel des Mycobionten von *B. rufus*; zum Nachbarmycel sind Hyphenverbindungen (hv) gebildet worden; bei weiterem Wachstum verschmelzen die Mycelien und bilden eine gemeinsame Mycelfront; (REM-Aufnahme).

Abbildung 59 macht deutlich, daß die Ausbildung der Kontakthyphen nicht nur auf den radialen Zuwachs der Mycelien zurückzuführen ist. Vielmehr kann auch ein gerichtetes Wachstum beinhaltet sein, so daß zwischen einzelnen Mycelclustern Hyphenbrücken entstehen. An der Vernetzung sind häufig auch Lufthyphen beteiligt, die Brücken zwischen den einzelnen Mycelien bilden, indem die Hyphen bei Kontakt miteinander verkleben. Bei der Präparation des Mycobionten von *Physconia distorta* hat sich gezeigt, daß sich die Lufthyphen nicht mit Wasser benetzen lassen. Sie besitzen offensichtlich hydrophobe Eigenschaften.

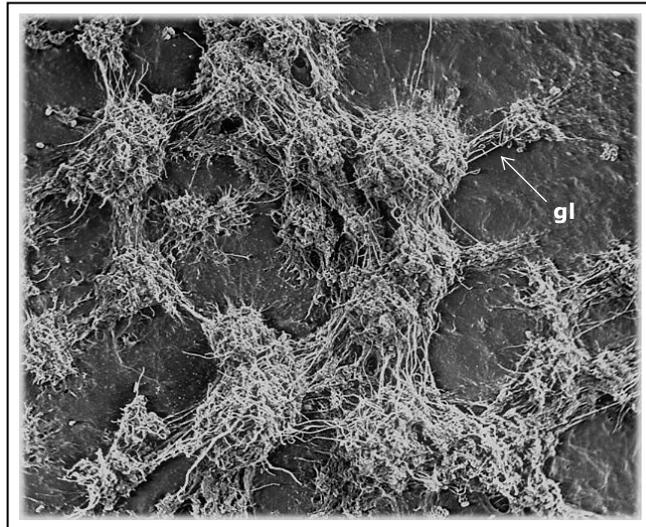


Abb. 59: 360 µm 
Mycelien des Mycobionten von *P. distorta*; die Mycelien sind über Hyphenbrücken miteinander verbunden, die von gerichtet wachsenden Lufthyphen (gl) gebildet werden; (REM-Aufnahme).

Mycelien, die sich aus Sporenclustern verschiedener Apothecien entwickelt haben, können sich ebenfalls miteinander vereinigen (Abb. 60). Die aus den Sporenclustern zweier Apothecien von *B. rufus* gebildeten Mycelien (a, b) weisen ein dichtes Netz von Hyphenverbindungen auf. Mit fortschreitender Entwicklung läßt sich keine Trennlinie mehr erkennen.



Abb. 60: 180 µm 
Mycelien (a, b) des Mycobionten von *B. rufus*, die aus den Sporenclustern zweier Apothecien hervorgegangen sind und miteinander fusionieren; (Habitus-Aufnahme).

Die untersuchten Mycobionten zeigen deutliche Unterschiede in der Tendenz, miteinander zu verschmelzen: *B. rufus* bildet in der Regel aus allen Clustern einen Mycel-„Teppich“ (s. Abb. 60), die Mycobionten von *Physcia tenella* und *Xanthoria parietina* (Abb. 61) entwickeln häufig kleinere, in sich geschlossenere Einheiten (s. Kap. 3.2.3).

3.2.2.2 Heterogenität der Mycelcluster

Die Mycelien der verschiedenen Isolate werden häufig durch nicht identifizierte Pigmente angefärbt. Stammen die Mycelien von den Sporen eines Apotheciums, ist die Farbe in der Regel einheitlich. Die Mycelien von Sporen unterschiedlicher Apothecien können jedoch variieren, wodurch ihre Heterogenität sichtbar wird. Die Farbunterschiede entstehen unabhängig von den verwendeten Kulturmedien.

Bei einigen Mycobionten kann beobachtet werden, daß auch in Mycelien, die sich aus Sporen eines Apotheciums gebildet haben, Bereiche unterschiedlicher Färbung auftreten. Abbildung 61 zeigt den Streubereich eines Apotheciums von *Xanthoria parietina*.

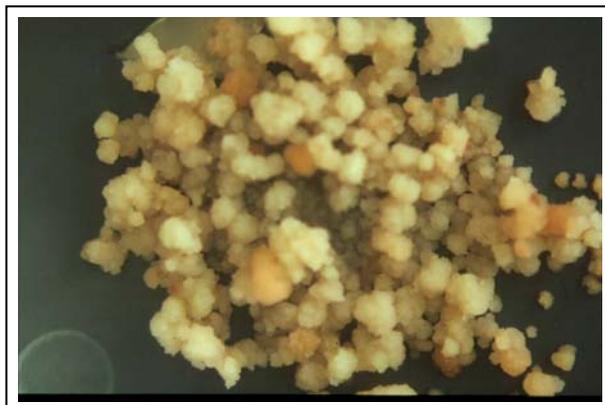


Abb. 61: 200 µm 
Mycobiont von *X. parietina*; die Mycelcluster sind aus dem Sporulationsbereich eines Apotheciums hervorgegangen und zeigen unterschiedliche Färbung; (Habitus-Aufnahme).

Die Gelbfärbung einzelner Cluster wird durch das Antrachinon Parietin hervorgerufen (s. Kap. 3.3.6.1). Auch der Mycobiont der Flechte *Physcia tenella* zeigt in einigen Fällen eine unterschiedliche Färbung der Mycelcluster. Seine Färbung basiert auf nicht identifizierten sekundären Inhaltsstoffen.

3.2.2.3 Konkurrenzfähigkeit der Mycelien

Auf den Kulturmedien traten trotz gründlicher Reinigung des Flechtenmaterials Verunreinigungen durch verschiedene Mikroorganismen auf. Bei Kontamination der Mycelien mit Schimmelpilzen mußten die Kulturen immer verworfen werden. Kontaminationen mit Hefepilzen hatten einen weniger negativen Effekt: In einigen Fällen wuchsen die Isolate in direkter Konkurrenz zu Bakterien-Plaques, und beide Organismen entwickelten sich scheinbar unbeeinflusst voneinander (Abb. 62). An einem Isolat von *Anaptychia ciliaris*

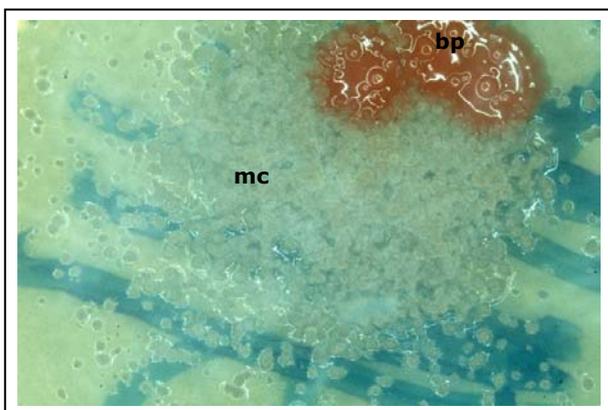


Abb. 62: 200 µm 
Mycobiont von *X. parietina*; die Mycelcluster (mc) entwickeln sich in Konkurrenz zu Bakterien-Plaques (bp); (Habitus-Aufnahme).

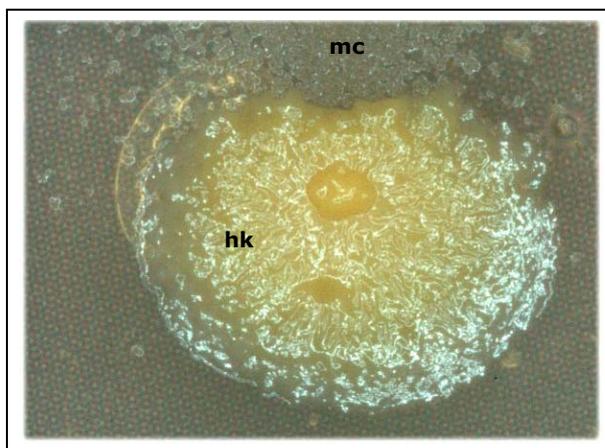


Abb. 63: 200 µm 
Mycobiont (mc) von *A. ciliaris*, der das Ausbreiten einer Hefe-Kolonie (hk) einschränkt; (Habitus-Aufnahme).

konnte beobachtet werden, daß sich eine Hefekolonie nicht weiter in Richtung der Flechtenpilzmycelien entwickeln konnte (Abb. 63). Möglicherweise hat der Mycobiont eine fungizide Wirkung; es kann jedoch auch reine Nahrungskonkurrenz vorliegen. Wie schon unter 3.1.1.2 beschrieben wurde, konnte an Sporenclustern der Flechte *Peltigera polydactyla* antibakterielle Wirkung beobachtet werden. Die isolierten Mycobionten zeigen sich folglich gegenüber anderen Mikroorganismen konkurrenzfähig.

3.2.3 Unterschiede in der Entwicklung der verschiedenen Mycobionten

Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben wurde, besitzen alle untersuchten Flechtenpilze einige grundsätzliche gemeinsame Verhaltensweisen, die vorwiegend in der ersten Wachstumsphase zu einem vergleichbaren Habitus der Mycelien führen. Außerhalb dieser Muster zeigen sich jedoch auch Unterschiede in der Entwicklung und in den Reaktionen der verschiedenen Mycobionten, die auf artspezifische Merkmale zurückgeführt werden können. Zum Beispiel entwickeln die Mycelien nach einer bestimmten Kulturdauer (> 2 Monate) einen artspezifischen Habitus. Details zu artbedingten Charakteristika der untersuchten Mycobionten werden im Folgenden besprochen.

3.2.3.1 *Xanthoria parietina*

I. Morphogenese

Nach der Sporulation entwickeln sich aus den einzelnen Sporenclustern zunächst kleine Mycelien (Abb. 64), die miteinander verschmelzen können. Isolierte Mycelien (z.B. an den Rändern der Streubereiche mit geringerer Sporendichte) wachsen häufig nur bis zu einer Größe von ungefähr 2 mm im Durchmesser heran. Abbildung 35 zeigt ein 9 Wochen altes Mycel von *Xanthoria parietina*,

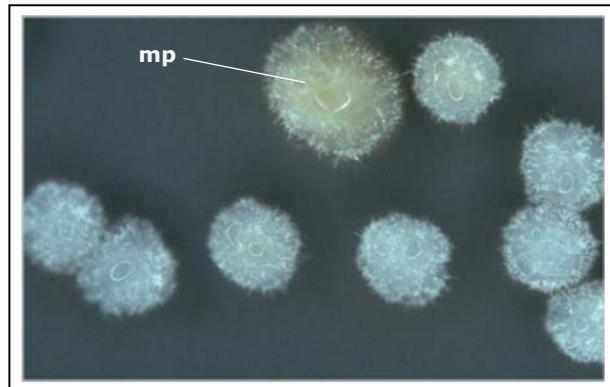


Abb. 64: Mycelien des Mycobionten von *X. parietina*; ein Mycel ist durch Parietin leicht gelb gefärbt (mp); (Habitus-Aufnahme).

dessen Wachstumszone im Randbereich an der intensiven Einfärbung mit Lactoglycerin-Baumwollblau erkennbar ist. Später bilden die Mycelien blättchenförmige Knospen aus (Abb. 65), die z.T. kettenartig aneinanderhängen (Abb. 66). Die Auswüchse sind nur sehr locker mit dem ursprünglichen Mycel verbunden und lösen sich bei der Präparation ab. Im Querschnitt weisen die lobenähnlichen Abschnürungen eine schwach ausgeprägte Ober- und Unterseite auf, die jedoch beide nicht in der Weise strukturiert sind wie die Rindenschicht einer Flechtenlobe. An Mycelflächen, die aus der Vereinigung von Einzelmycelien resultieren, äußert sich das spätere Wachstum durch derartige Knospenbildung.

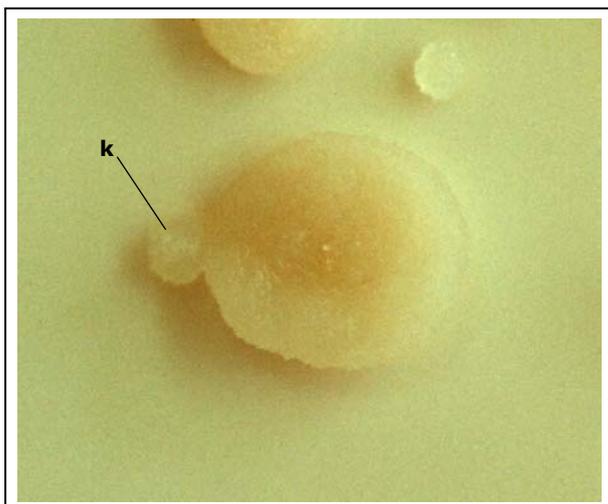


Abb. 65: 150 µm
Knospenbildung (k) an einem Mycelium des Mycobionten von *X. parietina*; (Habitus-Aufnahme).

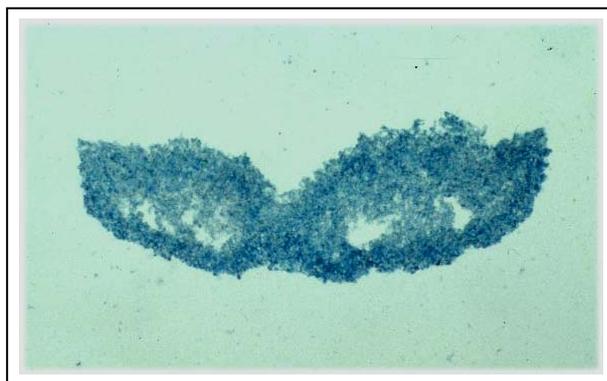


Abb. 66: 150 µm
Mycobiont von *X. parietina*; Querschnitt durch 2 aneinander hängenden Knospen, die sich vom Ursprungsmycel gelöst haben.

II. Bildung von Anthrachinonen und Carotinoiden

Die Mycelien des Mycobionten von *X. parietina* zeigen große Variation in ihrer Färbung. Es gibt weißliche, gelb- bis orangefarbene, hell- bis dunkelbräunliche und auch rosafarbene Mycelien, wobei in der Regel die Mycelien, die sich aus dem Streubereich eines Apotheciums gebildet haben, einheitlich gefärbt sind (s. Kap. 3.2.2.2). Aus der Farbe der Mycelien lassen sich Rückschlüsse auf die Bildung sekundärer Metaboliten ziehen: HONEGGER & KUTASI (1990) untersuchten die Bildung sekundärer Inhaltstoffe durch isolierte Mycobionten von Arten der Gattung *Xanthoria* unter verschiedenen Kulturbedingungen. Die Produktion von Anthrachinonen (hauptsächlich Parietin) manifestiert sich in einer Gelb- bis Orangefärbung (s. Abb. 64) der Mycelien und kann durch eine KOH-Farbreaktion (→ rot) nachgewiesen werden; pinkfarbene bis braune Pigmentierung wird durch Carotinoide hervorgerufen.

In den hier durchgeführten Kulturexperimenten bildete der Mycobiont von *X. parietina* auf den folgenden Medien das gelbe Anthrachinon Parietin: MY, MY+Rib, MY+Glu, MY+ABA, MY+NES+Rib, MY+NES+Kin, BG110+Rib+NES. War die Gelbfärbung der Mycelien durch braune Pigmente, hervorgerufen durch Carotinoide, überlagert, so konnte Parietin mit der KOH-Färbereaktion nachgewiesen werden. Die Anthrachinonbildung wurde jedoch nicht zwingend in allen Mycelien von den oben genannten Nährmedien induziert. Querschnitte der Mycelien machen deutlich, daß dieser sekundäre Inhaltstoff im inneren, locker strukturierten Bereich der Mycelien

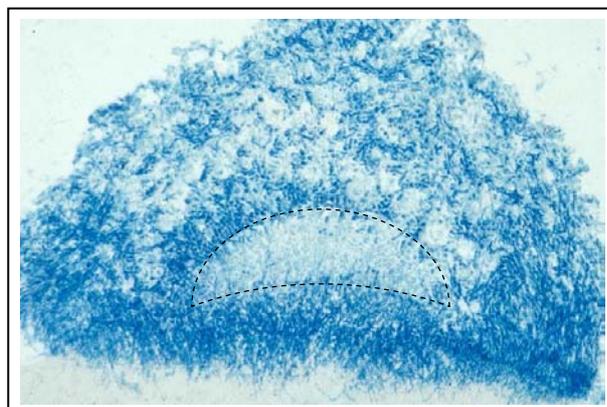


Abb. 67: 170 µm
Querschnitt durch ein Mycel des Mycobionten von *X. parietina*; der markierte Bereich enthält Parietin.

gebildet wird. Abbildung 67 zeigt ein 7 Wochen altes Mycel des Mycobionten, das sich auf einem Cellulose-Membranfilter über MY-Agar mit dem Zusatz von 1,5 % Ribitol entwickelt hat. Ausschließlich der zentrale, innere Bereich des Mycels ist in diesem Entwicklungsstadium normalerweise gelb gefärbt, erscheint durch die Einfärbung mit Lactoglycerin-Baumwollblau jedoch hellblau. Bei der Präparation für das Raster-Elektronen-Mikroskop kollabiert diese Struktur. Junge, im Wachstum befindliche Hyphen in den Randbereichen der Mycelien zeigen keine Parietin-Produktion. In der späteren Entwicklung kristallisiert das Anthrachinon auch in den äußeren Bereichen der kompakten Mycelien aus. Mehr oder weniger intensive Einfärbungen der Mycelien durch Carotinoide konnten auf allen MY-Medien beobachtet werden. Netzartig wachsende Mycelien (s. Abb. 26) und junge Mycelien auf nährstoffarmen Medien zeigen keine Pigmentierung.

3.2.3.2 *Physcia tenella*

Der Mycobiont von *Physcia tenella* zeigt im Vergleich mit den anderen untersuchten Arten eine sehr starke Tendenz, in den Cellulose-Membranfilter einzudringen. Es kann häufig beobachtet werden, daß die Pilzhyphen direkt nach dem Auskeimen unter der Bildung von Gallerte den Filter penetrieren (Abb. 68), jedoch auch nach einer kurzen Distanz wieder an die Oberfläche treten können.

Dieses Verhalten zeigt sich sowohl auf nährstoffarmen Medien (BG110) als auch nach längerem Wachstum auf nährstoffreichen Medien. Durchdringt der Mycobiont von *P. tenella* einen Cellulose-Membranfilter (unabhängig vom Nährmedium), so wird dieser von der Mitte des Mycels her stets aufgelöst (Abb. 69).

Im Gegensatz dazu sind die Hyphen nicht in der Lage, in einen Durapore Membranfilter mit einer Porengröße von $0.65 \mu\text{m}$ einzuwachsen. Die Abbildungen 70 a, b zeigen

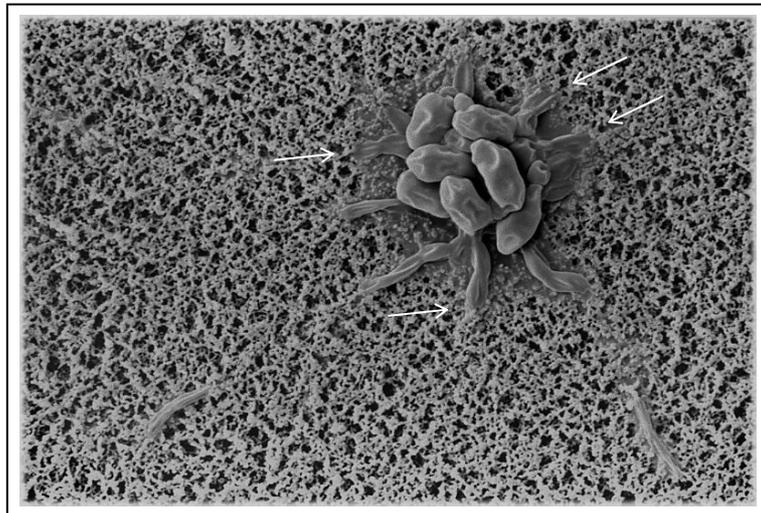


Abb. 68: Sporen von *P. tenella*, die unter Gallertbildung auskeimen; die Hyphen dringen z.T. direkt in den Membranfilter ein; (REM-Aufnahme). 20 μm 

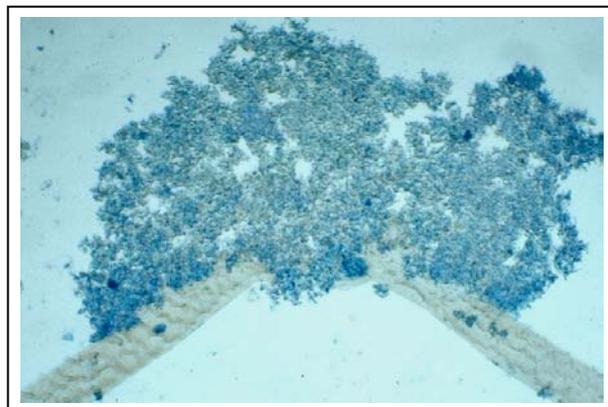


Abb. 69: Mycelquerschnitt des Mycobionten von *P. tenella*; der Cellulose Membranfilter wurde durchwachsen und löst sich im Zentrum des Mycels auf. 20 μm 

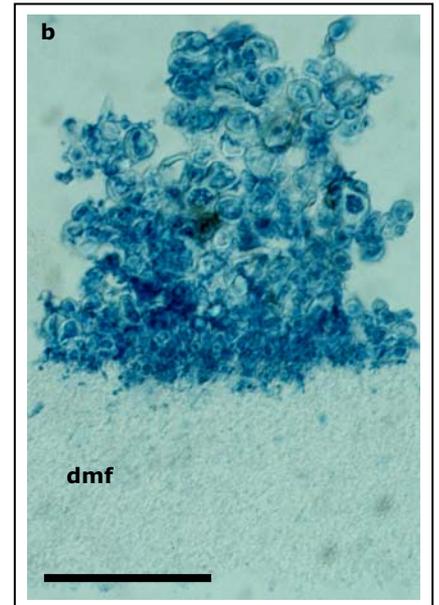
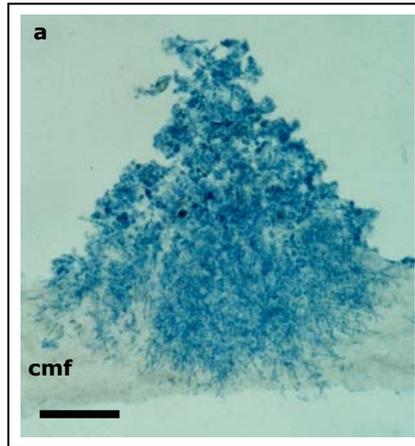
Abb. 70a, b:

Mycelquerschnitte des Mycobionten von *P. tenella*

a: Der Cellulose-Membranfilter (cmf) mit einer Porengröße von 0.45 µm wurde vollständig durchwachsen.

b: Der Durapore-Membranfilter (dmf), 0.45 µm, wird auf dem gleichen Kulturmedium (MY + NAA) nur oberflächlich penetriert.

Maßstab: 100 µm



Querschnitte 6 Wochen alter Mycelien des Mycobionten, die auf MY+NES kultiviert wurden. Im ersten Fall (Abb. 70a) besteht der Membranfilter aus Cellulosematerial mit einer Porengröße von 0.45 µm, und das Isolat hat die Filtermembran innerhalb des Untersuchungszeitraums vollständig durchdrungen. Im zweiten Fall wird die Membran aus Dura-pore mit einem Porendurchmesser von 0.65 µm nur ganz oberflächlich von den Hyphen penetriert (Abb. 70b).

Der Mycobiont von *P. tenella* entwickelt oberhalb des Substrates sehr locker strukturierte Mycelien (s. Abb. 69; siehe im Vergleich dazu den Mycobionten von *X. parietina*, Abb. 35), deren Oberfläche Höhlungen aufweisen (s. Kap. 3.4.3).

Aus dem Storulationsbereich eines Apotheciums bildet sich in der weiteren Entwicklung (und bei geeigneter Sporendichte) keine einheitliche, verwachsene Mycelfläche, sondern ein granuläres Mycel-cluster (Abb. 71). Auch auf nährstoff-reichen Medien beginnt der Mycobiont von *P. tenella* schon nach kurzer Kulturdauer (2-3 Monate), basal feine, radiale Hyphen auszubilden, die sich oberflächenparallel und auch innerhalb der Membranfilter ausbreiten. Damit tritt bei diesem Isolat im Vergleich zu den anderen untersuchten Arten der Phasenwechsel (s. Kap. 3.2.1.6) sehr früh ein.

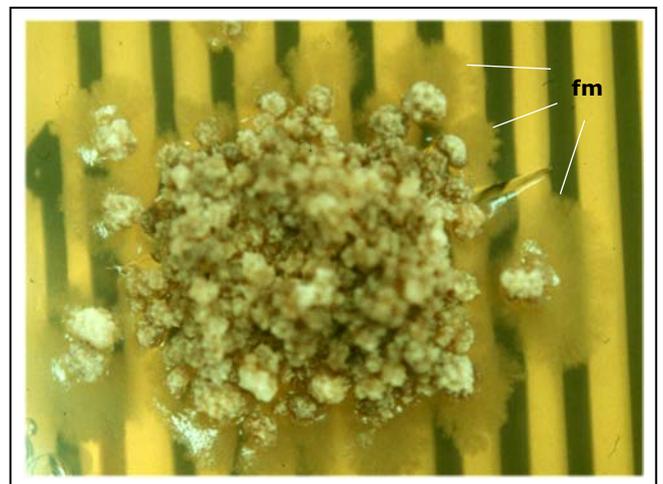


Abb. 71:

200 µm

Sporulationsbereich von *P. tenella*; auf dem nährstoffreichen Agar (MY + Rib) hat sich ein granuläres, erhabenes Mycelcluster gebildet; basal wächst der Mycobiont mit wenig verzweigten Hyphen radiär aus und bildet ein flächiges Mycel (fm).

Innerhalb der kompakteren Mycelbereiche zeigt der Mycobiont von *P. tenella* ein untypisches Zellteilungs-Muster. In älteren Hyphen, erkennbar an ihren extrem großen Durchmessern (bis zu 12 µm) und der starken Vakuolisierung, werden irisblendenartig neue Septen angelegt (Abb. 72a, b). Dadurch werden die Zellen in ungleichmäßige Kompartimente unterteilt. Die Wandstärke dieser Querwände variiert sehr stark von ca. 0.2 µm bis 0.8 µm.

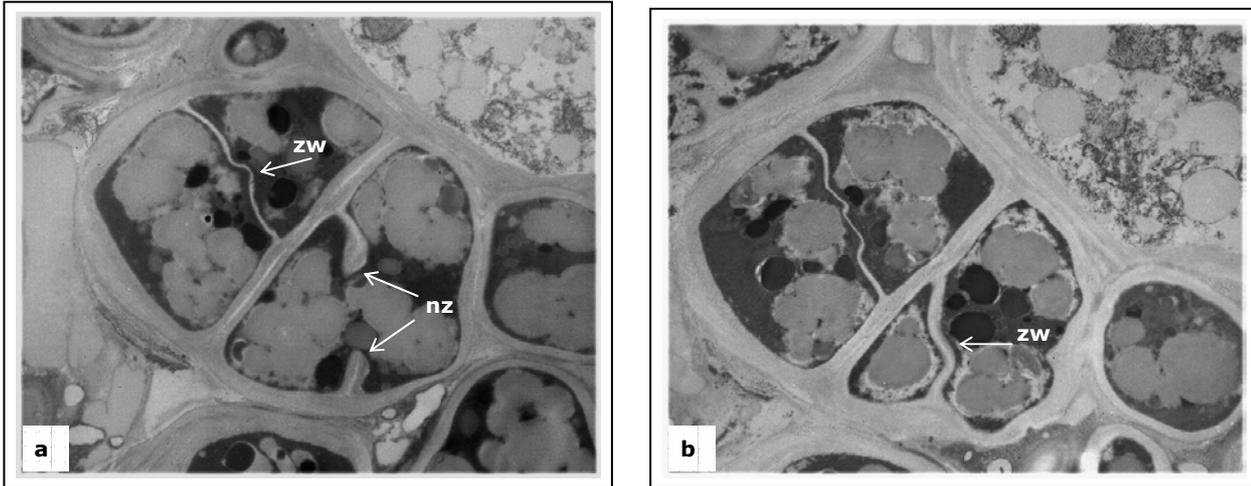


Abb. 72 a, b: Ultradünnschnitte des Mycobionten von *P. tenella*; die Abbildungen geben 2 Schnittebenen derselben Zelle wieder. **a:** Eine neue Zellwand (nz) wird irisblendenartig angelegt. **b:** In einer weiter außen liegenden Schnittebene ist die Zellwand (zw) schon vollständig. (TEM-Aufnahmen).

3.2.3.3 *Physconia distorta*

Auf nährstoffarmen Medien bildet der Mycobiont von *Physconia distorta* von Beginn an auffällig dunkel gefärbte Mycelien aus (Abb. 73). Der Querschnitt (Abb. 74) macht deutlich, daß die Mycelien zum größten Teil aus Hyphen mit dunkel inkrustierten, verdickten Zellwänden aufgebaut sind. Typische, junge Mycelien, die sich auf Vollmedien bilden, sind auf der Abbildung 52 zu sehen. Innerhalb der kompakten Masse aus feinen, hyalinen Hyphen finden sich nur verstreut einige großlumige Zellen mit dunkel inkrustierten Zellwänden.



Abb. 73: Sporulationsbereich von *P. distorta* auf nährstoffarmem Agar (BG110 + Glu); der Mycobiont hat dunkel gefärbte Mycelien gebildet. 200 µm

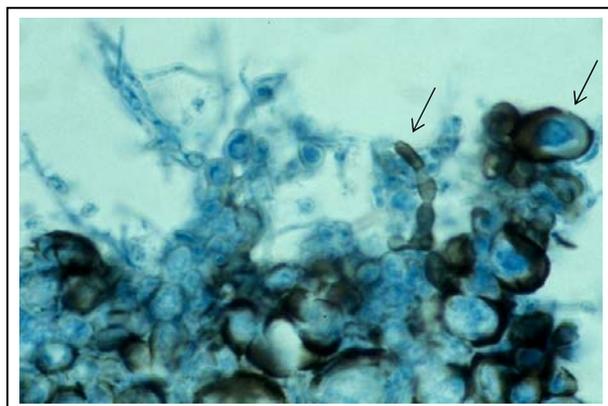


Abb. 74: Detail eines Mycelquerschnitts des Mycobionten von *P. distorta* (s. Abb. 74); die Hyphen zeigen inkrustierte Zellwände. 40 µm

In der weiteren Entwicklung bildet der isolierte Pilz von *P. distorta* große, innen hohle Mycelien aus. Abbildung 75 zeigt ein noch relativ kleines Mycel, in dessen Innerem sich bereits ein Hohlraum gebildet hat. In den Randbereichen finden sich Stränge aus parallel zur Oberfläche verlaufenden Hyphen mit engen Lumina und dünnen, hyalinen Zellwänden (Abb. 76). Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Arten vergrößern sich die Mycelien von *P. distorta* bei guter Nährstoffversorgung und unter Einbeziehung benachbarter Mycelcluster kontinuierlich zu immer größer werdenden einheitlichen Konglomeraten (s. Abb. 34), die Säulen-, Kugel- oder Pyramidenform annehmen können.

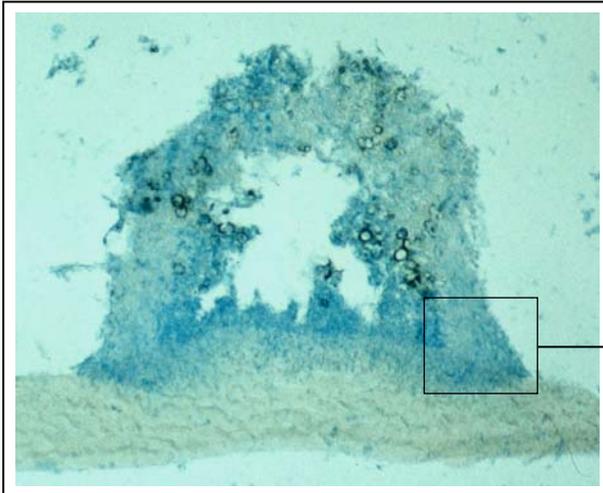


Abb. 75: Mycelquerschnitt des Mycobionten von *P. distorta*, kultiviert auf einem nährstoffreichem Medium. 200 µm

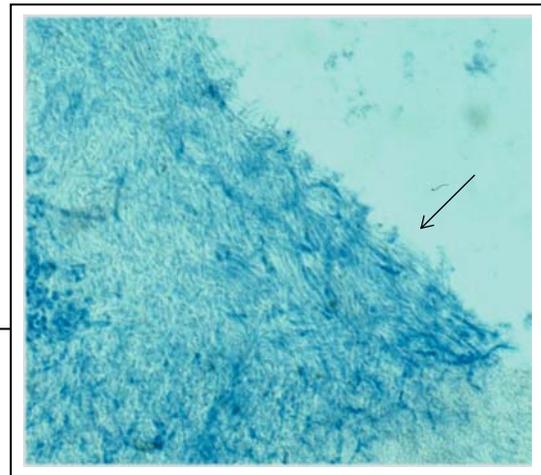


Abb. 76: Detail des Mycelquerschnitts von Abb. 75; im Randbereich des Mycels verlaufen parallel angeordnete Hyphen. 50 µm

Die Eigenschaft des Mycobionten, Strukturen aus parallel verlaufenden Hyphen anzulegen, wird bei der Kultivierung auf einem cellulosehaltigem Agarmedium besonders deutlich. Es entstehen säulenförmige Mycelien, deren Wandbereiche rhizinenähnlich aufgebaut sind (Abb. 77a, b). Detailuntersuchungen zeigen, daß der Wandbereich dieser Mycelien aus gleichgerichteten, unverzweigten Hyphen gebildet wird.

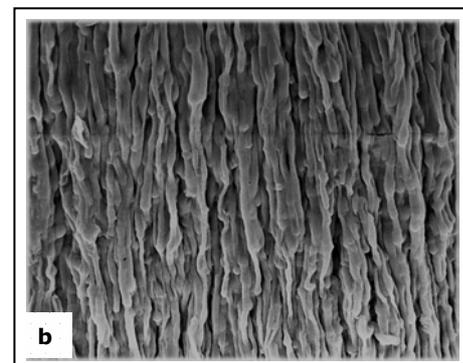
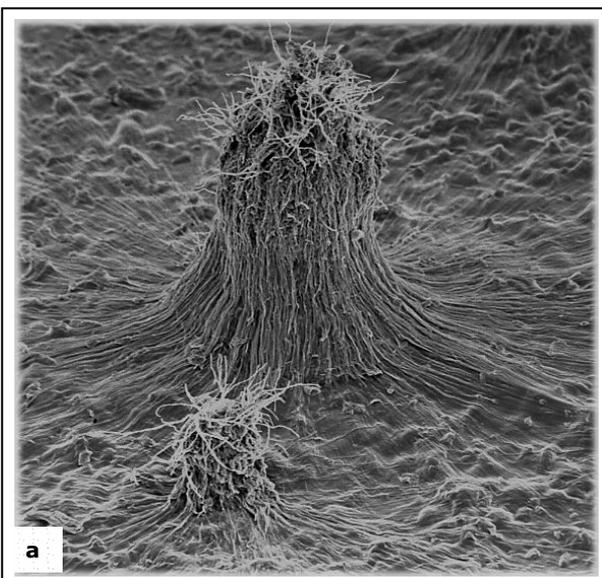
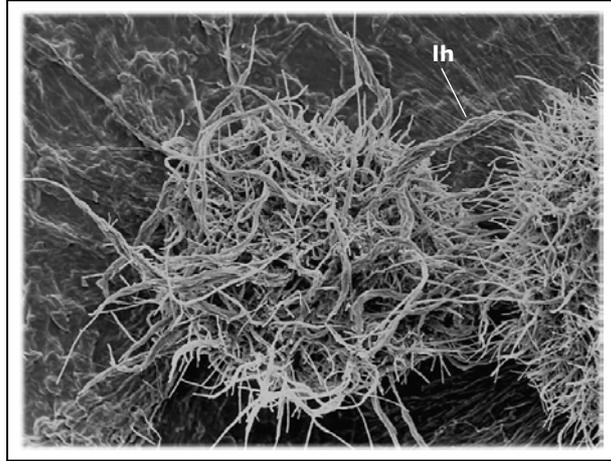


Abb. 77a, b: Mycobiont von *P. distorta* auf einem cellulosehaltigen Medium; die säulenförmigen Mycelien (a) werden aus parallelen, unverzweigten Hyphen aufgebaut (b); (REM-Aufnahme). a: 150 µm ; b: 45 µm

Abb. 78: 180 µm 
Mycobiont von *P. distorta*; die z.T. miteinander
verdrillten Lufthyphen (lh) besitzen hydrophobe
Eigenschaften; (REM-Aufnahme).



An der Spitze solcher Mycelien wird häufig ein hydrophober Haarfilz aus Lufthyphen, die miteinander verklebt sein können, entwickelt (Abb. 78). Über die Lufthyphen können die Mycelien Kontakt miteinander aufnehmen und verwachsen (s. Kap. 3.2.2.1; Abb. 59).

3.2.3.4 *Anaptychia ciliaris*

Der Mycobiont von *Anaptychia ciliaris* verhält sich in Kultur ähnlich wie der von *P. distorta*: Die Ausbildung von dunkel gefärbten Mycelien, besonders auf nährstoffarmen Medien (s. Abb. 29) und die Entwicklung zu großen, hohlkugelförmigen Strukturen bei geeigneter Nährstoffversorgung sind charakteristisch (Abb. 79). Große Mycelien dieser beiden Mycobionten ähneln sich im Habitus. Bei *A. ciliaris* können jedoch keine säulenförmigen Mycelien mit paralleler Hyphenanordnung wie bei *P. distorta* beobachtet werden.

Besonders auffällig ist die Bildung eines gelben, nicht identifizierten Farbstoffes, die in den Zentren junger Mycelien beginnt (Abb. 80). Der KOH-Test zeigt, daß es sich nicht um Parietin handelt. Nach längerer Kulturdauer diffundiert die Substanz auch in das Kultur-

medium. Bei Kontrastierung der Schnitte mit Lactoglycerin-Baumwollblau entsteht eine Grünfärbung (s. Kap. 3.2.4.1; Abb. 91a). Die Bildung dieses sekundären Inhaltstoffes kann auf allen Nährmedien auftreten. An Schnitten der Flechte *A. ciliaris* kann eine solche Farbreaktion nicht beobachtet werden.

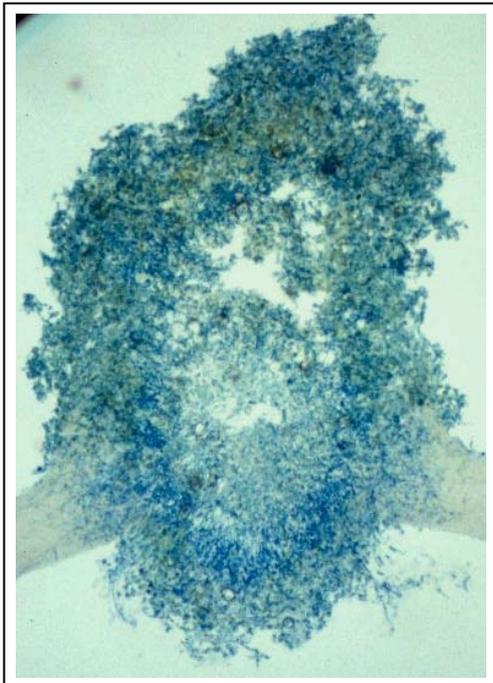


Abb. 79: 300 µm 
Mycobiont von *A. ciliaris*, kultiviert auf nährstoffreichem Medium, im Querschnitt; das Mycel hat die Filtermembran durchdrungen.

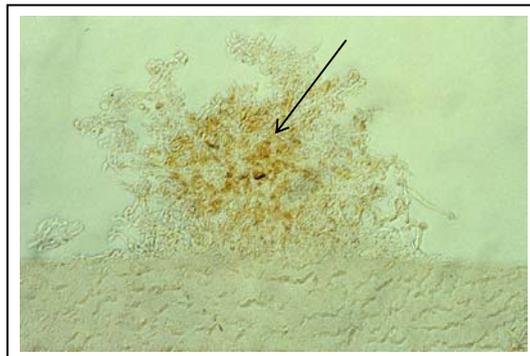


Abb. 80: 200 µm 
Mycobiont von *A. ciliaris*; der ungefärbte Querschnitt zeigt einen gelben, kristallinen Farbstoff im Zentrum des Mycels.

3.2.3.5 *Baeomyces rufus*

Der Mycobiont von *Baeomyces rufus* nimmt mit seinen Reaktionen in axenischer Kultur im Vergleich zu den oben beschriebenen Arten eine Sonderstellung ein. Die Sporen dieses Flechtenpilzes keimen, wie in Kapitel 3.1.3.1 erwähnt, schon wenige Stunden nach der Sporulation aus und bilden auf allen Substraten zunächst lange, unverzweigte Keimhyphen (Abb. 81). Das frühzeitige Auskeimen und die verzögerte Bildung von Verzweigungen auf nährstoffreicheren Medien kann nur bei diesem Isolat beobachtet werden.

Darüber hinaus zeigen die Mycelien auf nährstoffarmen Medien (BG110 und MBV) in den ersten Wochen ein gegen den Uhrzeigersinn gerichtetes Wachstum (Abb. 82), wobei gleichzeitig der Filter penetriert wird. Im Vergleich dazu wachsen die Mycelien der anderen Flechtenarten strahlenförmig. Zwischen benachbarten Hyphen werden Anastomosen gebildet. Im weiteren Verlauf der Entwicklung formieren sich flächige, netzartige Mycelien, und die spiralige Struktur geht verloren.

Auf nährstoffreichen Medien entwickeln sich oberhalb der Filtermembranen nur relativ flache Mycelien. Die Hauptmasse der Hyphen dringt durch die Filtermembran und breitet sich weiter im Agar aus (Abb. 83). Die Hyphen weisen knotige Verdickungen auf, und vereinzelt werden braune, kristalline Stoffe ausgeschieden (Abb. 84).

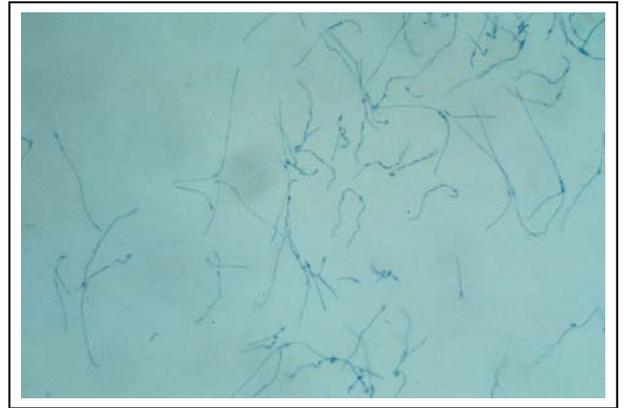


Abb. 81: 200 µm 
Sporenkeimlinge (2 Tage) von *B. rufus*; nach der Keimung bildet der Mycobiont auf allen Substraten lange, unverzweigte Hyphen.

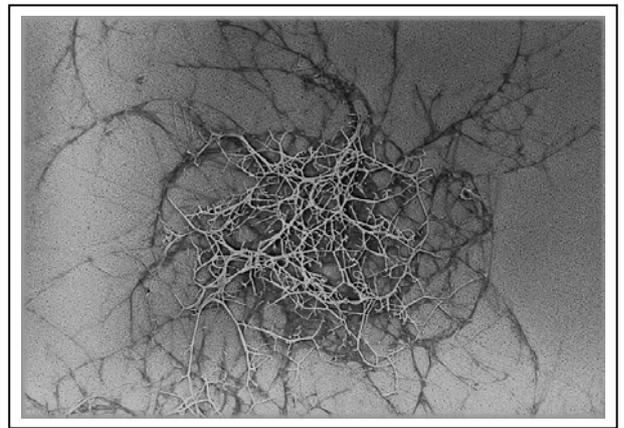


Abb. 82: 220 µm 
Mycobiont von *B. rufus* im frühen Entwicklungsstadium auf einem nährstoffarmen Medium; auffällig ist die spiralige, nach links gerichtete Wuchsform; (REM-Aufnahme).

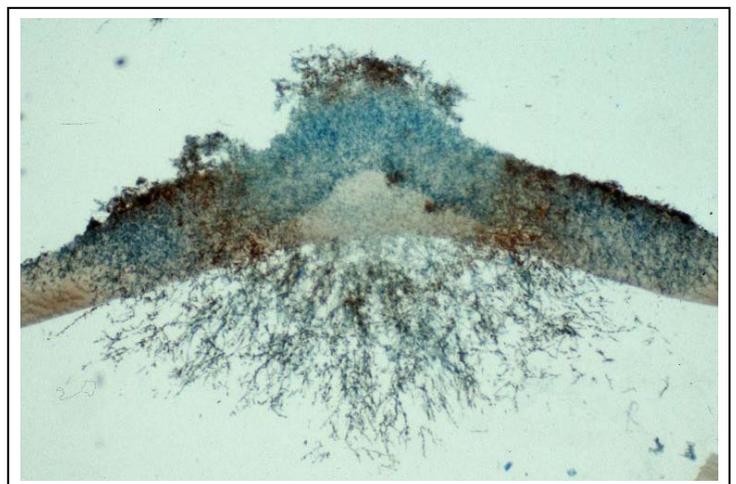


Abb. 83: 400 µm 
Mycobiont von *B. rufus* auf einem nährstoffreichen Kulturmedium (MY + Glu); der Querschnitt macht deutlich, daß sich das Mycel hauptsächlich im Substrat (Filtermembran, Agar) ausgebreitet hat.

Die Myceloberfläche kann im weiteren Verlauf der Entwicklung durch die Sekretion von Gallerte oder durch eine extrem kompakte Hyphenanordnung (Abb. 85a, b) versiegelt werden. In den meisten Fällen besteht die Oberfläche der Mycelien jedoch aus einem locker strukturierten Hyphengeflecht, das Durchlässe variabler Struktur aufweisen kann (Abb. 86a). Durch die Öffnungen wird eine gelblich-braune Flüssigkeit ausgeschieden, die auch den Agar anfärbt. Die Ränder der Durchbrüche werden von einem kompakten Hyphengeflecht gebildet, das jedoch im Querschnitt (Abb. 86b) keine auffällige Hyphenanordnung zeigt. Die Innen- und Oberseite der Öffnungen weisen hingegen eine intensivere, braune Inkrustierung auf. Im Bereich der Öffnungen haben sich die Mycelien von der Filteroberfläche abgehoben. Durch weiteres Wachstum schieben sich die vom Filter abgelösten Bereiche weiter empor, wobei sich aus den zunächst flächigen Mycelien voluminösere Strukturen mit variablen Formen entwickeln.

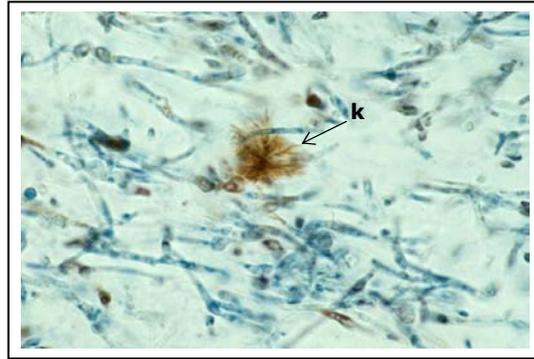


Abb. 84: 40 µm 
Mycobiont von *B. rufus*; die Hyphen weisen kno-
tartige Verdickungen auf; k: kristalline Aus-
scheidung.

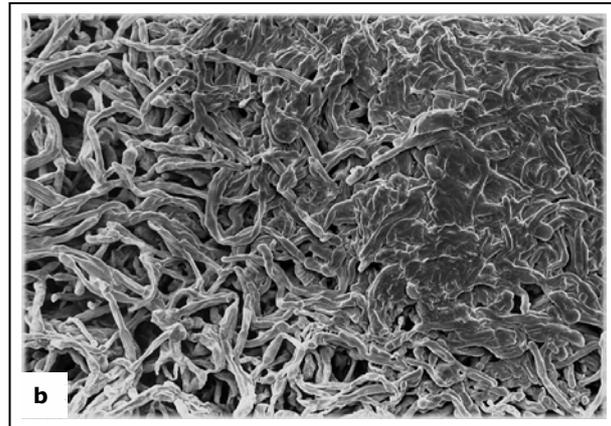
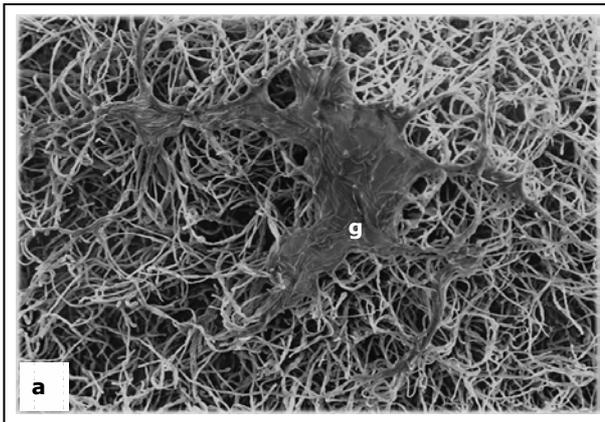


Abb. 85a, b: 125 µm  40 µm 
Mycobiont von *B. rufus*; die Oberfläche der Mycelien kann durch Gallerte (**a: g**) oder eine extrem kompakte Hyphenanordnung (**b**) versiegelt werden; (REM-Aufnahmen).

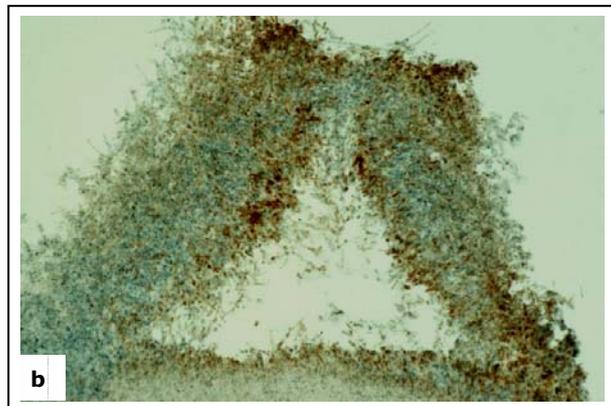
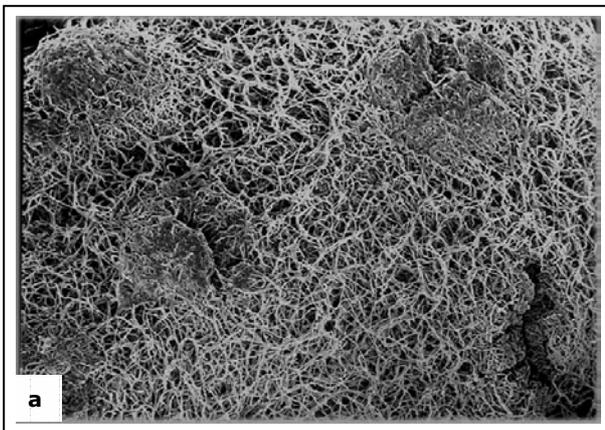


Abb. 86a, b: 25 µm  170 µm 
Mycobiont von *B. rufus*; die Myceloberfläche weist Öffnungen auf (**a**); im Querschnitt (**b**) wird eine Inkrustierung der Strukturen, die sich vom Membranfilter abgelöst haben, sichtbar; (a: REM-Aufnahme).

3.2.3.6 *Peltigera didactyla*

Die Mycobionten aus der Gruppe der Peltigerales nehmen durch ihre diffizile Isolierbarkeit eine Sonderstellung unter den untersuchten Arten ein. Aus der Familie der Peltigeraceae konnte der Mycobiont von *Peltigera didactyla* jedoch erfolgreich isoliert und vermehrt werden. Wie schon im Kapitel 3.1.3 beschrieben wurde, wurden hierfür kleine Mycelien, die sich auf dem Mineralagar MBV gebildet hatten, zusammen mit dem sie einschließenden Agarblock auf nährstoffreichere Medien übertragen. Auf den Medien BG110 + Biotin + Glukose bzw. Ribitol entwickelten sie sich kontinuierlich weiter (s. Abb. 13, 14), wobei sie jedoch in dem Agarstück, mit dem sie transplantiert worden waren, verblieben. Sie drangen weder in einen Membranfilter, noch in den neuen Agar ein und wichen mit diesem Verhalten von den anderen Isolaten ab.

3.2.4 Einfluß verschiedener Substanzen auf das Wachstumsverhalten der Mycobionten

Für die Experimente wurden verschiedene Substanzen und Kombinationen dieser Substanzen verwendet: Die für Flechten generell essentiellen Kohlenhydrate Ribitol und Glukose, die Phytohormone Naphthyllessigsäure (NAA), Abscisinsäure (ABA) und Kinetin sowie die Vitamine Biotin und Thiamin (s. Anh.).

Mit dem Grundbaustein „Pilzhyphe“ verfügen die Mycelien nur über eine relativ geringe Bandbreite an Reaktionsmöglichkeiten in Bezug auf ihr Wachstumsverhalten. Deshalb konnten in früheren Untersuchungen häufig keine habituellen Veränderungen an den Mycelien isolierter Mycobionten durch morphogenetischen Einflüsse z.B. der Kohlenhydrate Glukose und Ribitol (HUBER et al. 1994) beobachtet werden. Durch die Verwendung der Membranfilter als Kultursubstrat, die eine mehr oder weniger permeable Barriere darstellen, können feine Unterschiede im Verhalten und in der Entwicklung verstärkt werden.

Allgemein gilt, daß die getesteten Substanzen an den Mycobionten einer Flechtenart nur in der ersten Wachstumsphase (< 2 Mo) eindeutige morphogenetische Unterschiede hervorrufen. Nach einer längeren Kulturdauer ohne Erneuerung des Agarmediums kommt es zu einer Angleichung der Mycelien und sie entwickeln einen arttypischen Habitus (s. Kap. 3.2.3). Die Reaktionen der Mycobionten auf die verschiedenen Substanzen können in Abhängigkeit von der Art des Grundmediums (BG110 oder MY) variieren.

Die Vitamine Biotin und Thiamin und das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) hatten in diesen Experimenten keinen sichtbaren Einfluß auf die Morphogenese der Mycobionten. Der Mycobiont von *Peltigera didactyla* jedoch wächst nur auf biotinhaltigem Medium kontinuierlich weiter, was möglicherweise auf einen Einfluß dieses Vitamins zurückzuführen ist (s. Kap. 3.1.1.2).

Die Kohlenhydrate Glukose und Ribitol sowie die Phytohormone NAA und Kinetin haben einen deutlichen Einfluß auf das Wachstumsverhalten, wobei die Mycobionten von *Xanthoria*

parietina, *Physcia tenella*, *Physconia distorta* und *Anaptychia ciliaris*, die unterschiedlichen systematischen Gruppen angehören, gleiche Reaktionsmuster zeigen. Die Mycobionten von *Baeomyces rufus* und *Peltigera didactyla* zeigen (soweit getestet) abweichende Verhaltensweisen.

Die Wirkung von Substanzkombinationen (s. Anh.) konnte nur in wenigen Fällen beurteilt werden.

3.2.4.1 Wirkung der Kohlenhydrate Ribitol und Glukose

I. Beeinflussung des Wachstumsverhaltens

Wie schon im Kapitel 3.2.1.2 beschrieben wurde, erhöht die Zugabe von Ribitol bzw. Glukose zum Kulturmedium die Verzweigungsfrequenz der einzelnen Hyphen. Die Entwicklung der Mycelien von Mycobionten einer Flechtenart unter dem Einfluß der beiden Kohlenhydrate ist jedoch nicht einheitlich. Ein Vergleich der Mycelien von *X. parietina*, die sich auf den Medien MY (Abb 87), MY + Glu (Abb. 88) bzw. MY+ Rib (Abb. 89) entwickelt haben, macht dies deutlich. Ohne den Zusatz von Kohlenhydraten bildet sich auf MY-Agar auf der Filtermembran ein kompaktes Mycel, das in den ersten Wochen der Entwicklung kaum in das Substrat eindringt. Zusätzliches Ribitol (Abb. 88) führt zu einer lockereren Hyphenanordnung und der Bildung von großlumigen Zellen im Zentrum des Mycels. Die Hyphen sind nach einer Kulturdauer von 7 Wochen erst oberflächlich in den Filter eingedrungen.

Glukosehaltiges Medium (Abb. 89) regt hingegen ein stark gerichtetes Wachstum der Pilzhyphen an, die innerhalb der gleichen Zeit den Filter durchdringen. Auffällig ist die parallele Anordnung

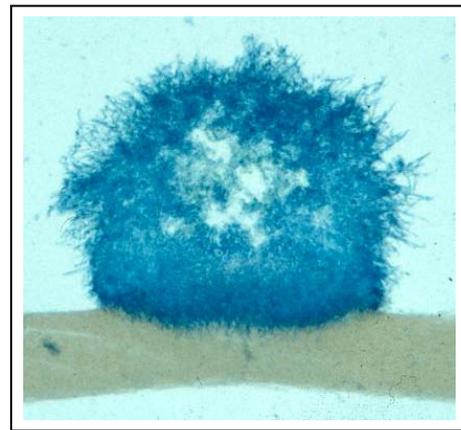


Abb. 87: 150 µm 
Mycobiont von *X. parietina*, der auf einem reinen MY-Agar kultiviert wurde; das Mycel bildet eine in sich geschlossene Struktur und dringt kaum in den Membranfilter ein.

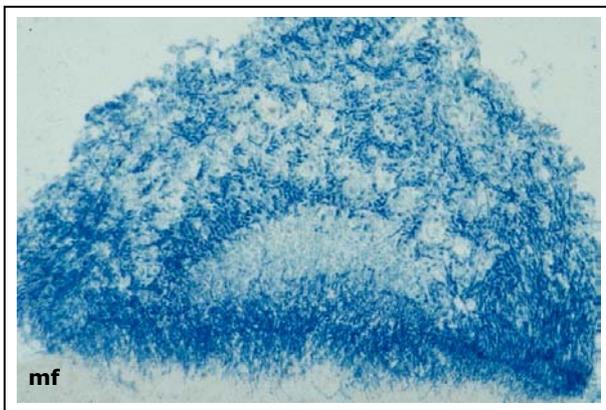


Abb. 88: 170 µm 
Mycobiont von *X. parietina*, kultiviert auf MY -Agar mit Zusatz von Ribitol; das Mycel bildet eine relativ lockere Struktur und ist kaum in den Membranfilter (mf) eingedrungen.

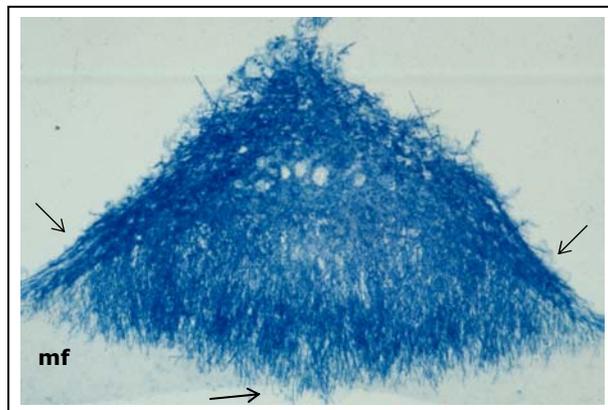


Abb. 89: 170 µm 
Mycobiont von *X. parietina*, kultiviert auf MY + Glukose; das Mycel hat den Membranfilter (mf) durchwachsen; siehe parallele Hyphenanordnung auf der Oberfläche.

feiner Hyphen nicht nur an der Basis des Mycels, sondern über die gesamte Oberfläche. [Die Zugabe des Phytohormons NAA zum Nährmedium führt zu sehr ähnlichem Wachstumsverhalten (s. Abb. 53).] Auf dem ribitolhaltigen Medium durchdringt der Mycobiont den Membranfilter erst nach längerer Kulturdauer.

Auch die Mycobionten der Flechten *P. distorta* und *A. ciliaris* zeigen eine deutliche Abhängigkeit bezüglich ihrer Wuchsform von der Art des Kohlenhydrats (Abb. 90a,b; 91a, b). Ähnlich wie die Mycelien von *X. parietina* sind auch diese auf dem glukosehaltigen Mineralmedium kultivierten Isolate in der Lage, einen Durapore-Membranfilter (0.45 µm) kontinuierlich zu durchdringen und sich weiter strahlenförmig im Agar auszubreiten. Im Gegensatz dazu bilden die Mycelien bei Zugabe von Ribitol an der Basis abgeschlossene Strukturen. Die Membranfilter werden nur oberflächlich penetriert. Häufig zerreißen bei der Präparation die Hyphen, mit denen die Mycobionten im Substrat verankert sind, so daß sich die Mycelien ablösen.

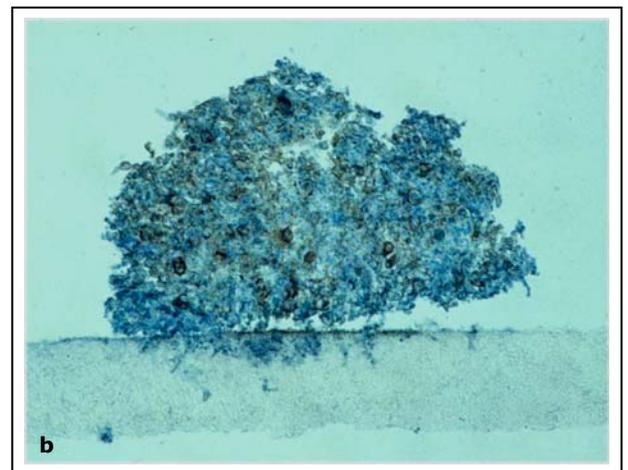
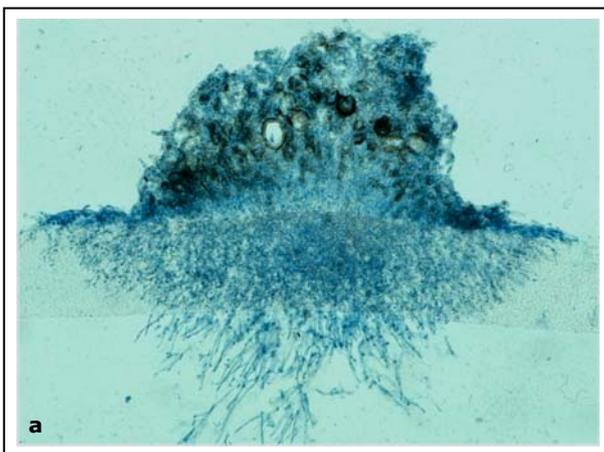


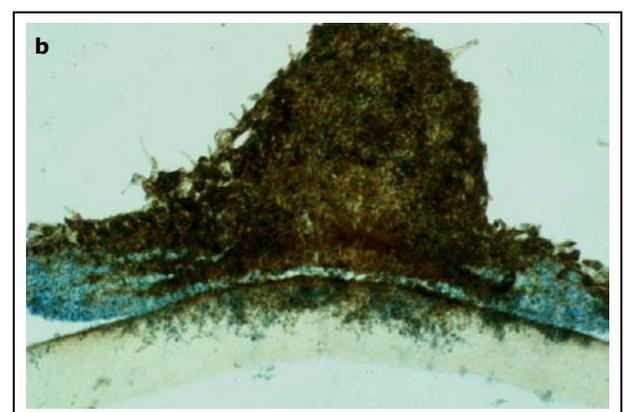
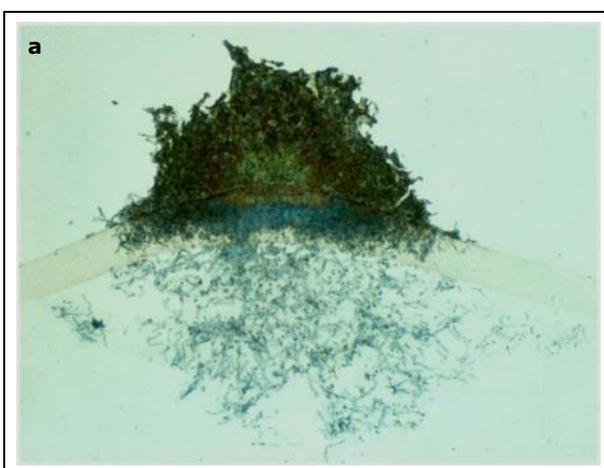
Abb. 90a, b: *P. distorta*; 170 µm

170 µm

Mycelquerschnitte von Mycobionten, die auf Durapore-Membranfiltern (0.45 µm) über nährstoffarmem Medium mit den Zusätzen von Glukose (a) bzw. Ribitol (b) kultiviert wurden. Glukose führt zu einem stark in das Substrat gerichteten Wachstum der Mycelien.

Abb. 91a, b: *A. ciliaris*; 280 µm

170 µm



Die Ausprägung der Reaktion auf die Kohlenhydrate ist von der Zusammensetzung des Grundmediums (BG110 oder MY) abhängig. Mycobionten von *A.ciliaris*, die auf dem nährstoffreichen Medium MY+ Glukose kultiviert werden, durchwachsen den Durapore-Membranfilter nicht, sondern bilden nur ein oberflächliches Mycel auf der Filtermembran.

Die Mycobionten der Flechten *P. tenella* und *B. rufus* haben unabhängig von der Zusammensetzung des Nährmediums eine starke Tendenz, in den Membranfilter einzudringen. Mycelquerschnitte zeigen diesbezüglich keine deutlichen Unterschiede in den Reaktionen auf Glukose bzw. Ribitol. In Abhängigkeit von den zugegebenen Kohlenhydraten zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede in der Oberflächenstruktur der Mycelien der verschiedenen Mycobionten:

Bei jungen Mycelien von *P. tenella* führt der Zusatz von Ribitol zur vermehrten Ausbildung von perlschnurartigen Lufthyphen (Abb. 92). Isolate von *B. rufus* entwickeln auf Glukosemedium (Abb. 93) eine einheitlichere Myceloberfläche als auf Ribitolagar (s. Abb. 85).

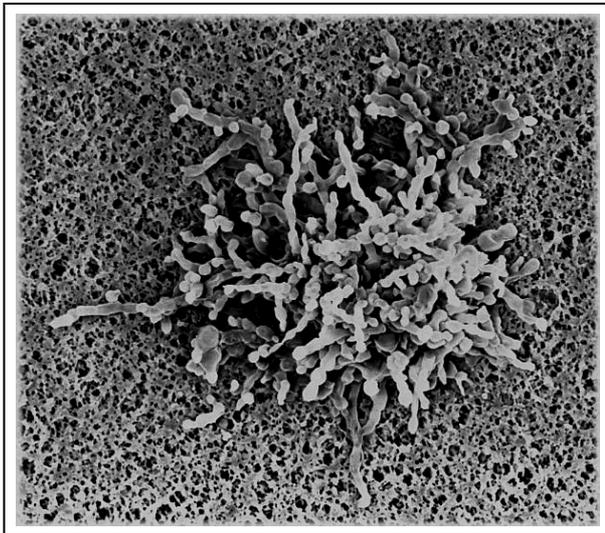


Abb. 92: 40 µm 
Mycobiont von *P. tenella*, kultiviert auf ribitolhaltigem Agar; das Mycel hat perlschnurartige Lufthyphen ausgebildet; (REM-Aufnahme).

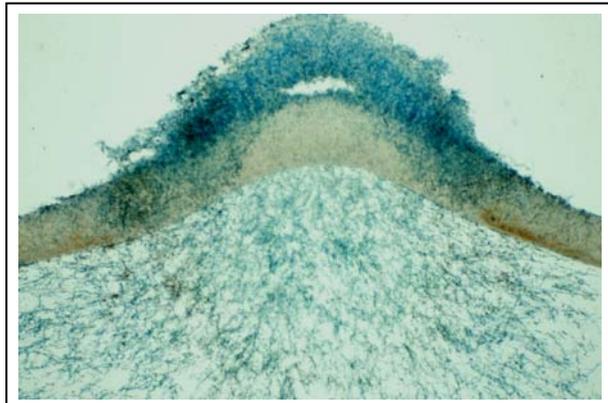


Abb. 93: 400 µm 
Mycobiont von *B. rufus*, kultiviert auf glukosehaltigem Agar (MY + Rib) ; die Myceloberfläche ist relativ homogen (vergl. Abb. 83).

Der Mycobiont von *Peltigera didactyla* bildet sowohl auf glukose- als auch auf ribitolhaltigem Medium einheitlich kompakte Mycelien aus (s. Abb. 13), und seine Hyphen dringen nicht in einen Membranfilter ein. Nach einer Transplantation auf neue Agar-Medien (s. Kap. 3.1.1.2) verbleiben sie in dem Agarblock mit dem sie transplantiert wurden, und wachsen nicht in das neue Agarmedium ein. (Anm.: Für diesen Test standen nur sehr wenige Mycelien zu Verfügung.)

II. Gallertbildung

Der Zusatz von Glukose zu dem Vollmedium MY führt bei den Isolaten häufig zu einer intensiven Ausscheidung von Gallerte, die sich auf der Filteroberfläche absetzt und die basalen Randhyphen der Mycelien verklebt (Abb. 94).

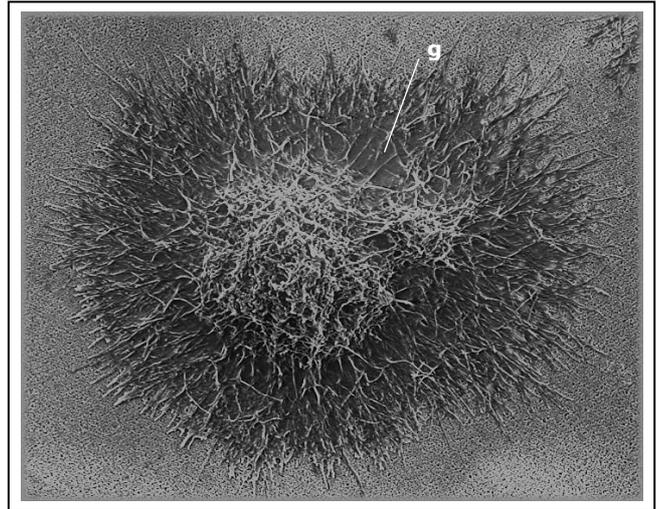


Abb. 94: Mycobiont von *P. distorta*, der über einem glukosehaltigen Medium kultiviert wurde; die Hyphen der Mycelbasis sind in eine gallertige Matrix (g) eingebettet; (REM-Aufnahme). 40 µm

3.2.4.2 Phytohormone

Die komplexen Interaktionen, die zur Bildung eines Flechtenthallus und Aufrechterhaltung des Symbiosegleichgewichtes notwendig sind, lassen vermuten, daß sie einem geregelten Steuerungsprozess unterliegen. Verschiedene Phytohormone, deren regulative Wirkungsweisen für höhere Pflanzen bekannt sind, konnten auch schon in Flechten nachgewiesen werden (EPSTEIN et al. 1986; OTT & ZWOCH 1992; SCHIELEIT 1997). Ihr Einfluß auf Differenzierungsprozesse synthetischer Flechten und vegetativer Fortpflanzungseinheiten wurde in Kulturversuchen gezeigt (REMMER et al. 1986; SCHIELEIT 1997). Es gibt jedoch keine detaillierten Untersuchungen darüber, in welcher Art die Morphogenese der Hyphenfilamente von Flechtenpilzen durch Phytohormone beeinflusst wird.

I. Naphthalinessigsäure (NAA)

Das Phytohormon NAA wurde in einer Konzentration von 0.05 % eingesetzt. Es regt bei Zugabe zu dem Vollmedium MY, wie auch schon für Glukose beschrieben, zu einer erhöhten Ausscheidung von gelatinösen Substanzen an. Die Gallertbildung erfolgt an den Randhyphen der Mycelien, kann aber in Einzelfällen auch auf den Oberflächen älterer Isolate beobachtet werden (Abb. 95).

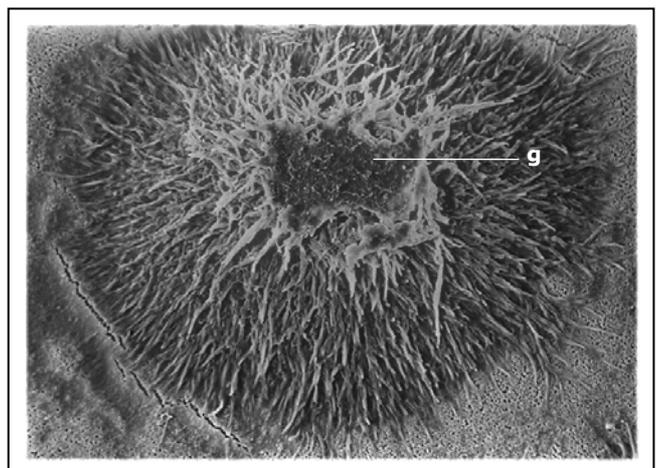


Abb. 95: Mycobiont von *X. parietina*, der über einem NAA-haltigen Medium kultiviert wurde; auf der Spitze des Mycels wurde Gallerte (g) ausgeschieden; (REM-Aufnahme). 75 µm

Zusätzlich beeinflusst NAA die Morphologie der Mycelien. Besonders deutlich wird dieser Einfluß in den Experimenten mit dem Mycobionten von *Xanthoria parietina*. Abb 53 (s.o.) zeigt ein 7 Wochen altes Mycel dieses Mycobionten, das sich auf dem Medium MY + NAA entwickelt hat. Innerhalb kurzer Zeit (5-6 Wochen) durchwächst das Isolat den Membranfilter und bildet auf der Filteroberfläche parallel verlaufende Hyphenstränge aus. Von diesen radiär wachsenden Hyphen zweigen kontinuierlich Seitenhyphen ab, die in das Substrat eindringen. Im weiteren Verlauf der Entwicklung setzt sich das stark gerichtete Wachstum des Isolates fort (Abb. 96a). Der Querschnitt zeigt eine Zonierung innerhalb des Mycels, die durch das Einfärben mit Lactoglycerin-Baumwollblau hervorgehoben wird. Die Hyphen sind, solange sie die Filtermembran noch nicht durchwachsen haben, intensiv blau gefärbt. Sobald die Hyphen den Agar erreicht haben, lassen sich ihre hinteren, älteren Bereiche, die innerhalb des Filters liegen, nicht mehr anfärben (Abb. 96b). Dies deutet entweder auf eine starke Vakuolisierung oder eine Degeneration hin.

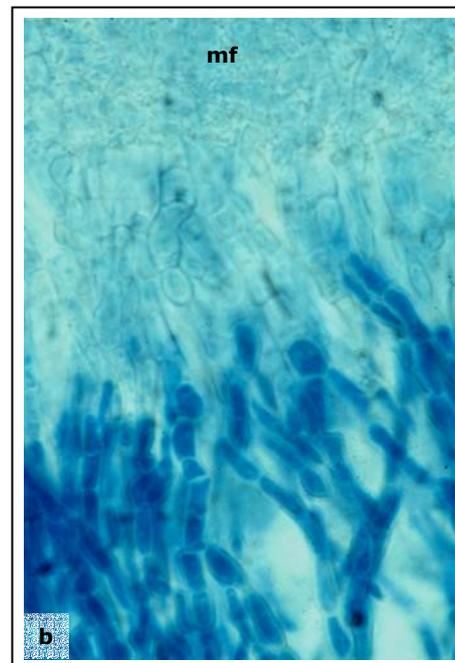
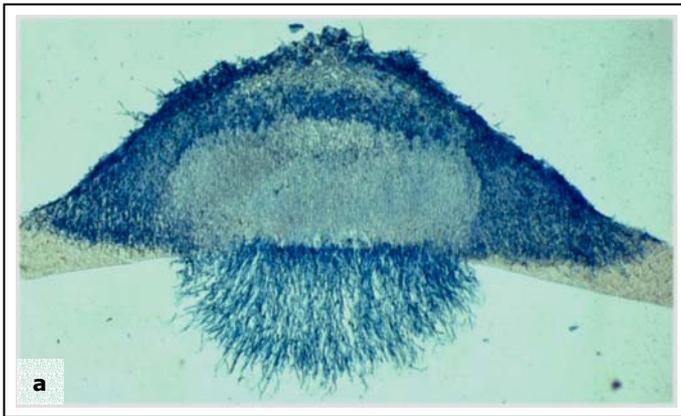


Abb. 96a, b:

Mycobiont von *X. parietina*, der über einem NAA-haltigen Medium kultiviert wurde; im Querschnitt werden verschiedene Zonen deutlich (**a**); im Deteil (**b**) zeigt sich, daß die Hyphen, die den Membranfilter (mf) durchwachsen haben, intensiv eingefärbt sind.

a: 230 µm  ; b: 15 µm 

Ältere Mycelien des Mycobionten von *X. parietina*, die sich auf NAA-freien Medien entwickelt haben, zeigen nach der Transplantation auf ein NAA-haltiges Medium ebenfalls ein stark polares Wachstum. Nach einer Vorkultur von 7 Wochen auf dem Medium MY+Rib (s. Abb. 67) war der Mycobiont auf ein MY-Agar mit dem Zusatz von NAA überführt worden. Nach einer weiteren Kulturdauer von 6 Wochen ist der Einfluß des Phytohormons deutlich zu erkennen (Abb. 97a). Das Mycel, das sich ohne den Einfluß von NAA zunächst oberhalb der Filtermembran entwickelt hatte, beginnt, den Filter intensiv zu penetrieren. Die Morphologie dieses Mycels gleicht sich der des ausschließlich auf NAA-haltigem Medium kultivierten Mycobionten an (vergl. Abb. 96a). Im Vergleich dazu dringen Mycelien, die zur Kontrolle weiterhin auf ribitolhaltigem Medien kultiviert worden waren, kaum in die Filtermembran ein (Abb. 97b).

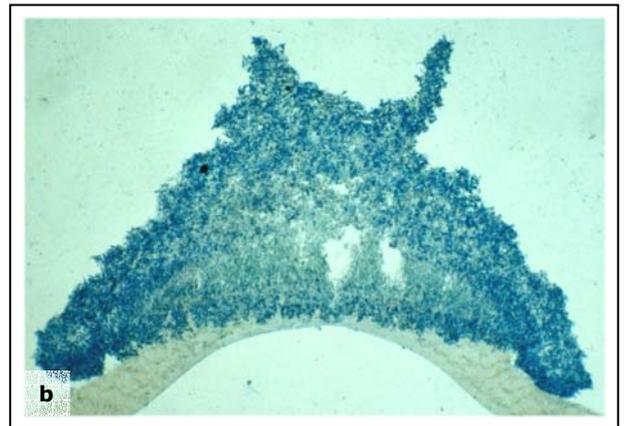
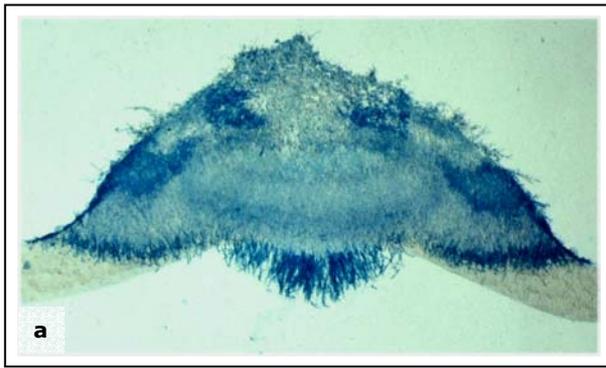


Abb. 97a, b: Mycobiont von *X. parietina*

a: Mycel, das nach einer Vorkultur auf ribitolhaltigem Medium (7 Wo.) auf ein NAA-haltiges Medium übertragen wurde (+ 6 Wo.); die Hyphen zeigen ein in das Medium gerichtetes Wachstum.

b: Mycel, das zur Kontrolle während der gesamten Kulturdauer (13 Wo.) auf ribitolhaltigem Medium gewachsen war; die Hyphen zeigen kein gerichtetes Wachstum. 240 µm

Bei den Isolaten von *Physcia tenella*, *Physconia distorta* und *Anaptychia ciliaris* führte die Zugabe von NAA ebenfalls zu einer intensiveren Penetration des Membranfilters, als es ohne die Zugabe des Phytohormons zu beobachten ist (s. Abb 70a, 100).

Außer der Polarisierung des Wachstums in Richtung Substrat bewirkt NAA bei allen Mycobionten in den ersten Entwicklungswochen eine verstärkte Ausbildung von Lufthyphen. Die Abbildung 98 zeigt Isolate von *P. tenella*, die auf MY-Agar bzw. MY+NAA sehr unterschiedliche Oberflächenstrukturen entwickeln. Zusätzlich fallen die verschiedenen Durchmesser der Hyphen auf. Durch die Zufuhr von NAA bildet der Mycobiont wesentlich feinere Hyphen aus als auf dem reinen MY-Medium.

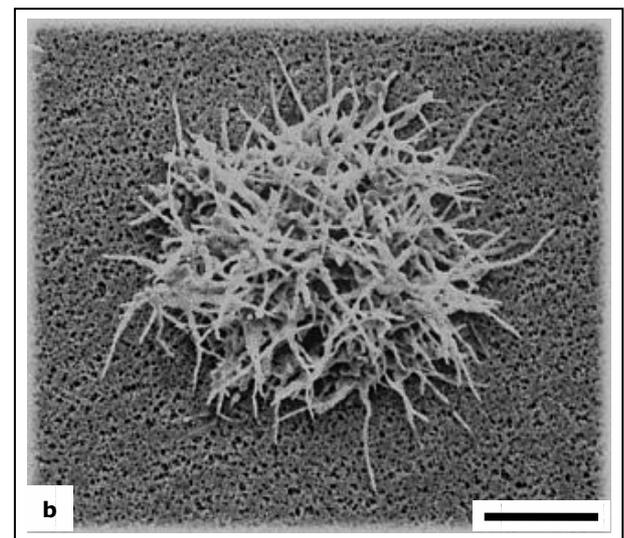
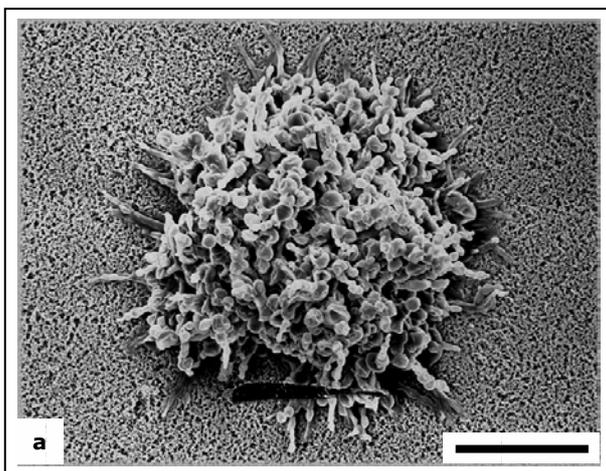


Abb. 98a, b: Mycobiont von *P. tenella*

a: Mycel, das auf einem reinen MY-Agar kultiviert wurde.

b: Mycel, das auf einem NAA-haltigem Medium kultiviert wurde und sich durch ein Luftmycel aus feinen Hyphen auszeichnet. (REM-Aufnahmen). Maßstab: 70 µm

Vergleicht man das Wachstum der Mycobionten, die sich auf dem Mineralmedium BG110 entwickelt haben, mit den auf BG110 + NAA angezogenen Mycelien, so fällt auf, daß die polysporen Keimlinge im ersten Fall nur einige wenig verzweigte Ausläufer bilden (Abb.

99a). Die Zugabe von NAA führt zu einem büschelartigen Auswachsen der Sporencluster (Abb. 99b).

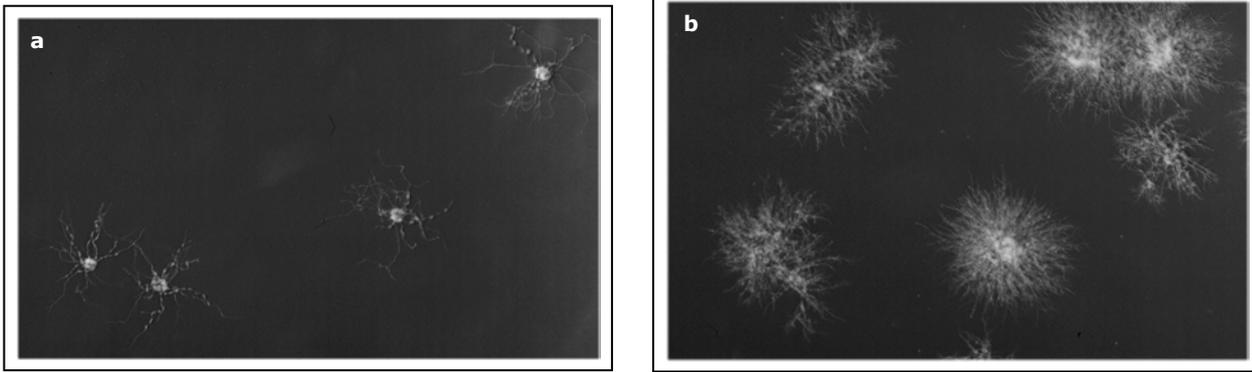


Abb. 99a, b: Mycobiont von *X. parietina*

a: Auskeimende Sporencluster auf dem reinem Mineralmedium BG110; es werden wenige, kaum verzweigte Hyphen gebildet.

b: Auskeimende Sporencluster auf dem Medium BG110 + NAA; ein büschelartiges Auswachsen der Hyphen kann beobachtet werden.

II. Kinetin

Das Phytohormon Kinetin bewirkt in der Konzentration von 0.2 % bei allen getesteten Mycobionten (*X. parietina*, *P. tenella*, *P. distorta* und *A. ciliaris*) eine Verringerung der radialen Ausbreitungsgeschwindigkeit. Nach einer definierten Kulturzeit wiesen die Mycelien, die auf einem kinetinhaltigen Medium herangezogen worden waren (z.B. MY + Kin), immer einen geringeren Radius auf als Mycelien, die sich auf dem gleichen Medium ohne Zugabe von Kinetin (z.B. MY) entwickelt hatten (s. Kap. 3.4.5). Der Einfluß von Kinetin führte auch in Kombination mit dem Phytohormon NES und mit Ribitol zu einem deutlich verringerten Wachstum der Isolate. Diese Beobachtung gilt für die ersten 2 bis 3 Kulturmonate. Später kommt es zu einer Angleichung der Myceliengröße.

Die Tendenz der Mycobionten, bei Zugabe von Kinetin in den Filter einzudringen, ist nur gering und variiert bei den einzelnen Mycelien eines Versuchsansatzes. Auch nach längerer Kulturdauer werden Cellulose-Membranfilter nicht aufgelöst.

3.2.4.3 Substanzkombinationen

Wie schon im Kapitel 3.2.4.2 beschrieben, führt Kinetin in der angewendeten Konzentration auch in Kombination mit anderen Substanzen bei allen Mycobionten zu einer Verringerung der radialen Ausdehnungsgeschwindigkeit der Mycelien. In Kombination mit NAA zeigt sich eine verringerte Tendenz aller getesteten Mycobionten, das Substrat mit Hyphen zu penetrieren (Abb. 100a, b).

Auf nährstoffreichem MY-Agar als Grundmedium zeigt NAA in Kombination mit Kohlenhydraten keinen Effekt. Bei Verwendung des Mineralagars BG110 als Ausgangsmedium kommt es zu deutlichen Unterschieden in der Morphologie der Mycelien. Vergleicht man Mycelien des Mycobionten von *X. parietina* miteinander, die auf Cellulose-Membranfilter über den Medien BG110+Rib (s. Abb. 56) bzw. BG110+Rib+NES (Abb. 101) kultiviert wurden, zeigt

sich, daß der Zusatz des Phytohormons NAA zur Bildung eines weit ausladenden Mycels führt, das nur punktuell im Substrat verankert ist. Ohne die Beimengung dieser Substanz dringt der Mycobiont bei sonst gleichen Bedingungen mit der gesamten unteren Mycelfront in den Filter ein. Wird dieser Mycobiont bei gleichem Nährmedium (BG110+Rib+NES) auf einem Durapore-Membranfilter kultiviert, penetriert der Pilz mit seiner gesamten Basis die Filtermembran nur oberflächlich (Abb. 102).

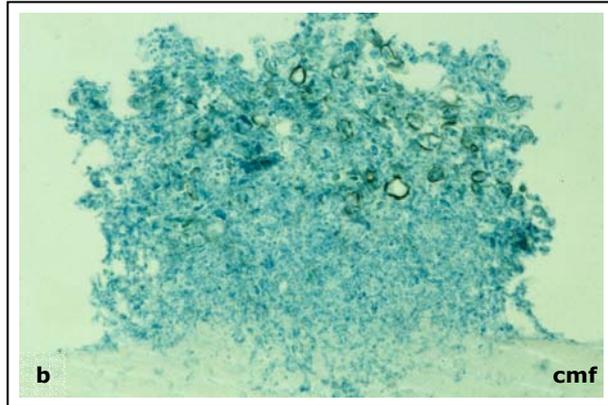
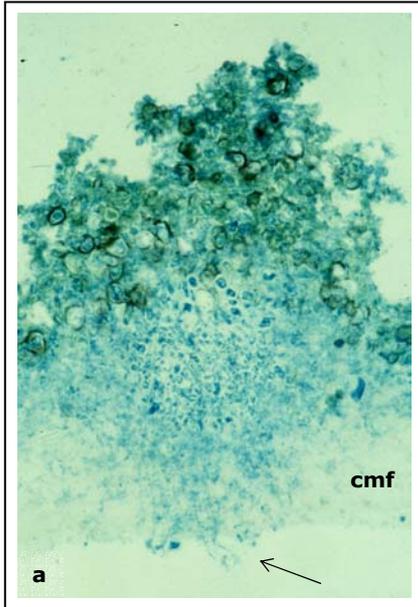


Abb. 100a, b: Mycobiont von *A. ciliaris* 170 µm
a: Das Mycel wurde über NAA-haltigem MY-Agar kultiviert; die Hyphen haben den Cellulose-Membranfilter (cmf) in der Kulturzeit von 10 Wo. vollständig durchwachsen.
b: Das Mycel wurde auf dem Medium MY+NAA+Kin kultiviert; die Hyphen haben den Membranfilter in der gleichen Kulturzeit (10 Wo.) noch nicht durchwachsen.

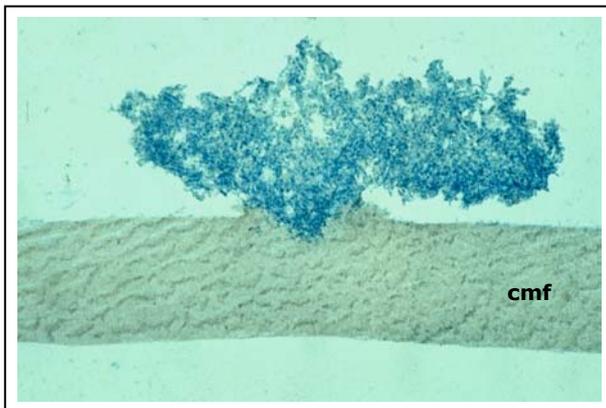


Abb. 101: 150 µm
 Mycobiont von *X. parietina*, der über dem Medium BG110+Rib+NAA kultiviert wurde; die Zufuhr von NAA führt zu einem weit ausladenden Mycel, das kaum im Cellulose-Membranfilter (cmf) verankert ist; vergl. Abb. 56.

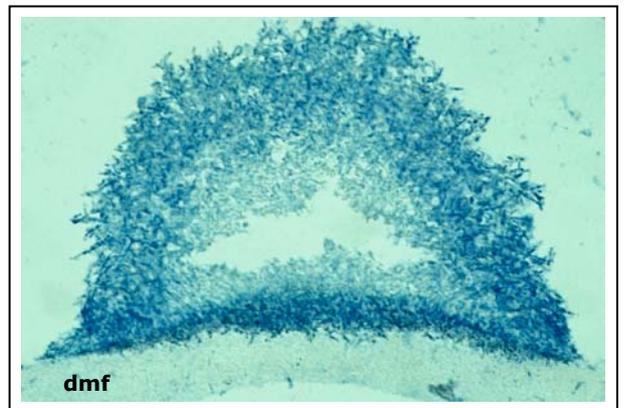


Abb. 102: 150 µm
 Mycobiont von *X. parietina*, der auf einem Durapore-Membranfilter (dmf) über dem Medium BG110+Rib+NAA kultiviert wurde; die untere Mycelfront ist in den oberen Bereich des Filters eingedrungen.

3.3 Einflüsse von Photobionten auf die Morphogenese und intrazelluläre Struktur der isolierten Mycobionten

3.3.1 Reaktion der Mycobionten auf angebotene Algen unter Laborbedingungen

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die Entwicklung der Mycobionten und ihre Reaktionen auf die Zugabe verschiedener Substanzen unter axenischen Bedingungen beschrieben. Darüber hinaus erfolgten Experimente, um den Einfluß von Algen auf isolierte Mycobionten unter definierten Laborbedingungen zu testen. Bei der Reaktion der Flechtenpilze kann, wie schon im Kapitel 3.2.1.1 beschrieben wurde, chemotropistisches Verhalten ausgeschlossen werden. Die Experimente wurden mit den isolierten und in Kultur angezogenen Mycobionten aus *Xanthoria parietina* und *Physconia distorta* durchgeführt. Beiden Mycobionten wurden sowohl die aus der jeweiligen Flechtenart isolierten Photobionten als auch Fremdalgen zugeführt.

3.3.1.1 Reaktion der Mycobionten auf ihre arteigenen Photobionten

Zunächst wurden polyspore Mycelien von *X. parietina* und *P. distorta* auf Cellulose-Membranfiltern über verschiedenen Medien (BG110, MY, MY+NAA, MY+Glu, MY+ Rib) herangezogen. Nach einer Entwicklungsdauer von 4 Wochen wurden die aus den jeweiligen Flechtenarten isolierten Grünalgen, *Trebouxia irregularis* bzw. *Trebouxia spec.*, den jungen Mycelien zugefügt. Hierfür wurden die Algen mit einer Mikropipette punktuell an eine Seite der Mycelien pipettiert, so daß zunächst nur wenige Hyphen direkten Kontakt zu den Algen hatten. Abbildung 103 zeigt den Versuchsansatz mit dem Mycobionten von *X. parietina* nach einer Kulturdauer von weiteren 7 Wochen, in der sich die Algen intensiv geteilt haben, was an der Größe der Cluster deutlich wird. Der den Algen abgewandte Bereich des Mycels hat unverändert seine Ausbreitungsrichtung beibehalten, d.h. die Mycelfront hat sich hier gleichmäßig weiterentwickelt. Lufthyphen im Zentrum des Mycels haben im Kontakt mit den Algenzellen Appressorien ausgebildet (Abb. 104). In Querschnitten wird der morphogenetische Einfluß, den die Algen auf die Mycelien ausüben, deutlich. Hierbei ist die Reaktion der Mycobionten offen-

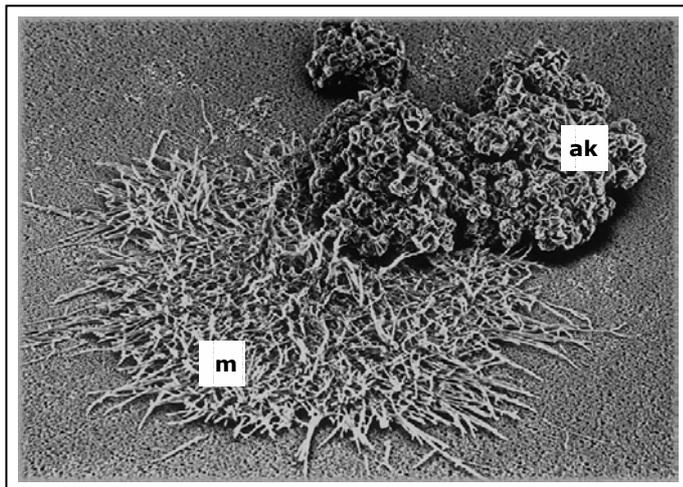


Abb. 103: Mycel des Mycobionten von *X. parietina*, dem die arteigene Alge *Trebouxia impressa* zugeführt wurde; das Mycel (m) hat sich weiter auf dem Membranfilter ausgebreitet, und die Algenzellen haben Kolonien (ak) gebildet. (Durch die Präparation für das REM sind die Algenzellen kollabiert.)

130 µm

sichtlich, wenn der Versuch auf einem Substrat durchgeführt wird, das ein stark polares Wachstum der Mycelien hervorruft, z.B. MY+NAA (s. Kap. 3.2.4.2). Mycobionten, die auf NAA-haltigem Medium kultiviert werden, dringen normalerweise gleichmäßig in den Membranfilter ein und bilden symmetrische Mycelien (s. Abb. 53 u. 97). Der Einfluß der Algen bewirkt eine Wachstumsänderung an der den Algen zugewandten Seite des Mycels (Abb. 105). Die Pilzhyphe

umgeben die Algen mit einem Geflecht, dringen teilweise in die Algenzellen ein (Abb. 106a, b), und der Filter wird in diesem Bereich kaum noch penetriert. Dieses Verhalten überträgt sich jedoch nicht auf das gesamte Mycel, sondern wirkt sich nur in den Kontakt-bereichen der beiden Symbiosepartner aus. Dadurch entsteht ein asymmetrisches Mycel (Abb. 105).

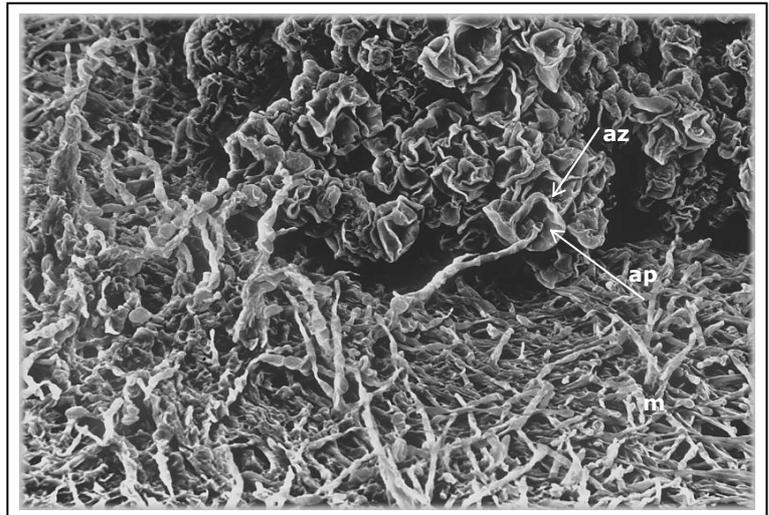


Abb. 104: Mycel des Mycobionten von *X. parietina*, dem die arteigene Alge *Trebouxia impressa* zugeführt wurde; Lufthyphen des Mycobionten (m) bilden im Kontakt mit den Algenzellen (az) Appressorien (ap) aus. (Durch die Präparation für das REM sind die Algenzellen kollabiert.) 40 µm

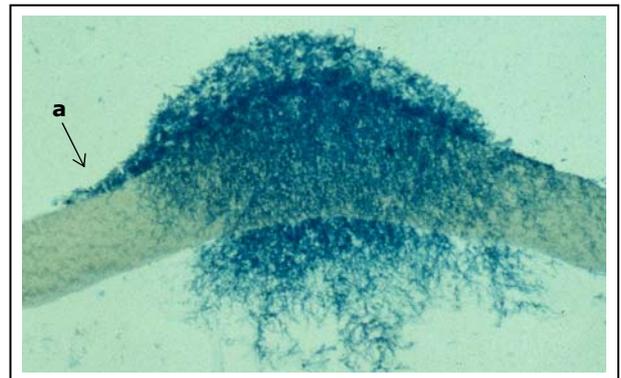


Abb. 105: Querschnitt eines Mycels des Mycobionten von *X. parietina*, das auf dem Medium MY+NAA kultiviert und dem nach einer Kulturdauer von 4 Wo. die arteigene Alge *Trebouxia impressa* zugeführt wurde (s. Abb. 103); die den Algen (a) zugewandte Seite des Mycels wächst nicht weiter in den Membranfilter. 220 µm

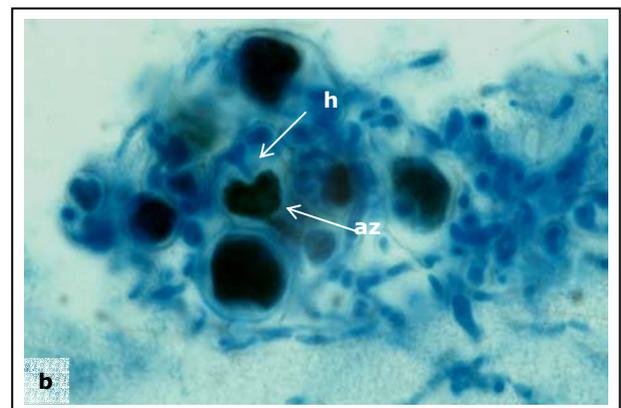
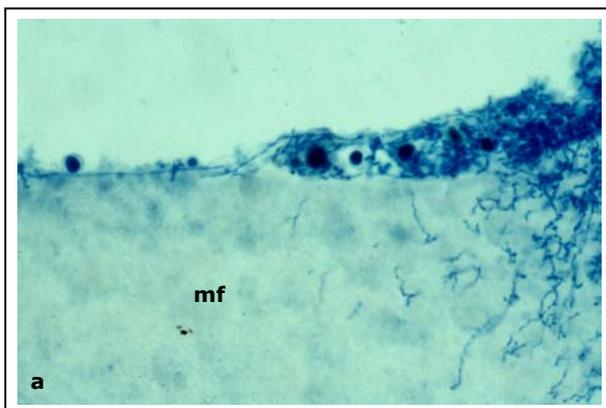


Abb. 106a, b: (Details v. Abb. 105) 60 µm **a:** Die Pilzhyphe reagieren auf ihre arteigenen Algen und breiten sich nicht weiter im Membranfilter (mf) aus. 15 µm **b:** Die Algenzellen werden von einem dichten Hyphengeflecht umgeben; Hyphenspitzen (h) dringen in die Algenzellen (az) ein.

Die Reaktion der Mycobionten von *X. parietina* und *P. distorta* auf ihre arteigenen Photobionten *Trebouxia irregularis* und *Trebouxia spec.* ist vergleichbar und kann auf allen verwendeten Kulturmedien unabhängig vom Nährstoffgehalt beobachtet werden.

Die Algen üben offensichtlich einen Einfluß auf die Entwicklung des Mycobionten aus, obwohl die Bedingungen mit z.T. hohem Nährstoffgehalt und permanenter Feuchtigkeit nicht für eine Relichenisierung geeignet sind.

3.3.1.2 Algenspezifität

Werden den Mycobionten von *X. parietina* und *P. distorta* die Photobionten einer anderen Flechtenart zugeführt, kann ebenfalls eine Wachstumsänderung der Pilzhyphen beobachtet werden. Auf nährstoffreichem Medium ist der Einfluß der Fremdalgen kaum von dem der arteigenen Algen zu unterscheiden. Auf einem reinen Mineralmedium (BG110) wird hingegen eine Abstufung in der Intensität deutlich. Die Abbildung 107 zeigt den Mycobionten von *P. distorta*, der zusammen mit der Alge *T. spec.*, isoliert aus dem Flechtenthallus von *P. distorta*, auf dem Mineralmedium BG110 kultiviert wurde. Anders als in ihrem normalen Verhalten sind die Pilzhyphen auf dem nährstoffarmen Medium (s. Abb. 30), nicht in den Filter eingedrungen. Das Mycel hat sich im Kontakt mit den Algen (Abb. 108) nur auf der Oberfläche der Membran ausgebreitet. Im Gegensatz dazu nimmt der Mycobiont mit der Fremdalge *T. spec.*, isoliert aus der Flechte *Parmelia saxatilis*, zwar ebenfalls Kontakt auf, dringt jedoch auch gleichzeitig in den Membranfilter ein (Abb. 109).

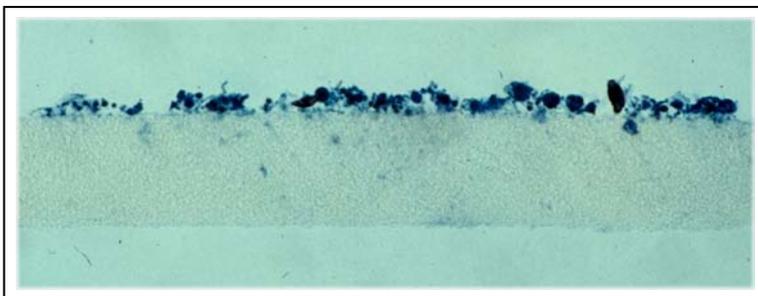


Abb. 107: 100 µm 
Mycobiont von *P. distorta*; das Mycel wurde zusammen mit dem arteigenen Photobionten auf einem Cellulose-Membranfilter über dem reinen Mineralmedium (BG110) kultiviert und ist nicht in die Filtermembran eingedrungen; auf der Filteroberfläche ist ein Algen-Pilz-Geflecht entstanden.

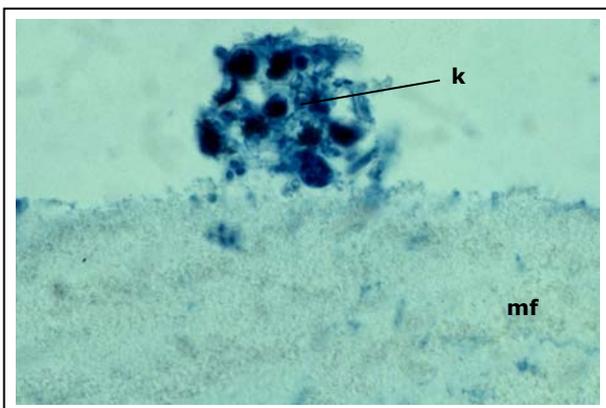


Abb. 108: 100 µm 
Der Mycobiont von *P. distorta* bildet zusammen mit dem arteigenen Photobionten ein Konglomerat (k) und penetriert nicht den Membranfilter (mf) (s. Abb. 107).

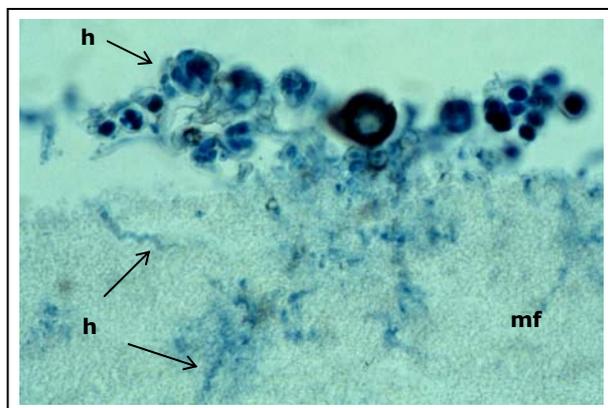


Abb. 109: 100 µm 
Mycobiont von *P. distorta*, dem eine Fremdalge zugeführt wurde; Hyphen (h) haben Kontakt zu den Algen und sind in den Membranfilter (mf) eingewachsen.

3.3.2 Ultrastruktur: concentric codies

In der Ultrastruktur unterscheiden sich lichenisierte von unlichenisierten Mycobionten durch das Vorhandensein proteinhaltiger Zellorganellen, der concentric bodies (Abb. 110), deren Funktion unbekannt ist. In axenisch wachsenden Mycobionten konnten diese Zellorganellen bis auf eine Ausnahme (Jacobs & Ahmadjian 1971) noch nie nachgewiesen werden. Ich habe die Mycobionten von *Xanthoria parietina*, *Physcia tenella*, *Physconia distorta* und *Anaptychia ciliaris* auf das Vorhandensein der Proteinkörper untersucht. Sie konnten jedoch auch in diesen Isolaten nicht gefunden werden.

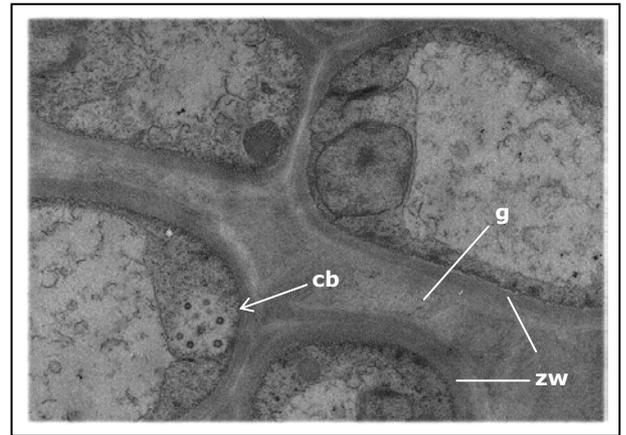


Abb. 110: 1,5 µm 
 Ultradünnschnitt der Flechte *P. tenella*; concentric bodies (cb) sind in typischer Weise zu mehreren in den Hyphen gruppiert; Hyphenzellwand (zw), Gallerte (g); (TEM-Aufnahme).

Die Krustenflechte *Rhizocarpon geographicum* bildet mit der Grünalge *Trebouxia spec.* einen Thallus aus Areolen, dem ein algenfreier Bereich vorgelagert ist. Dieser Prothallus ist in der Lage, mit freien Algen zu lichenisieren, d.h. neue Areolen zu bilden.

Meine Untersuchungen der Ultrastruktur ergaben, daß nicht nur der Thallus (ASCASO & GALVAN 1975) (Abb. 111), sondern auch der algenfreie Prothallus concentric bodies enthält (Abb. 112), obwohl ein deutlicher Abstand zum algenfreien Bereich besteht. Daraus ergibt sich die Frage, ob der Mycobiont dieser Flechte in Abweichung von den anderen Isolaten auch im unlichenisierten Zustand über die charakteristischen Zellorganellen verfügt. Leider hat kein Versuch, diesen Mycobionten zu isolieren zu einem Erfolg geführt. Versuche, netzartige Mycelien, die aus keimenden Ascosporen dieser Flechte im natürlichen Habitat hervorgegangen waren, für die elektronenmikroskopische Untersuchungen zu präparieren,

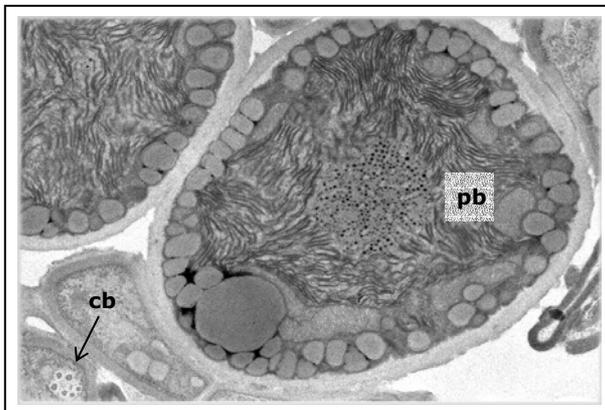


Abb. 111: 4 µm 
 Ultradünnschnitt einer Areole von *Rhizocarpon geographicum*; concentric bodies (cb) sind in einer Hyphe des lichenisierten Mycobionten gruppiert; pb: Photobiont; (TEM-Aufnahme).

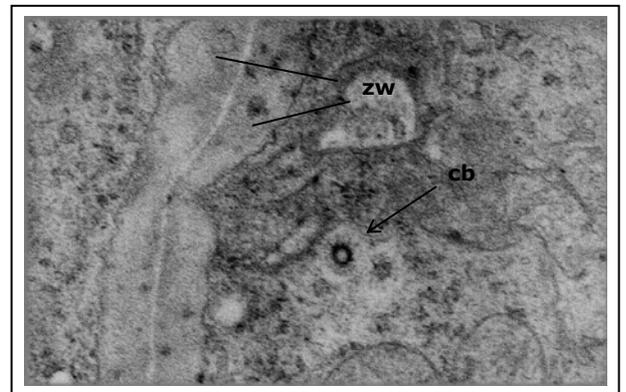


Abb. 112: 0,75 µm 
 Ultradünnschnitt des algenfreien Prothallus von *R. geographicum*; in den als nicht-lichenisiert geltenden Pilzhyphen befinden sich concentric bodies (cb); zw: Zellwand; (TEM-Aufnahme).

scheiterten daran, daß die einzelnen dunkel inkrustierten Hyphen so fest auf der Gesteinsoberfläche haften, daß sie nicht unbeschädigt isoliert werden konnten. Kulturversuche mit Ascosporen blieben ebenfalls erfolglos (s. Kap. 3.1.2).

Da die Möglichkeit diskutiert wird, daß concentric bodies bei Flechten durch Austrocknung entstehen (HONEGGER 1995), die ein essentieller Bestandteil der Lebensbedingungen dieser Symbioseorganismen ist, wurden die Mycobionten von *X. parietina* und *P. tenella* über einen Zeitraum von 2 Monaten einem Feucht-Trocken-Rhythmus unterzogen. Auch nach dieser Behandlung konnten keine concentric bodies in den Mycobionten nachgewiesen werden.

3.4 Überleben unlichenisierter Mycobionten am natürlichen Standort und Möglichkeiten der Relichenisierung

Alle aus der Literatur bekannten Kulturversuche mit isolierten Mycobionten wurden unter Laborbedingungen durchgeführt. Es gibt bisher keine Untersuchungen über das Verhalten bzw. die Überlebensfähigkeit von isolierten Mycobionten unter natürlichen Bedingungen im Freiland. Im Verlauf der von mir durchgeführten Untersuchungen wurden zum ersten Mal im Labor kultivierte Mycobionten in das natürliche Habitat der Flechten transplantiert.

In der einjährigen Anzuchtphase waren die Pilzisolat von *Physcia tenella*, *Physconia distorta*, *Anaptychia ciliaris* und *Xanthoria parietina* auf Membranfiltern (Durapore bzw. Cellulose) auf verschiedenen Nährmedien im Labor kultiviert worden. Nach diesem Zeitraum erfolgte die Transplantation der Mycelien, die sich in den Filtermembranen verankert hatten, auf die Äste einer Eiche (*Quercus robur*) (Abb. 113). Die Proben wurden für ein weiteres Jahr den natürlichen Bedingungen im Freiland ausgesetzt. In diesem Zeitraum konnten zusätzlich interessante Beobachtungen auch an den Membranfiltern gemacht werden.

3.4.1 Charakterisierung des Standortes

Die ca. 30 Jahre alte Eiche steht auf der Süd-Ost-Seite eines Gebäudes der Universität Düsseldorf, das den Baum vom frühen Nachmittag an beschattet. Die Membranfilter wurden in ca. 3-4 m Höhe auf der Oberseite von Ästen mit einem Silikonkleber befestigt (Abb. 114). Die Zweige der Eiche sind reichlich mit den Flechten *Physcia tenella*, *Parmelia sulcata* und *Parmelia elegantula* sowie einiger Thalli der Arten *Hypogymnia physodes* und *Evernia prunastri* bewachsen. Adulte Thalli von *Xanthoria parietina* sind nicht zu beobachten; sie finden sich jedoch auf anderen Bäumen und Sträuchern in unmittelbarer Nähe des Standortes.



Abb. 113: Standort der Eiche (*Quercus robur*), auf die isolierte Mycobionten transplantiert wurden.

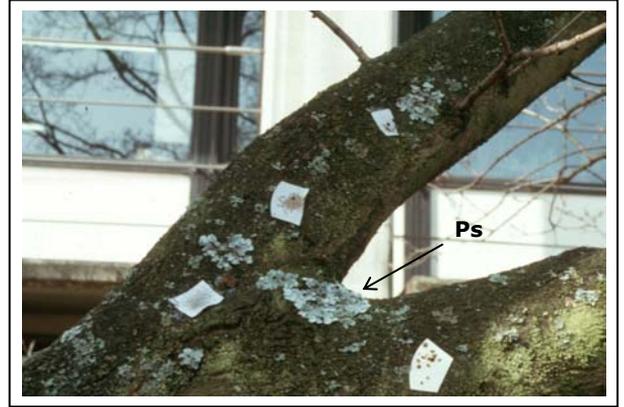


Abb. 114: Versuchsaufbau; verschiedene Mycobionten wurden mit Stücken der Membranfilter (3-5 cm²) auf die Äste der Eiche transplantiert; einige Thalli der Flechte *Parmelia sulcata* (Ps) sind zu erkennen.

Die Rinde des Baumes ist dicht von fädigen Cyanobakterien, frei lebenden Chlorophyta und Flechtenprimordien überwachsen (Abb. 115). Orange-gelbe Primordien mit kristalliner Oberfläche bilden in einigen Fällen Soredien (Abb. 116a, b), können aber nicht einer bestimmten Flechtenart zugeordnet werden.

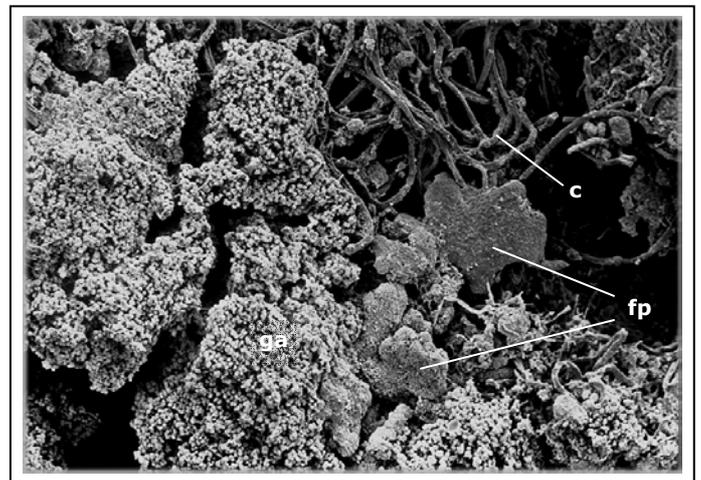


Abb. 115: Mikroflora auf der Eichenrinde; c: filamentöse Cyanobakterien, fp: Flechtenprimordien, ga: freie Grünalgen; (REM-Aufnahme). 240 µm

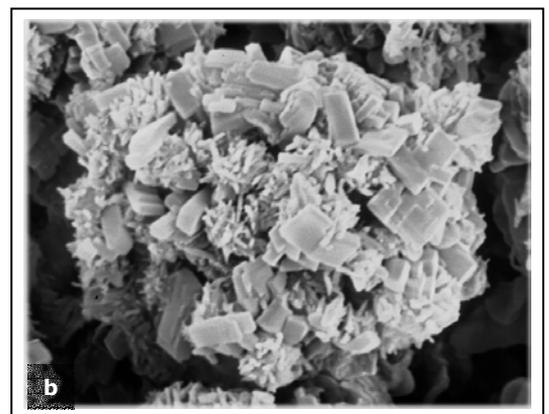
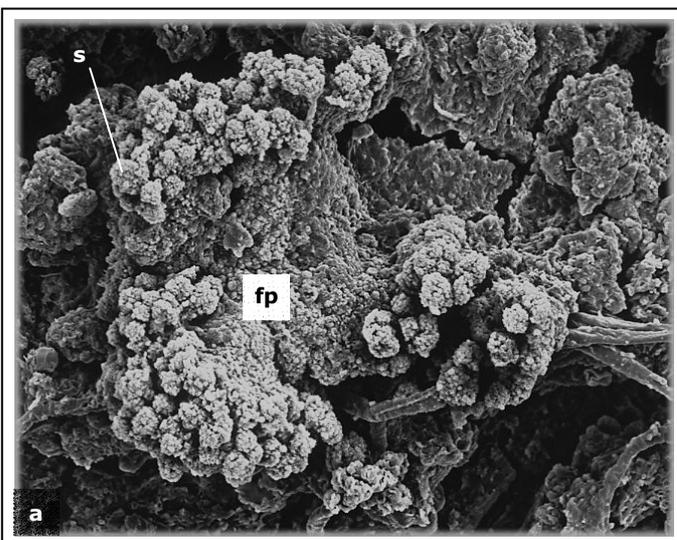


Abb. 116a, b: Flechtenprimordium (a: fp), dessen Soredien (s) gelbliche, kristalline Auflagerungen aufweisen (b); (REM-Aufnahme). a: 120 µm ; b: 8,5 µm

Die jungen Entwicklungsstadien der Flechten *P. tenella* und *P. sulcata* können schon sehr früh an artspezifischen morphologischen Besonderheiten identifiziert werden (SCHUSTER & JAHNS 85; OTT 1987c). Diese Tatsache ist für die Auswertung des Experiments von besonderer Bedeutung. Primordien von *P. tenella* sind durch ihre unebene Oberfläche und die Bildung von Rhizinen in einer sehr frühen Phase ihrer Entwicklung charakterisiert (Abb. 117). Im Gegensatz dazu zeichnen sich Primordien von *P. sulcata* durch ihre verhältnismäßig glatte Oberfläche und die für die gesamte Gattung charakteristischen Porenfelder in den Randbereichen aus (Abb. 118). Aus diesen Aufbrüchen entwickeln sich im adulten Thallus häufig Sorale als vegetative Reproduktionsstrukturen. Anatomisch unterscheidet sich *P. sulcata* von *P. tenella* u.a. im Aufbau der unteren Rinde.

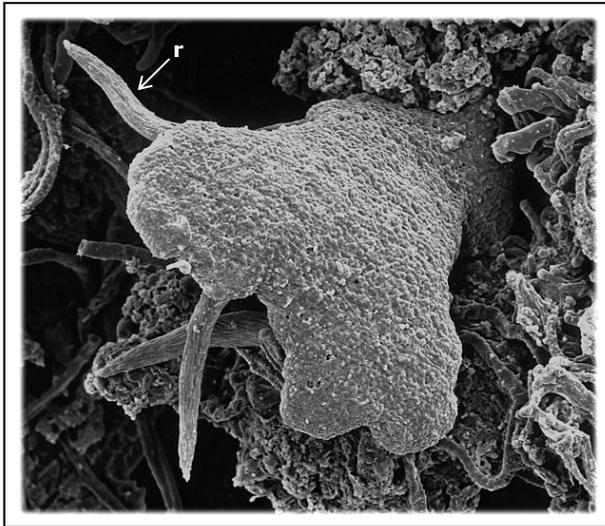


Abb. 117: Junge Lobe von *P. tenella*, die durch Rhizinenbildung in einem sehr frühen Entwicklungsstadium und die unebene Oberfläche charakterisiert ist; r: Rhizine; (REM-Aufnahme).

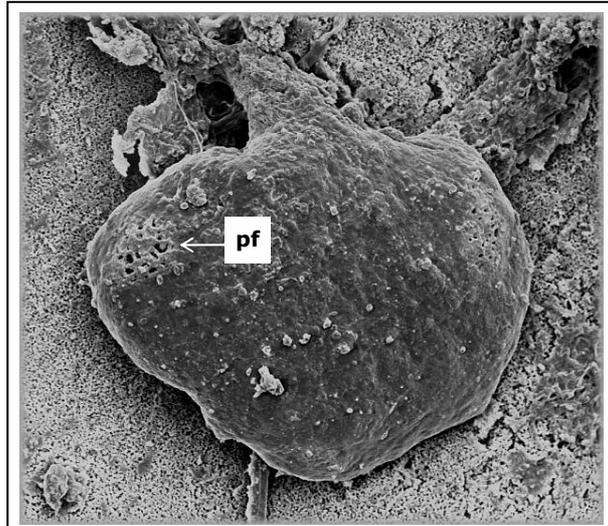


Abb. 118: Junge Lobe von *P. sulcata*; die relativ glatte Oberfläche ist von charakteristischen Porenfeldern (pf) durchbrochen; (REM-Aufnahme).

3.4.2 Beobachtungen nach 1 Jahr

Im Verlauf des Beobachtungszeitraums von einem Jahr hat die Flechtenvegetation zugenommen. Insbesondere juvenile Loben von *P. tenella* haben sich auf der Baumrinde stark ausgebreitet. Von den 13 ausgebrachten Proben waren nach einem Jahr noch 10 vorhanden. Von jedem Mycobionten wurden mindestens 2 Proben ausgewertet.

Die aus Cellulose bestehenden Filtermembranen dienen verschiedenen Flechtenprimordien vom natürlichem Standort als Substrat, auf und in dem sie sich mit auswachsenden Hyphen verankern. Frei lebende Algen siedeln sich ebenfalls auf den Filtermembranen an (Abb. 119). Die Abbildung 120 zeigt ein Primordium mit feinen auswachsenden Hyphen an der Basis. Die Oberfläche ist

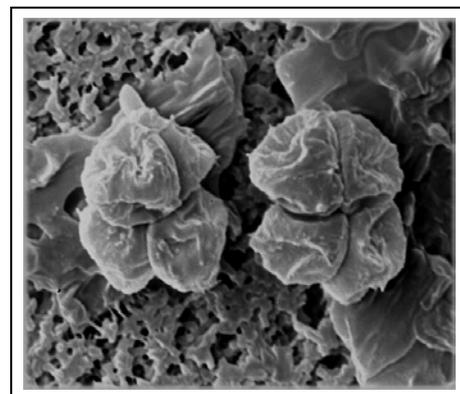


Abb. 119: Algentetraden auf einem Membranfilter; (REM-Aufnahme).

durch kristalline Auflagerungen gelb gefärbt. Dies läßt vermuten, daß es sich um ein Vorstadium einer *Xanthoria*-Art handelt (vergl. Abb. 116a, b).

Einige Primordien haben sich zu jungen Flechtenloben ausdifferenziert, die eindeutig einer Flechtenart zugeordnet werden können. Abbildung 121 zeigt einen Thallusquerschnitt von *P. tenella*. Die kleine Lobe ist mit feinen Hyphen in die Cellulose-Filtermembran eingedrungen und zeigt den Ansatz einer Rhizine. Eine zweite Flechtenart, die sich auf der Filtermembran etabliert

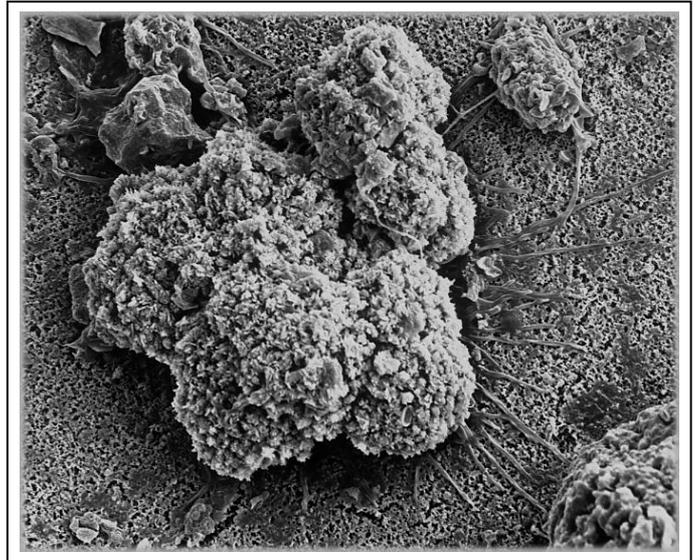


Abb. 120: 50 µm 
Flechtenprimordium auf einem Membranfilter; seine unregelmäßige Oberfläche zeigt kristalline Auflagerungen (s. Abb. 116b); von der Basis des Primordiums wachsen Hyphen aus; (REM-Aufnahme).

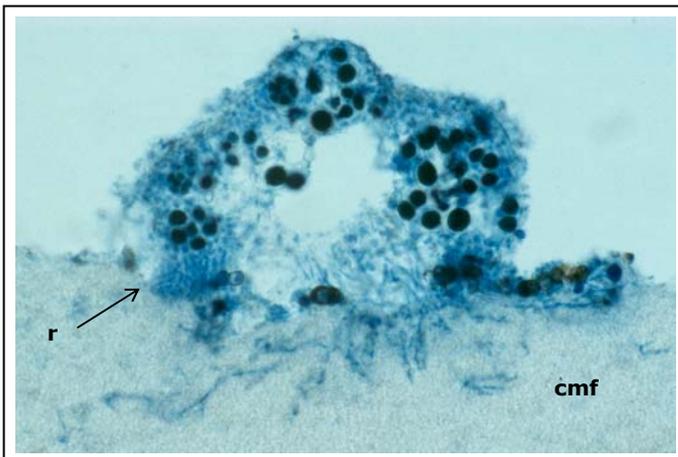


Abb. 121: 60 µm 
Querschnitt einer jungen Lobe von *P. tenella*, die sich auf einem Cellulose-Membranfilter (cmf) angesiedelt und mit feinen Hyphen darin verankert hat; der Ansatz einer Rhizine (r) ist zu erkennen.

hat, ist *P. sulcata* (Abb. 122). Auch diese junge Lobe ist mit feinen Hyphen im Substrat verankert. Die thallusumschließende Rinde ist bei der Präparation aufgefaltet worden. Im Gegensatz dazu haben sich auf den Durapore-Membranfiltern keine jungen Flechten angesiedelt.

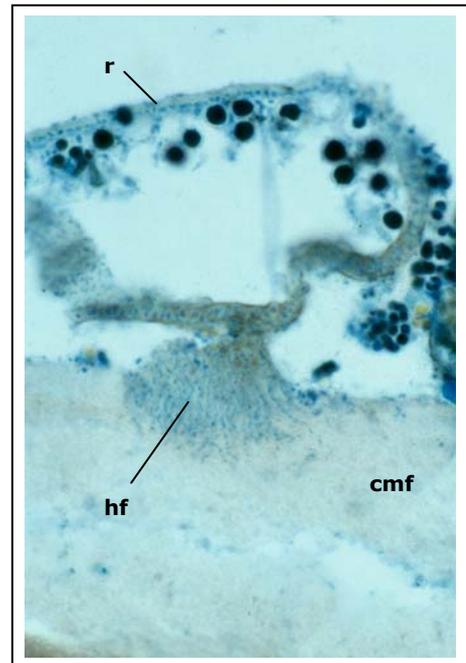


Abb. 122: 60 µm 
Querschnitt einer jungen Lobe von *P. sulcata*; der kleine Thallus ist mit einem Haftfuß (hf) in der Filtermembran (cmf) verankert; die Rinde (r) ist durch die Präparation beschädigt.

Vor der Transplantation in das Freiland befanden sich auf den Membranfiltern Mycelien von unterschiedlicher Größe (ca. 1-7 mm). Nach einjähriger Kultur unter Freilandbedingungen sind nur noch kleinere Mycelien (< 3 mm) vorhanden, an denen makroskopisch kein Wachs-

tum und keine Differenzierung beobachtet werden kann (Abb. 123a, b). Mikroskopische Untersuchungen zeigen jedoch, besonders an dem Isolat von *P. tenella*, vielfältige Veränderungen.

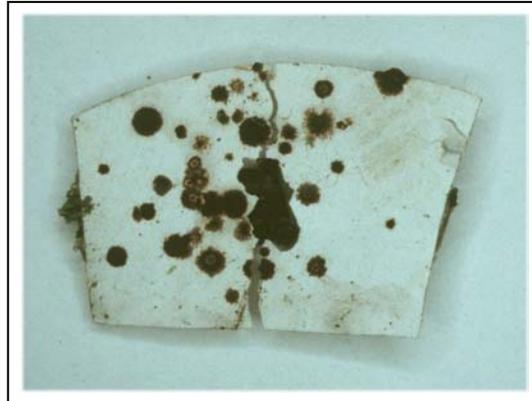


Abb. 123a, b: Membranfilter (ca. 2x1,7 cm) mit dem Mycobionten von *P. distorta*; **a:** Probe direkt nach der Transplantation auf die Rinde der Eiche; **b:** Probe nach der Kulturzeit von einem Jahr.

3.4.3 Beobachtungen am Mycobionten von *Physcia tenella*

Der Mycobiont von *P. tenella* hat sich vor der Transplantation unter Laborbedingungen zu dem typischen, locker strukturierten Mycel entwickelt (Abb. 69 u. 124). Nach der Freilandkultur finden sich auf der Oberfläche des Mycobionten eine Vielzahl von Primordien, von denen die meisten an ihrem unebenen Cortex und den charakteristischen Rhizinen als *P. tenella* identifiziert werden können (Abb. 125). Zum Teil sind diese Thalli tief in den Mycobionten eingesenkt. Zusätzlich haben sich kleine Loben von *P. sulcata* angesiedelt, die an der glatten, z.T. durchbrochenen Rinde zu erkennen sind (s. Abb. 118).

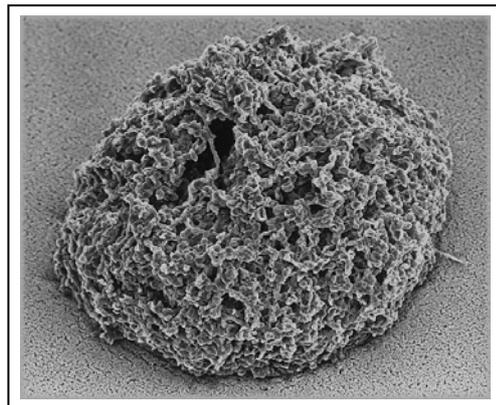


Abb. 124: Mycobiont von *P. tenella* auf einem Membranfilter vor der Transplantation in das Freiland; die Oberfläche des Mycels ist zerklüftet; (REM-Aufnahme). 130 µm

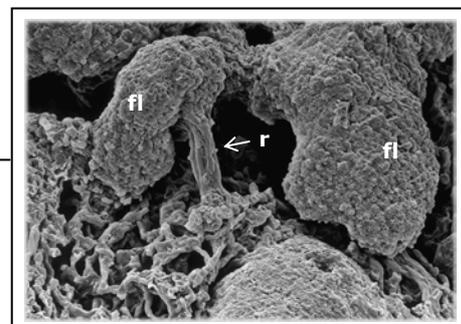
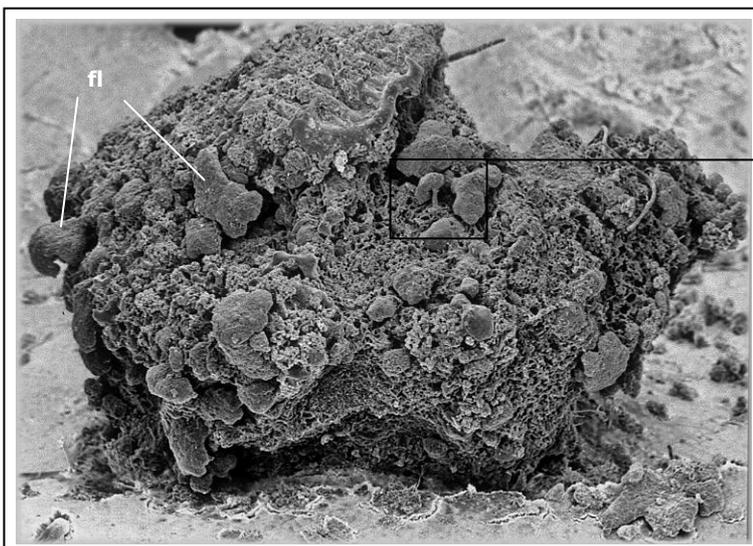


Abb. 125: Mycobiont von *P. tenella* nach der Freilandkultur; auf dem Mycel haben sich viele kleine Flechtenloben (fl) entwickelt, unter denen sich auch junge Loben der Flechte *P. tenella* befinden (s. Detail); r: Rhizine; (REM-Aufnahme). 300 µm

Querschnitte dieser Mycelien zeigen ein sehr komplexes Bild der anatomischen Struktur (Abb. 126): Der Mycobiont hat seine lockere Struktur beibehalten. Die z.T. intensive Färbung durch Lactoglycerin-Baumwollblau weist auf Wachstumsaktivität hin. Auf der Oberfläche des Myceliums liegen Soredien unbekannter Herkunft und Algen z.T. lose auf. Flechtenprimordien haben sich angesiedelt, und auf der Spitze des Mycels hat sich ein kleiner Thallus von *P. tenella* entwickelt. Innerhalb der Mycelien können vereinzelt Hyphen mit concentric bodies, den charakteristischen Zellorganellen lichenisierter Mycobionten, gefunden werden (s. Kap. 3.3.2).

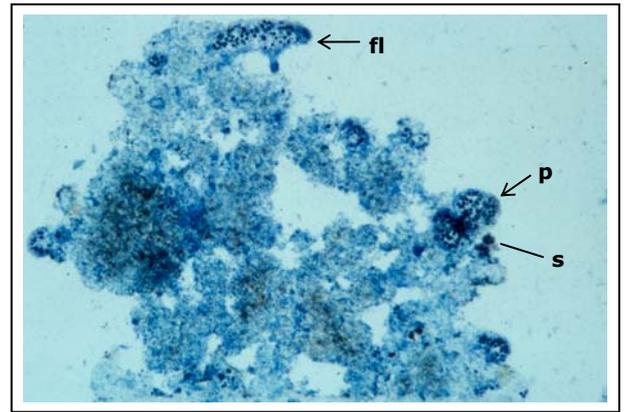


Abb. 126: Querschnitt eines Mycobionten von *P. tenella* nach der Freilandkultur; in der Übersicht sind auf der Oberfläche des Mycels einige Soredien (s), Primordien (p) und ein junger Thallus (fl) von *P. tenella* zu sehen. 90 µm

Bei einer eingehenden Analyse werden drei verschiedene Entwicklungsprozesse offensichtlich:

I. Der Mycobiont von *P. tenella* wird von Soredien der gleichen Art besiedelt.

Der Standort ist dicht besiedelt von der sorediösen Flechte *P. tenella*, deren Soredien durch Wind oder Wasser verbreitet werden. Abbildung 127 zeigt den Querschnitt einer allseitig berindeten Soredie, die auf die Oberfläche des Mycobionten von *P. tenella* gelangt ist. Im Inneren der Diaspore erkennt man Teilungsstadien von Algen. Im weiteren Verlauf der Entwicklung können sich die Soredien mit auswachsenden Hyphen in dem Mycobionten verankern, wobei sie tief in das Mycel eindringen (Abb. 128). Gleichzeitig wird die Berindung der Soredie in diesem Bereich destrukturiert.

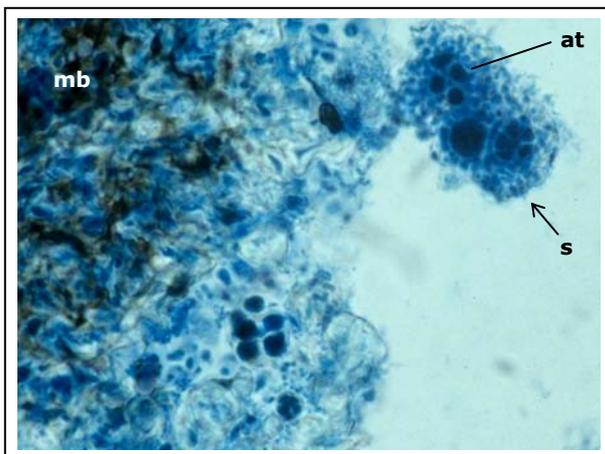


Abb. 127: Querschnitt eines Mycels (mb) von *P. tenella*, auf dessen Oberfläche sich eine Soredie (s) befindet; innerhalb der berindeten Diaspore sind Teilungsstadien von Algen (at) zu sehen. 30 µm

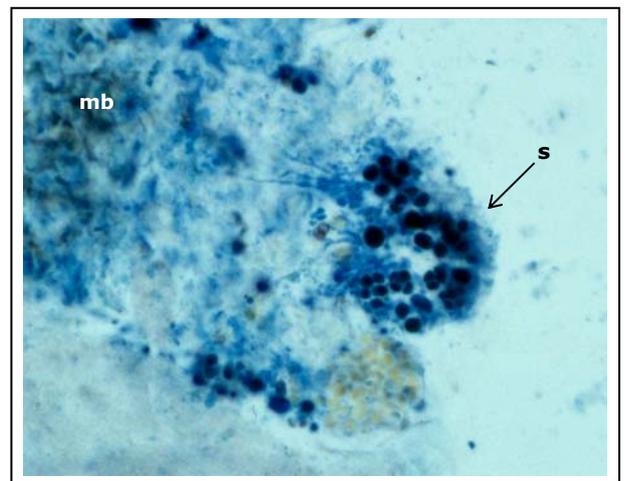


Abb. 128: Querschnitt eines Mycels (mb) von *P. tenella*; eine Soredie (s) hat sich mit feinen Hyphen im Mycel verankert; im Kontaktbereich ist die Berindung der Diaspore destrukturiert. 35 µm

Gleichzeitig vermehren sich die Algen innerhalb der Soredie. Die Differenzierung eines Cortex und einer Algenschicht initiiert die Entwicklung einer kleinen Lobe (Abb. 129). An der Ausbildung einer Rhizine in einem sehr frühen Entwicklungsstadium kann der kleine Thallus eindeutig als *P. tenella* identifiziert werden. Abbildung 130 zeigt einen solchen Thallus mit oberem Cortex, Algenschicht und locker strukturiertem Mark, von dem eine Rhizine aus parallel angeordneten Hyphen gebildet wird. In der Spitze der Lobe finden sich zahlreiche kleine Algen, ein Zeichen für eine intensive Teilungsaktivität des Photobionten. Es fällt auf, daß sich die junge Lobe im Verlauf der Entwicklung tief im Mycobionten verankert hat.

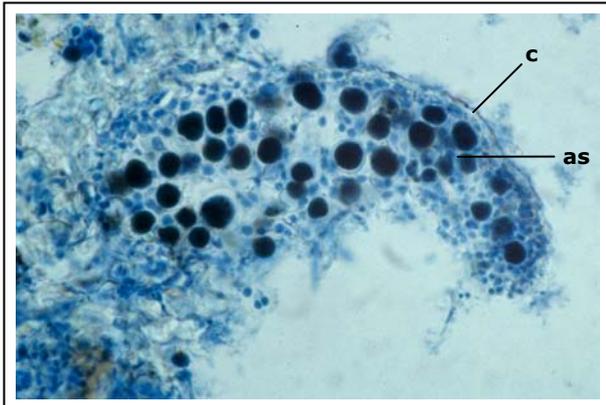


Abb. 129: Querschnitt eines Flechtenprimordiums, das sich auf dem Mycobionten von *P. tenella* gebildet hat; Cortex (c) und Algenschicht (as) beginnen sich auszubilden. 35 µm

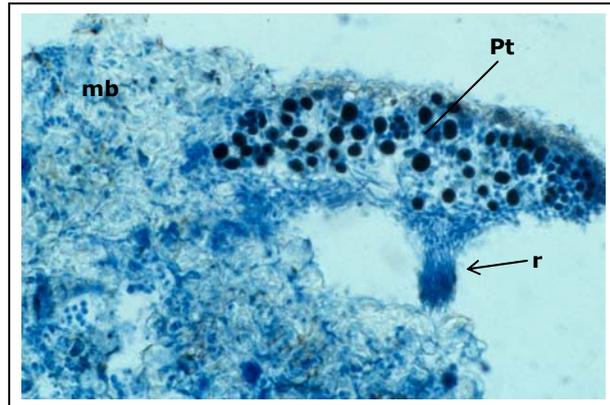


Abb. 130: Querschnitt einer jungen Flechtenlobe, die tief in dem Mycobionten (mb) von *P. tenella* verankert ist; durch die Rhizine (r) kann der Thallus eindeutig als *P. tenella* (Pt) identifiziert werden. 70 µm

II. Es finden Interaktionen des Mycobionten mit frei lebenden Algen statt.

Die Zweige der Eiche sind dicht bedeckt mit coccalen Grünalgen. In diesen Konglomeraten ist sehr wahrscheinlich auch der Photobiont von *P. tenella*, die Art *Trebouxia impressa*, zu finden, da die Algen aus abgestorbenen oder degenerierenden Thalli freigesetzt werden können.

Die freien Grünalgen geraten wie die Soredien in Kontakt mit Hyphen des transplantierten Mycobionten. Gelangen diese Algen in die Spalten des locker strukturierten Mycels, können dort interne Wachstumsprozesse initiiert werden. Abbildung 131 zeigt einen Mycelquerschnitt des Mycobionten von *P. tenella*, in dem eine Algentetrade von kurzelligen, stark angefärbten Hyphen umgeben ist. Auf der Oberfläche der Isolate wachsen Pilzhypen in Algenansammlungen hinein und verzweigen sich in Richtung einzelner Algen (Abb. 132a, b).

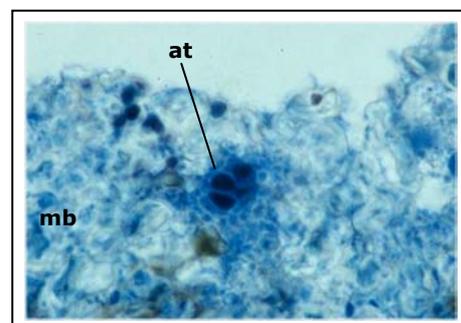


Abb. 131: Algentetrade (at) innerhalb eines Mycels des Mycobionten (mb) von *P. tenella*; die Algenzellen sind von teilungsaktiven Hyphen umgeben. 45 µm

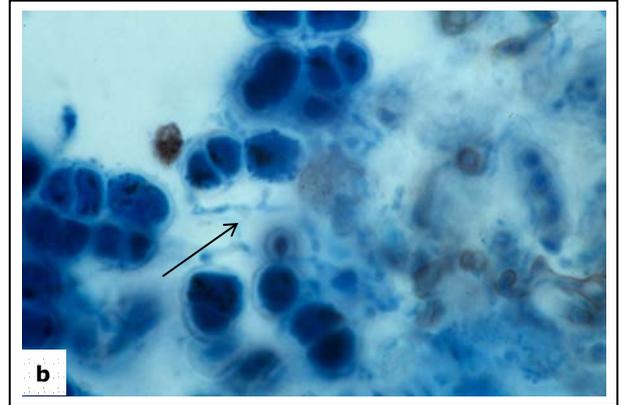
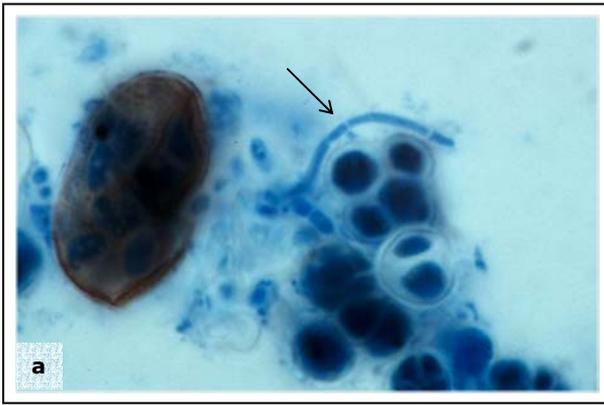


Abb. 132a, b:

15 µm 

In den Randbereichen der Mycelien des Mycobionten von *P. tenella* wachsen Hyphen in Algenansammlungen hinein und bilden Verzweigungen in Richtung der Algenzellen.

Im Gegensatz zu Fremdalgen regt der spezifische Photobiont von *P. tenella* offensichtlich symbiotische Wachstumsprozesse an. Abbildung 133 zeigt einen Mycobionten, an dessen Oberfläche feine Hyphen mit freien Algen reagieren. Die Hyphen verzweigen sich und bilden eine dünne Hyphenschicht über den Algen aus, so daß diese in das Mycel inkorporiert werden (Abb. 134). In diesen so entstandenen Primordien findet Algenteilung statt, und durch weiteres Wachstum hebt sich das Primordium über die Oberfläche des Mycels hinaus (Abb. 135a). Die Ausdifferenzierung einer Rinden- und Algenschicht führt auch hier zur Bildung einer kleinen Lobe, die als *P. tenella* identifiziert werden kann, auch wenn sie noch keine Rhizine hervorgebracht hat (Abb. 136b).

Das Primordium und der Mycobiont bilden vom Anbeginn der Morphogenese eine Einheit. Dieser Ablauf der Entwicklung ist deutlich zu unterscheiden von der sekundären Fusion des Mycobionten mit Soredien der gleichen Art (vergl. Abb. 128 u. 134).

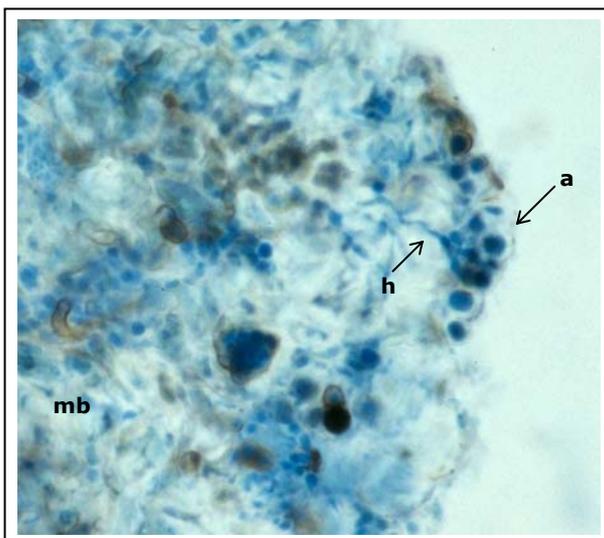


Abb. 133:

30 µm 

Mycobiont (mb) von *P. tenella*, dessen Hyphen (h) in Richtung von aufliegenden Algenzellen (a) wachsen.

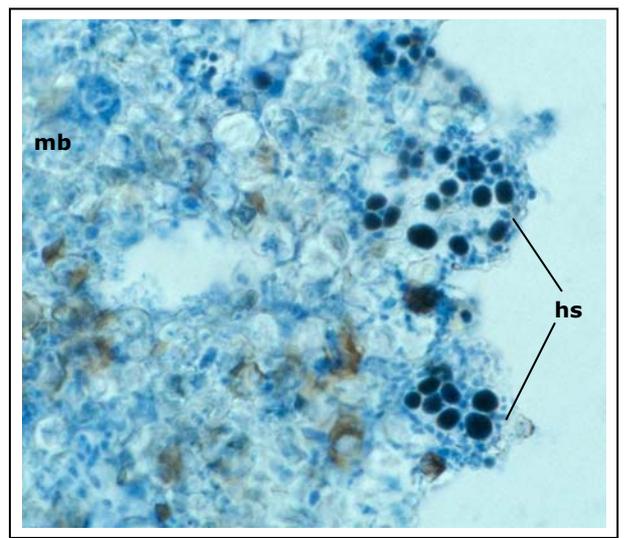


Abb. 134:

50 µm 

Algenzellen sind in den Mycobionten (mb) von *P. tenella* durch Ausbildung einer Hyphenschicht (hs) integriert worden.

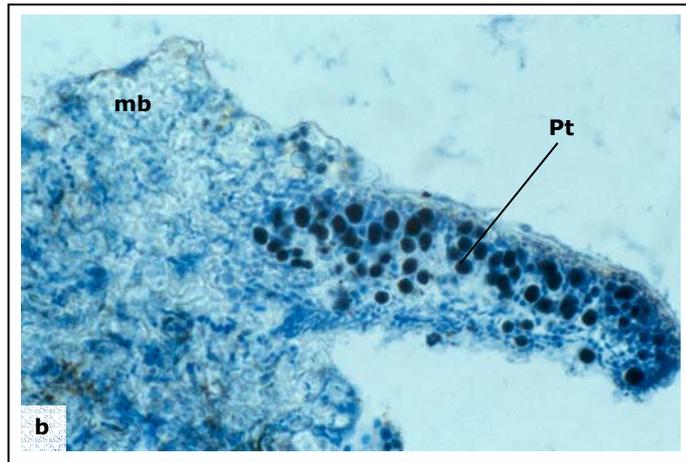
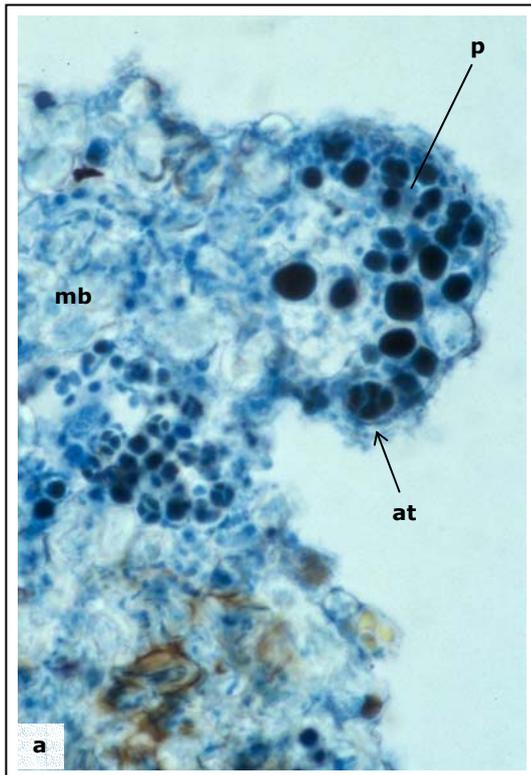


Abb. 135a, b:

Ein Flechtenprimordium (p) auf dem Mycobionten (mb) von *P. tenella* entwickelt sich zu einer Lobe der Flechte *P. tenella* (Pt); Algentetraden (at) innerhalb des Primordiums weisen auf Teilungsaktivität hin; der Mycobiont und die Flechte bilden eine Einheit.

a: 35 µm  ; b: 60 µm 

III. Der Mycobiont dient Primordien anderer Flechtenarten als Substrat.

Der Mycobiont von *P. tenella* wurde nicht nur von Diasporen und Photobionten der eigenen Flechtenart, sondern auch von Diasporen der Flechte *Parmelia sulcata* kolonisiert (s. Abb. 118 u. 122). Im Vergleich zu den Loben von *P. tenella* sind die jungen Thalli von *P. sulcata* jedoch nur mit wenigen Hyphen in dem Mycobionten von *P. tenella* verankert (Abb. 136). Das Mycel des Mycobionten von *P. tenella* und der Flechtenthallus von *P. sulcata* haben nicht miteinander fusioniert. Es wird deutlich, daß die Interaktionen zwischen den Soredien und dem Mycobionten von *P. tenella* wesentlich intensiver sind. Die Kolonisierung der Mycobionten von *Physconia distorta* und *Anaptychia ciliaris* durch Soredien von *P. tenella* unterstreichen diesen Aspekt (s. Kap. 3.4.3).

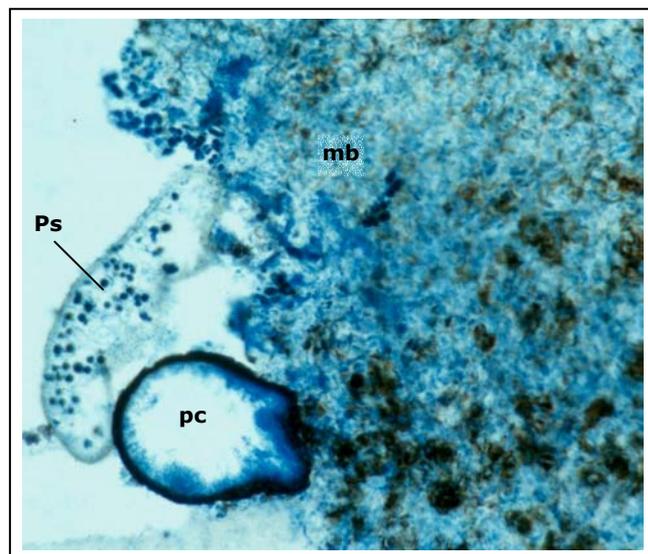


Abb. 136:

100 µm 

Junge Lobe von *P. sulcata* (Ps) auf dem Mycobionten (mb) von *P. tenella*; die Flechte ist nur mit wenigen Hyphen mit dem Mycobionten verbunden; zusätzlich ist ein Pycnocarp (pc) eines unidentifizierten Fremdpilzes zu sehen (s. Kap. 3.4.3).

Der Mycobiont wurde zusätzlich von gelb-orange farbigen Primordien besiedelt (Abb. 137), die sowohl auf den Zweigen von *Q. robur* als auch auf den Membranfiltern gefunden wurden (vergl. Abb. 116a u. 120). Eine Weiterentwicklung der Primordien zu adulten Flechtenloben konnte jedoch nie beobachtet werden.

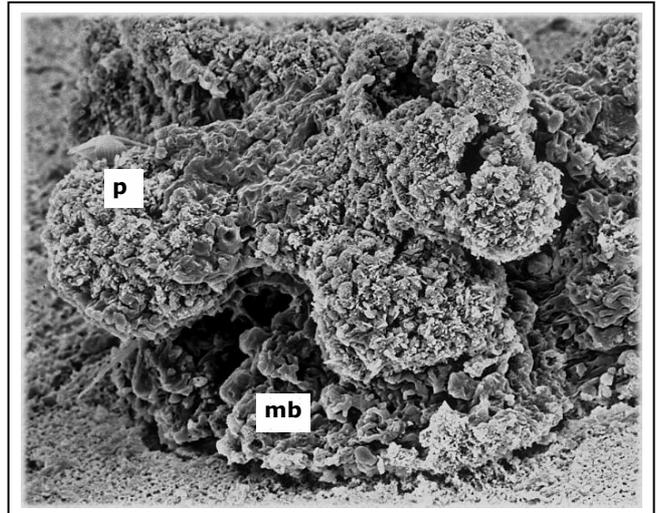


Abb. 137: Flechtenprimordium (p), das nicht identifiziert werden kann, auf dem Mycobionten (mb) von *P. tenella*; unter natürlichen Bedingungen weist das Primordium eine orange-gelbe Färbung auf; (REM-Aufnahme). 40 µm

3.4.4 Kolonisierung der Mycobionten von *Anaptychia ciliaris*, *Physconia distorta* und *Xanthoria parietina* durch vegetative Diasporen

Die im Labor kultivierten Mycobionten der Flechten *A. ciliaris*, *P. distorta* und *X. parietina* zeigten in Freilandkultur keine symbiotischen Interaktionen, wie sie für den Mycobionten von *P. tenella* beschrieben werden konnten (s. Kap. 3.4.2). Die Pilzisolat dieser Flechtenarten wurden jedoch ebenfalls von *P. tenella* Loben besiedelt. Die Abbildung 138 zeigt den Mycobionten von *P. distorta*, auf dem sich eine kleinen Lobe von *P. tenella* entwickelt hat. Das Thallusprimordium ist nur mit wenigen Hyphen in dem artfremden Mycobionten verankert. Auffällig bei diesem Primordium von *P. tenella* sind die kompakte Struktur und die ausgeprägte, mehrschichtige Rinde im Vergleich mit einem Primordium der gleichen Flechtenart auf dem Mycobionten von *P. tenella* (s. Abb. 135b).

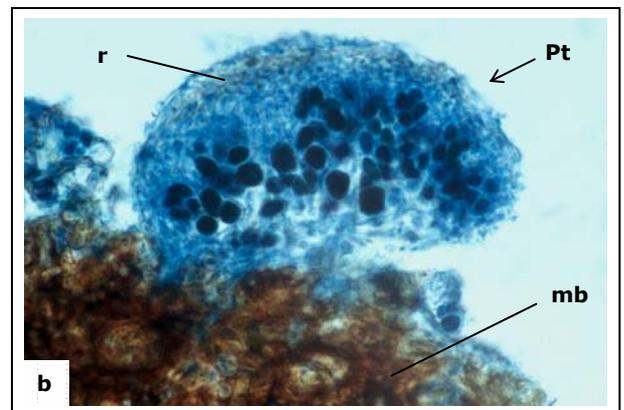
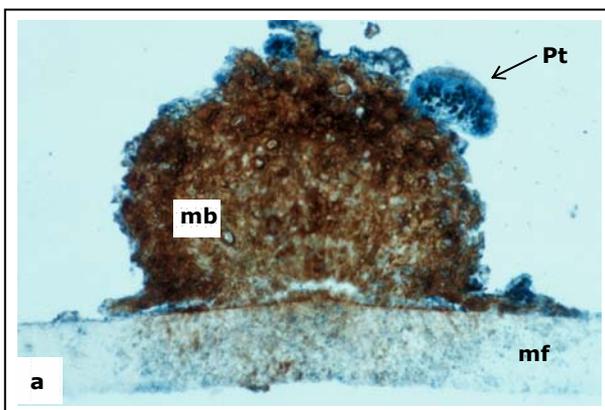


Abb. 138a, b: Besiedelung des Mycobionten von *P. distorta* durch *P. tenella*; die Übersicht (a) zeigt ein dunkel gefärbtes Mycel (mb) von *P. distorta* auf einem Membranfilter (mf); auf der Oberseite hat sich eine kleine Lobe von *P. tenella* (Pt) entwickelt, die nur mit wenigen Hyphen im Pilzmycel verankert ist; die Lobe zeichnet sich durch eine sehr kompakte Rinde (r) aus. 160 µm 40 µm

In einigen Fällen wird die Nische zwischen Mycobiont und Membranfilter zur Ansiedlung genutzt, ohne daß es im Verlauf der Entwicklung zu einem engen Kontakt zwischen der Flechte und dem Mycobionten kommt. Abbildung 139 zeigt den Mycobionten von *A. ciliaris*, an dessen Basis sich ein Primordium von *P. tenella* etabliert hat, ohne einen intensiven Kontakt mit dem Membranfilter oder dem Mycobionten aufzunehmen.

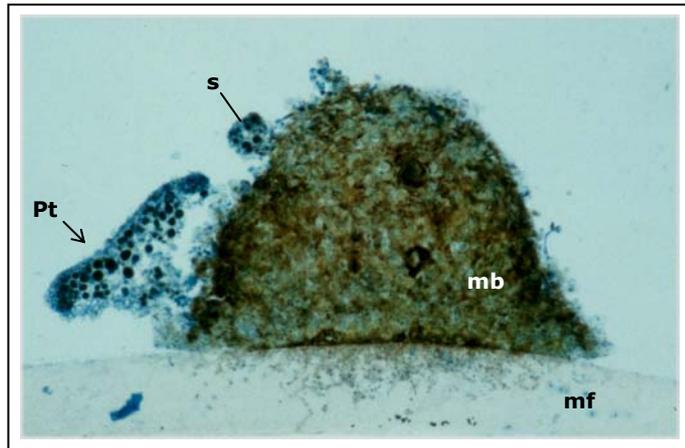


Abb. 139: Querschnitt des Mycobionten von *A. ciliaris*; in der Nische zwischen dem Pilzmycel (mb) und dem Membranfilter (mf) hat sich eine Lobe von *P. tenella* (Pt) angesiedelt; eine Soredie (s) liegt lose auf dem Mycel auf. 100 µm

Auf dem Mycobionten von *X. parietina*

wurden lediglich mit wenigen Hyphen verankerte Soredien beobachtet. Die Beispiele machen deutlich, daß die oben genannten Mycobionten artfremden Diasporen als Substrat dienen können. Ein intensiver Kontakt entsteht hierbei nicht.

3.4.5 Befall der Mycobionten durch Fremdpilze

Die Mycobionten aller transplantierten Arten sind von verschiedenen Fremdpilzen parasitiert worden. Eine Bestimmung war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich; an der Fruchtkörperform konnten jedoch mindestens drei verschiedene Höhere Pilze unterschieden werden. Die Abbildung 140 zeigt scheibenförmige Fruchtkörper mit unbewehrter Oberfläche, die sich im Mycobionten von *P. tenella* entwickelt haben. In Querschnitten dieses Mycobionten können zusätzlich ovale, mit Pycnosporen gefüllte Pycnokarprien gefunden werden (s Abb. 138). Ähnliche Fruchtkörper finden sich in allen Mycobionten.

Der Mycobiont von *A. ciliaris* wurde von einem Pilz, der mit Auswüchsen bewehrte Pycnokarprien bildet, befallen (Abb. 141).

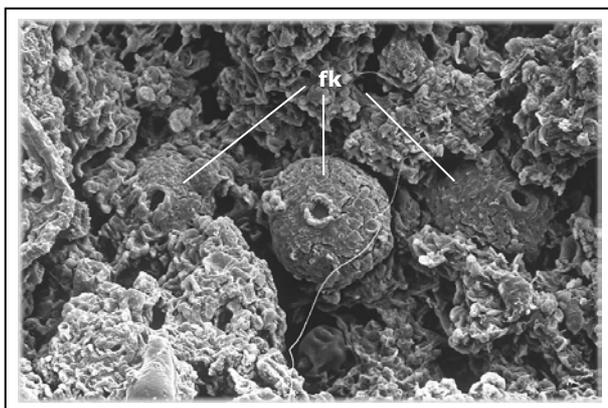


Abb. 140: Scheibenförmige Fruchtkörper (fk) eines Fremdpilzes innerhalb des Mycobionten von *P. tenella*; (REM-Aufnahme). 45 µm

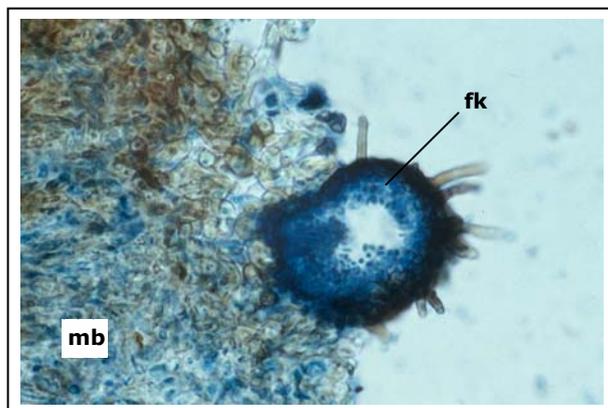


Abb. 141: Bewehrter Fruchtkörper (fk) eines Fremdpilzes innerhalb des Mycobionten (mb) von *A. ciliaris*. 40 µm

4 Diskussion

Wie bereits dargelegt wurde, gibt es in der Literatur keine genauen Angaben über das Wachstumsverhalten isolierter Flechtenpilze. Infolgedessen haben meine experimentellen Untersuchungen zu einer Vielzahl neuer Erkenntnisse geführt, die im Folgenden eingehend diskutiert werden: Auf der Grundlage der erstmalig erarbeiteten Reaktionsmuster der Hyphenfilamente ist es nun möglich, die Mycelentwicklung und -morphologie axenischer Mycobionten im Detail zu analysieren. Gleichzeitig können Rückschlüsse auf Entwicklungsprozesse im Flechtenthallus gezogen werden. Überdies ist ein Instrument geschaffen worden, das die Beurteilung einer möglichen morphogenetischen Beeinflussung der Hyphenfilamente bzw. der Mycelien erlaubt. Die zum ersten Mal angewendete Methode, isolierte Mycobionten in das natürliche Biotop zu transplantieren, führte nicht nur zu neuen Einblicken in ökologische Aspekte, sondern eröffnet ferner Möglichkeiten für zukünftige Experimente. - Diese hier kurz zusammengefaßten Diskussionspunkte werden in einem abschließenden Kapitel im Kontext mit ihrer komplexen Bedeutung für den Symbioseorganismus Flechte erörtert. Zunächst erfolgt jedoch eine Diskussion der einzelnen Untersuchungsbereiche der Arbeit.

4.1 Isolation der Mycobionten

Wie schon in der Einleitung erwähnt wurde, ist eine erfolgreiche Isolation von Mycobionten über Ascosporen zunächst von der Sporulationsfähigkeit der Apothecien und dem Keimverhalten der Ascosporen abhängig. Die Ascocarprien der Flechten wachsen im Vergleich zu denen der nicht-lichenisierenden Ascomyceten sehr langsam und sind in der Lage, über mehrere Jahre Sporen zu bilden (HENNSEN & JAHNS 1974). Frühere Kultur- und Freilandversuche (CHRISTMAS 1980; OSTROFSKY & DENISON 1980; YAMAMOTO et al. 1998a, b) haben gezeigt, daß das Sporulationsverhalten der Apothecien von exogenen Faktoren wie Licht, Temperatur und Feuchtigkeit beeinflusst wird. Die Sporenmenge und Dauer des Sporulierens kann sehr stark variieren, wobei die Maxima zwischen 1-2 Stunden und 22 Stunden nach der Präparation liegen. Auch hier sind verschiedene Faktoren wirksam: Flechtenart, Standort, Jahreszeit und Behandlung der Thalli nach der Entnahme vom Standort werden als maßgebend angesehen (BAILEY & GARRETT 1968; PYATT 1973; WHITON & LAWREY 1982).

Die Keimrate der Sporen wird von Medienkomponenten, wie pH-Wert, Mineral- und Nährstoffgehalt und der Temperatur beeinflusst (BELANDRIA et al. 1989; OSTROFSKY & DENISON 1980; PYATT 1968; TAKAHAGI et al. 2000; YAMAMOTO et al. 1998a). Gleichzeitig sind Prädispositionen des Materials (Sporenreife und -vitalität) von entscheidender Bedeutung, denn sowohl das Sporulations- als auch Keimverhalten kann durch eine Schädigung des Materials z.B. durch Luftverschmutzung beeinträchtigt werden (PYATT 1969, 1976). Die Keimrate kann zusätzlich individuell sehr variabel sein, denn die Sporen verschiedener Apothecien eines Thallus können unterschiedliche Keimfähigkeit besitzen (KOFLENER 1970). AHMADJIAN (1993)

formulierte die allgemeine Aussage, daß die Sporen von Krustenflechten eine höhere Keimrate als die von strauch- oder blattförmig wachsenden Flechten haben. Andere Autoren (CRITTENDEN et al. 1995) sehen eine davon abweichende Korrelation zwischen Thallusmorphologie und Isolationserfolg: Unter den reinen Grünalgenflechten sei der Prozentsatz der isolierten Arten bei Blatt- und Krustenflechten gleich.

Wie schon in der Einleitung besprochen, gibt es bis heute jedoch nur für einzelne Flechtenarten detaillierte Angaben über ihr Sporulations- und Keimverhalten, so daß man sich bei der Versuchsplanung kaum, wie z.B. bei der Anzucht Höherer Pflanzen, auf Literaturdaten stützen kann. Durch kommerzielles Interesse an neuen Lieferanten für biologisch aktive Substanzen, zu denen auch die isolierten Flechtenpilze zu rechnen sind, hat sich die Forschung in der letzten Jahren wieder verstärkt dieser Problematik angenommen. In einer sehr umfangreichen Arbeit zur Isolation von ca. 1200 lichenicolen und lichenisierten Pilzen wurden die Ursachen für Fehlversuche prozentual nach ihrer Häufigkeit aufgelistet (CRITTENDEN et al. 1995): Die Versuche scheiterten in 43% der Fälle daran, daß die Sporen nicht auskeimten und ausbleibende Sporulation war zu 30% der Grund für einen Mißerfolg. Diese Faktoren waren jedoch nicht allein ausschlaggebend, denn in 19% der Versuche stoppte das Wachstum nach dem Auskeimen der Sporen und zu 8% waren die Ascosporen stark durch Hefen und Bakterien kontaminiert.

Die Beobachtungen aus diesem Großversuch decken sich für einige Flechtenarten mit denen meiner Arbeit. Es ergaben sich jedoch auch deutliche Unterschiede, denn teilweise waren die von mir durchgeführten Isolationsversuche wesentlich erfolgreicher. Die Ursache mag in der Auswahl des Materials liegen. Um die Versuche mit möglichst sporulationsfähigem Material durchführen zu können, wurden stichprobenartig Schnitte von den Apothecien angefertigt, die der Überprüfung der Sporenreife dienten. Trotz dieser Kontrolle und auch unter Einbeziehung der saisonalen Variationen in der Sporulationsfähigkeit einiger Flechtenarten (CHRISMAS 1980, OSTROFSKY & DENISON 1980) waren jedoch nicht alle Versuche gleichermaßen erfolgreich. Die Sporulationsrate einzelner Ansätze (prozentualer Anteil der Apothecien, die sporuliert haben) variierte zwischen 2.5% und 100% (s. Abb. 18a-e). Berechnet man eine Gesamt-Sporulationsrate auf der Grundlage: Anzahl der Versuche, in denen Apothecien sporuliert haben, bezogen auf die Gesamtzahl der durchgeführten Versuche, so ergibt sich eine positive Bilanz. Von den insgesamt 41 Ansätzen führten lediglich 4 Versuche (ca. 10%) zu keiner Sporulation und hiermit unterscheidet sich das Ergebnis in der Tendenz von den Resultaten von CRITTENDEN et al. (1995), bei denen in 30% der Versuche keine Sporulation erfolgte. Vergleiche solcher Daten sollten jedoch nicht überbewertet werden, da einerseits eine verschieden große Anzahl von Versuchen durchgeführt wurde und zum anderen auch eine ungleiche Artenzusammensetzung zu abweichenden Ergebnissen führen kann.

Bei Flechten aus der Gruppe der Peltigerales scheitert eine Isolation des Mycobionten z.B. nicht daran, daß die Apothecien nicht sporulieren. Vielmehr sind hier eine fehlende Keimung, Wachstumsstopp der Hyphen nach dem Keimvorgang und starke Kontaminationen von entscheidender Bedeutung. Diese Beobachtungen wurden sowohl in meiner Arbeit, als auch in dem o.g. Großversuch (CRITTENDEN et al. 1995) gemacht. Andererseits werden die Mycobionten einiger Flechtenarten bevorzugt für physiologische Untersuchungen herangezogen, weil die Isolate routinemäßig hergestellt werden können, was gute Sporulations- und Keimraten voraussetzt. Zu diesen "Modellorganismen" gehören u.a. Arten der Gattungen *Cladonia* (AHMADJIAN 1980; OTT et al. 2000; SCHIELEIT 1997; YAMAMOTO et al. 1995) und *Xanthoria* (s. Kap. 2.2.1). Diese Beispiele verdeutlichen zusätzlich, daß eine starke Verallgemeinerung der Daten zu fehlerhaften Aussagen führen kann.

4.1.1 Peltigerales

Die untersuchten Arten aus der Ordnung der Peltigerales besitzen alle ein Cyanobakterium als Symbiosepartner, entweder als primären Photobionten in der Algenschicht oder als sekundären photoautotrophen Partner in speziellen, abgegrenzten Thallusbereichen, den Cephaliidien. Diese sogenannten „Cyanoflechten“ sporulieren in der Regel eine Vielzahl von Ascosporen (STOCKER-WÖRGÖTTER 1991, STOCKER-WÖRGÖTTER & TÜRK 1991). Auch in meiner Arbeit zeichneten sich diese Flechten in der Regel durch eine Sporulationsrate von 100% aus. Lediglich bei den Versuchsansätzen mit *Solorina crocea* und *Peltigera aphthosa*, die mit Material aus Norwegen (Sammeldatum 07.97) durchgeführt wurden, haben die präparierten Fruchtkörper nicht sporuliert. Da alle anderen Sporulationsversuche mit diesen Flechten positiv verlaufen sind, ist anzunehmen, daß das Material auf dem Transport (Exkursionsreise) unsachgemäß gelagert worden ist.

4.1.1.1 Die Gattung *Solorina*

Aus der Gattung *Solorina* wurde Material der Arten *Solorina crocea*, *Solorina spongiosa* und *Solorina saccata* sowohl direkt nach der Schneeschmelze (Frühjahr-Sommer), als auch im Herbst an verschiedenen Standorten (Österreich, Norwegen) gesammelt. Die Apothecien sporulierten in den meisten Fällen reife Ascosporen mit dunkel inkrustierten Wänden. Nur in einem Fall (Norwegen, Rondane) waren Sporen der Flechte *S. crocea* zum Teil unreif, d.h. sie hatten noch nicht die für die Gattung typische Wand-Ornamentierung (THOMSON & THOMSON 1984) entwickelt. Dies korreliert mit den Beobachtungen von GABMANN (pers. Anm.) an Flechtenmaterial von einem weiteren Standort in Norwegen (Hardanger Vidda): Auch hier enthielten die Fruchtkörper, die zur gleichen Jahreszeit gesammelt worden waren, nur hyaline Sporen.

Bei den Arten *S. crocea* und *S. saccata* konnte sehr vereinzelt der Ansatz eines Keimschlauches beobachtet werden. In diesen Fällen fand jedoch keine weitere Entwicklung statt. Weder die Zugabe der spezifischen Cyanobakterien der Gattung *Nostoc*, Inkubation auf Medien verschiedener Zusammensetzung, eine Kältebehandlung oder die Lagerung der Sporen im Dunkeln hatten einen induzierenden Einfluß auf das Keimverhalten. Die Mycobionten dieser Flechtengruppe scheinen sehr spezifische Ansprüche an die Medien und Kulturbedingungen zu stellen, die in bisherigen Experimenten nicht erfüllt wurden und auch das Fehlen von Literaturangaben bestätigt diese Annahme.

4.1.1.2 Die Gattung *Peltigera*

I. Sporulationsverhalten

In Bezug auf das Sporulationsverhalten ergibt sich für die Gattung *Peltigera* das gleiche Bild wie für die *Solorina* Arten. Das Material wurde zu verschiedenen Jahreszeiten und auch an unterschiedlichen Standorten gesammelt und zeigte (mit einer Ausnahme, s. Kap. 4.1.1) immer eine sehr gute Sporulationsfähigkeit. Auch *Peltigera aphthosa*, eine Flechte, die laut STOCKER-WÖRGÖTTER (1995) an Standorten der Alpen wenig fruchtet und deren Ascocapien vermeintlich nur wenige Sporen entlassen sollen, sporulierte immer reichlich.

Die Sporulation scheint bei diesen Arten keiner jahreszeitlichen Periodizität zu unterliegen. Auch eine Korrelation mit den Witterungsbedingungen (Regenfall) am Standort vor der Entnahme, die bei anderen Flechtengruppen häufig das Sporulationsverhalten beeinflussen (OSTROFSKY & DENISON 1980; CRITTENDEN et al. 1995), konnte nicht beobachtet werden.

II. Keimverhalten

Arten aus der Gattung *Peltigera* wurden schon vielfach für Isolations- und Resyntheseversuche herangezogen. Die Ergebnisse dieser Versuche ergeben ein relativ unübersichtliches Bild. SCOTT (1964) beobachtete, daß die Keimung der Ascosporen nur bei der Zugabe eines Extraktes aus dem spezifischen Photobionten (*Nostoc spec.*), der in Reinkultur herangezogen wurde, stattfindet. Daraus folgerte der Autor, daß die *Peltigera*-Mycobionten zum Überleben ihren lebenden Photobionten benötigen. In späteren Versuchen von BELANDRIA et al. (1989) erfolgte die Sporenkeimung von *Peltigera canina* sowohl auf einem Glukosemedium (38%), als auch auf einem Mineralmedium (90%), die Apothecien hatten jedoch zum Sporulieren auf der Agaroberfläche gelegen, und der Autor vermutet, daß Substanzen, die von den Cyanobionten in das Medium abgegeben wurden, die Keimung positiv beeinflußt haben. Bestätigt wird diese Annahme durch AHMADJIAN (1989), dessen Kulturversuche mit dem Mycobionten der gleichen Flechte erfolglos war.

Bei einer Isolation des Mycobionten von *Peltigera praetextata* aus Ascosporen konnte ohne Zugabe des Photobionten die Bildung von Keimschläuchen induziert werden, die zu langen Hyphen auswuchsen (STOCKER-WÖRGÖTTER & TÜRK 1991). Es entwickelten sich jedoch nie

Mycelien aus verzweigten Hyphenfilamenten, ohne daß die spezifischen Cyanobakterien *Nostoc spec.* hinzugegeben wurden. Auch vielfache Wiederholungen mit Material von verschiedenen Standorten brachten keinen Erfolg: Es konnte keine Mycelbildung induziert werden. Bei Resyntheseversuchen fand nur in den Bereichen Wachstum statt, in denen die Hyphen im Kontakt mit den Cyanobakterien waren.

Auch andere Autoren beobachteten, daß Sporen von *Peltigera canina* und *P. praetextata* entweder auf Agar-Medium nicht auskeimten oder das Wachstum auf die Elongation eines Keimschlauches begrenzt war (AHMADJIAN 1961, 1989; BELANDRIA ET AL. 1989; HALE 1961; SCOTT 1964). Eine Abhängigkeit der sexuellen Fortpflanzungseinheiten von der Anwesenheit des spezifischen Photobionten wurde auch bei anderen Flechten-Arten beobachtet. Die Sporenkeimung und die Entwicklung von Mycelien erfolgte bei *Lobaria laetevirens* nur in Kontakt mit dem Photobionten (LALLEMANT & BERNARD 1977). Für *Lobaria pulmonaria* konnte jedoch in der gleichen Arbeit gezeigt werden, daß der Photobiont das Mycelwachstum stimuliert, seine Präsenz war jedoch nicht obligat notwendig. HONEGGER (1996a) vermutet, daß die Mycobionten aus der Gruppe der Peltigerales obligat biotroph seien, d.h. in ihrer Ernährung an den lebenden Algenpartner gebunden sind.

Die Ergebnisse meiner Arbeit weichen von den oben beschriebenen Beobachtungen ab. Die Sporen der Flechten *Peltigera venosa*, *Peltigera aphthosa*, *Peltigera polydactyla* und *Peltigera didactyla* konnten unter axenischen Bedingungen, d.h. ohne die Anwesenheit des spezifischen Cyanobionten auf dem Mineralmedium MBV (bei Lagerung im Dunkeln) zum Auskeimen angeregt werden. In allen Fällen gingen die Keimschläuche in ein vegetatives Wachstum mit der Bildung von septierten und verzweigten Hyphen über. Die Sporen der Flechte *P. venosa* keimten auch auf dem Mineralmedium BG110 aus, weiteres Wachstum wurde jedoch nur auf dem Medium MBV beobachtet. Auch durch die Zugabe des Cyanobionten (*Nostoc spec.*, als Isolat oder in Cephalodien) wurde der Keimvorgang nicht angeregt.

Bei den anderen Arten zeigten die Ascosporen nur auf dem zuletzt genannten Medium Keim- und Wachstumsverhalten. Möglicherweise wirkt sich der leicht im sauren Bereich liegende pH-Wert (5.5) des MBV-Agars positiv aus.

Die Mycelien von *P. venosa*, *P. aphthosa* und *P. polydactyla* stellten nach kurzer Zeit das vegetative Wachstum ein. Somit unterstützen diese Experimente die Aussagen anderer Autoren. Die Mycelien von *P. didactyla* zeigten jedoch beständiges Wachstum und wurden auf nährstoffreichere Medien übertragen, auf denen sie erfolgreich kultiviert werden konnten (s. Kap. 4.1.2).

Viele Transplantationsversuche mit Keimlingen dieser Flechtengruppe auf Medien mit organischen Nährstoffen scheiterten an den starken Kontaminationen durch Bakterien, die sehr häufig mit Flechten aus der Gruppe der Peltigeraceae assoziiert sind (AHMADJIAN 1989;

CRITTENDEN et al. 1995; STOCKER-WÖRGÖTTER 1995) und auch aus dem Inneren der Thalli isoliert werden konnten (GIRLANDA et al. 1997). Erklärt werden diese Beobachtungen dadurch, daß die mit Cyanobakterien gebildeten Flechten kaum die für viele Flechten typischen sekundären Inhaltstoffe bilden (CULBERSON 1969; CULBERSON et al. 1977; GALUN & SHOMER-ILAN 1988), die z.T. antimikrobielle Wirkung haben (CHAPIN ET AL. 1987; TORZILLI & LAWREY 1995; TORZILLI et al. 1999). Dessen ungeachtet habe ich in einigen Versuchen mit *P. apthosa* und *P. polydactyla* bakterienfreie Höfe um einzelne Sporen beobachtet.

Verunreinigungen durch Mikroorganismen scheinen sich jedoch nicht unbedingt negativ auf die Sporenkeimung auszuwirken, denn auf Mineralmedien entstanden Keimlinge innerhalb von Bakterienclustern. Auf kohlenhydrathaltigen Medien waren die isolierten Mycobionten nicht mehr konkurrenzfähig.

Die oben beschriebenen Keimvorgänge konnten bei den *Peltigera*-Arten immer nur an den Rändern der Streubereiche mit geringer Sporendichte beobachtet werden, nicht in den Zentren mit dicht gedrängt liegenden Sporen. Hier scheint eine Hemmung der Sporen vorzuliegen, und YAMAMOTO et al. (1998a) vermuteten, daß bei den Peltigeraceae in einem solchen Fall Selbstinhibitoren wirksam werden.

Für *Peltigera apthosa* konnte zusätzlich beobachtet werden, daß die hyalinen Sporen auf der Oberfläche der Membranfilter früher auskeimten als die auf der Agarschicht. Ob es sich hierbei um ein einmaliges Ereignis handelt oder ob die rauhere Oberflächenbeschaffenheit der Filtermembran ein Auskeimen angeregt hat, läßt sich noch nicht beurteilen. Auffällig ist jedoch, daß die gleiche Beobachtung an den ebenfalls hyalinen Sporen von *Xanthoria parietina* gemacht werden konnte. Möglicherweise spielt auch eine unterschiedliche Wasser-versorgung der Sporen eine Rolle.

III. Mögliche Ursachen für Fehlversuche

Bei der Mycelbildung aus Pilzsporen muß nach der Keimung der Sporen ein Umstellen des Stoffwechsels stattfinden, ein Vorgang, der von einer Ruhepause begleitet sein kann (JENNINGS & LYSEC 1999). Saprobionten nehmen meist sehr frühzeitig Nährstoffe aus dem Medium auf und stellen sich übergangslos von der Keimung auf Hyphenwachstum um. Viele Pflanzenparasiten hingegen versorgen ihre ersten Entwicklungsstadien nach der Keimung im wesentlichen aus dem Nährstoffvorrat der Spore und nehmen erst nach Kontakt mit dem Wirt Nährstoffe auf (MÜLLER & LOEFFLER 1982). Bei den Ascosporen der Peltigeraceae scheint in den meisten Fällen das Umstellen des Stoffwechsels von der Keimung mit Energie aus endogenen Speichern auf eine exogene Nährstoffaufnahme nicht stattgefunden zu haben. Die Beobachtung, daß Keimung und Mycelwachstum der Mycobionten durch die Anwesenheit der Photobionten angeregt werden können, ließe den Schluß zu, daß eine sehr enge Abhängigkeit der Flechtenpilze von ihren Symbiosepartnern besteht, ähnlich wie bei den Pflanzenparasiten.

Unterstützt wird diese Annahme dadurch, daß die Gruppe der Peltigerales ausschließlich lichenisierte Pilze enthält (HAWKSWORTH 1982a), und daß vermutet wird, daß sie eine ursprüngliche Ordnung darstellen (HAWKSWORTH 1982a; GALLOWAY 1991). CRITTENDEN et al. (1995) folgerten daraus, daß die lange, gegenseitige Abhängigkeit der Symbiosepartner eine Barriere geschaffen hat, die es erschwert, die Bionten zu isolieren.

Dessen ungeachtet ist es jedoch in wenigen Fällen gelungen, über Ascosporen die Mycobionten aus Flechten der Peltigerales zu separieren. LALLEMANT & BERNARD (1977) berichten von einer erfolgreichen Isolation des Pilzes aus *Lobaria pulmonaria*, und auch der Mycobiont von *Peltigera leucophlebia* (STOCKER-WÖRGÖTTER & TÜRK 1994) wurde unter axenischen Bedingungen kultiviert. Die zuletzt genannten Autoren vermuten, daß lediglich die Peltigera-Arten, die Cyanobakterien als primären Photobionten besitzen, die Anwesenheit ihres Symbiosepartners benötigen, um ein Mycel zu bilden. Dieser Annahme widersprechen sowohl die erfolgreiche Isolation des Mycobionten von *Peltigera polydactyla* (Crittenden et al. 1995), als auch die Ergebnisse meiner Arbeit, in der der Mycobiont von *Peltigera didactyla* erstmalig in Reinform kultiviert werden konnte. Beide Flechtenarten besitzen den prokaryotischen Photosynthesepartner.

Welche Faktoren sich positiv auf das Keimverhalten und Mycelwachstum der Mycobionten einiger *Peltigera*-Arten ausgewirkt haben, kann nicht im Detail geklärt werden, da die Versuche sehr viele Variablen enthalten. Allein durch die Tatsache, daß Versuche solcher Art mit Material aus dem natürlichen Habitat durchgeführt werden müssen, ist eine Heterogenität unvermeidbar, selbst wenn die Flechten am selben Standort gesammelt wurden. Bestimmte Rahmenbedingungen haben sich jedoch als vorteilhaft erwiesen:

- Medien, die frei von organischen Nährstoffen sind und auf denen das Wachstum anderer Organismen (Bakterien und Fremdpilze) unterdrückt wird, fördern das Auskeimen der Sporen und sind somit besser für die ersten Schritte der Isolation geeignet als kohlenhydrathaltige Medien.
- Die Vitamine Biotin und Thiamin sind u.a. für den Mycobionten von *Peltigera aphthosa* essentiell (AHMADJIAN 1977), und auch viele frei-lebende Pilze haben einen Mangel in Bezug auf diese Vitamine (GARRAWAY & EVANS 1984). Biotin hat möglicherweise eine besondere Bedeutung in dieser Flechtengruppe, denn es wird von dem isolierten Photobionten aus *P. aphthosa* (*Coccomyxa spec.*) in sehr hohen Konzentrationen an Kulturmedien abgegeben (BEDNAR & HOLM-HANSEN 1964). Isolationsversuche, die mit dem vitaminhaltigen Kulturmedium MBV durchgeführt wurden, führten in vielen Fällen zur Sporenkeimung. Kontinuierliches Wachstum der vegetativen Hyphen wurde nur auf Biotin-haltigem Medium (MBV und BG110 + Bio + Glu bzw. +Rib) beobachtet.
- Um die Sporendichte zu verringern und dadurch mehr Keimvorgänge zu ermöglichen, sollte die Distanz zwischen sporulierendem Apothecium und der Substratoberfläche erhöht werden, so daß der Sporulationsbereich eine größere Fläche bedeckt.

- Nach der Vorkultur auf reinen Mineralmedien ist ein späteres Umsetzen der Mycelien auf nährstoffhaltige Medien notwendig, da die endogenen Reservestoffe der Sporen nur begrenztes Wachstum zulassen.
- Möglicherweise hat sich auch die Lagerung der Isolate im Dunkeln positiv auf die Keimung ausgewirkt; es gibt jedoch noch keine vergleichenden Untersuchungen.

4.1.2 Erfolgreiche Isolation des Mycobionten von *Peltigera didactyla*

In meinen Kulturexperimenten ist es erstmalig gelungen, den Mycobionten von *Peltigera didactyla* unter axenischen Bedingungen mit Hilfe von Ascosporen zu isolieren. Er steht nun nach Aufnahme in eine Stammkultursammlung für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

Bei solchen Isolationsversuchen muß immer sichergestellt werden, daß das entstandene Mycel tatsächlich von dem Mycobionten gebildet wird. Actinomyceten, die aus Flechten isoliert werden können (GIRLANDA et al. 1997, ZOOK 1983), sind durch ihr hyphenähnliches Wachstum leicht mit Flechtenpilzen zu verwechseln. Auch die konkurrierende Präsenz von filamentös wachsenden Fremdpilzen, die nicht den primären Mycobionten darstellen, erschwert es oft, eine Reinkultur des Flechtenpilzes heranzuziehen (CRITTENDEN et al. 1995; HONEGGER 1996a; PETRINI et al. 1990). Es konnten z.B. aus der Flechte *Peltigera praetextata* Pilze verschiedener Taxa, u.a. Arten der Gattungen *Fusarium* und *Trichoderma* isoliert werden (GIRLANDA et al. 1997). Solche sekundären Pilze wurden schon als Parasiten, Saprophyten und Parasymbionten bezeichnet (HAWKSWORTH 1982b) und haben möglicherweise eine Funktion in der Flechtensymbiose (HAWKSWORTH 1982b; PETRINI et al. 1990).

Bei der hier beschriebenen Isolation des Mycobionten von *P. didactyla* konnte die Entwicklung, beginnend mit der Keimung der charakteristischen vierzelligen, hyalinen Sporen bis zum kompakt strukturierten Mycel, beobachtet werden. Dadurch ist eine Verwechslung der Isolate mit anderen Organismengruppen ausgeschlossen. Die Transplantation auf nährstoffreiche Medien (s.u.) hat zusätzlich gezeigt, daß der Mycobiont nicht durch andere Mikroorganismen kontaminiert ist.

Wie schon unter 4.1.1.2 beschrieben, wuchs der Mycobiont von *P. didactyla* auf dem Mineralmedium MBV über den Beobachtungszeitraum von ca. 4 Monaten kontinuierlich weiter. Das Überführen dieser ersten mycelartigen Stadien auf ein Vollmedium (MY/2+Glu/+Rib) führte nicht zu einer Förderung des Wachstums; vielmehr wurde das Wachstum des Mycobionten auf solchen Medien gestoppt. Im Gegensatz dazu entwickelten sich nach der Transplantation der Keimlinge auf einem schwach nährstoffhaltigen Agar (BG110+Bio+Glu/+Rib) reichverzweigte, kompakte Mycelien. Möglicherweise wurde der Wachstumsstopp der

Mycelien auf dem Vollmedium durch den Mangel an Biotin (s. 4.1.1.2) hervorgerufen, denn der Malz-Hefe-Agar enthält nur einen sehr geringen Anteil dieses Vitamins (6,6 µm/l; DIFCO MANUAL 1998).

Die Versuche haben gezeigt, daß der Pilz dieser Flechte sowohl Glukose, als auch Ribitol als Kohlenstoffquelle nutzen kann. Er ist also nicht obligat auf Glukose, die in der Symbiose von den assoziierten Cyanobakterien an den Mycobionten abgegeben wird (GALUN 1988), angewiesen. Im Gegensatz zu den Angaben aus der Literatur (s.o.) ist dieser Mycobiont auch nicht obligat auf die Anwesenheit des spezifischen Photobionten (*Nostoc spec.*) angewiesen. Sowohl Keimvorgänge als auch vegetatives Wachstum können unter axenischen Bedingungen erfolgen.

4.1.3 Erfolgreiche Resynthese der Flechte *Peltigera venosa* aus Ascosporen

In den bisher geschilderten Versuchen war es das Ziel, die Flechtenpilze in Reinkultur zu isolieren und die dafür notwendigen Kulturbedingungen herauszuarbeiten. An dieser Stelle sei nun ein Experiment erwähnt, das unter nicht-sterilen Bedingungen in einer Klimakammer, parallel zu einer Langzeitbeobachtung durchgeführt wurde. Sporen der Flechte *Peltigera venosa*, die auf autoklavierter Erde vom natürlichen Standort kultiviert worden waren, hatten ohne die aktive Zugabe von Photobionten kleine Primordien entwickelt, die eindeutig als *P. venosa* identifiziert werden konnten. Dadurch wird deutlich, daß

- die Sporen unter diesen Bedingungen ausgekeimt sein müssen,
- spezifische Algen über die Luft auf das Substrat gelangt sind und
- eine Relichenisierung und Thallusmorphogenese stattgefunden hat.

Folglich sind die Bedingungen, die in der Klimakammer geschaffen worden sind, für die Entwicklung dieser Flechte geeignet – eine Tatsache, die sich mit früheren Beobachtungen (OTT, pers. Komm.) decken.

Die Cyanoflechte *P. venosa* konnte somit zum ersten Mal erfolgreich über Ascosporen resynthetisiert werden. Welche speziellen Faktoren zu dieser Entwicklung beigetragen haben, kann nun durch kontinuierliche Reduktion der Versuchsvariablen und unter Zuhilfenahme der Erkenntnisse aus den Isolationsversuchen zukünftig noch weiter eingegrenzt werden. Möglicherweise ergibt sich daraus die Chance, Flechten aus ihren Bionten unter sterilen Bedingungen heranzuziehen, so daß für Laborexperimente standardisiertes Material zur Verfügung steht.

4.1.4 *Rhizocarpon geographicum*

Über das Sporulationsverhalten dieser Krustenflechte liegen keine Literaturdaten vor; eine andere Art dieser Gattung, *Rhizocarpon lecanorinum*, zeigt jedoch saisonale Variationen mit einem Sporulationsmaximum im Frühjahr (CLAYDEN 1997b).

Mit *R. geographicum* wurden zwei Sporulationsversuche mit Material verschiedener Standorte und aus verschiedenen Jahreszeiten durchgeführt, die jedoch beide negativ verlaufen sind. Da bei dem Material des ersten Versuchs (Jotunheimen, 12.07.97) schon zum Sammelzeitpunkt (direkt nach der Schneeschmelze) Ascosporen der Flechte auf dem umgebenden Gestein und auch auf der Thallusoberfläche zu finden waren, kann vermutet werden, daß der Sporulationsvorgang durch die Feuchtigkeit des Schmelzwassers initiiert wurde. Der Mißerfolg des zweiten Versuchs mit Material aus Österreich (Fimbartal 09.10.97) läßt sich nicht eindeutig erklären. Es wäre jedoch eine ähnliche jahreszeitliche Abhängigkeit denkbar wie für *R. lecanorinum*. Die Beobachtungen sollten jedoch nicht überbewertet werden, und für eine Klärung des Sporulationsverhaltens müßte eine systematische Serie von Versuchen über den Zeitraum eines ganzen Jahres durchgeführt werden.

Eine Keimung der mit einer Mikropipette direkt aus den Apothecien präparierten vielzelligen Sporen konnte auf keinem der Substrate (Mineral- bzw. Malz-Hefe-Agar, Gestein) induziert werden. Möglicherweise waren die Sporen noch nicht ausgereift, obwohl sie schon die typische dunkel inkrustierte Wandstruktur aufwiesen.

4.1.5 Isolation der Mycobionten aus *Baeomyces rufus*, *Xanthoria parietina*, *Physcia tenella*, *Physconia distorta* und *Anaptychia ciliaris*

Im Vergleich zu den Versuchen mit Flechten aus der Ordnung der Peltigerales war die Isolation der Mycobionten aus den Arten *Baeomyces rufus*, *Xanthoria parietina*, *Physcia tenella*, *Physconia distorta* und *Anaptychia ciliaris* wesentlich leichter, denn aus allen Sporulationsversuchen mit diesen Arten gingen in meiner Arbeit Mycelien hervor (Abb. 18a-e). Dieses Ergebnis steht in deutlichem Gegensatz zu dem zuvor zitierten Großversuch (CRITTENDEN et al. 1994), in dem die Isolation des Mycobionten von *X. parietina* in 9 von 13 Fällen gescheitert und bei den Flechten *P. tenella* und *P. distorta* in keinem Versuch erfolgreich war.

4.1.5.1 Sporulationsverhalten

Insgesamt wurden mit den oben genannten Flechten 13 Versuche mit einer Anzahl eingesetzter Apothecien zwischen 54 und 320 durchgeführt. Die Sporulationsrate der einzelnen Versuche lag bis auf eine Ausnahme über 20%, bei den meisten Ansätzen (9 von 13) jedoch über 70% und reichte bis zu 100%. Nur in einem Versuch haben lediglich 8 von 320 präpa-

rierten Apothecien (2.5%) sporuliert. Diese geringere Rate (s. Abb. 18e: Mullsjö, 03.05.99;) ist möglicherweise auf eine falsche Lagerung während des Transportes zurückzuführen.

Einige Flechten, z.B. *X. parietina*, sporulieren ganzjährig (CHRISTMAS 1980; PYATT 1973), zeigen jedoch auch Schwankungen in ihrem Sporulationsverhalten (Abb. 18b). Solche Beobachtungen lassen sich durch witterungsbedingte Einflüsse vor der Entnahme erklären, denn Niederschläge können zum Sporulieren der Apothecien noch am Standort führen (BAILEY 1976).

Für die Flechte *B. rufus* ergeben sich nach PYATT (1969) von Jahresmitte bis einschließlich Dezember gute Sporulationsraten mit einem Maximum im November. Auch in dem in dieser Arbeit durchgeführten Versuch mit Herbstmaterial (Österreich, 28.09.99) wurde eine Sporulationsrate von nahezu 100% erreicht (Abb. 18a).

Für *P. tenella*, *P. distorta* und *A. ciliaris* gibt es keine Literaturdaten über eine jahreszeitliche Abhängigkeit in der Sporulationsrate (eine solche Abhängigkeit ist jedoch nicht ausgeschlossen), weshalb die verschiedenen Werte (Abb. 18c-e) schwer zu interpretieren sind. Standortfaktoren wie Luftverschmutzung und Belastungen durch Schwermetalle haben Einfluß auf die Vitalität der Flechten (PYATT 1969, 1976), und besonders Schwefeldioxid wirkt sich negativ auf die Fruchtkörperentwicklung aus (DESLOOVER & LEBLANC 1970; STRINGER & STRINGER 1974). Nicht zuletzt können auch natürliche Umweltfaktoren wie Strahlung und Feuchtigkeit, die die sexuelle Reproduktion durch Ascosporen beeinflussen (MONTE 1993), unterschiedliche Sporulationsraten hervorrufen.

Die Sporen der Arten *X. parietina*, *P. tenella*, *P. distorta* und *A. ciliaris* gelangen häufig in Clustern als Meioseprodukte eines Ascus auf die Substratoberfläche, und auch für andere Flechtenarten konnte eine solche Beobachtung gemacht werden (MOLINA & CRESPO 2000; Shapiro 1971). GARRETT (1972) vermutete, daß die Sporencluster durch elektrostatische Ladung entstehen. Die Bildung von Sporenclustern verschafft den Mycobionten den Vorteil, schneller die radiäre Form eines „idealen“ Mycels einzunehmen und somit effektiver das Substrat besiedeln und die vorhandenen Nährstoffe ausschöpfen zu können (s. Kap. 4.3.1).

4.1.5.2 Keimverhalten

Die Versuche wurden auf Mineral- und MY-Medien, denen verschiedene Substanzen (Kohlenhydrate, Phytohormone, Vitamine) zugefügt waren, durchgeführt. Keine dieser Komponenten hatte Einfluß auf die Mycelbildungsrate, d.h. der Anteil der gebildeten Mycelien, bezogen auf die Sporulationsereignisse, wurde weder erhöht noch vermindert. Es kann jedoch eine Korrelation mit der Nährstoffkonzentration des Grundmediums (Mineralmedium oder Vollmedium) beobachtet werden: Die Sporen der Arten *X. parietina*, *P. tenella*, *P. distorta* und *A. ciliaris* keimen in der Regel unter nährstoffarmen Bedingungen früher aus als auf einem Vollmedium. Möglicherweise erfolgt die Hydratation der Sporen auf den

geringer konzentrierten, nährstoffarmen Medien schneller. Bei *B. rufus* erfolgte die Keimung unabhängig vom Nährstoffgehalt des Kulturmediums und im Gegensatz zu den anderen Arten schon nach wenigen Stunden. Dieses Verhalten kann als eine Anpassung an das instabile natürliche Substrat und an die sehr kurze Lebensspanne dieser Flechte von ca. 2-3 Jahren angesehen werden (JAHNS 1982; JAHNS & OTT 1982) und ist der Ausdruck einer Lebensweise, die als r-Strategie bezeichnet wird (JAHNS & OTT 1997).

Der prozentuale Anteil der Sporencuster, aus denen Mycelien hervorgegangen sind, ist auf nährstoffarmen Medien, die eine Annäherung an die Bedingungen des natürlichen Standorts (mit den Substraten Rinde, Erde oder Gestein) darstellen, häufig höher als auf nährstoffreichen Medien (s. Abb. 18a-e). In den meisten Experimenten wird die Maximalrate von 100% erreicht, und nur in einem Ansatz liegt der Anteil bei 90%. Dieses Ergebnis macht deutlich, daß bei einer erfolgten Sporulation fast immer reife, vitale Sporen entlassen werden. Das Sporulationsverhalten ist jedoch nicht direkt an die Sporenreife gekoppelt, denn es können sich in den Sporencustern einzelner Asci auch unreife Sporen befinden (SHAPIRO 1971). Zusätzlich finden sich bei *Anaptychia ciliaris* und *Physconia distorta* regelmäßig aufgebrochene Sporen mit herausquellendem Protoplasten auf den Agar-Medien - möglicherweise ein Zeichen für Degeneration.

Auch die Mycelbildungsrate ist nicht direkt von der Sporulationsrate abhängig, da in Versuchen, in denen nur sehr wenige Apothecien sporuliert haben, dennoch aus allen entstandenen Sporencustern auch Mycelien hervorgehen können (s. z.B. Abb. 18e: Mullsjö, 03.05.99).

Auf nährstoffreichen Medien ist die Keim- bzw. Mycelbildungsrate der verschiedenen Flechtenarten variabel, und auch innerhalb der verschiedenen Versuche mit einer Art besteht Variabilität. Sie reicht von 29% bei *P. distorta* (Abb. 18d: Mullsjö, 03.05.99) bis zu 100% in Versuchen mit *B. rufus* (Abb. 18a), *X. parietina* (Abb. 18b: Fimbartal, 15.10.97 und Zeelande, 09.12.00) und *P. tenella* (Abb. 18c: Schiermonnikoog, 10.07.98). Die teilweise geringere Mycelbildungsrate zeigt, daß höhere Nährstoffkonzentrationen die Keimung der Ascosporen hemmen können. In der Literatur wird sogar von einer vollständigen Unterdrückung der Keimung von Sporen z.B. aus *X. parietina* und *P. distorta* bei einem lediglich 0.5%-igen Glukosemedium berichtet (BELANDRIA et al. 1989). Solche extremen Auswirkungen einzelner Medienkomponenten konnten in der vorliegenden Arbeit in keiner Versuchsreihe beobachtet werden. Es muß vermutet werden, daß in der zitierten Arbeit andere Faktoren ausschlaggebend waren.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen in den Experimenten mit den *Peltigera*-Arten (s. Kap. 4.1.1.2) führt bei den in diesem Abschnitt besprochenen Flechten eine hohe Sporendichte nicht zu einer Hemmung der Sporenkeimung. Es werden im gesamten Sporulationsbereich der einzelnen Apothecien Keimlinge gebildet, die sich unabhängig von der Zusammensetzung des Kulturmediums kontinuierlich zu Mycelien entwickeln.

4.1.6 Zusammenfassung I

- Aus der Gruppe der Peltigerales wurde der Mycobiont von *Peltigera didactyla* erstmalig unter axenischen Bedingungen isoliert und zur Mycelbildung angeregt.
- An den Sporen von 3 weiteren *Peltigera*-Arten (*P. venosa*, *P. aphthosa* und *P. polydactyla*) wurde unter axenischen Bedingungen Keimung und Bildung vegetativer Hyphen induziert.
- Die Flechte *Peltigera venosa* konnte erstmalig aus Ascosporen unter Laborbedingungen synthetisiert werden.
- Rahmenbedingungen für weitere Versuche mit Flechten aus dem Verwandtschaftsbereich der Peltigerales konnten erarbeitet werden.

- Alle Isolationsversuche mit den Arten *Xanthoria parietina*, *Physconia distorta*, *Physcia tenella*, *Anaptychia ciliaris* und *Baeomyces rufus* verliefen überdurchschnittlich erfolgreich und führten zur Bildung von Mycelien der entsprechenden Mycobionten, die somit für die weiteren Untersuchungen zur Verfügung standen.
- Bei den untersuchten Arten ist die Keim- bzw. Mycelbildungsrate auf nährstoffreichen Medien z.T. geringer als bei reduziertem Nährstoffangebot. Die Keimung der Ascosporen wurde jedoch von keiner der getesteten Medienkomponenten gehemmt oder gefördert.
- Eine sorgfältige Materialauswahl (u.a. Überprüfung der Sporenreife) und –behandlung scheint die Grundlage für einen Isolationserfolg bei diesen Arten zu sein.

4.2 Reaktionsmuster der Hyphenfilamente

Obwohl Flechtenpilze morphologisch und anatomisch sehr komplexe Strukturen bilden können, gibt es auf zellulärer Ebene kaum wesentliche Unterschiede zu nicht-lichenisierenden Pilzen (HONEGGER 1993). HAWKSWORTH & HILL (1984) vermuteten, daß Mycobionten ein ähnliches Wachstumspotential besitzen wie andere hyphenbildende Pilze. Wie in der Einleitung ausgeführt wurde, wird jedoch in der Literatur die Entwicklung und Struktur isolierter Mycobionten wenig differenziert beschrieben. Nach der allgemein akzeptierten Meinung bilden aposymbiotische Flechtenpilze lediglich ein undifferenziertes Hyphencluster, dessen zentraler Teil gewöhnlich von einer knorpeligen, verklebten Zellmasse gebildet wird, während filamentöses Wachstum in der Peripherie stattfindet (u.a. HONEGGER 1996a). Meine Untersuchungen haben jedoch eindeutig gezeigt, daß im Gegensatz zu den älteren Beschreibungen die Struktur und die Wuchsform von isolierten Mycobionten verschiedener Flechtenarten in Kultur variiert und darüber hinaus durch organische Nährstoffe, Phytohormone und das Substrat beeinflusst werden kann.

Da sich die anatomischen Strukturen in einem Thallus auf die Ausgangsformen der septierten Hyphe mit Verzweigungen zurückführen lassen (HENSSEN & JAHNS 1974), ist die Kenntnis der Faktoren, die an der Morphogenese von Hyphenfilamenten und damit auch an der Mycelbildung beteiligt sind, für das Verständnis des Symbioseorganismus Flechte von besonderer Bedeutung. Deshalb habe ich in meiner Arbeit zunächst die Entwicklung von Mycelien, ausgehend von den Ascosporen, im Detail untersucht. Es hat sich gezeigt, daß die generellen Prinzipien des Hyphenwachstums nicht lichenisierender Ascomyceten auch für die isolierten Mycobionten gelten. Im einzelnen sind jedoch auch sehr spezifische Reaktionen zu beobachten.

Auf der Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse wurden überdies der Einfluß verschiedener Medien bzw. Substrate und die Reaktionen der Hyphenfilamente auf einzelne Medienzusätze getestet. Durch die Verwendung der verschiedenen Membranfilter als permeable Barrieren konnten hierbei Unterschiede im Wachstumsverhalten teilweise verstärkt werden; z.T. wurden diese Unterschiede erst bei Kultur auf den Membranfiltern sichtbar. In den folgenden Kapiteln werden zunächst die Reaktionsmuster der Hyphenfilamente im Detail besprochen.

4.2.1 Tropismen

4.2.1.1 Chemotropismus

Als heterotrophe Organismen benötigen Pilze organische Nährstoffe für das Wachstum; sie reagieren jedoch nicht chemotroph auf kohlenhydrathaltige Substanzen (DEACON 1997). Lediglich bei Oomycota, die jedoch in neuerer Zeit zu den Heterokontophyta gestellt werden, konnte beobachtet werden, daß andere am Metabolismus beteiligte Stoffe, z.B. Aminosäuren, an Keimhyphen eine Änderung der Wachstumsrichtung hervorrufen (MANAVATHU & THOMAS 1985). Bei Interaktionen von Mycorrhiza-Pilzen mit ihrer Wirtspflanze kann chemotropisches Verhalten beteiligt sein: Die zwei Mycorrhiza-Pilze *Pisolithus tinctorius* und *Paxillus involutus* durchwachsen Membranfilter nur, wenn diese sie von den Wurzeln ihres Symbiosepartners Eukalyptus (*Eucalyptus globulus*) trennen. Dieses Verhalten wird von den Autoren auf eine selektive chemotropische Anziehungskraft bestimmter von den Wurzelspitzen ausgeschiedener Substanzen zurückgeführt (HORAN & CHLIVERS 1990).

Eine ähnliche Beobachtung konnte bei den hier durchgeführten Versuchen mit isolierten Flechtenpilzen gemacht werden: Die Mycobionten der Flechten *Xanthoria parietina*, *Physconia distorta* und *Anaptychia ciliaris* penetrieren die Filtermembranen verstärkt, wenn sie auf Glukose- oder Naphthalinessigsäure (NAA) -haltigen Medien kultiviert werden, der Mycobiont von *Physcia tenella* reagiert nur auf NAA-haltigem Medium mit intensiver Penetration. Dieses stark gerichtete Wachstum scheint auf positiven Chemotropismus hinzuweisen. Deshalb wurden Keimhyphen und vegetative Hyphen der Flechten einem Konzentrationsgradienten von Glukose und NAA ausgesetzt. Auch ihr Verhalten in Bezug auf Ribitol wurde getestet, da dieses Polyol eine wichtige Rolle bei diesen Symbioseorganismen spielt. Es konnte jedoch in keinem Fall eine Umorientierung der Wachstumsrichtung beobachtet werden, d.h. die Hyphen zeigen keine chemotropische Reaktion auf diese Substanzen. Deshalb müssen auch dem beschleunigten Penetrieren der Membranfilter auf bestimmten Kulturmedien andere Mechanismen zugrunde liegen.

4.2.1.2 Interaktionen der Bionten

I. Mycobiont ↔ Photobiont

Nach der sexuellen Reproduktion durch Ascosporen sind Flechtenpilze auf einen geeigneten Symbiosepartner angewiesen, um einen neuen Thallus zu bilden. Die Frage, ob sie in der unlichenisierten Form überleben können, wird in einem späteren Kapitel besprochen (s. Kap. 4.7.1). Beobachtungen an der Flechte *Xanthoria parietina* im Freiland haben gezeigt, daß sich nach der Keimung eines Sporenclusters die Hyphen in alle Richtungen über das Substrat ausbreiten, und durch das Bedecken einer relativ großen Substratfläche wird die Chance erhöht, auf den Symbiosepartner zu treffen (OTT 1987b). Das Auffinden des Photo-

bionten erfolgt nach Ansicht der Autorin jedoch nicht durch chemotrope Attraktion. Auch meine Laborversuche mit Isolaten von *Xanthoria parietina* und *Physconia distorta* ergaben, daß die unmittelbare Nähe von arteigenen Algenzellen nicht die Wachstumsrichtung von Keimschläuchen und vegetativen Hyphen beeinflußt. Das Zusammentreffen der beiden Symbiosepartner ist auch unter Laborbedingungen ein rein zufälliges Ereignis, bei dem die Hyphen beider Flechten sowohl mit ihren eigenen als auch mit den Photobionten der jeweils anderen Flechte Kontakt aufnehmen. Die erste Reaktion mit den Algen beruht auf Thigmotropismus der wachsenden Hyphenspitze, (AHMADJIAN 1967b, ARMALEO 1991), wobei eine runde Oberfläche ausschlaggebend ist (AHMADJIAN 1959, 1982; SCHUSTER 1992).

II. Mycobiont ↔ Mycobiont

Zwischen benachbarten Mycelien werden von den Isolaten Hyphen gebildet, über die sie miteinander Kontakt aufnehmen, und im weiteren Verlauf verschmelzen die Mycelien miteinander (s. Kap. 4.3.5). Es kann beobachtet werden, daß an der Seite eines Mycels, die einem anderen Mycel zugewandt ist, eine verstärkte Bildung der Kontakthyphen auftritt. Diese Beobachtung wurde auch bei Kulturversuchen mit vegetativen Diasporen der Flechten *Baeomyces rufus* und *Cladonia fimbriata* (KLÖCKNER 1998) und Freilandversuchen mit Soredien von *Lobaria scrobiculata* (HILMO 2001) gemacht. CLAYDEN (1997a, 1998) vermutete, daß bei der Krustenflechte *Rhizocarpon lecanorinum* die Gegenwart von benachbarten Areolen das Auswachsen von Hyphen zur Querverbindung stimuliert. Wenn ein solches Verhalten auf chemotropistische Attraktion zurückzuführen ist, muß das Signal vom Pilzpartner ausgehen, denn in meinen Untersuchungen haben auch die algenfreien, isolierten Mycobionten dieses Verhalten gezeigt. Die Natur des Reizes ist jedoch unbekannt. Auf jeden Fall ist es bemerkenswert, daß Pilzmycelien untereinander gezielt Kontakt miteinander aufnehmen, während ein solches Verhalten in der Pilz-Algen-Beziehung zu fehlen scheint.

4.2.2 Verzweigungsfrequenz der Hyphenfilamente

Der Grad der Verzweigung ist nicht nur bei der Mycelbildung nicht-lichenisierender Pilze und isolierter Flechtenpilze ein zentraler Aspekt. Auch innerhalb von Flechtenthalli, die nicht aus echten, meristematischen Geweben aufgebaut sind, sondern aus gewebeähnlichen Strukturen, die sich von einem Geflecht verzweigter und z.T. miteinander verklebter Hyphen ableiten lassen (HENNSEN & JAHNS 1974; JAHNS 1988a), spielt der Grad der Verzweigung eine wichtige Rolle. Deshalb sind Faktoren, die dieses Wachstumsverhalten beeinflussen, wichtig für die Ontogenie der Flechte und die Aufrechterhaltung des Symbiosegleichgewichtes.

Bei filamentös wachsenden Pilzen steigt die Verzweigungsfrequenz der Hyphen mit der Nährstoffkonzentration des Mediums, und in der Literatur (CROWFORD & RITZ 1994; DEACON

1997; RAYNER et al. 1994a, b) unterscheidet man zwischen der nährstoffsuchenden (nutrient searching) und der nährstofferschließenden (nutrient exploiting) Wachstumsstrategie. Die vorliegenden Literaturangaben über das Kulturverhalten der Mycobionten (s.o.) weisen darauf hin, daß sich dieses Prinzip auch im Wachstum der isolierten Flechtenpilze wirksam ist. Zur experimentellen Unterstützung dieser Annahme und um herauszufinden, auf welche Nährstoffkonzentration die Mycobionten sensibel reagieren, wurden exemplarisch die Isolate von *Xanthoria parietina* und *Physcia tenella* auf Kulturmedien mit einer abgestuften Nährstoffkonzentration herangezogen.

Ohne die Versorgung mit organischen Substanzen bilden diese Flechtenpilze Mycelien aus sehr feinen, langgestreckten Hyphen, die sich mit wenigen Verzweigungen radiär ausbreiten (s. Abb. 26, 28), ein Wachstumsverhalten, das für Pilzkolonien, die nach Nährstoffen „suchen“, typisch ist. Schon bei geringer Zufuhr von Kohlenhydraten, z.B. in Form von 0.2% Ribitol, werden verstärkt Verzweigungen gebildet (Vergl. Abb. 19 u. 20), ein Ausdruck einer Wachstumsstrategie, die dem Erschließen vorhandener Nährstoffe dient. Gleichzeitig wird deutlich, daß die Mycobionten schon auf geringe Erhöhungen der Nährstoffkonzentration reagieren.

Überträgt man dieses Verhaltensmuster auf lichenisierte Mycobionten, wird seine Bedeutung im Zusammenhang mit der Thallusmorphogenese offensichtlich:

- Die Photobionten werden in der Symbiose dazu angeregt, verstärkt Kohlenhydrate abzugeben.
- Die anatomischen Strukturen, die das Flechtenlager aufbauen, bestehen aus der Grundeinheit einer verzweigten, quergeteilten Hyphe.

Möglicherweise wird schon der erste Kontakt zwischen Pilz und Alge auf der Basis dieses Verhaltens intensiviert, denn die Pilzhyphen werden bei einem Zusammentreffen angeregt, sich zu verzweigen und die Algen zu umwachsen (AHMADJIAN 1969). Eine derartige Reaktion findet jedoch nicht im Dunkeln statt, wenn die Algen keine Photosynthese betreiben können (Ahmadjian 1982). Aus diesen Fakten ergibt sich die logische Folgerung, daß die von den Photobionten in der Symbiose produzierten und abgegebenen Kohlenhydrate am komplexen Regulationssystem der Flechten beteiligt sein müssen– ein Zusammenhang, der in bisher aufgestellten Modellen zur Thallusmorphogenese (z.B. ARMALEO 1991; CHILDRESS & KELLER 1980; LETROUIT-GALINOÛ & ASTA 1994) noch nie hergestellt wurde.

Mit jeder Anhebung der Konzentration organischer Nährstoffe erhöht sich die Verzweigungsfrequenz, bis schließlich nicht nur radiäres und tangenciales Wachstum auf dem Substrat und in das Substrat hinein stattfindet. Vielmehr verzweigen sich die Hyphen so häufig, daß auch Hyphenspitzen in Richtung des Mycelzentrums bzw. des Inokulates gebildet werden. Zusätzlich sind die Mycobionten in der Lage, Lufthyphen zu bilden, da die Substrathyphen ausreichend Nährstoffe zur Subventionierung dieses Wachstums aufnehmen können. Es entstehen die „typischen“ kompakten Mycelien der isolierten Mycobionten (s. Abb. 31), bei

denen die Verzweigungshäufigkeit nicht mehr zu erkennen ist. Insgesamt wird deutlich, daß das Wachstumsverhalten der Mycobionten direkt an die Nährstoffsituation gekoppelt ist und unter diesem Aspekt dem der nicht-lichenisierenden Pilze entspricht. Da die Mycobionten durch Erhöhung sowohl der Ribitol- als auch der Glukosezufuhr mit intensiverer Verzweigungsbildung reagieren, können sie die beiden Kohlenhydrate sehr wahrscheinlich ähnlich nutzen. Die Tatsache, daß Glukose und Ribitol auf die Morphogenese der Mycelien einen unterschiedlichen Einfluß ausüben, wird unter 4.6.2.2 besprochen.

Die Mycobionten der anderen in dieser Arbeit untersuchten Flechtenarten wurden entweder auf reinen Mineralmedien (BG110, MBV) oder auf Nährmedien mit einem Kohlenhydratanteil von mindestens 1.5 % (z.B. BG110 + Glu; MY) herangezogen. Sie zeigten ebenfalls im ersten Fall eine netzartige, im zweiten Fall eine kompakte Wuchsform. Es kann vermutet werden, daß dem Wachstum dieser Isolate die gleiche Strategie zugrunde liegt.

Die verschiedenen Wuchsformen der isolierten Mycobionten wurden auch von anderen Autoren (s.o.) beschrieben, die jedoch die Parallelen zu den Wachstumsstrategien der nicht lichenisierenden Pilze nicht hergestellt haben. Dadurch wurde häufig ein falscher Kausalzusammenhang hergestellt. HUBER et al. (1994) beschreiben ein flaches Wachstum des Mycobionten von *Xanthoria parietina* auf nährstoffarmen Medien, das im natürlichen Habitat im Zusammenhang mit einer komplexen Fortpflanzungsstrategie dieser Flechte stehen soll: Der Mycobiont könne sich schneller über das Substrat ausbreiten und den passenden Symbiosepartner finden. Die Kulturversuche haben jedoch gezeigt, daß diese Wuchsform primär ein Zeichen für Nährstoffmangel ist; erst als Konsequenz ergibt sich der oben beschriebene Vorteil. Da auch die anderen untersuchten Arten das gleiche Wachstumsverhalten zeigen, kann man nicht von einer besonderen Fähigkeit des Mycobionten von *X. parietina* sprechen. Vielmehr muß vermutet werden, daß solche Entwicklungsstadien bei anderen Flechtenarten bisher noch nicht unter natürlichen Bedingungen beobachtet werden konnten.

Auch Beobachtungen von AHMADJIAN (1980) an *Cladonia cristatella* lassen sich mit dem Prinzip, daß die Verzweigungsfrequenz direkt an die Nährstoffkonzentration gekoppelt ist, erklären: Der Mycobiont von *Cladonia cristatella* bildet auf natürlichen Substraten wie verrottendem Holz oder Gartenerde lediglich lockere, „baumwollartige“ Mycelien und zeigt nach Ansicht des Autors kein „Koloniewachstum“. „Kolonien“, also dreidimensionale Mycelien, wurden erst nach Transplantation der Mycelien auf ein organisches Medium gebildet.

Die Struktur dieser kompakten Mycelien ist jedoch nicht nur auf die erhöhte Verzweigungsfrequenz zurückzuführen, sondern auch auf die Bildung von Internen Hyphen, bzw. das Durchwachsen der eigenen, degenerierten Hyphen (s. 4.2.3.1): Eine hohe Verzweigungsfrequenz führt dazu, daß sich Zellen verschiedener Entwicklungsgrade bzw. Vitalitätszustände dicht beieinander befinden. Deshalb treffen wachsende Hyphenspitzen

auch auf degenerierte Zellen, in die sie hineinwachsen können. Schon AHMADJIAN (1980) stellte einen Zusammenhang zwischen der kompakten Wuchsform der Mycobionten in Kultur und der Bildung Interner Hyphen („intrahyphal hyphae“) her, wobei der Autor das Phänomen jedoch als „Selbstparasitismus“ einstufte und die Vitalitätszustände der beteiligten Hyphen unberücksichtigt ließ. Sehr wahrscheinlich spielt zusätzlich die generell geringe Wachstumsgeschwindigkeit der Mycobiont-Hyphen (s. Kap. 4.3.2) eine Rolle.

4.2.3 Reaktionen bei Zell-Zell-Kontakt

Interaktionen bzw. Reaktionen der Hyphen mit- und aufeinander sind u.a. von dem Vitalitätszustand der am Kontakt beteiligten Hyphen abhängig. Die Nährstoffsituation spielt eine untergeordnete Rolle, denn nach einem Kontakt zwischen zwei Pilzhyphen hängt die weitere Entwicklung davon ab, ob ein protoplasmatisches Kontinuum geschaffen werden kann, d.h. ob Anastomosierung stattfindet und somatische Kompatibilität vorliegt (AINSWORTH & RAYNER 1989; RAYNER et al. 1994a). Wird keine Fusionspore zwischen den benachbarten Hyphen geöffnet, kann es z.B. zu mycoparasitischen Reaktionen kommen. Berichte über intra- und interspezifischen Parasitismus (z.B. bei *Schizophyllum commune*) (NGUYEN & NIEDERPRUEM 1984; RAYNER & COATES 1987; YOKOYAMA & OGOSHI 1986) weisen darauf hin, daß dieses Verhalten eine wichtige Rolle in der Neuverteilung von Ressourcen spielt, wenn die Hyphen nicht in der Lage sind, Anastomosen zu bilden (RAYNER et al. 1994a).

4.2.3.1 Bildung Interner Hyphen

Die Bildung Interner Hyphen wurde in Kulturformen nicht-lichenisierender Pilze bisher selten beobachtet (BAUER, pers. Komm.), für Flechtenpilze in axenischer Kultur ist sie jedoch ein weit verbreitetes Charakteristikum (PEVELING 1973, AHMADJIAN 1980, 1987b). Die Autoren vermuten, daß der vermeintliche Selbstparasitismus eine Anpassung an das Leben unter extremen Bedingungen darstellt und daß die Internen Hyphen unter nährstoffarmen Bedingungen ein längeres Überleben ermöglichen (PEVELING 1973). Dieser Annahme widerspricht jedoch die Tatsache, daß den Mycobionten auf einem natürlichem Substrat (im unlichenisierten Zustand) kaum ein ausreichend hohes Nährstoffangebot zur Verfügung steht, um kompakte Mycelien auszubilden. Vielmehr führen nährstoffarme Bedingungen zu der oben beschriebenen radialen Ausdehnung, bei der nur wenige Verzweigungen gebildet werden.

Die Ursache für den vermeintlichen Selbstparasitismus bei isolierten Mycobionten wurde von JACOBS & AHMADJIAN (1971) in der Abwesenheit der Photobionten im Kulturmedium gesehen. In einer späteren Arbeit entwickelte AHMADJIAN (1980) das Modell, daß organische Substanzen im Kulturmedium die Komponenten, die ein Pilz von den Algen in Symbiose erhält, simuliert und dadurch eine bestimmte Wachstumsreaktion bei dem Mycobionten im Kontakt

mit runden Oberflächen auslöst. Der Pilz wird angeregt, Appressorien und Haustorien zu bilden, die dann die Nachbarhyphen penetrieren. Ein solches Verhalten sei eine Anpassung an die symbiotische Lebensweise mit den Photobionten, da diese im Flechtenthallus Glukose bzw. Zuckeralkohole abgeben. Solche Überlegungen gehen davon aus, daß sowohl lebende als auch abgestorbene Hyphen penetriert werden können und daß runde Oberflächen und Kohlenhydrate als Stimuli benötigt werden.

Entgegen den Beobachtungen von HUBER et al. (1994) konnte ich innerhalb der kompakten Mycelien des Mycobionten von *Xanthoria parietina* und auch denen der anderen untersuchten Arten (*Physconia distorta*, *Physcia tenella* und *Anaptychia ciliaris*) immer die Bildung der Internen Hyphen beobachten. Die ultrastrukturellen Untersuchungen der Mycelien haben gezeigt, daß die Mycobionten sich nicht selbst parasitieren, sondern ausschließlich in abgestorbene Hyphen eindringen. An penetrierten Hyphen konnten nie Zeichen einer Abwehrreaktion wie eine Wulstbildung an der Penetrationsstelle beobachtet werden. Außerdem sind eindringende Hyphen nicht in der Lage, die Cytoplasmamembran einer lebenden Wirtszelle zu durchdringen. Dieses Phänomen wird sowohl bei der Haustorienbildung im Flechtenthallus beobachtet (HONEGGER 1986), als auch bei der Kolonisierung von Wurzeln Höherer Pflanzen durch Endomycorrhiza Pilze (DEXHEIMER et al. 1987; DUDDRIDGE & READ 1982) und den Wirt-Parasit-Interaktionen von Brand- und Rostpilzen (BAUER et al. 1995, SZABO & BUSHNELL 2001). Intakte Membranen lebender Zellen werden von eindringenden Hyphen lediglich so deformiert, daß sie der Oberfläche der Penetrationshyphne wie eine Haut anliegen. Die in dieser Arbeit angefertigten Querschnitte und ultrastrukturellen Untersuchungen der Mycelien haben gezeigt, daß die eindringenden Hyphen nie durch eine Plasmamembran vom Zellumen der Wirtszelle abgegrenzt waren. Der Mycobiont penetriert folglich nur abgestorbene Zellen.

Es ist wahrscheinlich, daß eine Enzymaktivität in der Hyphenspitze das Durchwachsen der Zellwände ermöglicht. Hierbei wird in der Regel nur ein relativ enger Penetrationsporus mit einem Durchmesser zwischen 0.6 µm und 1 µm eröffnet, wobei gewährleistet sein muß, daß die Zellorganellen innerhalb des Protoplasten der wachsenden Hyphenspitze folgen können. Nach Durchtritt dieses Engpasses nehmen die Hyphen wieder einen größeren Durchmesser an. Ein solches Bild ergibt sich auch bei der Infektion von Pflanzenzellen durch obligate Parasiten (SZABO & BUSHNELL 2001).

Bei der Penetration scheint der Stimulus einer konvexen Oberfläche nicht benötigt zu werden, denn die Hyphenspitzen dringen nicht nur in andere Zellen ein (Abb. 36), sondern wachsen aus ihnen auch wieder hinaus (Abb. 38, 39). Im zweiten Fall kann die (jetzt konkave) Oberflächenform nicht als Reiz gewirkt haben. Berücksichtigt man die Wachstumsstrategie in Bezug auf die Nährstoffsituation, so muß man die Anwesenheit der Kohlenhydrate als Stimulus ebenfalls ausschließen. Vielmehr ist ein anderer Kausalzusammenhang herzustellen: Die ausreichende Nährstoffversorgung ermöglicht eine so hochgradige Verzweigung, daß wachsende Apices auf degenerierte Zellen treffen. Die

Penetration der eigenen abgestorbenen Hyphen kann als Auto-Heterotrophie angesehen werden und gibt den Mycobionten die Möglichkeit, sehr effizient alle vorhandenen Nährstoffe auszuschöpfen. Dieser Aspekt kann in Flechten, z.B. bei strauchförmigem Wachstum von Polstern von Bedeutung sein, da hier die vitalen oberen Teile auf die Reserve zurückgreifen können, die die toten Basalbereiche darstellen. Auch bei mehrschichtig wachsenden Blatt- und Krustenflechten ist ein solcher Prozess denkbar. Die Nutzung der eigenen abgestorbenen Hyphen als Substrat ist ein Hinweis darauf, daß die Flechtenpilze die Eigenschaften saprotroph lebender Pilze (JAHNS 1988a) nicht verloren haben.

Der in der Literatur verwendete Begriff „intrahyphal hyphae“ (AHMADJIAN 1980, 1987b; HUBER et al. 1994; JACOBS & AHMADJIAN 1971; PEVELING 1973) wird dem Vorgang ihrer Bildung und Bedeutung jedoch nicht gerecht, da nur die Momentaufnahme einer bestimmten Schnittebene beschrieben wird. Die Tatsache, daß die wachsenden Hyphenspitzen eines Mycels in eigene, abgestorbene Hyphenbereiche hinein und auch wieder herauswachsen, wird nicht zum Ausdruck gebracht.

In alten, makroskopisch nicht mehr wachsenden kompakten Mycelien stellen diese Hyphen den aktiven oder auch nach einer langen Kulturdauer aktivierbaren Anteil dar (Abb. 50). Bei Transplantation auf ein frisches Medium sind sie in der Lage, neue Mycelien auszubilden oder zu relichenisieren. Diese Fähigkeit macht man sich auch bei vielen in der Literatur beschriebenen Experimenten zunutze, denn zur Erzeugung von sogenannten „starter units“ werden solche kompakten Mycobionten zu kleinen Fragmenten homogenisiert (ARMALEO 1991; HONEGGER & KUTASI 1990). Auch hier ist die Aktivierbarkeit der kleinen Mycelienheiten sehr wahrscheinlich auf die Internen Hyphen zurückzuführen.

Innerhalb des Symbioseorganismus Flechte kann ein ähnliches Phänomen beobachtet werden: Leere Asci von *Letrouitia*-Arten können noch über längere Zeit im Hymenium stehenbleiben, und neue Asci werden innerhalb der Wände der abgesporteten Asci angelegt (HAFELLNER & BELLEMÈRE 1981). Durch die Einbeziehung der Ascuswände in die Dynamik des Hymeniums kann der laterale Druck des Hymeniums aufrechterhalten werden. Alte Ascuswände besitzen also eine zeitlich begrenzte „Paraphysenfunktion“. Die der Struktur-erhaltung dienende Funktion in diesem Teil des Flechtenthallus unterscheidet sich folglich von der Funktion der Substraterschließung bei den isolierten Mycobionten.

4.2.3.2 Anastomosenbildung

Bei der Bildung der Strukturen, die einen Flechtenthallus aufbauen, spielt neben Septierung und Verzweigung die Anastomosierung eine wichtige Rolle (HENSSEN & JAHNS 1974). Denn gerade weil in Flechten ein organisiertes Translokationssystem fehlt (HONEGGER 1991), muß ein Stofftransport durch das Hyphensystem stattfinden, um koordiniertes Wachstum zu ermöglichen. Innerhalb eines Flechtenthallus können Anastomosen in allen Bereichen

(Cortex, Algen- und Marksicht und Rhizinen) gefunden werden (HENNSEN & JAHNS 1974; HONEGGER 1993); es gibt jedoch keine systematischen Untersuchungen über die genaue Anordnung. Die Bedeutung der lateralen Verbindungen wird an rhythmisch wachsenden Pilzkolonien offensichtlich, deren Synchronität aufgehoben wird, wenn die Querverbindungen zerstört werden (JENNINGS & LYSEK 1999), denn die Koordination der Verzweigung wird durch Anastomisierung ermöglicht (RAYNER et al. 1994a). Nach HONEGGER (1993) spielen Anastomosen auch bei der Synchronisierung des Lobenwachstums von Blattflechten eine Rolle.

Auch die isolierten Mycobionten der hier untersuchten Flechtenarten bilden zwischen benachbarten lebenden Hyphen Anastomosen aus, verhalten sich also auch unter diesem Aspekt wie frei lebende, filamentös wachsende Pilze. Bei den sich flächig ausbreitenden Mycelien der Flechtenisolate kann dadurch ebenfalls ein gleichmäßiges Fortschreiten der Mycelfront erreicht werden. Übertragen auf auskeimende Flechtensporen im natürlichem Habitat, wie sie auch von OTT (1987a,b) beobachtet wurden, vergrößert sich durch die Bildung eines zusammenhängenden, anastomisierenden Netzes das Verbreitungs- und Überlebenspotential der Mycelien (RAYNER et al. 1994a). Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, auf einen geeigneten Symbiosepartner zu treffen. Zusätzlich können Diskontinuitäten innerhalb des Protoplasten (Abb. 27) oder Schädigungen durch äußere mechanische Einflüsse durch Anastomosenbildung abgemildert werden.

Möglicherweise spielt dieses Wachstumsverhalten auch bei der Entwicklung von Flechten aus vegetativen Verbreitungseinheiten eine Rolle. In Kulturexperimenten mit Soredien und Isidien wurde beobachtet, daß die Diasporen unter bestimmten Bedingungen zunächst in undifferenzierte „Gewebeklumpen“ degenerierten, bevor neue Loben gebildet wurden (JAHNS 1984, 1993). Für die Reorganisation kann die Neuverteilung der Nährstoffe durch Anastomisierung und Bildung Interner Hyphen von Bedeutung sein.

Bei den isolierten Mycobionten kann eine alternierende Intensität der Anastomosenbildung zusammen mit einer Änderung der Verzweigungsfrequenz zu einer Zonierung führen, die sich makroskopisch in konzentrischen Ringen manifestiert (Abb. 44). Damit unterscheidet sich diese Zonierung in der Bildung von der diurnalen Zonierung bei Arten von *Trichoderma* in Kultur: Hier unterdrückt Licht die Ausdehnung der Hyphenspitzen, die an die Substratoberfläche gelangen, wodurch sie sich stärker verzweigen. Hyphen innerhalb des Agar wachsen kontinuierlich mit weniger Verzweigungen weiter und „übergipfeln“ die Oberflächenhyphen (LYSEK 1978).

Für die untersuchten Mycobionten ist nicht bekannt, wodurch die verstärkte Anastomisierung und damit die Zonierung innerhalb des Mycels induziert wird. Die Faktoren Licht und Temperatur können ausgeschlossen werden, da die Isolate bei natürlichem Lichtwechsel und Raumtemperatur gelagert wurden, die Zonierung jedoch in einem Rhythmus von 2-3 Wochen gebildet wird.

Innerhalb der sehr dicht wachsenden Mycelien (auf nährstoffreichen Medien) konnte keine Anastomosenbildung beobachtet werden; ihr Vorkommen kann freilich nicht ausgeschlossen werden. Die Mycobionten von *Xanthoria parietina*, *Physconia distorta*, *Physcia tenella* und *Anaptychia ciliaris* durchwachsen unter diesen Bedingungen jedoch immer mit Internen Hyphen ihre z.T. abgestorbenen Mycelien.

4.2.4 Penetrationsfähigkeit der Mycobionten

Die für diese Untersuchungen verwendeten Membranfilter werden in der Mycologie häufig als semipermeable Barrieren genutzt, um wachsende Pilze von einem Agarmedium getrennt zu halten (HORAN & CHLIVERS 1990; MAY & LILLEY 1988). Wie schon im Kapitel 4.2.1.1 erwähnt wurde, penetrieren zwei Ectomycorrhiza Pilze von *Eucalyptus globulus* eine Cellulose-Filtermembran mit der Porengröße von 0.45 µm nur dann, wenn sich Wurzelspitzen des Eukalyptus auf der anderen Seite befinden. Die Autoren führen dieses Verhalten auf chemotropische Attraktion zurück (HORAN & CHLIVERS 1990). Die Beobachtung ist um so bemerkenswerter, als der Durchmesser einer Pilzhyphe normalerweise zwischen 1-15 µm liegt (HUDSON 1986). Bei der Kultur der isolierten Flechtenpilze zeigt sich, daß auch sie (mit Ausnahme des Isolates aus *Peltigera didactyla*) die Fähigkeit zur Penetration solcher Membranfilter haben, wobei artabhängige Unterschiede festgestellt werden können. Zusätzlich sind das Material und die Porengröße der Filtermembran und die Zusammensetzung des Kulturmediums von Bedeutung.

4.2.4.1 Abhängigkeit der Penetration vom Material und der Porengröße des Membranfilters

Die untersuchten Pilzisolare von *Xanthoria parietina*, *Physcia tenella*, *Physconia distorta*, *Anaptychia ciliaris* und *Baeomyces rufus* sind prinzipiell in der Lage, Cellulose-Filtermembranen zu penetrieren (Tab. 10). Hierbei weiten eindringende Hyphen die Poren der Membranen auf, wodurch die kompakte Membranstruktur verloren geht. Mit fortschreitendem Wachstum des Mycobionten wird das Filtermaterial aufgelöst (Abb. 54, 55). Es kann auch beobachtet werden, daß Mycobionten mit ihrer wachsenden Mycelfront die Filtermembran verdrängen und als Ringwulst beiseite schieben. Sehr wahrscheinlich spielt bei diesen Vorgängen eine Cellulaseaktivität der Flechtenpilze eine Rolle. In früheren Arbeiten wurde sowohl indirekt als auch direkt nachgewiesen, daß Flechtenpilze über Enzyme aus diesem Komplex verfügen: In Kulturversuchen konnte gezeigt werden, daß isolierte Mycobionten auf Medien mit Cellulose als einziger Carbonquelle wachsen können (AHMADJIAN 1977). Die Bildung extrazellulärer Cellulasen wurde bei der Flechte *Evernia prunastri* durch Cellobiose induziert und sowohl an den Photobionten als auch an den Mycobionten nachgewiesen (YAGÜE & ESTÉVEZ 1989; YAGÜE & ESTÉVEZ 1990). Auch bei der Kultur von

anderen Organismen, z.B. Ectomycorrhiza Pilzen, hat man einen Gewichtsverlust an Cellulose-Membranen durch Cellulaseaktivität festgestellt (BAJWA et al. 1985, MAY & LILLEY 1988) und ist deshalb später zur Verwendung der inerten Durapore-Membranfilter übergegangen.

Die Tatsache, daß es den Pilzhypen erleichtert ist, einen Cellulose-Membranfilter zu penetrieren, wird auch bei einer Transplantation der Membranfilter in das Freiland deutlich (s. Kap. 3.4.2): Unter den natürlichen Bedingungen siedelten sich nur auf Filtern dieses Materials Flechtenprimordien an, indem sie sich mit feinen Hyphen verankerten (Abb. 121, 122). Auf der inerten Durapore-Filtermembran wurden keine Jugendstadien von Flechten gefunden.

Der innerte Durapore-Membranfilter kann von den Flechtenisolaten aus *Xanthoria parietina*, *Physconia distorta* und *Anaptychia ciliaris* ebenfalls bei einem Porendurchmesser von 0.45 µm penetriert werden. Bei diesem Vorgang wird die Membranstruktur jedoch nicht angegriffen, eine Beobachtung, die auch schon von OLIVER et al. (1989) bei Kultur des Mycobionten von *Stereocaulon paschale* gemacht wurde. Poren von 0.22 µm wurden im gleichen Versuch nicht mehr durchdrungen. Die Mycobionten können sich also mit ihrem Hyphendurchmesser, der in der gleichen Größenordnung liegt wie der von nicht-lichenisierenden Pilzen (MOLINA & CRESO 2000), in gewissen Grenzen an eine Porengröße anpassen. Eine Porengröße von 0.22 µm läßt dies jedoch nicht mehr zu, wodurch das verzögerte Eindringen in eine Cellulose-Membran mit dieser Porengröße erklärt werden kann.

Die Fähigkeit der isolierten Flechtenpilze, enge Passagen zu durchwachsen, kann schon an der Bildung Interner Hyphen beobachtet werden. Hier werden beim Durchwachsen von Zellwänden Poren zwischen 0.6 µm und 1 µm eröffnet, und diese Größe scheint geeignet zu sein, den Protoplasten mit seinen Zellorganellen passieren zu lassen.

4.2.4.2 Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Nährmediums

Das Penetrationsverhalten der meisten Isolate ist zusätzlich von der Zusammensetzung des Agarmediums abhängig, wobei die Polarität des Mycelwachstums (s. Kap. 4.3.1) eine Rolle spielt. Medienkomponenten, die ein stark polares Wachstum der Mycobionten anregen, führen gleichzeitig zu einer verstärkten Penetration. Ein solches Verhalten kann z.B. bei Kultur der Isolate von *Physconia distorta* und *Physcia tenella* auf Durapore-Membranfilter über einem glukosehaltigem Medium beobachtet werden. Im Vergleich dazu führt ein ribitolhaltiges Medium dazu, daß die Hauptmasse des Mycels oberhalb der Filtermembran gebildet wird und sich leicht ablösen läßt, da nur sehr feine Hyphen oberflächlich in den inerten Filter einwachsen können (Abb. 90a, b; 91a, b).

Die Tatsache, daß das Penetrationsverhalten von der Zusammensetzung des Nährmediums abhängt, kann auch die Beobachtungen von OLIVER et al. (1989) an dem Mycobionten von

Xanthoria parietina erklären. In dieser Untersuchung war das Isolat nicht in der Lage, einen Durapore-Membranfilter mit einer Porengröße von 0.45 µm zu durchdringen. Meine Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß dieser Mycobiont prinzipiell in der Lage ist, diese Porengröße zu durchwachsen.

Der Mycobiont von *Peltigera didactyla* bildet eine Ausnahme unter den untersuchten Arten, denn er dringt selbst unter Bedingungen, bei denen andere Isolate intensiv die Filtermembranen penetrieren, nicht in das Substrat ein. Sogar die Grenze zwischen zwei verschiedenen Agarblöcken scheint für diesen Pilz eine Barriere darzustellen, die nicht überwunden wird. Möglicherweise ist für dieses Verhalten die Art des Kulturmediums von Bedeutung: Die ersten Entwicklungsstadien dieses Isolates hatten sich auf dem stickstoffhaltigem Medium MBV entwickelt. Zur Fortführung der Kultur wurden die jungen Mycelien zusammen mit dem sie umgebenden Agarblock auf verschiedene neue Medien transferiert (s. Kap. 3.1.1.2). Weiteres Wachstum konnte nur an solchen Isolaten beobachtet werden, die auf ein mit Kohlenhydraten und Biotin angereichertes Mineralmedium (BG110) übertragen worden waren, das jedoch keine Stickstoffverbindungen enthielt. Möglicherweise führt der Mangel an Stickstoff in diesem neuen Medium dazu, daß der Mycobiont nicht in diesen Agar eindringt, sondern sein Wachstum auf dem Agarblock aus MBV beschränkt. Dieses Verhalten würde die enge Abhängigkeit der Mycobionten aus dieser Flechtengattung von der Stickstoffverfügbarkeit (Crittenden 1991) widerspiegeln. Im lichenisierten Zustand sind die *Peltigera*-Arten u.a. dadurch charakterisiert, daß sie immer mit einem Cyanobakterium (*Nostoc*) als primärem oder sekundärem Photobionten assoziiert sind. Diese Prokaryonten fixieren verstärkt in der Symbiose freien Luftstickstoff, der an die Mycobionten abgegeben wird (FEIGE & JENSEN 1992).

4.2.4.3 Artspezifische Unterschiede

Die untersuchten Mycobionten sind, wie schon für *Peltigera didactyla* beschrieben, nicht gleichermaßen zur Penetration der verschiedenen Filtermembranen befähigt. Während der Mycobiont von *Physcia tenella* einen Durapore-Membranfilter mit einer Porengröße von 0.65 µm nicht durchdringen kann, zeigt sich in der Kultur auf einem Cellulose-Filter jedoch eine prinzipiell starke Tendenz des Mycobionten zur Substratpenetration, die von der Zusammensetzung des Nährmediums unabhängig zu sein scheint. Es kann häufig beobachtet werden, daß die Hyphen unmittelbar nach der Keimung in das Substrat einwachsen, eine Beobachtung, die bei den anderen Isolaten eher auf nährstoffarmen Medien gemacht wird. Möglicherweise ist das Isolat aus *P. tenella* jedoch nicht in der Lage, den Hyphendurchmesser auf 0.65 µm zu reduzieren. Bei der Penetration von Cellulose-Membranen kann die Porengröße durch Enzymaktivität verändert werden.

4.2.4.4 Bedeutung für die Kolonisierung natürlicher Substrate

Sowohl sexuelle als auch vegetative Verbreitungseinheiten der Flechten müssen sich vor der Ausdifferenzierung in einen Thallus in der Regel zunächst anheften (ARMSTRONG 1988), wobei das Material und die Textur des Substrates entscheidende Faktoren für einen Besiedlungserfolg sind (u.a. ARMSTRONG 1988; KLÖCKNER 1998; WEGNER 2001). Die artabhängigen Unterschiede in der Penetrationsfähigkeit der Mycobionten haben sehr wahrscheinlich ebenfalls einen Einfluß auf den Besiedlungserfolg des Symbioseorganismus Flechte. Der Mycobiont von *Xanthoria parietina* ist z.B. in der Lage, einen inerten Membranfilter mit einer Porengröße von nur 0.45 µm zu penetrieren, was auf eine starke Reduktion des Hyphendurchmessers zurückgeführt werden kann. Die Fähigkeit des Mycobionten, den Hyphendurchmesser zu verringern, trägt vermutlich mit dazu bei, daß sich die Flechte *X. parietina* auf den verschiedensten Substraten wie Rinde, Gestein und Beton ansiedeln kann. Im Vergleich dazu ist der Mycobiont von *P. tenella* weniger flexibel. Die Flechte wird nur auf dem Substrat Baumrinde angetroffen, wobei weichrindige Bäume bzw. Sträucher wie z.B. *Sambucus niger* bevorzugt werden. Hier gehört sie zu den Pionierorganismen. Solche Überlegungen sind jedoch in einem Gesamtzusammenhang zu sehen, da das Besiedlungsverhalten der Flechten zusätzlich von vielen anderen Faktoren, u.a. dem pH-Wert des Substrates und den mikroklimatischen Bedingungen, beeinflußt wird.

Im Zusammenhang mit der Frage, ob unlichenisierte Mycobionten Teil der Mycoflora natürlicher Substrate seien (s. Kap. 4.7.1), muß der Penetrationsfähigkeit der Hyphen ebenfalls eine Bedeutung zugesprochen werden.

4.2.5 Bedeutung der Concentric Bodies

Auf ultrastruktureller Ebene unterscheiden sich lichenisierte Mycobionten von der unlichenisierten Form durch die in der Literatur als „concentric bodies“ bezeichneten proteinhaltigen subzellulären Strukturen (AHMADJIAN 1980; BELLEMÈRE 1973; HONEGGER 1996a; PEVELING 1973). Auch ich habe diese Bildungen nie in axenischen Kulturen von Flechtenpilzen gefunden. Innerhalb von Mycelien, die in das Freiland transplantiert worden waren, wurden jedoch vereinzelt Hyphen mit concentric bodies gefunden. Sehr wahrscheinlich handelt es sich hierbei um Hyphenfilamente, die von den aufsitzenden Flechtenloben in den Mycobionten hineingeschoben wurden und sich im Zustand der Lichenisierung befanden.

Neben den isolierten Mycobionten wurde auch die Flechte *Rhizocarpon geographicum* bezüglich der intrazellulären Struktur untersucht. Die Sporen wie auch der Thallus (Areolen) dieser Krustenflechte besitzen concentric bodies (ASCASO & GALVAN 1975). Nach der Sporulation können auskeimende Sporen ein netzartiges melanininkrusiertes Hyphengeflecht auf dem Gestein bilden, wobei die Mycelien verschiedener Sporen miteinander fusionieren. Dieser Prothallus schiebt sich auch dann weiter über das Substrat, wenn nach

der Lichenisierung mit dem geeigneten Photobionten (*Trebouxia spec.*) Areolen gebildet wurden (ASTA & LETROUIT-GALINOU 1995; ASTA et al. 1989). Es stellt sich nun die Frage, ob die netzartig wachsenden Hyphen des Prothallus genau wie die Areolenhyphen in den Lichenisierungsprozess einbezogen sind. Als mögliches Kriterium kann die Ausbildung der concentric bodies herangezogen werden. In der Literatur gelten nur die Areolen von *R. geographicum* als lichenisiert. (LETROUIT-GALINOU & ASTA 1994). Meine Untersuchungen haben ergeben, daß die Hyphen des Prothallus ebenfalls durch diese besonderen Zellorganellen gekennzeichnet sind. Sie können folglich in Bezug auf dieses Kriterium ebenfalls als lichenisiert bezeichnet werden.

Leider ist es im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht gelungen, frei lebende, noch an keinem Symbioseprozess beteiligte Hyphen dieses Mycobionten vom Substrat zu isolieren, und auch die Kultivierung über Ascosporen im Labor war nicht erfolgreich (s. 4.1.3). Deshalb konnte die Frage nicht geklärt werden, ob die Proteinkörper im Verlauf der Ontogenie von den Ascosporen über den unlichenisierten Prothallus bis zur areolierten Flechte erhalten bleiben oder erst wieder wie bei den anderen untersuchten Arten im Symbioseorganismus gebildet werden.

Die Hypothese von HONEGGER (1995) hingegen, daß concentric bodies komprimierte Gasblasen seien, die durch Austrocknung entstehen, ist durch meine Versuche widerlegt worden: Die Isolate von *Xanthoria parietina* und *Physcia tenella* wurden für 2 Monate einem Feucht-Trocken-Rhythmus unterzogen. Es haben sich in dieser Zeit keine der subzellulären Strukturen im Cytoplasma der Hyphen gebildet.

4.2.6 Zusammenfassung II

Wie meine experimentellen Untersuchungen eindeutig gezeigt haben, besitzen die Hyphenfilamente der nicht-lichenisierten Mycobionten viele gemeinsame Eigenschaften mit nicht-lichenisierenden, filamentös wachsenden Ascomyceten:

- Die Verzweigungsfrequenz der Hyphenfilamente ist an den Gehalt an organischen Nährstoffen des Substrates gekoppelt.
- Sie zeigen keine chemotropischen Reaktionen in bezug auf angebotene organische Nährstoffe.
- Interaktionen zwischen benachbarten Hyphen sind u.a. vom Vitalitätszustand der beteiligten Filamente abhängig. Zwischen lebenden Hyphen findet Anastomisierung statt, die zu einer Synchronisation des Wachstums führt.

- Die Hyphen sind in der Lage, in verschiedene Substrate einzudringen und Poren zu penetrieren, deren Durchmesser geringer als der normale Hyphendurchmesser ist. Artabhängige Unterschiede können sich auf das Besiedlungsverhalten der einzelnen Flechtenarten auswirken.

Darüber hinaus wurden Besonderheiten im Verhalten der Flechtenpilze herausgearbeitet, mit denen erklärt werden kann, wie ihre als charakteristisch geltende kompakte Form unter Kulturbedingungen entsteht: Die Hyphenfilamente der Mycobionten reagieren sehr sensibel auf die Nährstoffkonzentration, und schon relativ geringe Kohlenhydratgehalte bewirken eine extrem hohe Verzweigungsfrequenz. Zusätzlich ist die Wachstumsgeschwindigkeit sehr gering. Vitale, im Wachstum befindliche Hyphenspitzen treffen auf ältere, degenerierte Hyphen, in die sie eindringen und die sie als Substrat nutzen (Bildung der sogenannten „Internen Hyphen“). Es tragen somit mehrere spezifische Eigenschaften der Hyphenfilamente von Mycobionten dazu bei, daß unter Laborbedingungen die kompakten Mycelien gebildet werden.

Da die Mycobionten auch innerhalb des Flechtenthallus nur nach ihrem natürlich vorgegebenen Potential reagieren können (ARMALEO 1991), lassen sich aus Reaktionsmustern der isolierten Mycobionten Rückschlüsse auf Differenzierungsprozesse innerhalb eines Flechtenthallus ziehen. Die Bedeutung der hier zusammengefassten Charakteristika für den Symbioseorganismus Flechte wurde erstmalig diskutiert.

Lichenisierte Mycobionten zeichnen sich im Gegensatz zu der isolierten Form durch das Vorhandensein von concentric bodies aus. Meine Kulturexperimente haben die Hypothese widerlegt, daß diese ultrastrukturellen Elemente komprimierte Gasblasen seien, die durch Austrocknung entstanden.

4.3 Mycelentwicklung und Reaktionspotential

Die Mycelentwicklung der untersuchten Mycobionten wird durch die diskutierten Reaktionsmuster der Hyphenfilamente bestimmt. Für die Übertragbarkeit der folgenden Beobachtungen war es von besonderer Bedeutung, daß nicht mit homogenisiertem Material gearbeitet, sondern die Entwicklung der Mycelien ausgehend von den auch unter natürlichen Bedingungen entstehenden Sporenclustern erfaßt wurde. Wie schon ausgeführt wurde, entstehen nach der Sporenkeimung Verzweigungen mit variierender Häufigkeit als Ausdruck eines unterschiedlich graduierten radiären (erforschenden) oder tangentialen (ausbeutenden) Wachstums. Dieses Verhalten bewirkt, daß auf Substraten mit einer homogenen Nährstoffverteilung Mycelien mit einer in der Aufsicht kreisförmigen Mycelfront entstehen. Je mehr Sporen an der Mycelbildung beteiligt sind, desto weniger Verzweigungsschritte sind notwendig, um diese „Idealform“ zu erreichen; sie wird jedoch auch von monosporen Isolaten erreicht. Eine solche Wuchsform ist unter dem Gesichtspunkt einer ökonomischen Substraterschließung sinnvoll und wird unabhängig von der Konzentration organischer Nährstoffe angestrebt.

Der innere Aufbau von Mycelien filamentös wachsender Pilze ist jedoch von dem Nährstoffangebot abhängig, denn das Verhältnis zwischen radiären und tangentialen Wachstumsprozessen bestimmt die räumliche Dichte der Hyphenanordnung (RAYNER et al. 1994a). Bei einem hohen Nährstoffangebot werden viele Verzweigungen gebildet, d.h. es findet verstärkt tangenciales Wachstum statt, und dadurch entstehen dichte Strukturen. Unter nährstoffarmen Bedingungen konzentrieren sich die Wachstumsvorgänge auf die radiäre Ausdehnung, so daß das Wachstum stark polarisiert ist (RAYNER et al. 1994a). Dieses einfache, jedoch grundlegende Prinzip läßt sich auch auf die Flechtenpilze im lichenisierten wie im unlichenisierten Zustand übertragen. Der Grad der Polarität und die davon abhängige räumliche Entwicklung ist auch im Symbioseorganismus Flechte ein bestimmender Faktor für die Morphogenese.

4.3.1 Radiäre Ausdehnung und Polarität des Wachstums

In den hier vorgestellten Kulturversuchen entwickeln sich unabhängig vom Nährstoffangebot aus den auskeimenden Sporen der Flechten ebenfalls radiäre Mycelien. Die Polarität des Wachstums ist, wie oben erläutert, um so größer, je weniger Verzweigungen gebildet werden. Die untersuchten Mycobionten zeigen unter nährstoffarmen Bedingungen kaum tangenciales Wachstum. Bei erhöhter Nährstoffzufuhr und auch als Reaktion auf die zugeführten Algen tritt verstärkt tangenciales Wachstum auf, das zu einer Verdichtung der Mycelstruktur führt.

Die gleiche Beobachtung wird bei der natürlichen Entwicklung einer Flechte (z.B. *Xanthoria parietina*) gemacht: Nach dem Auskeimen der Ascosporen bilden unlichenisierte Hyphen ein

radiäres, „areoliertes“ Mycel (OTT 1987b) und können in diesem geringen Differenzierungszustand eine relativ große Substratfläche überwachsen. Ein Kontakt mit Fremdalgen kann zur Bildung eines undifferenzierten Gewebeverbandes und mit passenden Photobionten zur Relichenisierung führen. In beiden Fällen wird tangentiales Wachstum angeregt, wodurch die starke Polarität des Wachstums reduziert wird. Es entsteht ein kompaktes Hyphen-Algen-Konglomerat bzw. ein ausdifferenzierter Flechtenthallus.

Das Prinzip der radiären Ausdehnung wird jedoch auch von dem Symbioseorganismus Flechte in vielen Fällen aufrecht erhalten, wobei das Verhältnis von radiärem zu tangentialem Wachstum durch die Lichenisierung verschoben ist. Vergleicht man die Wuchsform verschiedener Flechten im Hinblick auf die Art des Kontaktes zwischen Thallus und Substrat, so scheint eine radiäre Ausdehnung bei Flechten, die eng an das Substrat gebunden sind, z.B. bei den Krustenflechten, am ehesten erhalten zu sein. Bei Blattflechten, die mehr oder weniger intensiven Kontakt zum Substrat haben, ist sie in vielen Fällen auch noch zu beobachten (z.B. *Xanthoria parietina*). Strauchflechten und locker wachsende Blattflechten hingegen bilden einen bandförmigen Thallus, der keine radiäre Ausdehnung zeigt (z.B. *Anaptychia ciliaris*), und haben häufig nur über ein Haftorgan Kontakt mit dem Substrat. In der Gattung *Cladonia* finden sich sowohl ein blattförmiger Thallus horizontalis, der dem Substrat aufliegt, als auch ein strauchförmiger Thallus verticalis, der sich über das Substrat erhebt.

Die Polarität des Mycelwachstums wird jedoch nicht nur von der Nährstoffkonzentration des Kulturmediums bestimmt, sondern ist auch von dessen Zusammensetzung abhängig, z.B. von der Art der Kohlenhydrate. Auch das Phytohormon NAA beeinflusst die Polarität. Diese Aspekte werden unter 4.6.2 diskutiert.

4.3.2 Radiale Ausdehnungsgeschwindigkeit

Nicht nur Flechten gelten als langsam wachsende Organismen (ARMSTRONG 1988), sondern auch die aus ihnen isolierten Mycobionten (AHMADJIAN 1993; HENSSEN & JAHNS 1974; HONEGGER 1993; HUBER et al. 1994). AHMADJIAN (1987a) schreibt das langsame Wachstum der Flechtenpilze einer langen Phase der Coevolution der beiden Bionten zu, wodurch dieser Charakter genetisch festgelegt worden sei. Langsames Wachstum drückt sich jedoch nicht nur in einer geringen Wachstumsrate (Zunahme der Biomasse/Zeit) aus, sondern kann auch gleichzeitig eine geringe radiale Ausdehnungsgeschwindigkeit beinhalten.

Der Vergleich der radialen Ausbreitung z.B. von *Neurospora crassa* (einem in der Mycologie gut untersuchten Ascomyceten) und von dem Mycobionten der Flechte *Xanthoria parietina* zeigt einen beträchtlichen Unterschied: *Neurospora crassa* wächst ca. 3 mm/Stunde (CARLILE 1994), der Mycobiont von *Xanthoria parietina* maximal 550 µm/Monat. Einige Autoren

(AHMADJIAN et al. 1980) vermuteten, daß die Bildung von Internen Hyphen für die Langsamkeit des radialen Ausbreitens der Flechtenpilzmycelien verantwortlich sei. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Expansion der Mycelien nicht davon abhängt, ob sie sich unter nährstoffarmen Bedingungen mit wenig verzweigten Hyphen entwickeln oder auf nährstoffreichen Medien als kompaktes Mycel unter der Bildung von Internen Hyphen. In beiden Fällen zeigen die Mycelien die gleiche radiale Zuwachsrates. Vielmehr kann das folgende generelle Prinzip zum Wachstum filamentöser Pilze auch auf die untersuchten isolierten Flechtenpilze übertragen werden:

Kolonien von nicht-lichenisierenden Pilzen und isolierte Mycobionten dehnen sich in einer artabhängigen Geschwindigkeit, nahezu unabhängig von der Nährstoffkonzentration und sogar auf einem reinen Wasser-Agar Medium aus. Die Reaktion von filamentös wachsenden Pilzen auf die Nährstoffverfügbarkeit ist die Frequenz, mit der Verzweigungen gebildet werden, und nicht eine Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit (DEACON 1997).

Das extrem langsame Wachstum der Flechtenpilze ist sehr wahrscheinlich eine entscheidende Grundlage dafür, daß ein Lichenisierungsprozess erfolgen kann. Nur langsam wachsenden Pilzhyphen ist es möglich, Photobionten in eine gemeinsame Matrix zu integrieren und deren Population zu kontrollieren, so daß die koordinierte Entwicklung eines Flechtenthallus erfolgen kann. Hyphenfilamente, die sich schnell über das Substrat ausbreiten, würden die Algenzellen lediglich überwachsen und ihnen davonwachsen.

AHMADJIAN (1993) unterteilte die Mycobionten nach ihrer Ausdehnungsgeschwindigkeit in drei verschiedene Gruppen:

1. die schnell wachsenden Isolate, die im Vergleich mit anderen nicht-lichenisierenden Pilzen jedoch immer noch langsam wachsen; in dieser Gruppe findet man die Mycobionten von Krusten- und Schuppenflechten,
2. die langsam wachsenden Pilzisolate aus foliosen Flechten und
3. die nicht wachsenden Mycobionten, zu denen solche aus Flechten mit sehr großen Loben gerechnet werden, z.B. die *Peltigera*-Arten.

Diese Einteilung stellt eine sehr grobe Vereinfachung dar und kann auch z.T. nicht mit meinen Ergebnissen bestätigt werden. Die Flechte *Baeomyces rufus* müßte mit ihrem schuppenförmigen Wachstum in die erste Gruppe gestellt werden; der isolierte Mycobiont weist jedoch mit 480 µm radialem Zuwachs pro Monat keine auffällig höheren Ausbreitungsrates auf als die anderen untersuchten Arten (z.B. *X. parietina* mit 330 µm/Mo). Lediglich bei der Keimschlauchbildung kann ein ungewöhnliches Potential bei diesem Isolat beobachtet werden, denn die Keimlinge bildeten innerhalb von 2 Tagen Hyphen von bis zu 180 µm Länge aus. Möglicherweise wird diese hohe Expansionsrate durch Reservestoffe der Sporen ermöglicht.

Foliose Flechten haben ein radiales Wachstum von 0.5 mm – 4 mm/Jahr, und bei Strauchflechten liegt der Wert zwischen 1.5 mm – 5 mm/Jahr (HALE 1974). Somit liegen die monatlichen Zuwachsraten bei der Mycelbildung aus Ascosporen der Flechten *Xanthoria parietina*, *Physcia tenella*, *Physconia distorta* und *Anaptychia ciliaris* mit Werten 230 µm bei *A. ciliaris* und 330 µm bei *X. parietina* in der gleichen Größenordnung wie die der Flechtenthalli. Diese Arten können nach der obigen Einteilung der 2. Gruppe, den langsam wachsenden Isolaten, zugeordnet werden. Bei den meisten der hier untersuchten Mycobionten wird also durch die axenischen Kulturbedingungen kein verlangsamtes Wachstum erzeugt.

Die Mycobionten aus der Gattung *Peltigera* werden zu den nicht wachsenden Isolaten gerechnet (s.o., AHMADJIAN 1993); dennoch ist es in dieser Arbeit gelungen, den Pilz aus *Peltigera didactyla* in axenischer Kultur heranzuziehen. Erste feine Hyphen dieses Mycobionten zeigten nach dem Auskeimen ein relativ „schnelles“ Wachstum (500 µm/Mo), nach einer späteren Umsetzung kleiner Mycelien betrugen die maximalen Zuwachsraten jedoch nur noch ca. 75 µm/Monat. Hiermit zeigt sich dieses Isolat als extrem langsam wachsend – eine Beobachtung, die auch schon von STOCKER-WÖRGÖTTER & TÜRK (1994) an dem Mycobionten von *Peltigera leucophlebia* gemacht wurde.

Dieses Ergebnis ist um so bemerkenswerter, als die lichenisierten *Peltigera*-Arten als schnellwüchsige Flechten gelten und eine Ausnahmegruppe unter den Blattflechten bilden (AHMADJIAN 1993; ARMSTRONG 1988; HENSSEN & JAHNS 1974). Für *Peltigera canina* wurde z.B. im Freiland ein Zuwachs von 1.8 cm (FREY 1959) bis zu 6.4 cm (WEBSTER & BROWN 1997) in einem Jahr beobachtet. Solche Schwankungen innerhalb einer Art werden bei Blatt- und Strauchflechten u.a. mit verschiedenen klimatischen Bedingungen begründet (HENSSEN & JAHNS 1974). Für *Peltigera spuria* v. *erumpens*, die heute als *Peltigera didactyla* (With.) Laundon bezeichnet wird, sind jedoch lediglich Zuwachsraten von bis zu 4 mm/Jahr beobachtet worden (FREY 1959). Dennoch liegt dieser Wert weit über dem des isolierten Mycobionten, der sich hochgerechnet ca. 0.9 mm/Jahr ausdehnt. Berücksichtigt man die Tatsache, daß die Mycobionten in einem Flechtenthallus unter natürlichen Bedingungen nicht kontinuierlich mit Nährstoffen durch die Photobionten versorgt werden, wäre eine geringere Ausdehnungsgeschwindigkeit zu erwarten als bei den Isolaten unter konstanten Bedingungen. Es wird deutlich, daß die bisher angebotenen Kulturbedingungen nicht geeignet sind, annähernd das Wachstumspotential dieser Pilzgruppe auszuschöpfen. Für die radiale Ausbreitung des Symbioseorganismus scheinen nicht nur organische Nährstoffe, sondern auch andere Faktoren, deren Natur noch unbekannt ist, eine wichtige Rolle zu spielen.

4.3.2.1 Vergleiche mit Literaturwerten

In der Literatur gibt es für den Mycobionten aus *Xanthoria parietina* abweichende Angaben über den radialen Zuwachs. In einem Fall wird von einer radialen Entwicklungsrate von 8.3 mm/Monat berichtet (MOLINA & CRESPO 2000). In einer anderen Arbeit zur Wachstumssteigerung von Flechtenpilzen wird es jedoch als Erfolg gewertet, daß das radiale Wachstum dieses Isolates durch die Zugabe von Extrakten aus Alfalfa Samen von 0.3 mm um den Faktor 10 auf 3 mm/Monat erhöht werden konnte (GALUN & PELEG-ZURIEL 2000). Die Angaben des Kontrollversuchs (0.3 mm/Mo) der gleichen Arbeit liegen in einer ähnlichen Größenordnung wie der in meinen Untersuchungen gemessene Wert (0.33 mm bzw. 0.55 mm/Mo). In der zuerst zitierten Publikation (MOLINA & CRESPO 2000) wird auch das Wachstum des Mycobionten aus *Physconia distorta* mit 5 mm/Monat sehr hoch angesetzt und unterscheidet sich um mehr als das 10-fache von Werten, die sich in meinen Experimenten ergaben (0.32 mm bzw. 0.90 mm/Mo).

4.3.2.2 Änderung der Ausdehnungsgeschwindigkeit

An den Isolaten von *X. parietina*, *P. distorta* und *Anaptychia ciliaris* konnte beobachtet werden, daß sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit nach einem Phasenwechsel (s. Kap. 4.3.4) erhöht. Diese Mycobionten zeigen nach dem Auskeimen der Sporen bei der Mycelbildung zunächst eine geringere radiale Zuwachsrate, die jedoch unabhängig von der Konzentration organischer Nährstoffe und damit auch von der räumlichen Ausdehnung ist. Nach einem Phasenwechsel, der mit einem Umschalten der Verzweigungshäufigkeit auf eine geringere Frequenz verbunden ist, erhöht sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit teilweise um mehr als das 3-fache. Solche abrupten Änderungen im Verzweigungsmuster („phase shifts“) können nach RAYNER (1994a) durch Anastomisierung und Umverteilung der Ressourcen auch die Ausbreitungsgeschwindigkeit beeinflussen. Übertragen auf natürliche Verhältnisse bedeutet eine Erhöhung der Zuwachsrate eine größere Wahrscheinlichkeit, einen Symbiosepartner aufzufinden (HILL 1994).

4.3.3 Nährstoffversorgung des Mycobionten

Die Art der Nährstoffversorgung des lichenisierten Mycobionten korreliert nicht mit der des isolierten Pilzes. Innerhalb eines Flechtenthallus werden die Mycobionten von ihrem photosynthetisierenden Partner mit Kohlenhydraten versorgt, wobei Chlorophyta in der Symbiose Zuckeralkohole (die Gattung *Trebouxia* z.B. Ribitol) und Cyanobakterien Glukose an den Pilzpartner abgeben (GALUN 1988a). Wachsende Lobenränder und andere algenfreie Bereiche müssen von Hyphen, die in Kontakt mit Photobionten stehen, ernährt werden. Im lichenisierten Zustand nehmen Mycobionten sehr wahrscheinlich kaum organische Nähr-

stoffe aus dem Substrat auf (ARMSTRONG & SMITH 1996), sondern sind auf die von den Photobionten abgegebenen Kohlenhydrate angewiesen. Die Aufnahme erfolgt vermutlich innerhalb der Kontaktzone zwischen den Bionten, den Haustorien bzw. Appressorien (SMITH & DOUGLAS 1987). Dadurch wird ein intensiver Transport innerhalb des Hyphensystems zu den anderen Bereichen des Thallus notwendig. Gleichzeitig werden Hyphenfilamente innerhalb eines Flechtenthallus jedoch zur Strukturbildung terminiert. Bei der Blattflechte *Peltigera aphthosa* besteht z.B. die pseudoparenchymatische Rinde aus periklin angeordneten Hyphen, die im ausdifferenzierten Zustand kein Spitzenwachstum mehr aufweisen. Möglicherweise wird hier der Nährstofftransport zu den Hyphenspitzen unterbunden, indem die Septenporen durch Worronin Bodies verschlossen werden. Diese Hypothese soll zukünftig mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Serienschnitten dieser Flechte überprüft werden.

Bei saprotroph lebenden Pilzmycelien, zu denen die Mycobionten in axenischer Laborkultur zu rechnen sind, nehmen die Hyphen innerhalb der Absorbtionszone unmittelbar hinter den wachsenden Apices Nährstoffe aus dem sie umgebenden Substrat auf. Die Mycelfront ist im Vergleich zum fortschreitenden Thallusrand einer Flechte nur dann auf die Zufuhr von Nährstoffen der älteren Hyphenabschnitte angewiesen, wenn Lufthyphen gebildet werden oder z.B. im natürlichen Habitat nährstofffreie Bereiche überbrückt werden müssen. Bei dieser diskontinuierlichen Nährstoffversorgung wird das Spitzenwachstum über kurze Distanzen durch das Transportsystem innerhalb des Protoplasten ermöglicht, so daß (in gewissen Grenzen) eine gleichmäßige Ausbreitungsgeschwindigkeit erreicht wird (DEACON 1997).

Ein solches Potential wird auch an den Mycobionten deutlich, die auf Agar-Medien kultiviert wurden, die keine metabolisierbaren Kohlenhydrate enthielten (BG110 und MBV). Auskeimende Sporen entwickeln auf diesen Medien Hyphenfilamente einer z.T. mehr als 100-fachen Sporenlänge. Dieses Wachstum kann nur durch eine Translokation der internen Reservestoffe der Sporen zu den wachsenden Apices ermöglicht werden.

Vorhandene organische Nährstoffe werden von den isolierten Mycobionten extrem effizient erschlossen. Schon eine geringe Erhöhung der Nährstoffkonzentration führt zu einer deutlich sichtbaren Steigerung der Verzweigungsfrequenz, wodurch mehr Hyphenspitzen entstehen, die der Nährstoffaufnahme dienen können. Zusätzlich haben die Hyphenfilamente der daraufhin untersuchten Mycobionten die Fähigkeit, durch die Bildung von Internen Hyphen die eigenen abgestorbenen Mycelbereiche als Substrat zu verwerten, und können dadurch begrenzte Ressourcen optimal ausnutzen. Obwohl ungeklärt ist, ob solches Wachstum unter natürlichen Bedingungen zu erwarten ist, führt dieses Verhalten nicht nur bei Erschöpfung der Nährstoffe im Kulturmedium sondern sehr wahrscheinlich auch bei der Transplantation kompakter Mycelien in das natürliche Habitat (s. Kap. 4.7.1) zu einer erhöhten Überlebenschance.

4.3.4 Phasenwechsel

Wie schon im Kapitel 4.3.2.2 angesprochen wurde, können bei den Flechtenisolaten Phasenwechsel auftreten: Mycobionten, die auf nährstoffhaltigen Medien herangezogen werden und dichte Mycelien aus reich verzweigten Hyphen bilden, wachsen nach einer längeren Kulturdauer ohne Erneuerung des Mediums unvermittelt mit einem netzartigen Mycel aus. Solche Phasenwechsel können in Kultur auch an nicht lichenisierenden Pilzen, z.B. an dem Basidiomyceten *Hypholoma fasciculare*, beobachtet werden (COGGINS et al. 1980), und einige Autoren (RAYNER & COATES 1987) verwenden den Begriff „slow/dense - fast/effuse transitions“ zur Beschreibung dieses Phänomens. Die in dem Ausdruck formulierte Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit kann ebenfalls an einigen isolierten Mycobionten beobachtet werden (s. 4.3.2.2). Sehr wahrscheinlich führt ein Verbrauch der Nährstoffe und/oder eine Anreicherung mit Metaboliten im Kulturmedium zu diesem Verhalten, denn für Pilze verschiedener Habitats (Mycorrhiza, Dekompostierer) sind migratorische Hyphen ein Ausdruck einer Strategie der Nahrungssuche zwischen räumlich getrennten Nahrungsdepots (RAYNER et al. 1994b). Bei einer Transplantation dieser Mycelien auf neue Nährmedien erfolgt erneut ein Phasenwechsel zu reich verzweigten Hyphen mit ausgeprägtem tangenbialem Wachstum. Eine Änderung des Wachstumsverhaltens dieser Art ist bei einigen Organismen, z.B. bei dem Basidiomyceten *Phanerochaete magnoliae*, ontogenetisch bedingt und führt hier zur Sporulation (AINSWORTH & RAYNER 1991). Bei den isolierten Mycobionten liegt jedoch eine Reaktion auf die neue Nährstoffsituation vor. An diesem Prozess sind nicht nur die Hyphenspitzen der Mycelfront, sondern auch Apices in den hinteren Mycelbereichen beteiligt. Das Prinzip der Koppelung der Verzweigungsfrequenz an die Nährstoffkonzentration wird wieder deutlich (s. Kap. 4.2.2) und zeigt die Fähigkeit der Mycelien, zwischen assimilativen und nicht-assimilativen Stadien zu wechseln. Eine solche Wachstumstrategie wird nicht nur in Kultur beobachtet, sondern z.B. auch beim Wachstum von Mycorrhizapilzen in Erde als natürlichem Substrat (READ 1991).

YOSHIMURA et al. (1994) beobachteten, daß juvenile Thalli von *Peltigera pruinosa* auf einem Agar-Medium beginnen, radiäre Hyphen zu bilden, die das Substrat überwachsen. Hier ist die Änderung der Wachstumsphase durch den Zusammenbruch des Symbiosegleichgewichtes, das auf dem dauerfeuchten Agar-Medium nicht aufrecht erhalten werden kann (AHMADJIAN 1993), verursacht worden. Bei synthetischen Erdkulturen von *Cladonia cristatella* wurde beobachtet, daß in der Peripherie von wachsenden Squamules ein Hyphennetzwerk gebildet wird, das bis zu 5 mm in die Erde eindringt und mit passenden Algen neue Loben bildet (AHMADJIAN et al. 1980). Die Beispiele machen deutlich, daß sich die Pilze mit ihrem Wachstumsverhalten an die gegebenen Bedingungen anpassen können. Bei dem Mycobionten der Flechte *Ochrolechia frigida* scheint diese Fähigkeit besonders ausgeprägt zu sein, denn die symbiotische Ernährung wird durch parasitische oder zumindest saprotrophe Lebensphasen mit der Ausbildung von algenfreien Thallusbereichen ergänzt (GABMANN & OTT 2000).

4.3.5 Intraspezifische Kompatibilität und Verschmelzung von Mycelien

Die in dieser Arbeit untersuchten Flechtenisolate waren in der Regel polysporer Natur, d.h. sie entstanden entweder aus dem Sporencluster eines Ascus oder als Verschmelzungsprodukt verschiedener Mycelien aus den Sporen eines Apotheciums. Solche Verschmelzungsvorgänge können auch zwischen Mycelien erfolgen, die ihren Ursprung in Sporenclustern aus verschiedenen Apothecien haben. In ihrer weiteren Entwicklung bilden die Fusionsmycelien eine einheitliche Mycelfront - ein Zeichen dafür, daß das Wachstum synchronisiert wurde. Es muß also eine intraspezifische Kompatibilität der Hyphen vorliegen, die eine Anastomisierung ermöglicht (AINSWORTH & RAYNER 1989), und möglicherweise geht der Reaktion eine art-spezifische Erkennung voran. Ein ähnliches Verhalten ist an der Krustenflechte *Rhizocarpon geographicum* zu beobachten, bei der algenfreie Prothalli verschiedenen Ursprungs miteinander verschmelzen können. Auch hier wird im Verlauf der Entwicklung ein einheitlicher Mycel- bzw. Thallusrand gebildet (ASTA & LETROUIT-GALINOÛ 1995; LETROUIT-GALINOÛ & ASTA 1994).

Die Tendenz, aus den Sporen der Asci eines Apotheciums durch Fusion einen homogenen Mycelteppich zu bilden, ist bei dem Mycobionten der Flechte *Baeomyces rufus* am stärksten ausgeprägt. Dieses Verhalten kann im Zusammenhang mit der r-Strategie dieser Flechte gesehen werden (JAHNS 1982; JAHNS & OTT 1982) (s. Kap. 4.1.5.2) und trägt unter natürlichen Bedingungen zur Stabilisierung des unbeständigen Substrats bei, das von *B. rufus* als Pionierorganismus besiedelt wird (JAHNS & OTT 1997). Zusätzlich nimmt der Mycobiont auch im lichenisierten Zustand über feine Hyphen Kontakt mit Nachbarloben auf (JAHNS 1982; KLÖCKNER 1998).

Die Mycobionten von *Physconia distorta* und *Anaptychia ciliaris* haben ebenfalls eine ausgeprägte Fähigkeit, innerhalb der Art miteinander zu fusionieren. Aus diesem Wachstumsverhalten resultiert jedoch nicht wie bei *B. rufus* eine flächenhafte Struktur, sondern es entstehen sehr große, räumlich ausgedehnte Mycelkonglomerate von bis zu 1.5 cm.

Die Fusion einzelner Mycelien verläuft häufig über die Ausbildung von Hyphenbrücken, die den Mycelien ein spinnenähnliches Aussehen geben. Solche sogenannten „Spinnenstadien“ können auch bei der Jugendentwicklung von Flechten sowohl unter Kulturbedingungen als auch im natürlichen Habitat beobachtet werden (JAHNS et al. 1979; KLÖCKNER 1998; SCHUSTER 1985). Es ist wahrscheinlich, daß es auch bei der Verschmelzung von Flechtenprimordien zu einer Anastomosierung zwischen benachbarten Hyphen kommt, so daß die Protoplasten miteinander fusionieren und eine höhere genetische Diversität geschaffen wird.

Die Mycelien der isolierten Mycobionten können sowohl in der ersten Entwicklungsphase nach dem Auskeimen der Sporen, als auch nach längerer Kulturdauer miteinander fusionieren. Auch die Loben von Flechten einer Art sind in der Lage, miteinander zu

verschmelzen, wobei diese Fähigkeit mit der Struktur der Thallusoberfläche zusammenzuhängen scheint. An dem unberindeten Thallus verticalis der Flechte *Cladonia rangiferina* wurde beobachtet, daß einzelne benachbarte Zweige über Hyphen der äußeren Thallusschicht miteinander verwachsen können (JAHNS 1988a). Die Thallusoberfläche dieser Flechte ist ähnlich locker strukturiert wie die der Mycelien der isolierten Mycobionten. Die Pilzisolat erreichen zu keinem Zeitpunkt einen Differenzierungsgrad, der diese Reaktion verhindert. Bei der Blattflechte *Peltigera aphthosa* wird beobachtet, daß benachbarte Loben nur bis zu einem bestimmten Entwicklungsgrad des Cortex miteinander verschmelzen können. Thalli mit einer ausdifferenzierten Rinde fusionieren nicht mehr miteinander (ETGES 1996).

Die Abhängigkeit einer Fusion von dem Differenzierungszustand und zusätzlich der Kompatibilität der beteiligten Gewebe wird an einer Beobachtung von JAHNS & OTT (1997) an *Parmelia sulcata* und *Physcia tenella* deutlich: Keimende Soredien dieser Flechten können miteinander fusionieren und ein gemeinsames primordiales Gewebe mit einer homogenen Struktur bilden. Aus diesem Primordium entwickeln sich jedoch zwei verschiedene Loben. Bei den Interaktionen der in das natürliche Habitat transplantierten Mycelien mit vegetativen Diasporen (s. Kap. 4.7.2) hat ebenfalls der Differenzierungsgrad der beteiligten Strukturen und insbesondere die intraspezifische Kompatibilität entscheidenden Einfluß auf die Entwicklung. Soredien von *Physcia tenella*, die sich auf dem Mycobionten der gleichen Art ansiedeln, verschmelzen bei ihrer Entwicklung zu kleinen Loben mit dem Pilzmycel. Zwischen den Flechtenthalli und den algenfreien Mycobionten ist keine Grenze mehr zu erkennen (Abb. 130). Eine solche Fusion konnte nur beobachtet werden, wenn der transplantierte Mycobiont und die Diaspore der gleichen Art angehören. Es kann jedoch nicht beurteilt werden, ob bei dieser Vereinigung die verschiedenen Pilzhyphen miteinander anastomosieren, d.h. ob ein protoplasmatisches Kontinuum geschaffen wird.

Bei einem interspezifischen Kontakt bleiben die sich entwickelnde Flechte und das Pilzmycel getrennte Einheiten, die nur über einige Hyphen miteinander verbunden sind. Als Beispiel seien die jungen Loben von *Parmelia sulcata* genannt, die sich aus Soredien auf dem Mycobionten von *Physcia tenella* entwickeln und nicht mit dem artfremden Pilzmycel fusionieren - ein Verhalten, das mit den oben beschriebenen Beobachtungen an den beteiligten Flechten (JAHNS & OTT 1997) korreliert. An Flechten der Gattung *Cladonia* kann beobachtet werden, daß Thalli verschiedener Arten miteinander verschmelzen, und die daraus resultierenden Hybridthalli tragen Merkmale beider Arten (JAHNS 1988a). Es ist anzunehmen, daß zwischen den verschiedenen Hyphen ebenfalls eine Anastomosierung stattfindet, da die Bildung eines komplexen Flechtenthallus ein koordiniertes Wachstum aller beteiligten Organismen erfordert. Diese Beobachtung macht deutlich, daß nicht nur Verträglichkeiten zwischen Organismen einer Art, sondern auch interspezifische Kompatibilität (hier auf Gattungsebene) möglich ist.

4.3.6 Zusammenfassung III

- Die auskeimenden Sporen entwickeln sich bei homogener Nährstoffzufuhr zu radiären Mycelien, wobei das Verhältnis zwischen radialen und tangentialen Wachstumsprozessen vom Nährstoffangebot des Substrates abhängt.
- Die geringe radiale Ausdehnungsgeschwindigkeit der Mycelien ist nicht von der Konzentration organischer Nährstoffe abhängig, sondern scheint wie bei nicht-lichenisierenden Mycota artspezifisch zu sein.
- Isolierte Mycobionten nehmen organische Nährstoffe aus dem Substrat auf, können aber nährstofffreie Zonen durch cytoplasmatischen Stofftransport überbrücken. Durch Auto-Heterotrophie (Bildung Interner Hyphen) verwerten sie sehr effizient vorhandene Ressourcen.
- Phasenwechsel nach längerer Kulturdauer ohne Wechsel des Mediums führen unter Verringerung der Verzweigungsfrequenz der Hyphenfilamente zur spontanen Ausbildung migratorischer Hyphen. Der Vorgang kann mit einer Steigerung der Ausdehnungsgeschwindigkeit verbunden sein.
- Intraspezifische Kompatibilität zwischen Hyphen verschiedenen Ursprungs ermöglicht durch Anastomosierung die Bildung eines Fusionsmycels. Hierbei kann im Einzelfall zwischen benachbarten Mycelien tropistisches Verhalten beobachtet werden.
- Interaktionen zwischen isolierten Mycobionten und vegetativen Diasporen im natürlichen Habitat sind von der intraspezifischen Kompatibilität und dem Differenzierungsgrad der beteiligten Strukturen abhängig.

4.4 Morphologie der Mycelien und ihre Besonderheiten

Pilzkulturen auf Agar, Membranfiltern oder in flüssigen Medien sind künstliche Systeme, die zwar für experimentelle Studien unverzichtbar sind, jedoch nicht den natürlichen Lebensraum von Pilzmycelien darstellen. Da das Wachstum der Mycelien durch ihr direktes Umfeld, das Nährstoffe und Raum zur Verfügung stellt, bestimmt wird (JENNINGS & LYSEC 1999), entspricht die von den Laborbedingungen geprägte Morphologie der Isolate nicht ihrem natürlichen Habitus. Dennoch haben solche Beobachtungen ihre Bedeutung für das Verständnis von Entwicklungsvorgängen bei Flechtenpilzen und geben zusätzlichen Einblick in ihr großes morphogenetisches Potential.

4.4.1 Die Bedeutung des Substrates

Die Morphologie von Pilzmycelien ist u.a. von der physikalischen Beschaffenheit des Substrates abhängig. In Flüssigkulturen entstehen, bedingt durch allseitige Umspülung, kugelförmige Mycelpellets, die eine interne Zonierung aufweisen (TRINCI 1973; JENNINGS & LYSEC 1999), eine Struktur, die auch von isolierten Mycobionten unter diesen Bedingungen entwickelt wird. Auf den festen Medien Agar bzw. auf Membranfiltern, die den Mycobionten in meinen Untersuchungen angeboten wurden, entstehen in der Aufsicht radiärsymmetrische Mycelien, die sich im Querschnitt aus Luft- und Substrathyphen zusammensetzen. Das Verhältnis zwischen diesen Hyphentypen ist u.a. davon abhängig, ob die Mycobionten in das Substrat eindringen können - ein Aspekt, der unter 4.2.4 diskutiert wurde.

Die Mycelien breiten sich bei geeigneter Feuchtigkeit und Nährstoffversorgung kontinuierlich aus, und auf sehr nährstoffarmen Medien entstehen netzartige Strukturen. Auf kohlenhydratreichen Medien können kompakte Hyphenkonglomerate gebildet werden, die sich bis zu 1.5 cm über das Substrat erheben (Abb. 34). Eine solche Wuchsform kann als reine Kulturform angesehen werden, da u.a. das gleichmäßige, hohe Nährstoffangebot im Kulturmedium und auch die hohe Luftfeuchtigkeit innerhalb der versiegelten Petrischalen nicht den natürlichen Bedingungen entsprechen. Die kompakten Mycelien unterscheiden sich somit in ihrer Entstehung von der Stromabildung bei einigen frei-lebenden Ascomyceten, bei denen vergleichbare Strukturen eine Sammelunterlage für Ascomata darstellen (WEBER 1993). Die Entwicklung dieser erhabenen Strukturen in den Laborkulturen verlangt einen Nährstofftransport vom Substrat zu den wachsenden Apices des Luftmycels. Dieser Transport findet entweder innerhalb des kontinuierlichen Protoplasten statt und/oder wird durch Kapillarkräfte der Hyphenfilamente erreicht. Wie schon im Kapitel 4.2.3 erläutert wurde, spielen hierbei die Anastomosierung und die Nutzung der eigenen abgestorbenen Hyphen als Substrat durch die Bildung Interner Hyphen eine wichtige Rolle.

4.4.2 Artabhängigkeit der Morphologie

In der Lichenologie herrscht die allgemein akzeptierte Meinung, daß sich die kompakten Mycelien verschiedener Mycobionten nicht unterscheiden und eine artunabhängige, einheitliche Form aufweisen (u.a. AHMADJIAN 1980). Meine Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß sich die Mycelien der verschiedenen Arten zwar in den ersten Wachstumsphasen meist ähnlich entwickeln. Nach einer Kulturdauer von ca. 2-4 Monaten (besonders auf nährstoffreichen Medien) bilden sich jedoch artabhängige, morphologische Charakteristika aus, wobei u.a. die oben diskutierte Fähigkeit zur Mycelfusion eine Rolle spielt.

4.4.2.1 *Xanthoria parietina* (Telochistales)

Der Mycobiont von *Xanthoria parietina* bildet in Randzonen der Sporulationsbereiche kompakte, hohlkugelförmige Mycelien aus, die in der Regel nicht über die Größe von 2-3 mm im Durchmesser hinauswachsen (s Abb. 64). Weiteres Wachstum (auch das von Fusionsmycelien in den Zentren der Sporulationsbereiche) äußert sich häufig in der Bildung von blättchenförmigen Knospen. Makroskopisch weisen diese Auswüchse Ähnlichkeiten mit kleinen Flechtenloben auf; in Querschnitten findet sich diese Ähnlichkeit jedoch nicht. Das Mycel ist unstrukturiert und hat keine begrenzende pseudoparenchymatische Rindenschicht, wie sie von der Flechte *X. parietina* gebildet wird.

Die Morphogenese der Auswüchse weist die Besonderheit auf, daß sich (i.d. Aufsicht) kreisrunde Mycelien abschnüren, die nur durch eine Hyphenbrücke mit dem Ursprungmycel verbunden sind. Diese Wuchsform ist ungewöhnlich, da die Sekundärmycelien nicht dem Substrat aufliegen und die Nährstoffe vom Ursprungmycel über die enge Hyphenverbindung transportiert und verteilt werden müssen.

Auswüchse solcher Art konnten nur an Isolaten der Flechte *X. parietina* beobachtet werden, und ihre Bildung widerspricht dem Prinzip der gleichmäßigen radiären Ausdehnung von Pilzmycelien. Möglicherweise können bei diesem Isolat durch Unterbrechungen des protoplasmatischen Kontinuums keine größeren Strukturen einheitlich mit Nährstoffen versorgt werden. Wodurch die Ausbildung neuer Myceleinheiten induziert wird, ist ebenfalls unklar. Denkbar wäre eine Konzentration von Nährstoffen in wenigen Bereichen des Mycels, wodurch eine Art „point growth“ (COGGINS et al. 1980) ausgelöst würde.

4.4.2.2 *Anaptychia ciliaris* und *Physconia distorta* (Lecanorales)

Die Mycobionten der Flechten *Anaptychia ciliaris* und *Physconia distorta* ähneln sich im Habitus, denn sie bilden beide auf nährstoffreichen Substraten erhabene, innen hohle Mycelien aus. Die Hohlräume entstehen sehr wahrscheinlich durch autolytische Vorgänge, die auch im Innern von Mycelpellets in Flüssigkulturen beobachtet werden. Hier sind sie durch Sauerstoffmangel bedingt und abhängig von der Dichte des Mycels (JENNINGS & LYSEC 1999).

Morphologisch unterscheiden sich die Mycelien der beiden Flechtenarten jedoch dadurch, daß der Pilz von *P. distorta* in äußeren Mycelbereichen häufig Strukturen aus parallel angeordneten Hyphen anlegt (Abb. 77). Diese Wuchsform ist bei Kultur auf einem Cellulosehaltigen Medium besonders ausgeprägt und stellt auch in der Art der Entstehung eine Besonderheit dar: Hyphenfilamente wachsen von den oberen Bereichen des Mycels auf dessen Außenseite hinab und breiten sich von der Basis des Mycels radiär auf und in dem Substrat aus. Habituell erinnert diese Struktur an auswachsende Rhizinen eines Flechtenthallus, die sich sekundär im Substrat verankern (JAHNS 1988a). Bei der Präparation der im Freiland gesammelten Flechte *P. distorta* konnte beobachtet werden, daß der Thallus über die Rhizinen im Substrat (Borke) verankert ist. Ob die Bildung solcher Strukturen aus parallel angeordneten Hyphen durch das cellulosehaltige Substrat induziert wird, bleibt ungeklärt. Prinzipiell können bei Mycelien solche Hyphen-Aggregationen migratorische (z.B. mit Rhizomorphen), verbindende und schützende Funktionen erfüllen, und häufig breiten sich Mycelstränge sehr viel schneller aus als einzelne Hyphen (RAYNER et al. 1994a).

4.4.2.3 *Physcia tenella* (Lecanorales)

Der Mycobiont von *Physcia tenella* entwickelt bei geeigneter Nährstoffzufuhr ebenfalls kompakte Mycelien, die im Querschnitt jedoch nicht die Form einer Hohlkugel aufweisen wie die zuvor genannten Isolate. Es wird vielmehr ein sehr locker strukturiertes Mycel gebildet, das bei der Präparation sehr leicht zerfällt (Abb. 69). Bei einem Vergleich der morphologischen Merkmale der Mycobionten des Verwandtschaftsbereiches der Lecanorales fällt auf, daß *P. tenella* die einzige hier untersuchte Art ist, die Soredien bildet. Diese vegetativen Verbreitungseinheiten werden in sekundär angelegten, offenen Aufbrüchen des Thallus, den Soralen, gebildet. Möglicherweise stehen diese beiden Merkmale in einem morphogenetischen Zusammenhang. Es ist denkbar, daß die Veranlagung des Mycobionten zur Bildung lockerer Hyphengeflechte, übertragen auf die Flechte, die Ausbildung von Soralen und Soredien erst ermöglicht oder zumindest erleichtert. Dieser Interpretation widerspricht aber die Tatsache, daß Thalli von *P. tenella* eine kompakte Rinde besitzen. Zur Klärung des Sachverhaltes müßten die Mycobionten anderer soredienbildender Flechten in Bezug auf ihre Mycelbildung unter axenischen Bedingungen untersucht werden.

Die Tendenz, eher lockere Mycelstrukturen zu bilden, kann auch auf die Hyphenmasse eines Sporulationsbereiches übertragen werden, denn dieses Isolat bildet keine großen Fusionsmycelien wie *Physconia distorta* und *Anaptychia ciliaris* aus, sondern entwickelt einzelne, granuläre Strukturen. Die einzelnen Cluster innerhalb eines Sporulationsbereiches sind häufig unterschiedlich eingefärbt. Diese Beobachtung kann auf die polyspore Natur der Mycelien zurückgeführt werden. Die Heterogenität manifestiert sich in der unterschiedlichen Produktion der Sekundärmetaboliten.

4.4.2.4 *Baeomyces rufus*

Der Mycobiont von *Baeomyces rufus* zeigt schon in den ersten Entwicklungsphasen nach dem Auskeimen ein Verhalten, das ihn von den anderen untersuchten Arten unterscheidet. Auf nährstoffarmen Medien entstehen keine streng radiären, sondern spiralig gegen den Uhrzeigersinn wachsende Mycelien (Abb. 82). Nach JENNINGS & LYSEK (1999) haben Pilzmycelien generell die Tendenz zu einem spiraligen Wachstum, wobei die Orientierung der Spirale artabhängig ist. Die Ascomyceten *Aspergillus nudilans* und *Neurospora scrassa* z.B. bilden rechtsgedrehte Windungen. Dennoch konnte ich diese Wuchsform in meinen Untersuchungen nur an dem Isolat von *B. rufus* beobachten. Im Zusammenhang mit der taxonomischen Zuordnung der Flechte *B. rufus* könnte dieses Merkmal von Bedeutung sein. Einige Autoren (OTT & LUMBSCH 2001) stellen alle hier untersuchten Flechtenarten, einschließlic der `Telochistales` und `Peltigerales`, in die Ordnung der Lecanorales, die möglicherweise polyphyletischen Ursprungs ist. Die Baeomycetaceae mit der Art *B. rufus* wurden von den Autoren jedoch nur provisorisch dieser Gruppe zugeordnet, denn insgesamt ist die systematische Stellung der Baeomycetaceae umstritten. HAWKSWORTH et al. (1995) sehen auf Grund der Fruchtkörperstruktur eine Verwandtschaft mit den Helotiales, einer Gruppe mit sehr vielen nicht-lichenisierenden Arten. Diese Einordnung konnte durch molekularbiologische Untersuchungen an der SSU rDNA jedoch nicht bestätigt werden (PLATT & SPATAFORA 1999; 2000). Unter Berücksichtigung des Chemismus bilden sie vermutlich eine eigene Gruppe (PLATT & SPATAFORA 2000). Möglicherweise ist das rechtsgedrehte Wachstum der jungen Mycelien ein weiteres Merkmal, in dem sich der phylogenetische Unterschied zu den anderen untersuchten Arten ausdrückt.

Im weiteren Verlauf der Entwicklung verliert sich das spiralige Wachstum, und durch Fusion von Mycelclustern werden Mycelteppiche mit einer Oberfläche aus locker miteinander verwobenen Hyphen gebildet. Auffällig sind die darin gebildeten Poren, deren Ränder von kompakt zusammengelagerten Hyphen mit braunen Inkrustierungen gebildet werden, so daß eine Öffnung innerhalb der Mycelfläche entsteht (Abb. 86). Durch die Poren treten gelblich-braune Flüssigkeiten aus, es bleibt jedoch unklar, ob diese Ausscheidungen durch die gleichen Metabolite angefärbt werden, die innerhalb der Mycelien kristallin ausfallen. Die Bildung tropfenförmiger Metabolite wird auch an nematophagen Pilzen in Kultur beobachtet (ANKE et al. 1995; BARRON & THORN 1987). An *Pleurotus ostreatus* wurde nachgewiesen, daß die in den Ausscheidungen enthaltenen Säuren eine hohe Aktivität gegen die Nematode *Caenorhabditis elegans* haben (STADLER et al 1994). Möglicherweise haben auch die von *B. rufus* produzierten Metabolite antimikrobielle Aktivität, die die Mycelien im natürlichen Habitat (Erde) gegen Nahrungskonkurrenten und Fraßfeinde, z.B. Nematoden (PAUL & CLARK 1989) schützen. Auch die Versiegelung der Oberfläche durch gallertige Auflagerungen oder durch eine kompakte Hyphenanordnung (Abb. 85) kann eine schützende Funktion ausüben.

4.4.3 Warum wird in axenischer Kultur kein Flechtenthallus gebildet?

Nach JAHNS (1988a) ist der Thallus einer Flechte eine Struktur, die zwischen lichenisierten und nicht-lichenisierten Pilzen differenziert. Das Signal zur Thallusmorphogenese und zur Aufrechterhaltung des Symbiosegleichgewichtes ist dabei u.a. von der permanenten Anwesenheit des Photobionten abhängig (AHMADJIAN 1992; JAHNS 1988a). Versuche, Mycobionten durch die Zufuhr von Algenextrakten (AHMADJIAN 1969) oder der Kohlenhydrate Ribitol oder Glukose (AHMADJIAN 1992) zu einer Transformation anzuregen, blieben erfolglos. Dennoch gibt es vereinzelt Berichte über thallusähnliche Strukturen innerhalb von axenischen Flechtenpilzmycelien. LALLEMANT (1985) beobachtete verschiedene Schichten im kultivierten Mycobionten von *Xanthoria parietina* und die Bildung von kleinen, thallusähnlichen Loben. Beide Beobachtungen konnten auch in meiner Arbeit gemacht werden: Eine Schichtung innerhalb dieses Mycobionten wird besonders auf einem NAA-haltigen Medium deutlich (Abb. 96a, b); sie beruht jedoch nicht auf der Ausbildung von „Flechtengewebe“, sondern läßt sich auf den unterschiedlichen Entwicklungsgrad der Hyphen zurückführen und ist eine Reaktion auf die Substratverhältnisse. Die Abschnürung blättchenförmiger Auswüchse ist ebenfalls nicht mit der Morphogenese einer Flechtenlobe gleichzusetzen (s. Kap. 4.4.1.1.).

Auch die anderen untersuchten Isolate bildeten keine für Flechten charakteristischen Strukturen wie Cortex oder Marksicht und zeigten auch kein „Lobenwachstum“. An Mycelien des Mycobionten von *Physconia distorta* wurden zwar rhizinenähnliche Wandstrukturen beobachtet (s. Kap. 4.4.1.3). Solche Hyphen-Aggregationen finden sich jedoch auch an nicht-lichenisierenden Pilzen und können u.a. in Sklerotien oder Fruchtkörpern Schutzfunktion ausüben (RAYNER et al. 1994a).

Wie oben beschrieben wurde, zeigen die Mycelien einige artabhängige, morphologische Charakteristika; ihr Wachstumsverhalten wird jedoch auch durch die physikalischen Eigenschaften des Substrats (s. Kap. 4.4.1) und seiner Zusammensetzung bestimmt. Hierbei folgt die Ontogenie der Mycelien keinem vorgegebenen Schema, ist also nicht determiniert, sondern als eine opportunistische Reaktion auf die äußeren Reize zu sehen. Die Hyphen müssen sich wie die der nicht-lichenisierenden Pilze kontinuierlich im und/oder auf dem Substrat ausdehnen, um Nährstoffe aufzunehmen. Erst die Interaktion mit einem photosynthetisierenden Partner macht den Mycobionten unabhängig vom Substrat als Nährstoffquelle, so daß sich eine Flechtenlobe entwickeln kann. Die Struktur dieses in sich geschlossenen Systems Flechtenthallus wäre nicht geeignet, den Mycobionten im unlichenisierten Zustand mit Nährstoffen zu versorgen. Andererseits ist für die kontinuierliche Ausbeutung der Algen eine weitgehend stationäre Lebensform des Pilzes mit langsamem radialem Wachstum erforderlich. Genau dieses Verhalten zeigt das Mycel.

4.4.4 Zusammenfassung IV

- Die physikalische Beschaffenheit des Substrates ist ein bestimmender Faktor in der Morphogenese der unlichenisierten Flechtenpilze.
- Auf festen Medien und bei gleichmäßiger Nährstoffverteilung entstehen in der Aufsicht radiärsymmetrische Mycelien, die sich aus Luft- und Substrathyphen zusammensetzen. Die verhältnismäßige Verteilung der verschiedenen Hyphentypen wird von der Penetrationsfähigkeit der Filamente und der Zusammensetzung des Kulturmediums mitbestimmt.
- Die Morphologie der kompakten Kulturform, die bei ausreichender Nährstoffversorgung entsteht, zeigt entgegen der in der Literatur vertretenen Meinung arttypische Charakteristika, die mit ökologischen Spezialisierungen oder der systematischen Stellung verbunden sein können.
- Im Gegensatz zur Morphogenese des isolierten Mycobionten wird die Entwicklung eines Flechtenthallus nicht dadurch von der Art des Substrates beeinflusst, daß letzteres als Nährstoffquelle genutzt werden muß.

4.5 Sekundärmetabolismus

Flechten zeichnen sich durch die Bildung von charakteristischen sekundären Inhaltsstoffen aus, deren vielfältige Funktionen für den Symbioseorganismus nur teilweise geklärt sind. Viele dieser sogenannten „Flechtenstoffe“ besitzen antimikrobielle Wirkung oder können als Strahlungsschutz dienen, z.B. das Anthrachinon Parietin. Durch ihre hydrophoben Eigenschaften wirken viele dieser Flechtenstoffe imprägnierend auf die Pilzhyphen innerhalb des Thallus, so daß auch bei hoher Feuchtigkeit ein freier Gasraum erhalten bleibt. Ein für die Photosynthese der Algen notwendiger Gaswechsel ist dadurch möglich. Auch regulative Eigenschaften zur Aufrechterhaltung des Symbiosegleichgewichtes wird einigen Sekundärmetaboliten zugeschrieben (KINRAIDE & AHMADJIAN 1970; VAINSTEIN 1985).

Die Bildung vieler Flechtenstoffe kann auch bei isolierten Mycobionten in Kultur angeregt werden (HONEGGER & KUTASI 1990, YAMAMOTO et al. 1995). Man darf jedoch nicht vergessen, daß es in Bezug auf die Exkretion und auf andere physiologische Vorgänge einen großen Unterschied zwischen symbiontischem und nicht-symbiontischem Status geben kann. In axenischen Kulturen können z.B. auch Inhaltsstoffe gebildet werden, die nicht für die entsprechende Flechte bekannt sind (AHMADJIAN 1982). Eine solche Beobachtung wurde hier an dem Mycobionten von *Anaptychia ciliaris* gemacht, der in den Laborkulturen häufig einen gelben, noch nicht identifizierten Farbstoff ausbildet, der nicht in der Flechte gefunden wird.

4.5.1 Bildung von Parietin durch den Mycobionten von *Xanthoria parietina*

Die Flechte *Xanthoria parietina* ist als eine Art aus der Familie der Telochistaceae u.a. durch die Bildung des gelben Anthrachinons Parietin charakterisiert. Ihr isolierter Mycobiont ist unter geeigneten Kulturbedingungen ebenfalls in der Lage, den Inhaltsstoff zu bilden. HONEGGER & KUTASI (1990) zeigten, daß die Produktion von Parietin bei diesem Mycobionten durch Ribitol angeregt werden kann. Diese Untersuchungen wurden mit Material verschiedener Apothecien, das für die Testreihe homogenisiert wurde, durchgeführt. Im Gegensatz dazu habe ich polyspore „Original“-Mycelien verwendet. Es zeigte sich, daß die Mycelcluster verschiedener Apothecien auf gleichen Kulturmedien variabel in Bezug auf die Parietinproduktion reagieren. In Einzelfällen konnten Farbvariationen innerhalb einzelner Mycelcluster beobachtet werden. Zusätzlich wurde bestätigt, daß nicht nur ribitolhaltige Medien, sondern alle hier angebotenen nährstoffreichen Substrate mit MY-Agar als Grundmedium die Parietinbildung ermöglichen, bzw. induzieren können. Die Parietinproduktion wird also nicht nur durch die Kulturbedingungen beeinflußt, wie die Versuche von HONEGGER & KUTASI (1990) gezeigt haben. Vielmehr führen auch die genetischen Variationen zwischen den Sporen verschiedener Fruchtkörper und in einigen Fällen zwischen den

Sporen eines Apotheciums zur Bildung des Flechtenstoffes in unterschiedlichen Konzentrationen.

Diese Eigenschaft hat möglicherweise bei der Besiedlung natürlicher Standorte selektiven Einfluß. Die Produktion von Parietin beginnt in jungen Primordien der Flechte, unmittelbar nachdem ein kompatibler Photobiont eingebunden wurde (OTT 1987c). An sonnigen Standorten ist eine intensivere Parietinbildung in den Loben zu beobachten (HONEGGER & KUTASI 1990). Es wird vermutet, daß die Pigmentschicht, die in der Thallusrinde und im Hymenium der Fruchtkörper angelegt wird, dem Schutz vor zu intensiver Strahlung dient. Flechtenloben, deren Mycobionten durch ihr genetisches Potential eher zur Parietinproduktion neigen, können sich möglicherweise an diesen Standorten leichter ansiedeln.

Die Bildung sekundärer Inhaltstoffe hängt jedoch nicht nur von den Kulturbedingungen und von der genetischen Prädisposition ab, sondern auch vom Alter der Kultur und davon, in welchen Geweben diese Substanzen in der natürlichen Flechte gefunden werden (AHMADJIAN 1993; CULBERSON et al. 1983). ARMALEO (1995) zeigte in einem Kulturversuch mit dem Mycobionten von *Cladonia grayi*, daß verschiedene sekundäre Metaboliten der Flechte nur in bestimmten Entwicklungsphasen der Pilzhyphen gebildet werden. In meinen Kulturversuchen mit dem Mycobionten von *X. parietina* wurde deutlich, daß auch die Sekretion von Parietin vom Entwicklungszustand der Hyphenfilamente abhängt. In jungen Mycelien (bis ca. 2 Monate) kann lediglich in den inneren Bereichen, die in diesem Stadium nur die älteren Hyphenfilamente enthalten, eine Gelbfärbung beobachtet werden. Die jungen Hyphenfilamente in den Randbereichen sind noch farblos. Parietin wird folglich erst in einem fortgeschrittenen Differenzierungsstadium der Pilzzellen gebildet.

4.5.2 Bildung gelatinöser Substanzen

Die Bildung gelatinöser Substanzen wird auch bei anderen Organismengruppen beobachtet und ist nicht als ein besonderes Charakteristikum von Flechten anzusehen. Solche wasserlöslichen, heterogenen Polysaccharide (TAKAHASHI et al. 1979) spielen jedoch in der Ontogenie der Flechten eine wichtige Rolle (JAHNS 1988a, b; SCHUSTER 1985), und deshalb werden sie an dieser Stelle besprochen. Schon bevor es zu einer Relichenisierung zwischen Pilzhyphe und Algenzelle kommt, erleichtert eine ausgeprägte gelatinöse Matrix beider Symbiosepartner einen ersten physikalischen Kontakt, der dadurch länger aufrechterhalten bleiben kann (AHMADJIAN & JACOBS 1983). OTT (1987b) beobachtete die Ausscheidung von Schleimpolysacchariden bei Keimhyphen von *Xanthoria parietina*, durch die eine Anheftung an das Substrat gewährleistet wird und gleichzeitig freie Partikel, z.B. Fremdalgen, angebunden werden können. Im Verlauf der Thallusbildung erhöhen Mycobionten noch ihre Schleimbildung (AHMADJIAN 1993). Die Ausdifferenzierung von Flechtenloben wird häufig von oberflächlichen Auflagerungen dieser Polysaccharide begleitet (ETGES 1995; KON et al. 1990;

OTT 1987b; WEGNER 2001), wobei auf natürlichen Thalli mehr Gallerte gefunden wird, als auf synthetisch erzeugten Loben (AHMADJIAN 1993).

Meine Laborversuche haben gezeigt, daß Keimvorgänge an den Ascosporen unabhängig vom Kulturmedium von der Ausscheidung von Gallerte begleitet werden. Unter natürlichen Bedingungen haben die Schleimpolysaccharide neben der oben angesprochenen Bedeutung, der Aufrechterhaltung des Kontaktes zum Substrat und zu möglichen Photobionten zusätzliche ökologische Funktionen. Ihre ausgeprägte Wasserbindungsfähigkeit (HÄNSEL et al. 1999) verzögert Austrocknungsprozesse - eine Eigenschaft, die bei der Keimung von Pilzsporen von besonderer Bedeutung sein kann. Für die Keimlinge erhöht sich dadurch die Überlebenschance im natürlichen Habitat, das u.a. von Trockenphasen geprägt ist. Zusätzlich erleichtern diese Biopolymere durch ihre physikalische Eigenschaft, eine hochviskose, abdeckende Lösung zu bilden (HÄNSEL et al. 1999), das Fortschreiten der Hyphenfilamente auf den rauhen Oberflächen natürlicher Substrate.

Die vegetativen Hyphen, die die Mycelfront bilden, können auf dem Vollmedium MY durch den Zusatz von Glukose oder des Phytohormons Naphthalinessigsäure (NAA) zu intensiver Schleimausscheidung angeregt werden. Beide Substanzen führen dazu, daß sich die fortschreitenden Hyphenfilamente verstärkt in eine gelatinöse Masse betten (Abb. 94). Es muß jedoch angenommen werden, daß die Sekretion durch unterschiedliche Wirkmechanismen angeregt wird. Dies wird auch daran deutlich, daß nur NAA eine Absonderung der Schleimpolysaccharide auf der Oberfläche älterer Mycelien bewirkt (Abb. 95). Habituell gleichen diese Bereiche dadurch den Differenzierungsbereichen junger Loben (ETGES 1995; SCHUSTER 1985). Die Anregung zur Bildung der in der Flechtensymbiose wichtigen Biopolymere durch das Phytohormon NAA konnte auch in Kulturversuchen an Phyllocladien (Thallusbruchstücke) der Flechte *Cladonia sulphurina* beobachtet werden (OTT, unveröff.). Diese Beobachtung mag ein Hinweis auf eine Beteiligung dieses Phytohormons an den Entwicklungsprozessen der Flechten sein - ein Aspekt, der im folgenden Kapitel (4.6) besprochen wird.

4.5.3 Zusammenfassung V

- Die Produktion des Anthrachinons Parietin durch den Mycobionten von *Xanthoria parietina* erfolgte auf allen hier verwendeten nährstoffreichen Medien. Die Bildung dieses Flechtenstoffes ist von der genetischen Prädisposition abhängig. Nur Hyphen eines bestimmten Entwicklungsgrades bilden den Inhaltstoff.
- Die Ausscheidung gallertartiger Substanzen begleitet die Sporenkeimung bei allen untersuchten Arten.
- Die Schleimsekretion vegetativer Hyphen wird durch Glukose und das Phytohormon Naphtylessigsäure (NAA) induziert.

4.6 Morphogenetische Beeinflussung der isolierten Mycobionten

Flechtenpilze haben im Verlauf der Evolution Mechanismen entwickelt, die es ihnen ermöglichen, mit photosynthetisierenden Partnern eine für beide Bionten nutzbringende Form zu entwickeln. Die Lichenisierung läuft nach einem Modell von GALUN (1988b) in folgenden Schritten ab: Pre-Kontakt, Kontakt, Umwachsen der Algen, Einbindung der Bionten in eine gemeinsame Matrix und schließlich die Thallusmorphogenese. Der Impuls zur Thallusmorphogenese und zur Aufrechterhaltung des Symbiosegleichgewichtes ist dabei u.a. von der permanenten Anwesenheit des Photobionten abhängig (AHMADJIAN 1992; JAHNS 1988a). Die Natur dieses Signals ist bisher unbekannt; man geht jedoch davon aus, daß es sich um ein multifaktorielles System handelt. Weitere notwendige Voraussetzungen für die Transformation des Mycobionten sind Nährstoffdefizite, da sonst das unabhängige Wachstum der Bionten gefördert wird, sowie alternierende Feucht-Trocken-Phasen (AHMADJIAN 1980; HONEGGER 1996b).

4.6.1 Einfluß von arteigenen Photobionten und Fremdalgen auf die Mycelien

Werden Mycobionten mit arteigenen Algen unter Laborbedingungen zusammengeführt, resultiert daraus in der Regel kein Flechtenthallus, da eine Lichenisierung nur unter ganz bestimmten Voraussetzungen, die nur schwer im Labor geschaffen werden können, stattfindet. Dieser Sachverhalt ist jedoch nicht negativ zu werten, sondern als Zeichen dafür, daß eine Symbiose unter den gegebenen Bedingungen nicht die geeignete Lebensform darstellt. Dennoch erfolgen Interaktionen zwischen den Bionten. Die Mycelien der Mycobionten aus *Xanthoria parietina* und *Physconia distorta* reagieren auch unter den Laborbedingungen auf ihre arteigenen Photobionten, unabhängig von der Nährstoffkonzentration des Mediums. Die zugegebenen Algen lenken von der jeweiligen Ernährungsstrategie ab, wobei solche Hyphen eines Mycels einen morphogenetischen Impuls erfahren, die im direkten Kontakt mit den Algen stehen (Abb. 105). Die Reaktion geht über den reinen Thigmotropismus (s. Kap. 4.2.1.2) hinaus, denn die Algen werden in eine gemeinsame Matrix eingebunden (Abb. 106). Nach dem oben zitierten Modell werden folglich die ersten vier Schritte der Lichenisierung vollzogen, nur die abschließende Thallusmorphogenese findet nicht statt.

Die „freien“ Hyphen eines Mycels breiten sich kontinuierlich im Modus ihrer bisherigen Wachstumsstrategie aus und stehen für weitere Kontakte zur Verfügung. Die Mycelien dieser Mycobionten werden also nicht durch ein einmaliges Kontaktereignis mit dem arteigenen Photobionten in einem Teil des Mycels terminiert. Übertragen auf das natürliche Habitat, ergibt sich aus diesem Verhalten ein Vorteil für die Kolonisierung des Substrates: Eine erste positive Interaktion zwischen den Symbiosepartnern ist zwar ein notwendiges Ereignis für die Lichenisierung, garantiert jedoch nicht die Entwicklung eines reifen Flechtenthallus. Die Chance eines Mycobionten im natürlichen Habitat, einen Standort

dauerhaft im lichenisierten Zustand zu besiedeln, wird folglich durch die mehrmalige Einbindung von Photobionten in ein Mycelium erhöht.

Die Reaktion der isolierten Mycobionten auf artfremde Algen ist auch unter Laborbedingungen in der Intensität abgestuft. Während Interaktionen mit dem spezifischen Photobionten unter diesen Bedingungen zur Bildung einer gemeinsamen Matrix führen und dadurch asymmetrische Mycelien entstehen, werden Fremdalgen nur umwachsen. Möglicherweise beruht diese Reaktion auf reinem Thigmotropismus. Die Mycelien erfahren keinen morphogenetischen Impuls, denn die beteiligten Hyphen werden kaum von der durch den Nährstoffgehalt des Mediums vorgegebenen Wachstumsstrategie abgelenkt und breiten sich weiterhin kontinuierlich aus. Die isolierten Mycobionten diskriminieren also schon in sehr frühem Stadium, sowie unter Bedingungen, die keine Thallusmorphogenese erlauben, zwischen arteigenen Photobionten und Fremdalgen.

4.6.2 Einfluß verschiedener Substanzen auf die Mycelien

Die ausgewogenen morphologisch-anatomischen und physiologischen Interaktionen, die zur Bildung eines Thallus notwendig sind, erfordern geregelte Steuerungsmechanismen. Für Höhere Pflanzen sind die regulierenden Funktionen von Phytohormonen bei Wachstums-, Differenzierungs- und Stoffwechselprozessen gut untersucht (DAVIES 1995). Im Vergleich dazu ist der Kenntnisstand über biologisch wirksame Substanzen mit Steuerungsfunktion bei Flechten äußerst gering.

Frühere Untersuchungen der Wirkung verschiedener Substanzen auf Differenzierungsprozesse bei Flechten wurden meist an synthetischen Loben oder vegetativen Verbreitungseinheiten durchgeführt (AHMADJIAN 1969; KLÖCKNER 1998; REMMER et al. 1986; SCHIELEIT 1997). Als Referenz diente bei diesen Experimenten die weitere Entwicklung des eingesetzten Gesamtsystems. Solche Versuche lassen jedoch keine Rückschlüsse auf den direkten Effekt der getesteten Substanzen auf die einzelnen Bionten zu. Bisherige Experimente mit isolierten Mycobionten unter dem Einfluß verschiedener Wirkstoffe konzentrierten sich meist auf die Veränderungen der Wachstumsraten (REMMER ET AL. 1986; GALUN & PELEG-ZURIEL 2000). In meiner Arbeit wurden zum ersten Mal morphogenetische Reaktionen von Hyphenfilamenten, also der Grundeinheit eines Flechtenthallus, auf verschiedene Substanzen im Detail und auf der Basis der oben diskutierten Erkenntnisse über die grundsätzlichen Verhaltensweisen isolierter Flechtenpilze untersucht. Getestet wurden die Phytohormone Abscissinsäure (ABA), Naphthalinessigsäure (NAA) und Kinetin, die in der Flechtensymbiose wichtigen Kohlenhydrate Glukose und Ribitol und schließlich die Vitamine Biotin und Thiamin, die für viele Mycobionten essentiell sind (AHMADJIAN 1977).

Es zeigte sich, daß die beiden Vitamine sowie ABA keine sichtbaren Veränderungen an den Hyphenfilamenten hervorrufen. Morphologisch unterscheiden sich Mycelien, denen diese Substanzen zugeführt wurden, nicht von der Kontrolle. Deutlich unterschiedliche Reaktionen konnten an den Isolaten unter dem Einfluß von Glukose und Ribitol sowie den Phytohormonen NAA und Kinetin beobachtet werden.

4.6.2.1 Die Phytohormone Naphthalinessigsäure (NAA) und Kinetin

Verschiedene Phytohormone, deren Wirkungsweise für Höhere Pflanzen bekannt ist, konnten schon in Flechten und deren Bionten nachgewiesen werden und scheinen an den vielfältigen Regulationsmechanismen in einem Flechtenthallus beteiligt zu sein (EPSTEIN et al. 1986; FORTIN et al. 1972; OTT et al. 2000; SCHIELEIT 1997). In früheren Kulturversuchen zeigten z.B. vegetative Diasporen und Thallusfragmente der Flechte *Cladonia sulphurina* deutliche morphogenetische Reaktionen u.a. auf die zugeführten Phytohormone NAA und Kinetin (OTT 1996). Die Wirkungsweise dieser Hormone war sowohl von ihrer Konzentration, der Kombination miteinander, als auch vom Entwicklungsgrad der eingesetzten Flechtenstruktur abhängig. In einem solchen Kulturansatz läßt sich jedoch nicht beurteilen, ob die Phytohormone direkten Einfluß auf den Mycobionten ausgeübt haben oder ob eine Reaktionskette über den Photobionten zu dieser Entwicklung geführt hat.

In den hier vorgestellten Kulturversuchen mit isolierten Mycobionten konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß das Wachstumsverhalten der isolierten Flechtenpilze direkt durch die Phytohormone NAA und Kinetin beeinflusst wird. Die Reaktion war bei den Mycobionten von *Xanthoria parietina*, *Physconia distorta* und *Anaptychia ciliaris* einheitlich. Auf nährstoffhaltigen Medien, die normalerweise eine hohe Verzweigungsfrequenz der Hyphen anregen, führt NAA in der eingesetzten Konzentration von 0.05% zu einem stark gerichteten Wachstum von weniger verzweigten Filamenten in das Substrat. Das bedeutet, daß Wachstumsstrategien, die durch organische Nährstoffe angeregt werden (Verzweigungsbildung), durch dieses Auxin beeinflusst werden können. Wegen dieser Wirkungsweise bietet sich NAA als regulative Substanz innerhalb des Steuerungssystems der Flechten an.

Die Isolate aus *Physconia distorta* und *Baeomyces rufus* haben generell eine starke Tendenz, in das Substrat einzudringen, so daß dieses Kriterium nicht zur Beurteilung herangezogen werden kann. An den Mycelien aller getesteten Mycobionten wurde jedoch durch NAA eine intensive Bildung von Lufthyphen in den ersten Entwicklungswochen induziert. Zusätzlich wurden die Durchmesser der Hyphenfilamente stark reduziert.

Das Phytohormon Kinetin (0.2%) hatte keinen sichtbaren Einfluß auf die Morphologie der Mycelien. Vielmehr wirkte es sich bei den untersuchten Isolaten reduzierend auf die radiale Ausdehnungsgeschwindigkeit aus. Dieser Effekt trat auch in Kombination mit den anderen getesteten Substanzen auf. Die Beobachtung ist um so bemerkenswerter, als Kinetin die

wachstumshemmende Wirkung des Auxins Indoleessigsäure auf den Mycobionten von *Cladonia cristatella* abmildert (REMMER et al. 1986).

4.6.2.2 Die Kohlenhydrate Ribitol und Glukose

In einigen früheren Versuchen mit isolierten Mycobionten wurde die Wirkung verschiedener Substanzen daran gemessen, ob sie den Mycobionten dazu anregen, einen Flechtenthallus oder thallusähnliche Strukturen zu bilden. In diesen Experimenten wurde deutlich, daß die Zufuhr von Algenextrakten oder der Kohlenhydrate Ribitol und Glukose nicht zu einer Transformation der Mycobionten in dem oben genannten Sinn führt (AHMADJIAN 1969, 1992). Dennoch verhalten sich isolierte Flechtenpilze nicht indifferent in Bezug auf die Kohlenhydratzufuhr. Primär wirkt sich der Nährstoffgehalt des Mediums auf die Verzweigungsfrequenz der Hyphen aus, wobei schon geringe Konzentrationen wirksam werden. Die weitreichende Bedeutung dieser Beobachtung im Zusammenhang mit der Thallusmorphogenese der Flechten wurde schon unter 4.2.2 diskutiert.

Die Zufuhr von Kohlenhydraten führt bei den Isolaten jedoch nicht nur zu mehr Verzweigungen, vielmehr erfahren die Mycelien durch Glukose und Ribitol unterschiedliche morphogenetische Impulse. Diese Beobachtung widerspricht der Aussage von HUBER ET AL. (1994), daß sich der Mycobiont von *Xanthoria parietina* indifferent in Bezug auf die Kohlenhydratquelle verhalte. Meine detaillierten Untersuchungen belegen eindeutig, daß Glukose im Gegensatz zu Ribitol bei den Mycobionten aus *X. parietina*, *Physconia distorta* und *Anaptychia ciliaris* eine Polarisierung des Mycelwachstums in Richtung des Substrates bewirkt (Abb. 90, 91). Die Penetrationsfähigkeit der Hyphen wird durch den Einfachzucker beeinflußt, so daß Membranfilter, die ohne Glukose-Zusatz eine Barriere darstellen, durchwachsen werden können. Gleichzeitig kann beobachtet werden, daß die Oberflächenstruktur aller untersuchten Mycobionten (mit Ausnahme von *Peltigera didactyla*) unter dem Einfluß von Glukose einheitlicher ist als bei Kultur auf ribitolhaltigen Medien. Auf letzterem Substrat wird die Bildung von Lufthyphen beobachtet.

Es stellt sich nun die Frage, ob das Verhalten der Mycobionten durch die unterschiedliche Verwertbarkeit der Kohlenhydrate Ribitol und Glukose verursacht wird oder ob die lange Zeit der Coevolution zwischen Pilz und Algen ebenfalls eine Rolle spielt. Die oben genannten Mycobionten sind in der Symbiose mit Grünalgen aus der Gattung *Trebouxia* assoziiert, die im Flechtenthallus Ribitol abgeben. Im Gegensatz dazu geht der Mycobiont von *P. didactyla* eine Symbiose mit *Nostoc spec.* ein und erhält Glukose von dem Cyanobionten. In Kultur zeigt sich dieser Flechtenpilz indifferent in Bezug auf verschiedene Kohlenhydrate. Da von diesem Isolat erst wenige Mycelien getestet werden konnten, ist noch unklar, ob die Beobachtung allgemeine Gültigkeit hat.

Auch wenn diese Aspekte und ihre Bedeutung für die Flechtensymbiose im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden können, haben die hier vorgestellten Versuche erstmals gezeigt,

daß die Art der zugeführten Kohlenhydrate Einfluß auf die Morphogenese von isolierten Mycobionten haben kann. Es wird erneut deutlich, daß Ribitol bzw. Glukose über ihre Funktion als Energielieferant hinaus an der Thallusmorphogenese beteiligt sind.

4.6.3 Zusammenfassung VI

- Die Mycobionten der Flechten *Xanthoria parietina* und *Physconia distorta* erfahren unabhängig vom Nährstoffgehalt des Kulturmediums einen morphogenetischen Impuls durch ihre arteigenen Photobionten, der dazu führt, daß auch bei einer hohen Kohlenhydratkonzentration eine gemeinsame Matrix gebildet wird. In diese Reaktion sind nur solche Hyphen einbezogen, die in direktem Kontakt zu den Photobionten stehen, d.h. die Mycelien werden durch die Interaktion mit dem Algenpartner nicht in ihrer Gesamtheit determiniert, und freie Hyphen stehen für weitere Lichenisierungsprozesse zur Verfügung.
- Reaktionen dieser Mycobionten mit artfremden Photobionten sind in der Intensität abgestuft, denn es wird keine gemeinsame Matrix gebildet.
- Die isolierten Mycelien werden durch die Phytohormone Naphtylessigsäure (NAA) und Kinetin in der Art morphogenetisch beeinflußt, daß:
 - NAA die Verzweigungsfrequenz der Hyphen einiger untersuchter Arten reduziert und zu einem stark in das Substrat gerichteten Wachstum der Filamente führt;
 - Kinetin die Ausdehnungsgeschwindigkeit der Mycelien verringert.Dadurch sind die Hormone geeignet, regulative Funktionen in einem Flechtenthallus auszuüben.
- Die Kohlenhydrate Ribitol und Glukose geben den Mycelien unterschiedliche morphogenetische Impulse:
 - Glukose führt wie NAA zu einem stark in das Substrat orientierten Wachstum, wobei die Myceloberfläche relativ ebenmäßig ist.
 - Unter dem Einfluß von Ribitol entwickeln die Mycelien Lufthyphen, während ihre Basis eine geschlossene Struktur aufweist.

Somit wurde erstmalig gezeigt, daß sich die Isolate von Flechtenpilzen nicht indifferent in Bezug auf die Kohlenhydratzufuhr verhalten - eine Beobachtung, deren Bedeutung für die Flechtensymbiose im abschließenden Kapitel aufgegriffen wird.

4.7 Mycobionten im natürlichen Biotop

Viele Flechten sind in der Lage, sich über vegetative Diasporen, z.B. Soredien oder Isidien, zu verbreiten. Diese Fortpflanzungseinheiten enthalten beide Symbiosepartner, so daß zur Bildung eines neuen Flechtenthallus keine Relichenisierung notwendig ist. Im Gegensatz dazu wird bei der sexuellen Reproduktion durch Ascosporen lediglich der Mycobiont verbreitet, und zur Thallusneubildung sind die auswachsenden Hyphen auf ein Zusammenreffen mit ihrem passenden Photobionten angewiesen. Bis ein Kontakt zwischen den Bionten hergestellt wird, muß der Mycobiont im unlichenisiertem Zustand verbleiben. Es ist jedoch nicht bekannt, ob Mycobionten in dieser Form freilebend in der Natur vorkommen (AHMADJIAN 1987a; DEACON 1997; HENSSEN & JAHNS 1974; LAWREY 1984). Beobachtungen verschiedener Autoren (FRIEDL 1987; OTT 1987a, b; OTT et al. 1995) weisen darauf hin, daß Mycobionten in Kontakt mit suboptimalen Photobionten zumindest für einen begrenzten Zeitraum überleben können. Auch saprotrophes Verhalten kann an Mycobionten beobachtet werden (GABMANN & OTT 2000; LAWREY 1984; OTT 1987a). Nach der Auffassung von HONEGGER (1996a) sind unlichenisierte Flechtenpilze sehr wahrscheinlich Teil der Mycoflora von Substraten wie Erde oder Baumrinde. Da sie sich jedoch morphologisch nicht von anderen filamentös wachsenden Pilzen unterscheiden, können sie nicht identifiziert werden. Zusätzlich sind die Zugänglichkeit und das Monitoring von Mikropilzgemeinschaften auf Grund der geringen Größe der Objekte und der damit verbundenen Schwierigkeit bei der Isolation sehr eingeschränkt. In Zukunft werden molekularbiologische Methoden weiterhelfen.

Um herauszufinden, ob isolierte Mycobionten prinzipiell in der Lage sind, im natürlichen Habitat zu überleben, wurden Pilzisolat der Flechten *Xanthoria parietina*, *Physcia tenella*, *Physconia distorta* und *Anaptychia ciliaris* in das Freiland transplantiert. Hierfür fanden polyspore Mycelien Verwendung, die auf Membranfiltern im Labor für die Dauer von einem Jahr vorkultiviert worden waren. Nach dieser Periode wurden die Mycelien zusammen mit den Membranfiltern, in denen sie sich verankert hatten, auf die Zweige einer Eiche übertragen und für den Zeitraum von 12 Monaten den natürlichen Standortbedingungen ausgesetzt.

Das in dieser Art erstmalig durchgeführte Experiment eröffnete zusätzlich die Möglichkeit, das Verhalten der Mycelien in Bezug auf mögliche Interaktionen mit anderen Organismen zu untersuchen. Besonders die Frage, ob Mycobionten nach einer längeren Kulturzeit unter axenischen Bedingungen noch zur Relichenisierung fähig sind, konnte für den Pilz von *P. tenella* geklärt werden. Einige biotrophe Parasiten (z.B. Rostpilze), die sehr schwer zu kultivieren sind, verlieren ihr Infektionspotential, nachdem sie ohne den Wirt kultiviert wurden (MACLEAN 1982). Hier hat möglicherweise ein auch von Hefen bekannter „Domestikationseffekt“ dazu geführt, daß sie sich irreversibel in eine saprotrophe Form verändert haben.

4.7.1 Überlebensfähigkeit der Mycelien

Schon die Laborversuche haben gezeigt, daß isolierte Mycobionten über eine bemerkenswerte Überlebens- und Anpassungsfähigkeit verfügen. Austrocknung z.B. stoppt zwar Wachstumsprozesse bei den Isolat, die Mycelien können jedoch selbst nach einer Trockenperiode von 2 Monaten wieder zu neuem Wachstum angeregt werden. Ähnlich wie in einem Flechtenthallus überdauern sie diese Phasen sehr wahrscheinlich in einem Zustand latenten Lebens. In Bezug auf den Nährstoffbedarf scheinen die untersuchten Mycobionten relativ anspruchslos zu sein, denn Mycelbildung findet auch ohne die Zufuhr organischer Nährstoffe statt, sie reagieren schon auf geringe Erhöhungen der Kohlenhydratkonzentration, und für ein kontinuierliches Wachstum benötigen die Isolate nur sehr geringe Nährstoffgehalte im Substrat. Berücksichtigt man die Tatsache, daß auch unlichenisierte Mycobionten Flechtenstoffe mit antimikrobiellen Fähigkeiten, z.B. Usninsäure, bilden können (HAMADA 1991), so kann vermutet werden, daß sie über eine bemerkenswerte Konkurrenzfähigkeit verfügen.

Diese Eigenschaften tragen mit dazu bei, daß die Mycobionten auch unter den Bedingungen des natürlichen Habitats überleben können. Nach einem Jahr unter den Witterungseinflüssen der verschiedenen Jahreszeiten weisen die Mycelien zwar keinen radialen Zuwachs auf, sie sind jedoch nicht degeneriert. Lediglich größere Mycelien (> 3 mm) sind verloren gegangen, was sehr wahrscheinlich auf mechanische Einwirkung zurückzuführen ist. Innerhalb der verbliebenen Mycelien, die gut im Membranfilter verankert waren, kann Wachstumsaktivität beobachtet werden. Es ist anzunehmen, daß die Mycobionten unter Bildung Interner Hyphen ihre eigenen abgestorbenen Hyphen als Substrat nutzen (s. Kap. 4.2.3.1). Hierbei gerät ihnen die unter den relativ nährstoffreichen Laborbedingungen angenommene „Kulturform“ zum Vorteil, und sie können die vorhandenen Ressourcen optimal ausbeuten. Eine weitere Möglichkeit der Nährstofferschließung mag die Fähigkeit isolierter Mycobionten sein, cellulosehaltige Substrate als Carbonquelle zu verwerten (AHMADJIAN 1977). Die Vermutung liegt nahe, daß Flechtenpilze Teil der Mycoflora natürlicher Substrate sind, und daß nicht-lichenisierte Hyphen der Standorterhaltung dienen und zusätzlich neue Habitate erschließen können.

Da die kompakte, dreidimensionale „Kulturform“ nicht im natürlichen Habitat zu erwarten ist, soll diese Annahme in weiteren Versuchsserien abgesichert werden. Zu diesem Zweck sollen netzartige Mycelien, die unter nährstoffarmen Bedingungen vorkultiviert worden sind und dem Habitus der natürlichen Umgebung entsprechen, auf ihre Überlebensfähigkeit im Freiland getestet werden.

4.7.2 Kolonisierungsprozesse an den Mycobionten, insbesondere Interaktionen mit vegetativen Diasporen freilebender Flechten

Im natürlichen Habitat befinden sich die Mycelien nicht mehr unter axenischen Bedingungen, sondern geraten mit den verschiedenen Organismen, die auch die Rinde der Eiche besiedeln, in Kontakt. Freilebende Algen liegen den Mycelien z.T. lose auf; es können jedoch auch Interaktionen von Pilzhyphen mit Algenzellen beobachtet werden (Abb. 132). Möglicherweise nutzen die Mycobionten die Algenzellen in parasitischer Weise als Substrat, wie es auch von OTT (1987b) im Freiland an Keimlingen von *Xanthoria parietina* und von KLÖCKNER (1998) an dem Mycobionten von *Baeomyces rufus* in Kultur beobachtet werden konnte.

Zusätzlich wurde parasitischer Befall der Flechtenpilze durch nicht-lichenisierende Pilze beobachtet. Diese Fremdpilze nutzen das Hyphengeflecht der Mycobionten als Substrat, in dem sie ihre Fruchtkörper ausbilden. An der Form der Fruchtkörper können mindestens 3 verschiedene Arten unterschieden werden. Leider wäre eine taxonomische Bearbeitung weit über den Rahmen dieser Arbeit hinausgegangen. Im Hinblick auf die Diversität der Mycoflora könnte eine Untersuchung jedoch äußerst interessante Aspekte beinhalten.

Neben den Besiedlungsprozessen konnten Interaktionen zwischen den Mycobionten und freilebenden Flechten bzw. vegetativen Diasporen beobachtet werden. Die Eiche, auf deren Zweige die Mycelien transplantiert worden waren, wird natürlicherweise von den Flechten *Physcia tenella* und *Parmelia sulcata* besiedelt. Beide Flechten bilden Soredien aus, die bei Freisetzung in einen Kontakt mit den Mycobionten kommen können. Hierbei ergeben sich verschiedene Reaktionsmuster:

- Gelangen die Soredien von *P. tenella* auf den transplantierten Mycobionten dieser Flechtenart, so keimen sie aus und entwickeln sich direkt zu neuen Loben. Eine solche Entwicklung kann nicht als selbstverständlich betrachtet werden, denn in den Soralen der Flechten keimen Soredien normalerweise nicht aus. Solange das Symbiosegleichgewicht des Flechtenthallus intakt ist, verhindert eine Wachstumshemmung die weitere Entwicklung der vegetativen Diasporen. Nur in degenerierten Thalli differenzieren sich die Diasporen zu neuen Loben aus, so daß der Standort für die Art gesichert bleibt (JAHNS & OTT 1990). Der transplantierte Mycobiont übt offensichtlich keinen inhibitorischen Effekt auf die Soredien aus, obwohl zwischen ihnen ein sehr enger Kontakt besteht. Entweder hat der Mycobiont diese Fähigkeit während der Kultivierungsperiode verloren, oder es können, was eher wahrscheinlich erscheint, nur intakte Flechtenloben, die beide Bionten enthalten, Soredien derartig beeinflussen.

In Kulturexperimenten von JAHNS (1984, 1993) mit vegetativen Diasporen sind solche Verbreitungseinheiten zunächst zu einem undifferenzierten Gewebe degeneriert, bevor neue Loben gebildet wurden. Auch Freilandkulturen von WEGNER (2001) mit den Soredien von

Physcia tenella haben gezeigt, daß die Diasporen zu einem undifferenzierten, gallertüberzogenen Gewebeverband verschmelzen, bevor neue Loben daraus hervorgehen. Bei Experimenten unter anderen Klimabedingungen mit Soredien von *Lobaria scrobiculata* erfolgte dagegen keine Degeneration (HILMO 2001). Auch die Soredien von *P. tenella* entwickeln sich auf dem transplantierten Mycobiont ihrer Art direkt in eine neue Flechtenlobe. Mit dem Mycobionten als Substrat scheint keine Degeneration vor dem organisierten Wachstum stattzufinden. Gleichzeitig verschmilzt die sich entwickelnde Flechte vollständig mit dem vorkultivierten Mycobiont, so daß das Pilzmycel und der Flechtenthallus eine Einheit bilden. Dieser Prozess wird durch intraspezifische Kompatibilität ermöglicht – ein Aspekt, der schon im Abschnitt 4.3.5 diskutiert wurde.

- Bei einer Besiedlung der Mycobionten durch artfremde Soredien kommt es nicht zu einer Verschmelzung der verschiedenen Gewebe. In diesen Fällen nutzen die Diasporen die Mycelien lediglich als ein Substrat, in dem sie sich z.T. mit auswachsenden Hyphen verankern. Es ist nicht bekannt, ob über solche Haftthyphen Nährstoffe ausgetauscht werden – ein Transport organischer Substanzen scheint nach CRITTENDEN (1991) jedoch möglich. In einer noch stärker abgeschwächten Form des Kontaktes wird lediglich die Nische zwischen Pilzmycelium und Membranfilter zur Ansiedlung genutzt, ohne daß von der heranreifenden Flechtenlobe besondere Haftorgane ausgebildet werden. Hier bietet der Spalt dem Primordium Schutz vor mechanischen Einflüssen und möglicherweise gleichzeitig eine bessere Wasserversorgung.

4.7.3 Relichenisierung

Wie schon angesprochen, konnte die Frage, ob isolierte Mycobionten nach einer längeren Kulturdauer unter axenischen Bedingungen noch in der Lage sind zu relichenisieren, für den Mycobionten von *Physcia tenella* positiv beantwortet werden. Auf der Rinde der Eiche kommen verschiedene freilebende Algen vor, unter denen sich auch der Photobiont von *Physcia tenella*, die Grünalge *Trebouxia spec.*, befinden muß, die aus degenerierten Thalli dieser Flechtenart freigesetzt werden kann. Die Algen gelangen durch Wind- und Wassertransport auf die Oberfläche sowie auch in die Spalten der locker strukturierten Mycelien des transplantierten Mycobionten von *P. tenella*. In den Kontaktbereichen mit Algenzellen können kurzzeitige Hyphen, die sich durch Lactoglycerin-Baumwollblau intensiv anfärben lassen, beobachtet werden. Bei Flechten sind solche Hyphentypen charakteristisch für wachstumsaktive Bereiche, da sich junge, wenig ausdifferenzierte Hyphenzellen, die noch nicht vakuolisiert sind, gut anfärben lassen. Ob das Wachstum durch saprotrophen Kontakt mit den Algenzellen hervorgerufen wird oder ob sogar erste Interaktionen mit einem Photobionten, die möglicherweise eine Relichenisierung einleiten, ursächlich sind,

kann an solchen Momentaufnahmen nicht beurteilt werden. Erst die Kombination vieler Einzelschritte, die durch Serienuntersuchungen möglich ist, macht deutlich, daß der transplantierte Mycobiont von *P. tenella* in einem symbiotischen Kontakt mit seinem spezifischen Photobionten neue Flechtenloben ausbildet (Abb. 133-135). Der Mycobiont von *P. tenella* hat also selbst nach längerer Kulturdauer unter axenischen Bedingungen nicht die Fähigkeit verloren zu relichenisieren. Diese Beobachtung ist umso bemerkenswerter, als für Resyntheseversuche normalerweise die schon unter 4.2.3.1 angesprochenen „starter units“ (ARMALEO 1991; HONEGGER & KUTASI 1990) oder auskeimende Sporen Verwendung finden. Frühere Studien an Flechtenpilzen hatten gezeigt, daß junge wachsende Spitzen eher für eine Relichenisierung geeignet sind als ältere Mycelien (AHMADJIAN 1993). Im Gegensatz dazu zeigten in dem hier vorgestellten Freilandversuch intakte, ältere Mycelien von *P. tenella* einen Phasenübergang vom Mycelwachstum zum symbiotischen Status. Interaktionen mit dem geeigneten Photobionten führten zur Entwicklung von Flechtenloben. Es ist höchst wahrscheinlich, daß auch hier die wachsenden Apices der Internen Hyphen, die zufällig auf freilebende Algen trafen, die Lichenisierung initiierten. Interaktionen mit Photobionten bzw. die Reaktionen der Mycelien sind folglich nicht vom Alter der Struktur abhängig, sondern davon, ob wachsende Hyphenspitzen vorhanden sind. Ähnliche Prozesse wurden von AHMADJIAN (1982) unter Laborbedingungen an dem Mycobionten von *Cladonia cristatella* beobachtet: Mycelien dieses Flechtenpilzes wurden aus einer Flüssigkultur auf ein festes Medium übertragen und bildeten unter diesen Bedingungen Lufthyphen aus, die in der Lage waren, Algenzellen zu binden.

An den transplantierten Mycobionten der Flechten *Anaptychia ciliaris*, *Physconia distorta* und *Xanthoria parietina* konnten die oben beschriebenen symbiotischen Interaktionen mit freilebenden Algen nicht beobachtet werden. Auf keinem Mycelium dieser Mycobionten hatten sich Flechtenloben der gleichen Art gebildet. Dieser Beobachtung liegen sehr wahrscheinlich verschiedene Ursachen zugrunde:

Die Flechten *A. ciliaris* und *P. distorta* kommen nicht in der Umgebung von Düsseldorf vor, so daß sehr wahrscheinlich auch die Photobionten dieser Flechten, die aus abgestorbenen Thalli freigesetzt werden können, nicht in diesem Habitat vertreten sind. Die Mycobionten benötigen jedoch zur Relichenisierung ihre arteigenen Photobionten.

Adulte Thalli der Flechte *X. parietina* werden zwar im Bereich von Düsseldorf gefunden (WEGNER 2001), nicht jedoch auf der Eiche (*Quercus robur*), auf die die Mycelien transplantiert worden waren. Es ist anzunehmen, daß die spezifische Grünalge der Flechte (*Trebouxia impressa*) zwar in diesem Habitat anzutreffen ist, mikroklimatische Bedingungen oder andere Parameter, z.B. der pH-Wert der Rinde (van HERK 2001), die Entwicklung der Flechte auf den Ästen jedoch verhindern.

Aus den hier geschilderten Beobachtungen ergeben sich weitere Möglichkeiten, den Versuchsansatz zu variieren:

- Vorkultivierte Mycobionten werden in ein Habitat transplantiert, in dem auch die korrespondierenden Flechten zu finden sind, so daß sowohl geeignete Photobionten vorhanden, als auch die Standortfaktoren für eine Relichenisierung geeignet sind.
- Isolierte Myco- und Photobionten werden unter Laborbedingungen herangezogen, unter kontrollierten Bedingungen zusammengeführt und erst anschließend in das Freiland transplantiert. – Dieser Versuch wurde mit *Physconia distorta* schon in der Art verwirklicht, daß ein Homogenisat aus axenisch kultivierten Myco- und Photobionten dieser Flechte auf die Rinde verschiedener Bäume, auf denen sich die Flechte natürlicherweise ansiedelt, geimpft wurde. Erste Ergebnisse sind jedoch erst nach ca. 6 Monaten zu erwarten.

Besonders im Zusammenhang mit der in den letzten Jahren beobachteten Wiedereinwanderung der Flechten auch in städtische Biotope (auf Grund verbesserter Luftqualität) kann der zuletzt genannte Ansatz interessante Aufschlüsse über die potentiell mögliche Flechtenflora geben. Transplantationsversuche mit adulten Thalli haben häufig den Nachteil, daß vollständig ausdifferenzierte Loben sich nicht mehr an die veränderten Bedingungen des neuen Standortes anpassen können (BRUMBERG 2000; SCHEIDEGGER 1995). Sie degenerieren, obwohl die Bedingungen grundsätzlich eine Besiedlung des Standortes durch diese Art erlauben. Die reine Aufnahme der jetzt schon anzutreffenden Flechtenvegetation, die besonders im Zusammenhang mit der aktuell diskutierten Biodiversität intensiv durchgeführt wird (LIECKFELD 2001; ZIMMER 2000), ergibt ebenfalls kein erschöpfendes Bild, denn die Geschwindigkeit der Rückwanderung ist für die Arten verschieden, so daß eine Besiedlung z.T. wesentlich später erfolgt, als es theoretisch möglich wäre.

Möglicherweise bietet dieser Ansatz zusätzlich eine Chance, in der Zukunft routineartig Flechtenloben heranzuziehen, was bisher trotz allen Fortschrittes auf dem Gebiet der Resynthese noch nicht möglich ist (AHMADJIAN 1993; GALUN 1988b). Da es immer noch sehr große Lücken im Verständnis der Relichenisierung gibt, werden Transplantationsexperimente solcher Art neue Einblicke geben.

4.7.4 Zusammenfassung VII

- Die untersuchten Mycobionten sind in der Lage, auch im unlichenisiertem Zustand im natürlichen Habitat zu überleben. Dies wird durch die Fähigkeit unterstützt, ungünstige Perioden in einem Zustand latenten Lebens zu überdauern und vorhandene Ressourcen bei einem geringen Nährstoffbedarf ökonomisch zu nutzen.
- Alle Mycobionten werden von verschiedenen Organismengruppen kolonisiert: frei lebenden Algen, nicht-lichenisierenden Pilzen und vegetativen Diasporen verschiedener Flechten.
- Zwischen dem Mycobionten von *Physcia tenella* und frei lebenden Diasporen der gleichen Art finden Interaktionen statt. Die Entwicklung einer Flechtenlobe aus Soredien findet ohne vorherige Degeneration statt, und Mycobiont und Flechtenlobe fusionieren miteinander.
- Diasporen von *Physcia tenella* und *Parmelie sulcata* nutzen die transplantierten Mycobionten von *Xanthoria parietina*, *Physconia distorta* und *Anaptychia ciliaris* als Substrat; die verschiedenen Gewebe verschmelzen bei diesem artfremden Kontakt nicht miteinander.
- Der Mycobiont von *Physcia tenella* ist auch nach längerer Kulturdauer in der Lage, zu relichenisieren, denn er entwickelt mit seinem spezifischen Photobionten einen Flechtenthallus. Dieser Prozess wird sehr wahrscheinlich von den Internen Hyphen, die den aktiv wachsenden Anteil der kompakten Mycelien darstellen, initiiert.
- Die Mycobionten von *Xanthoria parietina*, *Physconia distorta* und *Anaptychia ciliaris* sind am untersuchten Standort nicht an einer Relichenisierung beteiligt; mögliche Ursachen für diese Beobachtung wurden diskutiert.
- Aus den Beobachtungen wurden Konzepte für weiterführende Versuchsansätze entwickelt.

5 Schlussbetrachtungen

In den vorausgehenden Kapiteln wurden die jeweiligen Ergebnisse im einzelnen diskutiert und abschließend zusammengefaßt. So interessant aber die verschiedenen Aspekte im Detail auch sein mögen, so bleibt doch die Notwendigkeit, die übergreifende Bedeutung der Resultate für das grundsätzliche Verständnis des Symbioseorganismus Flechte darzustellen. Vor allem haben meine Untersuchungen gezeigt, daß es nicht ausreicht, nur von der intakten Gesamtflechte auszugehen. Ein wirkliches Verständnis dieser Organismen ist nur zu erlangen, wenn die inhärenten Eigenschaften der beiden Symbiosepartner einbezogen werden. Da in der Literatur zu diesem Problemfeld nur sehr wenige Angaben existieren, ist eine isolierte Untersuchung der "angeborenen" Eigenschaften von Mycobiont und Photobiont unbedingt notwendig. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich nur eine begrenzte Zahl von Taxa bearbeiten, so daß in Zukunft neben weiteren Familien der Lecanorales und Telochistales auch andere Ordnungen (z.B. Collematales) untersucht werden müssen, bevor allgemeingültige Aussagen über Eigenschaften der Mycobionten und deren Bedeutung für Ontogenie und Phylogenie möglich sind.

Ein besonders wichtiges Ergebnis meiner Versuche ist die Beobachtung, daß die Hyphenfilamente der isolierten Flechtenpilze prinzipiell die gleichen Reaktionsmuster zeigen, die von nicht-lichenisierten Ascomyceten bekannt sind. Somit wurden entsprechende Vermutungen anderer Autoren (Hawksworth & Hill 1984; Poelt 1991) erstmalig experimentell bestätigt. Im breiten Spektrum der Verhaltensweisen aus den Bereichen Keimung, Wachstumsverhalten und Differenzierung, das anscheinend allen Ascomyceten in grundsätzlich ähnlicher Form eigen ist, sind jedoch einige Aspekte bei Mycobionten besonders akzentuiert. Diese Besonderheiten, die im folgenden kurz summiert werden sollen, zeigen sich nicht nur im algenfrei angezogenen Mycobionten, sondern sind auch für den Aufbau der Flechtensymbiose unverzichtbar.

Charakteristisch für alle filamentös wachsenden Ascomyceten ist, daß sie besonders dort Verzweigungen bilden, wo organische Nährstoffe vorhanden sind. Flechtenpilze reagieren schon auf geringe Kohlenhydratkonzentrationen außergewöhnlich sensibel. Gleichzeitig wachsen sie extrem langsam. Die Kombination dieser beiden Eigenschaften ist Teil eines multifaktoriellen Systems, das es den Mycobionten ermöglicht, photosynthetisierende Algenpartner als stationäre Nährstoffquelle zu nutzen: Algenzellen werden schon nach dem ersten Kontakt durch Verzweigungsbildung umwachsen und in eine gemeinsame Matrix eingebunden. Zu schnelles Wachstum der Hyphen hätte bei diesem Prozess einen negativ selektiven Einfluß, da sich der Mycobiont vom Algenpartner - seiner beständigen Energiequelle - entfernen würde. Die Strukturbildung bei der Entwicklung eines Flechtenthallus wird ebenfalls nachhaltig durch das Verzweigungsmuster der Hyphen geprägt. Es ist höchst wahrscheinlich, daß neben anderen Regulationsmechanismen der Einfluß von Kohlen-

hydraten, die von den Photobionten in einem Flechtenthallus abgegeben werden, bei der Steuerung der Thallusmorphogenese von Bedeutung ist und bei der Interpretation berücksichtigt werden muß. Diese These wird durch die Fähigkeit der untersuchten Mycobionten unterstützt, zwischen den Kohlenhydraten Glukose und Ribitol, die von unterschiedlichen Photobionten zur Verfügung gestellt werden, zu diskriminieren und angepaßt zu reagieren.

Unlichenisierte Mycobionten bilden bei homogener Zufuhr organischer Nährstoffe die für viele Pilze charakteristischen radiären Mycelien, die sich sehr wahrscheinlich mit art-typischer, von der Konzentration der Nährstoffe unabhängiger Geschwindigkeit ausdehnen. Die radiäre Wuchsform wird auch noch von Krusten- und einigen Blatflechten, die eng mit dem Substrat verbunden sind, eingenommen. Artspezifische Unterschiede und Variationen innerhalb einer Art bei der Mycelbildung bzw. im Kulturverhalten der Mycobionten, die erstmalig herausgearbeitet wurden, können mit ökologischen Spezialisierungen oder taxonomischen Aussagen verknüpft sein:

- Die Artabhängigkeit in der Penetrationsfähigkeit der Pilzhyphen hat z.B. Auswirkungen auf das Besiedlungsmuster der einzelnen Flechtenarten.
- Genetische Variationen in der Parietinproduktion des Mycobionten von *Xanthoria parietina* haben möglicherweise Einfluß auf die Kolonisierungsfähigkeit der Flechte.
- Die taxonomische Sonderstellung der Flechte *Baeomyces rufus* findet Ausdruck im abweichenden Kulturverhalten des isolierten Mycobionten.

Das Wachstum sowohl der radiären Mycelien, als auch eines Flechtenthallus wird wie bei nicht-lichenisierenden Pilzen durch Anastomosierung synchronisiert. Innerhalb eines Flechtenthallus können die lateralen Querverbindungen zwischen benachbarten Hyphen darüber hinaus bei Regenerationsvorgängen eine Neuverteilung der Ressourcen ermöglichen. In diesem Zusammenhang ist auch die Fähigkeit der Mycobionten zu nennen, die eigenen abgestorbenen Hyphen als Substrat zu verwenden. Diese intensive Methode, Ressourcen zu nutzen, kann zusammen mit der Anastomosierung bei Regenerationsvorgängen auf abgestorbenen Thallusteilen von Bedeutung sein. Interspezifische Kompatibilität, die für eine Anastomosierung Voraussetzung ist, erlaubt die Fusion benachbarter Mycelien und Flechtenprimordien und auch von unlichenisierten Mycobionten mit vegetativen Diasporen der gleichen Art. Solche Verschmelzungsprozesse werden selbst zwischen benachbarten adulten Flechtenloben beobachtet; hier sind sie zusätzlich vom Differenzierungsgrad der beteiligten Strukturen bzw. ihrer Oberflächenbeschaffenheit abhängig. In einigen Fällen scheint tropistische Attraktion diesen Prozess zu beschleunigen, denn sowohl zwischen unlichenisierten Mycelien als auch zwischen Flechtenloben kann eine verstärkte Ausbildung von Kontakthyphen beobachtet werden.

Der geringe Determinierungsgrad der Gewebe eines Flechtenthallus, der z.B. in Regenerationsvorgängen Ausdruck findet (ETGES 1996), ist ein Zeichen für die große Flexibilität der Mycobionten. Strukturen innerhalb eines Flechtenthallus werden weitgehend von der Funktion bestimmt, obwohl gleichzeitig bestimmte ontogenetische Abläufe unveränderbar sind (JAHNS & OTT 1990; KLÖCKNER 1998). Phasenwechsel, die auch von nicht-lichenisierenden Pilzen bekannt sind, und die Fähigkeit der Filamente, sich bei geeigneter Nährstoffversorgung unbegrenzt auszudehnen, ermöglichen den Flechtenpilzen zusätzlich eine bemerkenswerte morphogenetische Plastizität. Dadurch können sie sowohl im lichenisierten als auch im unlichenisierten Zustand effizient auf Veränderung ihrer Lebensbedingungen reagieren. Ein Phasenwechsel kann z.B. nicht nur eine abrupte Änderung der Verzweigungsfrequenz der Hyphenfilamente unlichenisierter Mycelien bedeuten, sondern auch eine Relichenisierung oder den Übergang vom symbiotischen zum aposymbiotischen Status unter der Ausbildung von migratorischen Hyphen. Freilandbeobachtungen (AHMADJIAN et al. 1980; GABMANN & OTT 2000; KLÖCKNER 1998; OTT 1987c) haben gezeigt, daß unlichenisierte Mycelien nicht nur aus Ascosporen gebildet werden, sondern auch auf vegetativem Weg durch Auswachsen von freien Hyphen entstehen können. In meinen Experimenten haben sich Mycelien unlichenisierter Mycobionten im natürlichen Habitat als überlebensfähig erwiesen. Zusätzlich konnte der Mycobiont von *Peltigera didactyla* erfolgreich isoliert werden, obwohl die Pilzpartner aus diesem Verwandtschaftsbereich durch evolutionäre Veränderungen in der langen Abhängigkeit von den Photobionten von vielen Autoren (u.a. AHMADJIAN 1987a, HONEGGER 1996b) als obligat biotroph angesehen werden. Aus den oben geschilderten Beobachtungen kann gefolgert werden, daß freilebende Populationen von Flechtenpilzen Teil der Mycoflora natürlicher Substrate sind. Hierbei ist das Potential der Hyphenfilamente, sich bei geeigneter Nährstoffzufuhr unbegrenzt auszudehnen, mit der Relichenisierungsfähigkeit wachsender Hyphenspitzen gekoppelt, die auch nach längerer Kulturdauer unter axenischen Bedingungen nicht verlorenght.

Da in vielen natürlichen Substraten die Nährstoffe nicht homogen vorliegen, sondern sich auf einzelne Depots konzentrieren, besteht eine räumliche und, witterungsbedingt, auch eine zeitliche Diskontinuität in der Nährstoffversorgung. Das Kolonisierungsprofil vieler nicht lichenisierter Mycota ist deshalb u.a. von der Verteilung der Nährstoffe abhängig. Auch die Morphogenese der Flechtenpilze ist im unlichenisierten Zustand vom Substrat abhängig. Lichenisierte Mycobionten sind hingegen durch die Ausbildung eines Flechtenthallus mit einer integrierten Nahrungsquelle vom Substrat unabhängig und können zusätzlich neue und auch „extreme“ Habitate besiedeln. Gleichzeitig spielen jedoch Energieeffizienz und Ressourcenzugänglichkeit eine entscheidende Rolle. Durch das außergewöhnliche morphogenetische Potential der Mycobionten ergibt sich in Abhängigkeit von den biotischen und abiotischen Umwelteinflüssen in der Ontogenie ein außergewöhnlich anpassungsfähiger Lebenszyklus, der nicht nur den Symbioseorganismus Flechte, sondern darüber hinaus auch

nicht-lichenisierte Phasen unterschiedlichster Ausprägung einbezieht. Auf phylogenetischer Ebene haben sich alle Schritte von sehr einfachen Typen der Lichenisierung bis hin zu hoch organisierten Flechten herausgebildet. Darüber hinaus können von jeder Stufe Rückschritte in Richtung mehr oder weniger vollständiger Delichenisierung geschehen (SANTESSON 1967), so daß viele rezente Ascomyceten möglicherweise lichenisierte Vorfahren haben (LUZONI et al. 2001).

LITERATURVERZEICHNIS

- AHMADJIAN, V. (1959): A contribution toward lichen synthesis. - *Mycologia* 51(1): 56-60.
- AHMADJIAN, V. (1960): The lichen association. - *The Bryologist* 63(4): 250-254.
- AHMADJIAN, V. (1961): Studies on lichenized fungi. - *The Bryologist* 64(2/3): 168-179.
- AHMADJIAN, V. (1964): Further studies on lichenized fungi. - *The Bryologist* 67(1): 87-98.
- AHMADJIAN, V. (1967a): A guide to the algae occurring as lichen symbionts: Isolation, culture, cultural physiology and identification. - *Phycologica* 6: 127-160.
- AHMADJIAN, V. (1967b): *The Lichen Symbiosis*. - Blaisdell Publishing Co., Waltham, Massachusetts.
- AHMADJIAN, V. (1969): Factors influencing the establishment of lichens in artificial culture. - *Bulletin de la Societ e Botanique de France, Memoires*: 27-34.
- AHMADJIAN, V. (1977): Qualitative requirements and utilization of nutrients: Lichens. - In: *Chemical Rubber Company Handbook Series in Nutrition. Section D: Nutritional Requirements. Volume 1*. Rechig, M. (ed.). Chemical Rubber Company Press, Cleveland: 203-215.
- AHMADJIAN, V. (1980): Separation and artificial synthesis of lichens. - In: *Symbiosis and parasitism. Ohio State University Biosciences Colloquia, No. 5*. Cook, C.B., Pappas, P.W. & Rudolf, E.D. (eds). Ohio State, University Press: 1-27.
- AHMADJIAN, V. (1982): Algal/fungal symbioses. - In: *Progress in Phycological Research. Vol. 1*. Round, F.C. & Chapman, D.J. (eds). Elsevier Biomedical Press, B.V., Amsterdam: 179-233.
- AHMADJIAN, V. (1987a): Laboratory culture of lichens and lichen symbionts. - In: *Proceedings of Symposium on Tissue Culture of Lichens and Bryophyte, April 23, 1987, Kyoto*. Committee for Symposium on Tissue Culture of Lichens and Bryophyte. Sponsored by the Nippon Paint Co., Ltd., Neyagawa: 1-13.
- AHMADJIAN, V. (1987b): Coevolution in lichens. - *Annals of the New York Academy of Sciences* 503: 307-315.
- AHMADJIAN, V. (1989): Studies on the isolation and synthesis of bionts of the cyanolichen *Peltigera canina* (*Peltigeraceae*). - *Plant Systematics and Evolution* 165(1-2): 29-38.
- AHMADJIAN, V. (1992): Basic mechanisms of signal exchange, recognition, and regulation in lichens. - In: *Algae and Symbiosis: Plants, Animals, Fungi, Viruses, Interactions Explored*. Reisser, W. (ed.). Bristol: Biopress Limited: 675-697.
- AHMADJIAN, V. (1993): *The Lichen Symbiosis*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- AHMADJIAN, V. & HEIKKILA, H. (1970): The culture and synthesis of *Endocarpon pusillum* and *Staurothele clopima*. - *The Lichenologist* 4: 259-267.
- AHMADJIAN, V. & JACOBS, J.B. (1983): Algal-fungal relationships in lichens: recognition, synthesis, and development. - In: *Algal Symbiosis*. Goff, L.J. (ed.). Cambridge University Press, Cambridge: 147-172.
- AHMADJIAN, V. & JACOBS, J.B. (1987): Studies on the development of synthetic lichens. - In: *Progress and Problems in Lichenology in the Eighties*. Peveling, E. (ed.). J. Cramer, Berlin, Stuttgart. - *Bibliotheca Lichenologica* 25: 47-58.
- AHMADJIAN, V., RUSSELL, L.A. & HILDRETH, K.C. (1980): Artificial reestablishment of lichens. I. Morphological interactions between the phycobionts of different lichens and the mycobionts of *Cladonia cristatella* and *Lecanora chrysoleuca*. - *Mycologia* 72: 73-89.
- AINSWORTH, M.D. & RAYNER, A.D.M. (1989): Hyphal and mycelial responses associated with genetic exchange within and between species of the basidiomycete genus *Stereum*. - *Journal of General Microbiology* 135: 1643-1659.

- AINSWORTH, M.D. & RAYNER, A.D.M. (1991): Responses of living hyphae associated with self and non-self fusions in the basidiomycete, *Phanerochaete velutina*. – Journal of General Microbiology 132: 191-201.
- AMÊNDE, I. (1950): Ernährungsphysiologie des Pilzes der *Xanthoria parietina*. – Archiv für Mikrobiologie 15: 185-202.
- ANKE, H., STADLER, M., MAYER, A. & STERNER, O. (1995): Secondary metabolites with nematocidal and antimicrobial activity from namatophagous fungi and Ascomycetes. – Canadian Journal of Botany 7(1): 932-939.
- ARMALEO, D. (1991): Experimental microbiology of lichens: mycelia fragmentation, a novel growth chamber, and the origins of thallus differentiation. – Symbiosis 11: 163-177.
- ARMALEO, D. (1995): Factors affecting depside and depsidone biosynthesis in a cultured lichen fungus. – Cryptogamic Botany 5(1): 14-21.
- ARMSTRONG, R.A. (1988): Substrate colonization, growth, and competition. – In: CRC Handbook of Lichenology II. Galun, M. (ed.). Boca Raton, Florida, CRC Press: 3-16.
- ARMSTRONG, R.A. & SMITH, S.N. (1996): Do the lichens *Xanthoparmelia conspersa* (Ach.) Hale and *Rhizocarpon* Ram. em. Th. Fr. subgenus *Rhizocarpon* utilise exogenous carbohydrates for radial growth? – Environmental and Experimental Botany 36(1): 13-20.
- ASCASO, C. & GALVAN, J. (1975): Concentric bodies in three lichen species. – Arch. Microbiol. 105: 129-130.
- ASTA, J. & LETROUIT-GALINO, M.-A. (1995): Observations on the early growth of *Rhizocarpon geographicum* thalli (Beobachtungen über das frühe Wachstum von *Rhizocarpon geographicum*-Thalli). – Herzogia 11: 239-252.
- ASTA, J., LETROUIT, M.-A. & WAGNER, J. (1989): Colonisation de quartzites en milieu alpin par *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC (lichen crustacé saxicole). 1 - Les différents modes de développement du thalli. – Travaux Scientifiques du Parc National de la Vanoise 17(90): 63-88.
- BAILEY, R.H. (1976): Ecological aspects of dispersal and establishment in lichens. – In: Lichenology: Progress and Problems. Brown, D.H., Hawksworth D.L. & Bailey R.H. (eds). Academic Press, London: 215-247.
- BAILEY, R.H. & GARRETT, R.M. (1968): Studies on the discharge of ascospores from lichen apothecia. – The Lichenologist 4: 57-65.
- BAILEY, D., OTTEN, W. & GILLIGAN, C.A. (2000): Saprotrophic invasion by the soil-borne fungal plant pathogen *Rhizoctonia solani* and percolation thresholds. – New Phytologist 146: 535-544.
- BARRON, G.L. & THORN, R.G. (1987): Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. – Canadian Journal of Botany 65: 774-778.
- BAUER, R., MENDGEN, K. & OBERWINKLER, F. (1995): Cellular interaction of the smut fungus *Ustilicystis waldsteiniae*. – Canadian Journal of Botany 73: 867-883.
- BEDNAR, T.W. & HOLM-HANSEN, O. (1964): Biotin liberation by the lichen alga *Coccomyxa* sp. and by *Chlorella pyrenoidosa*. – Plant & Cell Physiology 5: 297-303.
- BEJWA, R., ABUARGHUB, S. & READ, D.J. (1985): The biology of the Ericaceae. X. The utilization of proteins and the production of proteolytic enzymes by the mycorrhizal endophyte and the mycorrhizal plants. – New Phytologist 101: 469-486.
- BELANDRIA, G., ASTA, J. & NURIT, F. (1989): Effects of sulphur dioxide and fluoride on ascospore germination of several lichens. – The Lichenologist 21(1): 79-86.

- BELLEMERE, A. (1973): Observation de "corps concentriques, " semblables a ceux des lichens, dans certaines cellules de plusieurs ascomycetes non lichenisants. - Comptes Rendus à l'Académie de Science (Paris) 276 D: 949-952.
- BRUMBERG, J. (2000): Neuansiedlung und Wachstum der Flechte *Lobaria pulmonaria* im stadtnahen Bereich. - Schriftliche Hausarbeit im Rahmen der Ersten Staatsprüfung für das Lehramt für die Sekundarstufe I und II. Botanisches Institut der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- BUBRICK, P., FRENSDORFF, A. & GALUN, M. (1985): Selectivity in the lichen symbiosis. In: Lichen Physiology and Cell Biology. Brown, D.H. (ed.). Plenum Press, New York and London: 319-334.
- CARLILE, M.J. (1994): The success of the hypha and mycelium. - In: The Growing Fungus. N.A.R. Gow & G.M. Gadd (eds). Chapman & Hall, London: 1-19.
- CHAPIN, F.S.III., BLOOM, A.J., FIELD, C.B. & WARING, R.H. (1987): Plant responses to multiple environmental factors. - BioScience 37: 49-57.
- CHILDRESS, S. & KELLER, J.B. (1980): Lichen growth. - Journal of Theoretical Biology 32: 157-165.
- CHRISTMAS, M. (1980): Ascospore discharge and germination in *Xanthoria parietina*. - The Lichenologist 12: 403-406.
- CLAYDEN, S.R. (1997a): Intraspecific interactions and parasitism in an association of *Rhizocarpon lecanorinum* and *R. geographicum*. - The Lichenologist 29(6): 533-545.
- CLAYDEN, S.R. (1997b): Seasonal variations in ascospore discharge by *Rhizocarpon lecanorinum*. - The Lichenologist 29(5): 495-499.
- CLAYDEN, S.R. (1998): Thallus initiation and development in the lichen *Rhizocarpon lecanorinum*. - New Phytologist 139: 685-695.
- COGGINS, C.R., HORNING, U., JENNINGS, D.H. & VELTKAMP, C.J. (1980): The phenomenon of "point growth", and its relation to flushing and strand formation in the mycelium of *Serpula lacrimans*. - Transactions of the British Mycological Society 75: 69-76.
- CRITTENDEN, P.D. (1991): Ecological significance of necromass production in mat-forming lichens. - The Lichenologist 23: 323-331.
- CRITTENDEN, P.D., DAVID, J.C., HAWKSWORTH, D.L. & CAMPBELL, F.S. (1995): Attempted isolation and success in the culturing of a broad spectrum of lichen-forming and lichenicolous fungi. - New Phytologist 130(2): 267-297.
- CROWFORD, J.W. & RITZ, K. (1994): Origin and consequences of colony form in fungi: a reaction-diffusion mechanism for morphogenesis. - In: Shape and form in plants and fungi. Ingram, D.S. & Hudson, A. (eds). Academic Press, London, UK: 311-327.
- CULBERSON, C.F. (1969): Chemical and Botanical Guide to Lichen Products. - University of North Carolina Press, Chapel Hill.
- CULBERSON, C.F. , CULBERSON, W.L. & JOHNSON, A. (1977): Second Supplement to "Chemical and Botanical Guide to Lichen Products". - American Bryological and Lichenological Society, Missouri Botanical Garden, St. Louis.
- DAVIES, P.J. (1995): Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, London.
- DEACON, J.W. (1997): Modern Mycology. Blackwell Science, UK.
- DE LOS RIOS, A., RAMIREZ, R. & ESTÉVEZ, P. (1997): Production of several isoforms of β -1,4-glucanase by the cyanolichen *Peltigera canina*. - Physiologia Plantarum 100: 159-164.
- DESLOOVER, J. & LEBLANC, F. (1970): Pollutions atmosphériques et fertilité chez les mousses et les lichens épiphytiques. - Académie et Société Lorraines de Science Bulletin 9: 82-90.

- DEXHEIMER, J., GIANINAZZI, S. & GIANINAZZI-PEARSON, V. (1987): Ultrastructural cytochemistry of the host-fungus interface in the endomycorrhizal association *Glomus mosseae*/*Allium cepa*. - Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 92: 191-206.
- DIAZ, C.L., MELCHERS, L.S., HOOYKAAS, P., LUGTENBERG, B. & KIJNE, J.W. (1989): Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the Rhizobium-legume symbiosis. - Nature 338: 579-581.
- DIFCO MANUAL (1998): Difco Laboratories, Division of Becton Dickinson and Company. Sparks, Maryland 21152, USA.
- DUDDRIDGE, J.A. & READ, D.J. (1982): Ultrastructural analysis of the development of mycorrhizas in *Rhododendron ponticum*. - Canadian Journal of Botany 60: 2345-2356.
- EPSTEIN, E., SAGEE, O., COHEN, D.J. & GARTY, J. (1986): Endogenous auxin and ethylene in the lichen *Ramalina duriaei*. - Plant Physiology 82: 1122-1125.
- ETGES, S. (1996): Die vegetative Regeneration von Flechtenthalli. Diplomarbeit. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- FEIGE, G.B. & JENSEN, M. (1992): Basic carbon and nitrogen metabolism of lichens. - In: Algae and Symbiosis: Plants, Animals, Fungi, Viruses, Interactions Explored. Reisser, W. (ed.). Biopress Limited, Bristol: 277-299.
- FORTIN, J.A., THIBAUT, J.R. & MORISSET, P. (1972): Presence d'auxine chez un lichen (*Cladonia alpestris*) et transformation du tryptophane en acide indolyl-acétique par trois mycobiontes. - Naturaliste Canadian 99: 213-218.
- FREY, E. (1959): Flechtenflora und -vegetation des Nationalparks im Unterengadin. II. Teil: Die Entwicklung der Flechtenvegetation auf photogrammetrisch kontrollierten Dauerflächen. - Ergebnisse der wissenschaftlichen Untersuchung des schweizer Nationalparks, N.F. 6(41): 237-319.
- FRIEDL, T. (1987): Thallus development and phycobionts of the parasitic lichen *Diploschistes muscorum*. - The Lichenologist 19: 183-191.
- FRIEDL, T. (1989): Systematik und Biologie von *Trebouxia* (Microthamniales, Chlorophyta) als Phycobiont der Parmeliaceae (lichenisierte Ascomyceten). - Inaugural Dissertation, Universität Bayreuth.
- GALLOWAY, D.J. (1991): Chemical evolution in the order Peltigerales: triterpenoids. - Symbiosis 11: 327-344.
- GALUN, M. (1988a): Carbon Metabolism. - In: CRC Handbook of Lichenology I. Galun, M. (ed.). Boca Raton, Florida, CRC Press: 197-200.
- GALUN, M. (1988b): Lichenization. - In: CRC Handbook of Lichenology II. Galun, M. (ed.). Boca Raton, Florida, CRC Press: 153-169.
- GALUN, M. & KARDISH, N. (1995): Lectins as determinants of symbiotic specificity in lichens. - Cryptogamic Botany 5(2): 144-148.
- GALUN, M. & PELEG-ZURIEL, L. (2000): Growth enhancement of lichen-forming fungi. - In: New Aspects in Cryptogamic Research. Contributions in Honour of Ludger Kappen. Schroeter, B., Schlenz, M. & Green, T.G.A. (eds). J. Cramer, Berlin, Stuttgart. - Bibliotheca Lichenologica 75: 105-111.
- GALUN, M. & SHOMER-ILAN, A. (1988): Secondary metabolic products. - In: CRC Handbook of Lichenology 2. Galun, M. (ed.). Boca Raton, Florida, CRC Press: 3-8.
- GALUN, M., BEHR, L. & BEN-SHAUL, Y. (1974): Evidence for protein content in concentric bodies of lichenized fungi. - Journal of Microscopy 19: 193-196.
- GARRAWAY, M.O. & EVANS, R.C. (1984): Fungal nutrition and physiology. New York, Wiley & Sons.

- GARRETT, R.M. (1972): Electrostatic charges on freshly discharged lichen ascospores. - *The Lichenologist* 5: 311-313.
- GABMANN, A. & OTT, S. (2000): Growth strategy and the gradual symbiotic interactions of the lichen *Ochrolechia frigida*. - *Plant Biology* 2: 368- 278.
- GIRLANDA, M., ISOCRONO, D., BIANCO, C. & LUPPI-MOSCA, A.M. (1997): Two foliose lichens as microfungial ecological niches. - *Mycologia* 89(4): 531-536.
- GRANETT, A.L. (1974): Ultrastructural studies of concentric bodies of the ascomycetous fungus *Venturia inaequalis*. - *Canadian Journal of Botany* 52: 2137-2139.
- HÄNSEL, R, STICHLER, O. & STEINEGGER, E. (1999): *Pharmakognosie-Phytopharmazie*. 6. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- HAFELLNER, J. & BELLEMÈRE, A. (1981): Elektronenoptische Untersuchungen an Arten der Flechtengattung *Letrouitia* gen. nov.. - *Nova Hedwigia* 35: 263-312.
- HALE, M.E. (1961): *Lichen Handbook. A Guide to the Lichens of Eastern North America*. Smithsonian Institution, Washington, D.C.
- HALE, M.E. (1974): *The Biology of Lichens*. - Willis, A.J. & Sleigh, M.A. (eds.). Edward Arnold Ltd., London.
- HAMADA, N. (1991): Environmental factors affecting the content of usnic acid in the lichen mycobiont of *Ramalina siliquosa*. - *Bryologist* 92: 57-59.
- HAWKSWORTH, D.L. (1973): Some advances in the study of lichens since the time of E. M. Holmes. - *Botanical Journal of the Linnean Society* 67: 3-31.
- HAWKSWORTH, D.L. (1982a): Co-evolution and the detection of ancestry in lichens. - *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 52: 357-366.
- HAWKSWORTH, D.L. (1982b): Secondary fungi in lichen symbioses: parasites, saprophytes and parasymbionts. - *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 52: 357-366.
- HAWKSWORTH, D.L. (1988): The variety of fungal-algal symbiosis, their evolutionary significance, and the nature of lichens. - *Botanical Journal of the Linnean Society* 96: 3-20.
- HAWKSWORTH, D.L. & HILL, D.J. (1984): *The Lichen-Forming Fungi*. - Blackie, Glasgow and London.
- HAWKSWORTH, D.L., KIRK, P.M., SUTTON, B.C. & PEGLER, D.N. (1995): *Dictionary of the Fungi*. - CAB International, Wallingford.
- HAMMER, S. (1997): Vegetative establishment and expansion by the mycobiont of *Cladina subtenuis*. - *The Lichenologist* 29(4): 369-377.
- HENSSEN, A. & JAHNS, H.M. (1974): *Lichenes: Eine Einführung in die Flechtenkunde*. - Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- HILL, D.J. (1985): Changes in photobiont dimensions and numbers during co-development of lichen symbionts. - In: *Lichen Physiology and Cell Biology*. Brown, D.H. (ed.). Plenum Press, New York, London: 303-317.
- HILL, D.J. (1994): The nature of the symbiotic relationship in lichens. - *Endeavour* 18(3): 96-103.
- HILMO, O. (2001): Lichen response to environmental changes in managed boreal forest systems. - Dr. scient. avhandling 2001, Fakultet for kjemi og biologi, Botanisk institutt, NTNU Trondheim.
- HONEGGER, R. (1987): Questions about pattern formation in the algal layer of lichens with stratified (heteromerous) thalli. - In: *Progress and Problems in Lichenology in the Eighties*. Peveling, E. (ed.). J. Cramer, Berlin-Stuttgart. *Bibliotheca Lichenologica* 25: 59-71.
- HONEGGER, R. (1991): Functional aspects of the lichen symbiosis. - *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 553-578.

- HONEGGER, R. (1993): Developmental biology of lichens. - *New Phytologist* 125: 659-677.
- HONEGGER, R. (1995): Experimental studies with foliose macrolichens: fungal response to spatial disturbance at the organismic level and to spatial problems at the cellular level during drought stress events. - *Canadian Journal of Botany* 73: 569-578.
- HONEGGER, R. (1996a): Mycobionts. - In: *Lichen Biology*. Nash, T.H. (ed.). Cambridge, University Press: 24-37.
- HONEGGER, R. (1996b): Morphogenesis. - In: *Lichen Biology*. Nash, T.H. (ed.). Cambridge, University Press: 65-88.
- HONEGGER, R. (1997): Metabolic interactions at the mycobiont-photobiont interface. - In: *The Mycota V, Part A*. Carroll & Tudzynski (eds). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg: 209-221.
- HONEGGER, R. & KUTASI, V. (1990): Anthraquinone production in three aposymbiotically cultures teloschistalean lichen mycobionts: the role of the carbon source. - *Endocytobiology IV*: 175-178.
- HORAN, D.P. & CHLIVERS, G.A. (1990): Chemotropism - the key to ectomycorrhizal formation? - *New Phytologist* 116: 297-301.
- HUBER, G., STOCKER-WÖRGÖTTER, E. & TÜRK, R. (1994): Die Kultivierung des Mycobionten von *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. auf unterschiedlichen Kulturmedien. - *Phyton (Austria)* 33(2): 305-319.
- HUDSON, H.J. (1986): *Fungal Biology*. Edward Arnold, London.
- JACOBS, J.B. & AHMADJIAN, V. (1971): The ultrastructure of lichens. II. *Cladonia cristatella*: the lichen and its isolated symbionts. - *Journal of Phycology* 7: 71-82.
- JAHNS, H.M. (1982): The cyclic development of mosses and the lichen *Baeomyces rufus* in an ecosystem. - *The Lichenologist* 14: 261-265.
- JAHNS, H.M. (1984): Morphology, reproduction, and water relation - a system of morphogenetic interactions in *Parmelia saxatilis*. - *Nova Hedwigia* 79: 715-737.
- JAHNS, H.M. (1988a): The lichen thallus. - In: *CRC Handbook of Lichenology I*. Galun, M. (ed.). Boca Raton, Florida: CRC Press: 95-143
- JAHNS, H.M. (1988b): The establishment, individuality and growth of lichen thalli. - *Botanical Journal of the Linnean Society* 96(1): 21-29.
- JAHNS, H.M. (1989): Systematics, Morphology and Ecology of Lichenized Fungi. - *Progress in Botany* 50: 267 - 283.
- JAHNS, H.M. (1993): Culture experiments with lichens. - *Plant Systematics and Evolution* 187: 145-174.
- JAHNS, H.M. & OTT, S. (1982): Flechtenentwicklung an dicht benachbarten Standorten. - *Herzogia* 6: 201-241.
- JAHNS, H.M. & OTT, S. (1990): Regulation of regenerative processes in lichens. - In: *Contributions to Lichenology in Honour of A. Henssen*. Jahns, H.M. (ed.). J. Cramer, Berlin-Stuttgart. - *Bibliotheca Lichenologica* 38: 243-252.
- JAHNS, H.M. & OTT, S. (1997): Life strategies in lichens - some general considerations. - In: *New Species and Novel Aspects in Ecology and Physiology of Lichens*. In Honour of O. L. Lange. Kappen, L. (ed.). J. Cramer, Berlin, Stuttgart. *Bibliotheca Lichenologica* 67: 49-67.
- JAHNS, H.M., MOLLENHAUER, D., JENNINGER, M. & SCHONBORN, D. (1979): Die Neubesiedlung von Baumrinde durch Flechten I. - *Natur und Museum* 109: 40-51.

- JAMES, P.W. & HENSSEN, A. (1976): The morphological and taxonomic significance of cephalodia. - In: Lichenology: Progress and Problems. Brown, D.H., Hawksworth, D.L. & Bailey, R.H. (eds.). Academic Press, London: 27-77.
- JENNINGS, D.H. & LYSEK, G. (1999): Fungal Biology (2nd ed): Understanding the fungal lifestyle. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK.
- KARDISH, N., SILBERSTEIN, L., FLEMINGER, G. & GALUN, M. (1991): Lectin from the lichen *Nephroma laevigatum* Ach.. Localization and function. - Symbiosis: 11: 47-62.
- KINRAIDE, W.T.B. & AHMADJIAN, V. (1970): The effects of usnic acid on the physiology of two cultured species of the lichen alga *Trebouxia* Puym.. - The Lichenologist 4: 234-247.
- KLÖCKNER, P. (1998): Wachstums- und Differenzierungsprozesse vegetativer Flechtenstrukturen unter kontrollierten Bedingungen. Inaugural-Dissertation. Universität Düsseldorf.
- KOFLER, L. (1970): A method to use lichen spores in quantitative studies on germination. - The Bryologist 73: 602-606.
- KON, Y., KASHIWADANI, H. & KUROKAWA, S. (1990): Induction of lichen thalli of *Usnea confusa* Asah. ssp. kitamiensis (Asah.) Asah. in vitro. - Journal of Japanese Botany 65(1): 26-32.
- LALLEMANT, R. (1985): Le developement en cultures pures in vitro des mycosymbiotes des lichens. - Canadian Journal of Botany 63: 681-703.
- LALLEMANT, R. & BERNARD, T. (1977): Obtention des cultures pures des mycosymbiotes du *Lobaria laetevirens* (LIGHTF.) ZAHLBR. et du *Lobaria pulmonaria* (L.) HOFFM.: le role des gonidies. - Revue Bryologique et Lichénologique 42: 303-308.
- LAWREY, J. D. (1984): Biology of Lichenized Fungi. Praeger Publishers, New York.
- LEGAZ, M.E. & VINENTE, C. (1981): Location of several enzymes of L-arginine catabolism in *Evernia prunastri* thallus. - Zeitschrift für Naturforschung 36: 692-692
- LEGAZ, M.E. & VINENTE, C. (1989): Regulation of urease activity of *Cladina dendroides* and its photobiont by lichen phenols. - Plant Science 63(1): 15-24.
- LETROUIT-GALINOU, M. & ASTA, J. (1994): Thallus morphogenesis in some lichens. - Cryptogamic Botany 4(3): 274-282.
- LIECKFELD, C.-P. (2001): Eine PR-Strategie für den Flohkrebs. Artenvielfalt im Ruhrpott? - Die ZEIT 26.
- LINES, C.E.M., RATCLIFFE, R.G., REES, T.A.V. & SOUTHON, T.E. (1989): A ¹³C MNR study of photosynthate transport and metabolism in the lichen *Xanthoria calcicola* OXNER. - New Phytologist 111: 447-456.
- LUTZONI, F., PAGEL, M. & REEB, V. (2001): Major fungal lineages are derived from lichen symbiotic ancestors. - Nature 411: 937-940.
- LYSEK, G. (1978): Circadian rhythms. - In: The Filamentous Fungi, Vol. 3. Smith, J.E. & Berry, D.R. (eds). Arnold, London: 376-388.
- MACLEAN, D.J. (1982): Axenic culture and metabolism of rust fungi. In: The Rust Fungi. Scott, K.J. & Chakravorty, A.K. (eds). Academic Press, London: 38-84.
- MANAVATHU, E.K. & THOMAS, D. des S. (1985): Chemotropism of *Achlya ambisexualis* to methionine and methionyl compounds. - Journal of General Microbiology 131: 301-306.
- MAY, G.D. & LILLEY, W.W. (1988): A rapid method for extraction of membrane-plate grown fungal cultures. - Mycologia 80: 247-249.
- MOLINA, M.C. & CRESPO, A. (2000): Comparison of development of axenic cultures of five species of lichen-forming fungi. - Mycological Research 104(5): 595-602.

- MOLINA, M.C., STOCKER-WÖRGÖTTER, E., TÜRK, R. & VICENTE, C. (1997): Axenic culture of the mycobiont of *Xanthoria parietina* in different nutritive media: effect of carbon source in spore germination. - *Endocytobiosis and Cell Research* 12: 103-109.
- MONTE, M (1993): The influence of environmental conditions on the reproduction and distribution of epilithic lichens. - *Aerobiologia* 9: 169-179.
- MÜLLER, E. & LOEFFLER, W. (1982): *Mycologie*, 4. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- NGUYEN, T.T. & NIEDERPRUEM, D.J. (1984): Hyphal interactions in *Schizophyllum commune*: the dimon mating. - In: *The Ecology and Physiology of the Fungal Mycelium*. Jennings, D.H. & Rayner, A.D.M. (eds). Cambridge University Press, Cambridge: 73-102.
- OARD, M. & TIFFANY, L.H. (1985): Soil lichens of the Loess Hills prairies in Iowa. - *Proceedings of the Iowa Academy of Science* 92: 189-192.
- OLIVER, E., CRITTENDEN, P.D., BECKETT, A. & BROWN, D.H. (1989): Growth of lichen-forming fungi on membrane filters. - *The Lichenologist* 21: 387-392
- OSTROFSKY, A. & DENISON, W.C. (1980): Ascospore discharge and germination in *Xanthoria polycarpa*. - *Mycologia* 72: 1171-1179.
- OTT, S. (1987a): Reproductive strategies in lichens. - In: *Progress and Problems in Lichenology in the Eighties*. Peveling, E. (ed.). J. Cramer, Berlin, Stuttgart. *Bibliotheca Lichenologica* 25: 81-93.
- OTT, S. (1987b): Sexual reproduction and developmental adaptations in *Xanthoria parietina*. - *Nordic Journal of Botany* 7: 219-228.
- OTT, S. (1987c): The juvenile development of lichen thalli from vegetative diaspores. - *Symbiosis* 3: 57-74.
- OTT, S. (1987d): Exogene und endogene Einflüsse auf die Entwicklung von Ascocarpien bei *Physcia tenella*. - *Nova Hedwigia* 45(3-4): 327-345.
- OTT, S. (1996): Do phytohormones influence lichen growth in culture? - Abstracts. IAL 3: *Progress and Problems in Lichenology in the Nineties*. Salzburg, Austria.
- OTT, S. & LUMBSCH, H.T. (2001): Morphology and phylogeny of ascomycete lichens. - In: *The Mycota IX, Fungal Associations*. Hock, B. & Esser, K. (eds). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 189-210.
- OTT, S. & ZWOCH, I. (1992): Ethylene production by lichens. - *The Lichenologist* 24(1): 73-80.
- OTT, S., MEIER, T. & JAHNS, H. M. (1995): Development, regeneration, and parasitic interactions between the lichens *Fulgensia bracteata* and *Toninia caeruleonigricans*. - *Canadian Journal of Botany* 73(1): 595-602.
- OTT, S., SCHRÖDER, T. & JAHNS, H.M. (2000): Colonization strategies and interactions of lichens on twigs. In: *New Aspects in Cryptogamic Research. Contributions in Honour of Ludger Kappen*. Schroeter, B., Schlenzog, M. & Green, T.G.A. (eds.). J. Cramer, Berlin, Stuttgart. - *Bibliotheca Lichenologica* 75: 445-455.
- OTT, S., KRIEG, T., SPANIER, U. & SCHIELEIT, P. (2000): Phytohormones in lichens with emphasis on ethylene biosynthesis and functional aspects on lichen symbiosis. - *Phyton* 40: 83-94.
- PAUL, E.A. & CLARK, F.E. (1989): *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, San Diego, California.
- PEREZ-URRIA, E., RODRIGUEZ, M. & VICENTE, C. (1989): Algal partners regulates fungal urease in the lichen *Evernia prunastri* by producing a protein which inhibits urease synthesis. - *Plant Molecular Biology* 13: 665-672.
- PETRINI, O., HAKE, U. & DREYFUSS, M.M. (1990): An analysis of fungal communities isolated from fruticose lichens. - *Mycologia* 82(4): 444-451.

- PEVELING, E. (1973): Fine structure. - In: The Lichens. Ahmadjian, V. & Hale, M. E. (eds.). Academic Press, New York, London: 147-182.
- PLATT, J.L. & SPATAFORA, J.W. (1999): A re-examination of generic concepts of baeomycetoid lichens based on phylogenetic analyses of nuclear SSU and LSU ribosomal DNA. - The Lichenologist 31(5): 409-418.
- PLATT, J.L. & SPATAFORA, J.W. (2000): Evolutionary relationships of nonsexual lichenized fungi: molecular phylogenetic hypotheses for the genera *Siphula* and *Thamnolia* from SSU and LSU rDNA. - Mycologia 92(3): 475-487.
- POELT, J. (1991): Homologies and analogies in the evolution of lichens. - In: Frontiers in Mycology. Hawksworth, D.L. (ed.). CAB International, Wallingford: 85-97.
- PYATT, F.B. (1968): An investigation into conditions influencing ascospore discharge and germination in lichens. - Revue Bryologique et Lichenologique 36: 323-329.
- PYATT, F.B. (1969): Studies on the periodicity of spore discharge and germination in lichens. - The Bryologist 72: 48-53.
- PYATT, F.B. (1973): Lichen propagules. - In: The Lichens. Ahmadjian, V. & Hale, M.E. (eds.). Academic Press, New York, London: 117-145.
- PYATT, F.B. (1976): Lichen ecology of metal spoil tips: effects of metal ions on ascospore viability. - The Bryologist 79: 172-179.
- RAYNER, A.D.M. & COATES, D. (1987): Regulation of mycelial organisation and responses. - In: Evolutionary Biology of the Fungi. Rayner, A D.M., Brasier, C.M. & Moore, D. (eds). Cambridge University Press, Cambridge: 115-136.
- RAYNER, A.D.M., GRIFFITH, G.S. & AINSWORTH, A.M. (1994a): Mycelial interconnectedness. - In: The growing fungus. Gow, N. A. R. & Gadd, G.M. (eds). Chapman & Hall, London: 21-40.
- RAYNER, A.D.M., GRIFFITH, G.S. & WILDMAN, H.G. (1994b): Differential insulation and the generation of mycelial patterns. - In: Shape and form in plants and fungi. Ingram, D.S. & Hudson, A. (eds). Academic Press, London: 291-310.
- REYNOLDS, E.S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. - Journal of Cell Biology 17: 208- 212.
- READ, D.J. (1991): Mycorrhizas in ecosystem - nature's response to the "Law of the Minimum". In: Frontiers in Mycology. Hawksworth, D.L. (ed.). CAB International, Wallingford: 102-130.
- REMMER, S.B., AHMADJIAN, V. & LIVDAHL, T.P. (1986): Effects of IAA (indole-3-acetic acid) and kinetin (6-furfurylamino-purine) on the synthetic lichen *Cladonia cristatella* and its isolated symbionts. - Lichen Physiology and Biochemistry 1: 1-25.
- RIPPKA, R. , DERUELLES, J., WATERBURY, J.B., HERDMAN, M. & STANIER, R.Y. (1979): Generic assignments, stain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. - Journal of General Microbiology 111: 1-61.
- SAMUELSON, D.A. & BEZERRA, J. (1977): Concentric bodies in two species of the Loculoascomycetes. - Canadian Journal of Microbiology 23: 1485-1488.
- SANDERS, W.B. (1994): Role of lichen rhizomorphs in thallus propagation and substrate colonization. - Cryptogamic Botany 4(3): 283-289.
- SANTESSON, R. (1967): On taxonomical and biological relations between lichens and non-lichenized fungi. - Botaniska Notiser 120:497-498.
- SCHEIDEGGER, C., FREY, B. & ZOLLER, S. (1995): Transplantation of symbiotic propagules and thallus fragments: methods for the conservation of threatened epiphytic lichen populations. - In:

- Conservation Biology of Lichenised Fungi. Mitteilungen der Eidgenössischen Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft. Scheidegger, C., Wolseley, P.A. & Thor, G. (eds.). Birmensdorf, Switzerland: 41-62.
- SCHIELEIT, P. (1997): Phytohormone in der Flechtensymbiose unter besonderer Berücksichtigung des Ethylens. Inaugural-Dissertation. Universität Düsseldorf.
- SCHIELEIT, P. & OTT, S. (1996): Ethylen production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content of lichen bionts. - *Symbiosis* 21: 223-231.
- SCHUSTER, G. (1985): Die Jugendentwicklung von Flechten – ein Indikator für Klimabedingungen und Umweltbelastung. - *Bibliotheca Lichenologica* 20.
- SCHUSTER, G. (1992): Development of adventive thalli in *Umbilicaria* HOFFM.. - *Flora* 187: 201-207.
- SCHUSTER, G. & JAHNS, H.M. (1985): Artificial cultures of lichens in the natural environment. - *The Lichenologist* 17: 247-253.
- SCHWENDENER, S. (1869): Die Algentypen der Flechtengonidien. - Programm für die Rektorsfeier der Universität Basel 4: 1-42.
- SCOTT, G.D. (1959): Observations on spore discharge and germination in *Peltigera praetextata* (FLK.) VAIN. - *The Lichenologist* 1:109-111.
- SCOTT, G.D. (1964): Studies of the lichen symbiosis. 2. Ascospore germination in the genus *Peltigera*. - *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* 4: 326-336.
- SHAPIRO, I.A. (1971): Isolation of lichen fungi into culture. - *Mikologija i Fitopatologija* ("Nauka", Leningrad) 5: 98-100.
- SMITH, D.C. (1975): Symbiosis and the biology of lichenised fungi. - *Symposia Soc. Exper. Biol.* University Press, Cambridge. 29: 373-405.
- SPURR, A.R. (1969): A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. - *Journal of Ultrastructural Research* 26: 31-43.
- STADLER, M., MAYER, A., ANKE, H. & STERNER, O. (1994): Fatty acids and other compounds with nematicidal activity from cultures of Basidiomycetes. - *Planta Med.* 60: 128-132.
- STOCKER-WÖRGÖTTER, E. (1991): Thallus formation of two cyanobacterial lichens: *Peltigera didactyla* and *Peltigera praetextata*, under laboratory conditions. - *Bulletin de la Société Botanique de France, Lettres Botaniques* 138(3): 179-187.
- STOCKER-WÖRGÖTTER, E. (1995): Experimental cultivation of lichens and lichen symbionts. - *Canadian Journal of Botany* 73(1): 579-589.
- STOCKER-WÖRGÖTTER, E. & Türk, R. (1989): Laborversuche zur Kultivierung von Blatt- und Strauchflechten und deren Komponenten. *Nova Hedwigia* 48: 207-228.
- STOCKER-WÖRGÖTTER, E. & Türk, R. (1991): Artificial resynthesis of thalli of the cyanobacterial lichen *Peltigera praetextata* under laboratory conditions. - *Lichenologist* 23(2): 127-138.
- STOCKER-WÖRGÖTTER, E. & Türk, R. (1994): Artificial resynthesis of of the photosymbiodeme *Peltigera leucophlebia* under laboratory conditions. - *Cryptogamic Botany* 4(3): 300-308.
- STRINGER, P.W. & STRINGER, M.H.L. (1974): Air pollution and the distribution of epiphytic lichens and bryophytes in Winnipeg, Manitoba. - *The Bryologist* 77: 405-426.
- SZABO, L.J. & BUSHNELL, W.R. (2001): Hidden robbers: The role of fungal haustoria on parasitism of plants. - *Proceedings of the National Academy of Science* 98: 7654-7655.
- TAKAHAGI, T., YAMAMOTO, Y., KINOSHITA, Y., & YAMADA, T. (2000): Influence of NaCl concentration of spore germination and hyphal growth of lichens. - *J. Hattori Bot. Lab.* 88: 67-77.

- TAKAHASHI, K., TAKEDA, T. & SHIBATA, S. (1979): Polysaccharides of lichen symbionts. - Chemical and Pharmaceutical Bulletin 27: 238-241.
- THOMSON, N.F. & THOMSON, J.W. (1984): Spore ornamentation in the lichen genus *Solorina*. - The Bryologist 87: 151-153.
- TORZILLI, A.P. & LAWREY, J.D. (1995): Lichen metabolites inhibit cell wall degrading enzymes produced by the lichen parasite *Nectria parmeliae*. - Mycologia 87(6): 841-845.
- TORZILLI, A.P., MIKELSON, P.A. & LAWREY, J.D. (1999): Physiological effect of lichen secondary metabolites on the lichen parasite *Marchandiomyces corallinus*. - The Lichenologist 31(3): 307-314.
- TRINCI, A.P.J. (1973): The hyphal growth unit of wild type and spreading colonial mutants of *Neurospora crassa*. - Archiv für Mikrobiologie 91: 127-136.
- TRINCI, A.P.J. (1984): Regulation of hyphal branching and hyphal orientation. - In: The Ecology and Physiology of the Fungal Mycelium. Eighth Symposium of the British Mycological Society. Jennings, D.H. & Rayner, A.D.M. (eds). Cambridge University Press, Cambridge: 23- 52.
- TU, J.C. & COLOTELO, N. (1973): A new structure containing cyst-like bodies in apothecia bearing sclerotia of *Sclerotinia borealis*. - Canadian Journal of Botany 51: 2249-2250.
- VAINSTEIN, E.A. (1985): Lichen acids and permeability of alga *Trebouxia erici* cells. - Fiziologiya Rastanii 32: 1153-1158.
- VAN HERK, C.M. (2001): Bark pH and susceptibility to toxic air pollutants as independent causes of changes in epiphytic lichen composition in space and time. - The Lichenologist 33(5): 419-441.
- VENABEL, J.H. & COGGESHALL, R. (1965): A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. - Journal of Cell Biology 25: 407.
- WEBER, H. (1993): Allgemeine Mykologie. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.
- WEBSTER, J. (1980): Introduction to Fungi. Cambridge University Press, Cambridge.
- WEBSTER, M. & BROWN, D.H. (1997): Preliminary observations on the growth of transplanted *Peltigera canina* under semi-natural conditions. - The Lichenologist 29(1): 91-96.
- WEGNER, A. (2001): Besiedlung von Bäumen durch Flechten im Stadtgebiet von Düsseldorf. Diplomarbeit. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- WHITON, J. C. & LAWREY, J. D. (1982): Inhibition of *Cladonia cristatella* and *Sordaria fimicola* ascospore germination by lichen acids. - The Bryologist 85: 222-226.
- YAGÜE, E. & ESTÉVEZ, M. P. (1989): β -1,4-Glucanase (cellulase) location in the symbionts of *Evernia prunastri*. - The Lichenologist 21(2): 147-151.
- YAGÜE, E. & ESTÉVEZ, M. P. (1990): Cellobiose induces extracellular β -1, 4-glucanase and β -glucosidase in the epiphytic lichen *Evernia prunastri*. - Plant Physiology and Biochemistry 28(2): 203-207.
- YAMAMOTO, Y., KINOSHITA, Y. & YOSHIMURA, I. (1998a): Difference of cell-viability and spore discharge capability between two lichen species, *Letharia columbiana* (Nutt.) Thoms. and *L. vulpina* (L.) Hue. - Plant Biotechnology 15(3): 131-133.
- YAMAMOTO, Y., MIZUGUCHI, R., TAKAYAMA, S. & YAMADA, Y. (1987): Effects of culture conditions on the growth of Usneaceae lichen tissue cultures. - Plant and Cell Physiology 28(8): 1421-1426.
- YAMAMOTO, Y., MIURA, Y., HIGUCHI, M., KINOSHITA, Y. & YOSHIMURA, I. (1993): Using lichen tissue cultures in modern biology. - The Bryologist 96(3): 384-393.
- YAMAMOTO, Y., KINOSHITA, Y., KUROKAWA, T., YOSHIMURA, I., AHMADJIAN, V. & YAMADA, Y. (1995): Cell growth and pigment production in suspension cultures of a mycobiont isolated from the lichen *Cladonia cristatella*. - Canadian Journal of Botany 73: 590-594.

- YAMAMOTO, Y., KINOSHITA, Y., TAKAHAGI, T., KROKEN, S., KUROKAWA, T. & YOSHIMURA, I. (1998b): Factors affecting discharge and germination of lichen ascospores. - *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 85: 267-278.
- YOKOYAMA, K. & OGOSHI, A. (1986): Studies on hyphal anastomosis of *Rhizoctonia solani*. IV. Observaton of imperfect fusion by light and electron microscopy. - *Transactions of the Mycological Society of Japan* 27: 399-413.
- YOSHIMURA, I., KUROKAWA, T., YAMAMOTO, Y. & KINOSHITA, Y. (1994): In vitro development of the lichen thallus of some species of *Peltigera*. - *Cryptogamic Botany* 4(3): 314-319.
- ZEHNDER, A. (1949): Über den Einfluß von Wuchsstoffen auf Flechtenbildner. - *Berichte der Schweizer Botanischen Gesellschaft* 59: 202-265.
- ZIMMER, D. (2000): Dauerbeobachtung der epiphytischen Flechtenvegetation unter emmissionsökologischen Aspekten an Boden-Dauerbeobachtungsflächen in Schleswig-Holstein. In: - *New Aspects in Cryptogamic Research, Contributions in Honour of Ludger Kappen*. Schroeter, B., Schlenzog, M. & Green, T.G.A. (eds). J. Cramer, Berlin, Stuttgart. *Bibliotheca Lichenologica* 75: 231-251.
- ZOOK, D.P. (1983): A study of the role of bacteria in lichens. M.A. Thesis. Clark University, Worcester, Massachusetts, USA.

ANHANG

I. Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
Bio	Biotin
CA	Cellulose-Aufschicht
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Erd-Extrakt
Glu	Glukose
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
Kin	Kinetin
MY	Malz-Hefe-Extrakt
NAA	1-Naphthalinessigsäure
PPFD	Photosynthetische Photonendichte ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)
REM	Rasterelektronenmikroskop
Rib	Ribitol
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
Thia	Thiamin
TOM	Trebouxia-Organic-Medium
Upm	Umdrehungen pro Minute

II. Tabellarische Auflistung der Kulturansätze mit den Flechten *Baeomyces rufus*, *Xanthoria parietina*, *Physcia tenella*, *Physconia distorta* und *Anaptychia ciliaris*

M+: Anzahl der Spoulationsbereiche, aus denen Mycelien hervorgegangen sind

präp.: Anzahl der präparierten Apothecien

spor.: Anzahl der Apothecien, die sporuliert haben

(): Anzahl der mit Schimmelpilzen kontaminierten Spoulationsbereiche, die nicht ausgewertet werden konnten

Die prozentual aufgeführten Spoulations- und Mycelbildungsraten der einzelnen Kulturansätze sind im Kap. 3.1.3.2 grafisch dargestellt (Abb. 18a-e).

1 *Baeomyces rufus*

1.1 Versuch vom 01.10.99 (Österreich, Fimbartal 28.09.99)

Medium	Anzahl der Apothecien		
	Cellulose 0.65 µm, schwarz		
	präp.	spor.	M+
MY	10	9	9
MY + NAA	10	10	10
MY + Rib 1.5 %	10	10	10
MY + Glu 1.5 %	10	10	10
MY + Rib + NAA	10	10	10
Σ	50	49	49
BG110	10	10	10
MBV	10	10	10
Σ	20	20	20

Sporulationsrate	69 von 70	= 98,5 %
Mycelbildungsrate (nährstoffreich)	49 von 49	= 100 %
<i>Absolut</i>	49 von 50	= 98 %
Mycelbildungsrate (nährstoffarm)	20 von 20	= 100 %
<i>Absolut</i>	20 von 20	= 100 %

2 *Xanthoria parietina*

2.1 Versuch vom 19.10.97 (Österreich, Fimbartal 15.10.97)

Medium	Anzahl der Apothecien		
	Durapore 0.65 µm		
	präp.	spor.	M +
MY	10	9	9
MY + NAA	10	8	8
MY + Rib 1.5 %	10	9	9
MY + Glu 1.5 %	10	10	10
MY + Kin	10	10	10
MY + NAA	10	10	10
Σ	60	56	56

Sporulationsrate 56 von 60 = 93,3 %

Mycelbildungsrate (nährstoffreich) 56 von 56 = 100 %

Absolut 56 von 60 = 93,3 %

2.2 Versuch vom 24.02.98 (Gerolstein 23.02.98)

Medium	Anzahl der Apothecien								
	Cellulose 0.45 µm			Cellulose 0.22 µm			Durapore 0.45 µm		
	präp.	spor.	M +	präp.	spor.	M +	präp.	spor.	M +
MY	24	23	14						
MY + NAA	9	7	5	9	9	9	3	3	2
MY + ABA	6	3 (3)	1	3	3	3	6	5	5
MY + Rib 1.5 %	12	12	11				6	4	2
MY + Glu 1.5 %	6	4	4				6	(6)	k.A.
MY + Bio	6	6	5						
MY + Thia	6	5	3						
MY + NAA + Kin	6	3 (3)	3	6	5	5	6	2 (3)	1
MY + Rib + NAA	6	5	5	6	3 (3)	3	6	4	3
MY + Rib + Kin	6	6	4						
Σ	87	74 (6)	55	24	20 (3)	20	33	18 (9)	13
BG110	6	5	5						
BG110 + Rib 1.5 %	6	5	5						
BG110 + Glu 1.5 %	6	5	5						
BG110 + Rib + NAA	6	6	6						
Σ	24	21	21						

Sporulationsrate 151 von 168 = 89,9 %

Mycelbildungsrate (nährstoffreich) 88 von 112 = 78,6 %

Absolut 88 von 144 = 61,1 %

Mycelbildungsrate (nährstoffarm) 21 von 21 = 100 %

Absolut 21 von 24 = 87,5 %

In 18 Streubereichen entwickelten sich Kontaminationen aus Schimmelpilzen, so daß keine weitere Auswertung möglich war.

2.3 Versuch vom 08.04.99 (Niederlande, Zeeland 05.04.99)

Medium	Anzahl der Apothecien					
	Cellulose 0.45 µm			Durapore 0.65 µm		
	präp.	spor.	M +	präp.	spor.	M +
MY	10	2	2	10	2	2
MY + NAA	10	(1)	k. A.	10	2	2
MY + Rib 1.5 %	10	1	1	10	1	1
MY + Rib 3.0 %	10	2	2	10	1	1
MY + Glu 1.5 %	10	1	1	10	2	2
MY + Glu 3.0 %	10	3	3	10	1	1
MY + Rib + Kin				10	1	1
Σ	60	9 (1)	9	70	10	10
BG110	10	4	4	10	2	2
BG110 + NAA	10	6	6	10	3	3
BG110 + Rib 1.5 %	10	2	2	10	2	2
BG110 + Rib 3.0 %	10	2	2	10	2	2
BG110 + Glu 1.5 %	10	5	5	10	3	3
BG110 + Glu 3.0 %	10	3	3	10	3	3
Σ	60	22	22	60	15	15

Sporulationsrate 57 von 250 = 22,8 %

Mycelbildungsrate (nährstoffreich) 19 von 19 = 100 %

Absolut 19 von 130 = 14,6 %

Mycelbildungsrate (nährstoffarm) 37 von 37 = 100 %

Absolut 37 von 120 = 30,8 %

2.4 Versuch vom 11.12.00 (Niederlande, Zeeland 09.12.00)

Medium	Anzahl der Apothecien					
	Cellulose 0.22 µm			Cellulose 0.45 µm		
	präp.	spor.	M +	präp.	spor.	M +
BG110	5	4	4	5	5	5
BG110 + Rib 0.05 %	5	5	5	5	3	3
BG110 + Rib 0.1 %	5	5	5	5	5	5
BG110 + Rib 0.2 %	5	5	5	5	4	4
BG110 + Rib 0.5 %	5	5	5	5	5	5
BG110 + Rib 0.8 %	5	4	4	5	4	4
BG110 + Glu 0.05 %	5	4	4	5	3	3
BG110 + Glu 0.1 %	5	5	5	5	2	2
BG110 + Glu 0.2 %	5	5	5	5	3	3
BG110 + Glu 0.5 %	5	4	4	5	3	3
BG110 + Glu 0.8 %	5	3	3	5	5	5
Σ	55	49	49	55	42	42

Sporulationsrate 91 von 110 = 82,7 %

Mycelbildungsrate (nährstoffarm) 91 von 91 = 100 %

Absolut 91 von 110 = 82,7 %

3 *Physcia tenella*

3.1 Versuch vom 14.07.98 (Niederlande, Schiermonnikoog 10.07.98)

Medium	Anzahl der Apothecien		
	Cellulose 0.45 µm		
	präp.	spor.	M+
MY	6	6	6
MY + NAA	3	3	3
MY + Rib 1.5 %	6	6	6
MY + Glu 1.5 %	6	6	6
MY + Rib + NAA	6	6	6
MY + Rib + Kin	6	6	6
MY + Bio	3	3	3
Σ	36	36	36
BG110	6	6	6
BG110 + Rib 1.5 %	6	6	6
BG110 + Glu 1.5 %	6	6	6
Σ	18	18	18

Sporulationsrate	54 von 54	= 100 %
Mycelbildungsrate (nährstoffreich)	36 von 36	= 100 %
<i>Absolut</i>	36 von 36	= 100 %
Mycelbildungsrate (nährstoffarm)	18 von 18	= 100 %
<i>Absolut</i>	18 von 18	= 100 %

3.2 Versuch vom 08.04.99 (Niederlande, Zeeland 05.04.99)

Medium	Anzahl der Apothecien					
	Cellulose 0.45 µm			Durapore 0.65 µm		
	präp.	spor.	M +	präp.	spor.	M +
MY	6	3	3	6	0	k. A.
MY + NAA	6	3	3	6	5	5
MY + Rib 1.5 %	6	5	5	6	2	2
MY + Rib 3.0 %	6	2	2	6	0	k. A.
MY + Glu 1.5 %	6	4	4	6	0	k. A.
MY + Glu 3.0 %	6	2	2	6	1	0
MY + Rib + Kin				6	3	3
Σ	36	19	19	42	11	10
BG110	6	4	4	6	2	2
BG110 + NAA	6	3	3	6	4	4
BG110 + Rib 1.5 %	6	4	4	6	3	3
BG110 + Rib 3.0 %	6	4	4	6	2	2
BG110 + Glu 1.5 %	6	4	4	6	1	1
BG110 + Glu 3.0 %	6	4	4	6	3	3
Σ	36	23	23	36	15	15

Sporulationsrate	68 von 150 = 45,3 %
Mycelbildungsrate (nährstoffreich)	29 von 30 = 96,6 %
<i>Absolut</i>	29 von 78 = 37,2 %
Mycelbildungsrate (nährstoffarm)	38 von 38 = 100 %
<i>Absolut</i>	38 von 72 = 52 %

3.3 Versuch vom 11.12.00 (Niederlande, Zeeland 09.12.00)

Medium	Anzahl der Apothecien					
	Cellulose 0.22 µm			Cellulose 0.45 µm		
	präp.	spor.	M +	präp.	spor.	M +
BG110	3	3	3	3	2	2
BG110 + Rib 0.05 %	3	3	3	3	3	3
BG110 + Rib 0.1 %	3	3	3	3	3	3
BG110 + Rib 0.2 %	4	3	3	4	2	2
BG110 + Rib 0.5 %	4	2	2	4	4	4
BG110 + Rib 0.8 %	4	3	3	4	4	4
BG110 + Glu 0.05 %	3	3	3	3	2	2
BG110 + Glu 0.1 %	3	3	3	3	3	3
BG110 + Glu 0.2 %	3	2	2	3	3	3
BG110 + Glu 0.5 %	3	1	1	3	2	2
BG110 + Glu 0.8 %	3	2	2	3	2	2
Σ	36	28	28	36	30	30

Sporulationsrate	58 von 72 = 80,5 %
Mycelbildungsrate (nährstoffarm)	58 von 58 = 100 %
<i>Absolut</i>	58 von 72 = 80,5 %

4 *Physconia distorta*

4.1 Versuch vom 04.03.98 (Schweden, Gotland 01.03.98)

Medium	Anzahl der Apothecien								
	Cellulose 0.45 µm			Cellulose 0.22 µm			Durapore 0.45 µm		
	präp.	spor.	M+	präp.	spor.	M+	präp.	spor.	M+
MY	35	31	26	10	10	10	10	7	7
MY + NAA	15	15	12	10	9	9	10	10	7
MY + Kin	10	7 (2)	0						
MY + ABA	6	5	5						
MY + Rib 1.5 %	12	5 (4)	0				10	(9)	k.A.
MY + Glu 1.5 %	12	10	10				10	9	9
MY + Bio	6	6	0						
MY + Thi	6	5	0						
MY + NAA + Kin	18	16	11	5	4	1	10	6	6
MY + Rib + NAA	5	5	0						
MY + Rib + Kin	10	7	1						
Σ	135	112 (6)	65	20	19	19	50	41	29
BG110	12	12	8						
BG110 + NAA	12	10	9						
BG110 + Kin	6	6	6						
BG110 + ABA	6	5	4						
BG110 + Rib 1.5 %							10	9	9
BG110 + Glu 1.5 %							10	8	8
BG110 + Rib+ NAA							15	13	13
Σ	36	33	27				35	30	30

Sporulationsrate	241	von 276 = 87,3 %
Mycelbildungsrate (nährstoffreich)	113	von 172 = 65,7 %
<i>Absolut</i>	113	von 205 = 55,1 %
Mycelbildungsrate (nährstoffarm)	57	von 63 = 90,5 %
<i>Absolut</i>	57	von 71 = 80,3 %

Es waren 6 Streubereiche mit Schimmelpilzen kontaminiert, so daß keine weitere Auswertung möglich war.

4.2 Versuch vom 07.05.99 (Schweden, Mullsjö 03.05.99)

Medium	Anzahl der Apothecien					
	Durapore 0.65 µm			Cellulose 0.45 µm		
	präp.	spor.	M+	präp.	spor.	M+
MY	10	5	1	10	10	0
MY + NAA	10	7	3	10	9	0
MY + Rib 1.5 %	10	7	5	10	10	4
MY + Rib 3.0 %	10	6	3	10	(6)	k.A.
MY + Glu 1.5 %	10	5	1	10	6	0
MY + Glu 3.0 %	10	6	5	10	8	3
MY + Bio	10	7	3	10	7	0
MY + Thia	10	7	2	10	9	2
Σ	80	50	23	80	59 (6)	9
BG110	10	6	6	10	10	10
BG110 + CA	10	8	8	10	9	9
BG110 + Rib 1.5 %	10	8	8	10	6	6
BG110 + Rib 3.0 %	10	9	9	10	8	8
BG110 + Glu 1.5 %	10	9	9	10	3	3
BG110 + Glu 3.0 %	10	8	8	10	9	8
BG110 + Bio	10	8	8	10	7	7
BG110 + Thia	10	6	6	10	8	8
Σ	80	62	62	80	60	59

Sporulationsrate	237	von 320 = 74,1 %
Mycelbildungsrate (nährstoffreich)	32	von 109 = 29,4 %
<i>Absolut</i>	32	von 160 = 20 %
Mycelbildungsrate (nährstoffarm)	121	von 122 = 99,2 %
<i>Absolut</i>	121	von 160 = 75,6 %

5 Anaptychia ciliaris**5.1 Versuch vom 20.10.97 (Schweden, Mullsjö 16.10.97)**

Medium	Anzahl der Apothecien		
	Durapore 0.65 µm		
	präp.	spor.	M +
MY	10	(6)	k.A.
MY + NAA	10	(8)	k.A.
MY + Rib 1.5 %	10	(6)	k.A.
MY + Glu 1.5 %	10	6	5
MY + Kin	10	(5)	k.A.
MY + NAA	10	(7)	k.A.
Σ	60	38	5

Sporulationsrate	38	von 60 = 63,3 %
Mycelbildungsrate (nährstoffreich)	5	von 6 = 83 %
<i>Absolut</i>	5	von 60 = 8,3 %

Auf allen Platten mit Ausnahme von MY + Glu 1.5 % haben sich innerhalb von wenigen Tagen andere Mikroorganismen (Bakterien, Schimmelpilze und Hefen) so stark entwickelt, daß die Platten verworfen werden mußten.

5.2 Versuch vom 04.03.98 (Schweden, Gotland 01.03.98)

Medium	Anzahl der Apothecien					
	Cellulose 0.45 µm			Durapore 0.45 µm		
	präp.	spor.	M +	präp.	spor.	M+
MY	24	22	7	9	9	3
MY + NAA	18	16	8	12	11	4
MY + Kin	6	6	3			
MY + ABA	6	6	3			
MY + Rib 1.5 %	9	8	1			
MY + Glu 1.5 %	6	5	1			
MY + Bio	6	3 (3)	3			
MY + Thia	6	4	1			
MY + NAA + Kin	15	14	6			
MY + Rib + NAA	9	9	4			
MY + Rib + Kin	6	6	0			
Σ	111	99 (3)	37	21	20	7
BG110	12	12	12			
BG110 + NAA	12	12	12			
BG110 + Kin	6	5	5			
BG110 + ABA	6	6	6			
BG110 + Rib 1.5 %				6	6	6
BG110 + Glu 1.5 %				3	3	3
BG110 + Rib + NAA				6	6	6
Σ	36	35	35	15	15	15

Sporulationsrate	172	von 183 = 94,5 %
Mycelbildungsrate (nährstoffreich)	44	von 119 = 37 %
<i>Absolut</i>	44	von 132 = 33,3 %
Mycelbildungsrate (nährstoffarm)	50	von 50 = 100 %
<i>Absolut</i>	50	von 51 = 98 %

Drei Streubereiche waren mit Schimmelpilzen kontaminiert, so daß keine weitere Auswertung möglich war.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgender Form veröffentlicht:

- ETGES, S. & OTT, S. (1998): Lichen bionts in culture - a testing system for morphogenetic influences. Poster presentation. - In: Abstracts from the Sixth International Mycological Congress (IMC6). Jerusalem, Israel: 117.
- ETGES, S. & OTT, S. (1999): Morphogenesis in species of *Physcia* and *Xanthoria*. Oral presentation. - In: Abstracts from the Sixteenth International Botanical Congress. St. Louis, USA: 70.
- ETGES, S., BAUER, R. & OTT, S. (2000): Growth patterns of lichen fungi in axenic culture. Poster presentation. - In: Abstracts from the Fourth IAL Symposium, Progress and Problems in Lichenology at the Turn of the Millennium. Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain: 38.
- ETGES, S. & OTT, S. (2001): Lichen mycobionts transplanted into the natural habitat. - *Symbiosis* 30: 191-206.

Erklärung:

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe.

Düsseldorf, November 2001

Sabine Etges

Zum Schluß folgt immer die Danksagung.....

... und was macht man, wenn man kurz vor der Abgabe steht (die verbleibende Zeit wie üblich knapp ist) und sich dennoch bei all den lieben Menschen bedanken möchte, die am Gelingen der Arbeit beteiligt waren?

Zuerst sieht man nach, was die anderen denn so geschrieben haben.

... und nach einiger Überlegung stellt man fest, wie schwer es ist, jeden einzelnen wirklich persönlich anzusprechen und nicht in die üblichen Formulierungen zu verfallen.

Deshalb sage ich an dieser Stelle nur ganz herzlich: „Dankeschön!“

Meinen Betreuern Sieglinde Ott und Martin Jahns und allen anderen, die mir in unterschiedlichster Weise geholfen und mich begleitet haben, mich in mühsamen Zeiten unterstützt und aufgemuntert haben, ein wenig für mich gesorgt haben und die mich nicht vergessen haben, auch wenn ich mich sehr rar gemacht habe:

Robert Bauer, Ulrike Ellersiek, Jean-Pierre de Véra, Gideon Fleminger, André Gaßmann, Margalith Galun, Werner Gelius-Dietrich, Anne Heller, Thomas Laatsch, Inge Latka, Thomas Lisowsky, Thorsten Lumbsch, Inecke Masselink, Jan-Eric Mattsson, Marion Nissen, Joachim Pirch, Eva Posthoff, Rüdiger Riehl, Judith Romeike, Uwe Santoré, Katja Schaffrath, Trudi Schaper, Petra Schieleit, Karl-Heinz Schimz, Günter Schuster, Mirjana Stankovic, Peter Thielen, Volker Walldorf, den anderen „Kandidaten“ und ehemaligen, an die ich mich gerne erinnere, meinen Freunden und meiner Familie.

Ein offizielles Dankeschön gilt der GIF (German-Israeli Foundation for Scientific Research and Development) für die Finanzierung des Projektes, in dessen Rahmen diese Dissertation entstand. Ein weiterer Dank für finanzielle Unterstützung geht auch an die FAZIT-Stiftung, die mir zwei Kongressreisen (Jerusalem 1998; St. Louis 1999) ermöglichte.