



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Lokalisierung von sekundären Metaboliten in Flechten“

verfasst von / submitted by

Lisa Fülöp

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2019 / Vienna, 2019

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 190 423 445

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Lehramtsstudium UF Chemie
UF Biologie und Umweltkunde

Betreut von / Supervisor:

A.o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Ingeborg Lang

Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei meinen Eltern und Großeltern bedanken, die mich sowohl finanziell als auch emotional durch mein gesamtes Studium begleitet haben, insbesondere bei meiner Mama, welche auch immer ein offenes Ohr für mich hatte, wenn mal nicht alles glatt lief.

Weiters möchte ich ein ganz großes Danke an meine Studienkollegen und -kolleginnen aussprechen, besonders an Melanie Schöffman. Ohne sie hätte ich wahrscheinlich einfach nie Lernunterlagen gehabt.

Ich möchte auch allen meinen Freunden danken und ganz besonders Nino, welche fast meine gesamte Studienzeit im gleichen Haus im zweiten Stock gewohnt hat. Dort konnte ich immer, wenn ich nach Hause kam, auf ein nettes Gespräch vorbeikommen, was mir jedes Mal, egal wie stressig die Lernphase gerade war, ein Lächeln ins Gesicht gezaubert hat.

Als nächstes möchte ich mich bei meiner Diplomarbeitsbetreuerin, Frau Mag. Dr. Ingeborg Lang, bedanken, da sie mich mit ihrer freundlichen und motivierenden Art tatkräftig unterstützt hat. Es war immer unkompliziert mit ihr in Kontakt zu treten und alle Probleme wurde sehr schnell behoben.

Einen weiteren Dank möchte ich dem gesamten Team der Core Facility Cell Imaging und Ultrastructure der Universität Wien aussprechen, im Besonderen Dr. Irene Lichtscheidl-Schulz, da sie mir die Geräte zur Verfügung stellte und Dr. Marieluise Weidinger, welche mich tatkräftig am Elektronenmikroskop unterstützt hat.

Am Schluss möchte ich mich noch bei Dr. Michal Goga bedanken, welcher mir sowohl die Flechten als auch die Liste der sekundären Metaboliten zur Verfügung stellte.

Zusammenfassung

Flechten werden schon seit langer Zeit von Menschen und Tieren verwendet. Dabei werden sie von Tieren meist als Nahrung genutzt, von den Menschen aber wurden schon früh die sekundären Metabolite verwendet. So wurden sie zum Färben von Stoffen verwendet, als Gift, zur Herstellung von Parfums und auch als Säure/Base Indikator. Heutzutage wird sehr viel Forschung in die sekundären Metabolite investiert, da sie in der Medizin Einzug gefunden haben. Früher wurden Flechten nach Signaturenlehre zu medizinischen Zwecken verwendet. Signaturenlehre bedeutet, dass Pflanzen oder Pflanzenteile, welche bestimmter menschlicher Organe optisch ähnlich, sind zur Heilung dieser Organe verwendet werden. Heutzutage werden spezielle Flechtensäuren extrahiert und finden als Antibiotika Einsatz, aber auch in der Krebsforschung. Da bisher nur der gesamte Flechtenkörper mit high performance liquid chromatography extrahiert wurde, hatte man bis dato wenig Vorstellung davon, wo sich im Flechtenkörper die sekundären Metabolite befinden.

In dieser Arbeit wird versucht die sekundären Metabolite Usninsäure, Fumarprotocetrarsäure, Stictinsäure, Norstictinsäure, Atranorin, Chloratranorin, Physodsäure und Gyrophorsäure in den Flechten *Lobaria pulmonaria*, *Pseudovernia furfuracea*, *Usnea dasypoga*, *Umbilicaria hirsuta*, *Cladonia foliacea*, *Cladonia furcata* und *Usnea antarctica* zu lokalisieren. Dies wurde durch Fluoreszenzmikroskopie, Lambdascans und Elektronenmikroskopie bewerkstelligt. Es wurden zuerst von jeder Flechte Querschnitte mit dem Schlittenmicrotom und per Hand angefertigt, welche dann im Fluoreszenzmikroskop mit unterschiedlichen Wellenlängen untersucht wurden. Anschließend wurden Lambdascans durchgeführt, welche die gleichen Ergebnisse zeigen sollten, nur genauer als die Fluoreszenzbilder. Diese Querschnitte wurden dann auch auf Stubs geklebt und mit Kohle bedampft, um sie unter dem Elektronenmikroskop mittels Elementaranalyse untersuchen zu können. Dabei wurde von jeder Flechte eine Elementzusammensetzung gemessen und eine Pointmap erstellt. Mit Hilfe all dieser Messungen wurde nun versucht im Flechtenthallus die sekundär Metabolite zu lokalisieren.

Da die meisten der Flechtensäuren nur aus Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff bestehen, konnte eine Lokalisierung bis auf eine Ausnahme mit den Pointmaps leider nicht bestimmt werden. Allerdings stellte sich heraus, dass man Rückschlüsse auf den

Boden, auf dem die Flechte gewachsen ist, durch diese Messmethode ermitteln kann. Die Lambdascans von Flechten mit gleichen Metaboliten wurden miteinander verglichen.

Abstract

Lichens are mostly used by animals as food, but humans also used the secondary metabolites early on. They used the lichen for dying fabrics, as poison, to produce perfumes and also as an acid/base indicator. Nowadays a great deal of research is invested in secondary metabolites as they have found their way into medicine. In the past, a lichen was used for medical purposes according to the theory of signatures. The theory of signatures says that plants or parts of plants that look like human organs are used to cure those organs. Nowadays, special lichen acids are extracted and used as antibiotics, but also in cancer research. Since only the entire lichen body has been extracted with high performance liquid chromatography up to now, there has been little understanding of where the secondary metabolites are located in the lichen body.

In this work the secondary metabolites usnic acid, fumarprotocetraric acid, stictic acid, norstictic acid, atranorin, chloratranorin physodic acid and gyrophoric acid were tried to be localised in the lichens *Lobaria pulmonaria*, *Pseudovernia furfuracea*, *Usnea dasypoga*, *Umbilicaria hirsuta*, *Cladonia foliacea*, *Cladonia furcata* and *Usnea antarctica*. This was realized with fluorescence microscopy, lambda scans and electron microscopy. At first, cross sections of every lichen were made by the sledge microtome and by hand. Those were irradiated with different wavelengths in the fluorescence microscope. After that lambda scans were performed, which should show the same results as the fluorescence images but more accurately. The cross sections were also fixed on stubs and coated with carbon for measurements in the electron microscope combined with X-ray microanalysis. With every lichen the elemental composition was measured and a pointmap was created. With the help of all these measurements, the secondary metabolites were tried to be localized in the lichen thallus.

Since most of the lichen secondary metabolites only consist of carbon, hydrogen and oxygen, it was not possible to locate them by the measurements of the electron microscope, apart from one exception. However, it turned out that the soil composition on which the lichen grew can be determined by this measuring method. The lambda scans of lichen with the same metabolites were compared. The lambda scans of lichen with the same metabolites were compared with each other.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINFÜHRUNG FLECHTEN.....	- 1 -
1.1. Symbiose	- 1 -
1.2. Mycobiont	- 3 -
1.3. Photobiont	- 4 -
1.3.1. Unterschied Grünalge und Cyanobakterium.....	- 4 -
1.3.2. Cyanobakterien.....	- 5 -
1.3.3. Grünalgen.....	- 5 -
1.4. Einteilung nach Wuchsformen.....	- 6 -
1.5. Aufbau	- 8 -
1.5.1. Homöomerer Thallus	- 8 -
1.5.2. Heteromerer Thallus	- 8 -
1.6. Vorkommen	- 9 -
1.7. Sekundäre Metabolite	- 10 -
1.7.1. Synthesewege	- 11 -
1.7.2. Usninsäure	- 12 -
1.7.3. Fumarprotocetrarsäure.....	- 13 -
1.7.4. Stictinsäure	- 13 -
1.7.5. Norstictinsäure.....	- 14 -
1.7.6. Atranorin.....	- 15 -
1.7.7. Chloratranorin	- 15 -
1.7.8. Physodsäure.....	- 15 -
1.7.9. Gyrophorsäure	- 16 -
2. ZIELE DER ARBEIT.....	- 17 -
3. MATERIALIEN UND METHODEN	- 18 -
3.1. Flechten.....	- 18 -
3.1.1. <i>Lobaria pulmonaria</i>	- 18 -
3.1.2. <i>Pseudovernia furfuracea</i>	- 20 -
3.1.3. <i>Usnea dasypoga</i>	- 20 -
3.1.4. <i>Umbilicaria hirsuta</i>	- 21 -
3.1.5. <i>Cladonia foliacea</i>	- 23 -
3.1.6. <i>Cladonia furcata</i>	- 23 -
3.1.7. <i>Usnea antarctica</i>	- 24 -
3.2. Schnitte herstellen	- 25 -
3.3. Mikroskopie	- 26 -
3.3.1. Präparatherstellung und Hellfeldmikroskopie	- 26 -
3.3.2. Fluoreszenzmikroskopie	- 26 -

3.3.2.1.	Mechanismus der Fluoreszenz	- 26 -
3.3.3.	Confocal Laser Scanning Mikroskop	- 28 -
3.3.4.	Elektronenmikroskopie	- 28 -
3.3.4.1.	Funktionsweise der EDX	- 28 -
3.3.4.2.	Probenvorbereitung	- 29 -
4.	ERGEBNISSE	- 31 -
4.1.	Ergebnisse der Lichtmikroskopie	- 31 -
4.1.1.	<i>Lobaria pulmonaria</i>	- 31 -
4.1.3.	<i>Usnea dasypoga</i>	- 34 -
4.1.4.	<i>Umbilicaria hirsuta</i>	- 36 -
4.1.5.	<i>Cladonia foliacea</i>	- 36 -
4.1.6.	<i>Cladonia furcata</i>	- 38 -
4.1.7.	<i>Usnea antarctica</i>	- 39 -
4.2.	Ergebnisse der Elementanalyse	- 41 -
4.2.1.	Kalium	- 41 -
4.2.2.	Silizium und Aluminium	- 42 -
4.2.3.	Kalzium	- 43 -
4.2.4.	Natrium	- 44 -
4.2.5.	Magnesium	- 45 -
4.2.6.	Chlor	- 46 -
4.2.7.	Zusammenfassung der Elementanalysen	- 47 -
4.3.	Ergebnisse Pointmaps	- 47 -
4.3.1.	<i>Lobaria pulmonaria</i>	- 47 -
4.3.2.	<i>Pseudovernia furfuracea</i>	- 48 -
4.3.3.	<i>Usnea dasypoga</i>	- 49 -
4.3.4.	<i>Usnea antarctica</i>	- 50 -
4.4.	Fluoreszenz und Lambdascan Ergebnisse	- 51 -
4.4.2.	<i>Pseudovernia furfuracea</i>	- 56 -
4.4.3.	<i>Usnea dasypoga</i>	- 58 -
4.4.4.	<i>Umbilicaria hirsuta</i>	- 60 -
4.4.5.	<i>Cladonia foliacea</i>	- 63 -
4.4.6.	<i>Cladonia furcata</i>	- 67 -
4.4.7.	<i>Usnea antarctica</i>	- 71 -
5.	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	- 76 -
5.1.	Usninsäure	- 76 -
5.2.	Fumarprotocetrarsäure	- 77 -
5.3.	Stictinsäure	- 78 -
5.4.	Atranorin und Chloratranorin	- 79 -
5.5.	Physodsäure	- 81 -

5.6.	Gyrophorsäure.....	- 81 -
5.7.	Silizium und Aluminium	- 82 -
5.8.	Lichtmikroskopische Bilder.....	- 82 -
6.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	- 84 -
7.	LITERATURVERZEICHNIS	- 86 -
8.	ANHANG ELEMENTANALYSE	- 89 -
	LOBARIA PULMONARIA	- 89 -
8.1.	Elementanalyse <i>Pseudovernia furfuracea</i>	- 90 -
8.2.	Elementanalyse <i>Usnea dasypoga</i>	- 90 -
8.3.	Elementanalyse <i>Umbilicaria hirsuta</i>	- 91 -
8.4.	Elementanalyse <i>Cladonia foliacea</i>	- 92 -
8.5.	Elementanalyse <i>Cladonia furcata</i>	- 92 -
8.6.	Elementanalyse <i>Usnea antarctica</i>	- 93 -

1. Einführung Flechten

Aus traditionellen Gründen werden die Flechten der Botanik zugeordnet, obwohl sie eigentlich keine Pflanzen sind (Büdel 2010). Sie gehören zu den Pilzen, sind aber keine einheitlichen Organismen (Wirth *et al.* 2013). Es gibt geschätzt 13.500 bis 17.000 Flechtenarten weltweit (Laursen und Seppelt 2010). Der größte Teil des Flechtenkörpers, welcher auch Thallus oder Lager genannt wird, wird vom Pilz gebildet. Der Pilz ist der sogenannte Mycobiont und komplett für das Aussehen der Flechte verantwortlich. Dieser lichenisierte Pilz hat einen oder mehrere photosyntheseaktive Symbiosepartner, die sogenannten Photobionten. Diese können Grünalgen oder Cyanobakterien sein. Die Biomassenverteilung liegt sehr stark auf der Seite des Pilzes, deswegen wird nur dieser bei der Benennung berücksichtigt. Der Großteil der lichenisierten Pilze sind Ascomyceten (zirka 98%); in mindestens 5 dieser Gruppen findet man lichenisierte Pilzarten. Die meisten Cyanobakterien gehören zu der Gattung *Nostoc*. Bei den Grünalgen sind mehrere Gattungen in Flechten vertreten. Zudem gibt es sogar Anzeichen für eine Coevolution zwischen Pilz und Grünalge in Flechten, zwischen Cyanobakterium und Pilz jedoch nicht (Büdel 2010).

1.1. Symbiose

Eine Symbiose ist ein enges Zusammenleben zwischen zwei unterschiedlichen Organismen (Hale 1977). Flechten sind der symbiotische Phänotyp der lichenisierten Pilze und einer Population von extrazellulär lebenden symbiotischen Cyanobakterien oder Grünalgen (Honegger 2009). Bei den Flechten hat sich also eine Symbiose zwischen einem Pilz und einem Photobionten entwickelt. Dies entstand bereits im Devon vor ungefähr 400 Millionen Jahren.

Durch die Symbiose von Mycobionten und Photobionten können Flechten nahezu alle Standorte besiedeln. Es hat sich gezeigt, dass Flechten gerade an nährstoffarmen, kühlen Standorten sehr gut gedeihen. Sie können nicht nur solche extremen Standorte bewohnen, sie können auch erstaunlich alt werden (Berg *et al.* 2016).

Ein Großteil der Flechten lebt in Symbiose mit einer Grünalge, ein weitaus weniger hoher Teil hat Cyanobakterien als Partner. Zudem ist auch ein Großteil der Flechten in einer Symbiose, bei der nur 2 Partner involviert sind. Jedoch haben zirka 4% der

Flechtenpilze zwei Photobionten als Partner. Diese Flechten haben sehr oft einen primären Photobionten, welcher die Photosynthese übernimmt, und einen sekundären, meist das Cyanobakterium, welches Stickstoff fixiert (Zachariah und Varghese 2018).

Flechten sind eine polyphyletische Gruppe. Sie sind taxonomisch divers, aber sie sind alle Ernährungsspezialisten, welche eine Symbiose mit einem Kohlenstoff fixierenden Partner eingehen. Der Mykobiont ist meist in Hinsicht der Biomasse der dominante Partner, der Flechtenthallus besteht nämlich zu 50-90% aus Pilz. Ein wichtiger Fakt ist auch, dass der Pilz im Gegensatz zu anderen parasitisch lebenden Pilzen seinen Partner nicht tötet, aber dennoch einen Einfluss auf den Wachstum haben kann (Honegger 2009).

Der erste Schritt in Richtung Symbiose ist, dass der Pilz an einer gallertartigen Hülle anheftet, die von der Alge gebildet wird. Anschließend werden mehrere Algen von Hyphen umspinnen und es bildet sich eine Thallusvorstufe. Diese Thallusvorstufen entstehen an unterschiedlichen Stellen und werden anschließend durch Hyphen miteinander verbunden. So bildet sich nach und nach ein zusammenhängender Flechtenthallus. In diesem Stadium werden viele unterschiedliche Photobionten von dem Mykobionten umspinnen. Es kann sogar vorkommen, dass Erdklumpen umspinnen werden. Erst in späteren Stadien wird ein Photobiont dominant und alle anderen sterben ab. Es kann während der Thallusbildung auch zu Kontakten zwischen den Mycobionten benachbart wachsender Flechten kommen (Peveling 1988).

Es gibt mittlerweile Studien, welche belegen, dass Flechten nicht nur aus Photobionten und Mycobionten bestehen, sondern sich auch weitere Prokaryoten und Eukaryoten einverleibt haben. So wurden nicht nur Viren, Bakterien, Cyanobakterien und Grünalgen in Flechten gefunden, sondern auch Diatomeen und sogar ein epiphytisches Lebermoos (Zachariah und Varghese 2018).

In der Symbiose wird der Stoffaustausch zwischen Pilz und Alge auf unterschiedliche Art und Weise gewährleistet. Eine Möglichkeit ist der einfache Wand zu Wand Kontakt. Dabei sind die Zellwände der Symbiosepartner sehr nah beieinander und der Stoffaustausch findet durch die Zellwände statt. Bei dieser Form kann es vorkommen, dass die Zellwände der Hyphen aus weniger Schichten bestehen als die in der Rinde oder der Marksicht der Flechte. Die zweite Möglichkeit ist, dass der Pilz ein

Haustorium ausbildet. Dieses Haustorium dringt nur in die Zellwand ein, zerstört diese allerdings nicht ganz. Diese Art des Kontaktes wird auch „intraparentale Haustorien“ genannt. Bei der dritten Kontaktmöglichkeit wird die Zellwand des Photobionten durchdrungen. Sie wird entweder enzymatisch aufgelöst oder durch mechanischen Druck durchdrungen. Diese Variante wird „intrazelluläre Haustorien“ genannt. Die Kontaktbildung zwischen den Partnern ist allerdings unterschiedlich je nach Flechte und zum Teil auch je nach Thallustyp. Es kommt durchaus auch vor, dass in einer Flechte unterschiedliche Kontakttypen auftreten (Peveling 1988).

1.2. Mycobiont

Ungefähr 98% der lichenisierten Pilze gehören zu den Ascomyceten (Büdel 2010). Allerdings gibt es auch lichenisierte Basidiomyceten und ganz selten *Fungi imperfecti* (Türk 2016). Insgesamt sind ungefähr 24% aller Pilze lichenisiert (Masuch 1993). Der Großteil des Flechtenkörpers wird von Pilzhypen gebildet. Diese bestimmen auch die Form des Thallus. Manche dieser lichenisierten Pilze können auch ohne ihren Photobionten wachsen und haben alleinstehend eine ganz andere Form als in Kombination (Laursen und Seppelt 2010). Pilze sind heterotrophe Eukaryonten, welche Glykogen, Mannit und Fette als Speicherstoffe verwenden (Masuch 1993). Sie haben eine Vielzahl an Ernährungsweisen entwickelt. Die lichenisierten Pilze sind wie auch Pflanzenpathogene und Mykorrhiza Pilze eine taxonomisch heterogene Gruppe, und Ernährungsspezialisten (Honegger 1996). Die Zellhyphen stehen zum Teil im Kontakt mit dem Photobionten. Dabei können die Hyphen unterschiedliche Durchmesser haben, je nachdem ob sie im Kontakt stehen oder nicht, jedoch ist das Lumen meist gleich groß. Der einzige Unterschied besteht also in der Dicke der Zellwand. Diese besteht wie bei allen Pilzen aus Chitin (Masuch 1993). Zytologisch gibt es keinen Unterschied zwischen lichenisierten und unlichenisierten Pilzen (Honegger 1996). Wenn man den lichenisierten Pilz einer Flechte ohne den Photobionten auf einer Agarplatte wachsen lässt, dann bildet er ähnliche Fruchtkörper aus wie nicht lichenisierte Pilze. Diese Kolonien wachsen nur langsamer und sind etwas kompakter (Mueller *et al.* 2008).

Phylogenetische Untersuchungen ergaben, dass es mehrere Male zur Lichenisierung bei Pilzen kam, diese allerdings auch öfter wieder verloren gegangen ist (Honegger 2009).

1.3. Photobiont

Ungefähr 85% der lichenisierten Ascomyceten gehen eine Symbiose mit einer Grünalge als Photobiont ein, zirka 10% mit Cyanobakterien und ungefähr 3% mit beiden. Es gibt zwar eine sehr hohe Anzahl an Flechtenpilzen, allerdings ist die Anzahl der Spezies, die als Photobionten dienen, sehr gering. Es wurden bisher nur 120 unterschiedliche Cyanobakterien und Grünalgen gefunden, welche am Aufbau eines Flechtenthallus beteiligt sind. Verglichen mit der hohen Zahl der flechtenbildenden Ascomyceten ist die Zahl der flechtenbildenden Photobionten daher sehr gering. Diese 120 Arten, welche an solchen Symbiosen beteiligt sind, wurden bis jetzt allerdings noch nicht auf Speziesniveau bestimmt. Alle Photobionten können in Sterilkultur gezogen werden und einige dieser Photobionten sind auch in nicht symbiotischer Form sehr weitverbreitet (Honegger 2009).

1.3.1. Unterschied Grünalge und Cyanobakterium

Cyanobakterien gehören zu den Prokaryonten und Grünalgen zu den Eukaryonten. Somit haben Cyanobakterien keine Chloroplasten, Mitochondrien und Zellkerne. Bei ihnen liegen die Tylakoide und Nucleinsäuren frei im Zytoplasma. Grünalgen sind Eukaryonten und haben aus diesem Grund Chloroplasten und Mitochondrien. Die Art der Metabolite einer Flechte hängt davon ab, welcher Photobiont involviert ist. Ist eine Grünalge involviert wird, von ihr als Kohlehydrat Zuckeralkohol gebildet, bei Cyanobakterien allerdings Glukose. Es gibt auch einen Unterschied bei der Photosynthese, so benötigt das Cyanobakterium eine wesentlich höhere Konzentration an Wasser beziehungsweise sogar Wasser in flüssiger Form. Bei der Grünalge reicht bereits Wasserdampf aus (Friedl und Bündel 1996).

1.3.2. Cyanobakterien

Cyanobakterien gehören zu den Prokaryonten. Sie kommen meistens fadenförmig oder in capsaler Form vor. *Nostoc* ist die Gattung, welche am häufigsten in den Flechtenthalli vorkommt. Zum Beginn der Erforschung der Photobionten wurden die Cyanobakterien aufgrund des Erscheinungsbilds in lichenisierter Form bestimmt. Jedoch kommen viele Kolonieformen nur in freilebender Form vor. Somit kann das Cyanobakterium nur durch Züchtung in Reinkultur zuverlässig bestimmt werden (Masuch 1993). Es kann auch die Zellgröße im lichenisierten Zustand und in freilebender Form unterschiedlich sein. Eine Vergrößerung des Cyanobakteriums im Flechtenkörper kann ein Zeichen für sehr engen Kontakt zwischen Photobiont und Mycobiont sein (Friedl und Bündel 1996). Cyanobakterien sind zwar Prokaryonten, jedoch ist der Photosyntheseweg der gleiche wie bei den grünen Pflanzen. Sie beinhalten Chlorophyll a und besitzen zwei nachgestellte Photosysteme (Masuch 1993). Allerdings haben die Cyanobakterien zusätzlich auch andere Photopigmente, welche in den Grünalgen nicht vorkommen, wie Phycocyanin (Ogashawara und Li 2019).

Cyanobakterien sind zwar resistent gegenüber Austrocknung, benötigen aber wie oben bereits angeführt meist flüssiges Wasser, um wieder aktiviert zu werden. Viele der Cyanobakterien gehen nur eine Symbiose mit einem speziellen flechtenbildenden Pilz ein. Allerdings hat die Gattung *Nostoc* viele unterschiedliche Pilzpartner und erschließt somit eine hohe Bandbreite an möglichen Standorten (Honegger 2009). Cyanobakterien welche Heterocysten bilden, haben eine höhere Heterocystenfrequenz im Flechtenthallus. Aus diesem Grund gibt es auch eine höhere Nitrogenaseaktivität und es kann mehr Luftstickstoff fixiert werden (Masuch 1993).

1.3.3. Grünalgen

Die meisten Grünalgen, welche in Flechtenthalli vorkommen, sind einzellige Algen. Es gibt jedoch, wenn auch selten, welche, die mehrzellig, scheibenförmig oder filamentös sind. Auch hier ist die Bestimmung der Gattung nicht so einfach, da vor allem filamentöse Algen in dem Flechtenkörper ihr Erscheinungsbild verändern und meist als Einzelzelle oder als kurze Kette vorliegen (Masuch 1993).

Im Thallus pflanzen sich die Grünalgen nur asexuell durch Sporulation fort. Um die Art der Grünalge bestimmen zu können, muss auch hier auf Nährmedium kultiviert werden, da die Photobionten nicht nur ihr Erscheinungsbild verändern, sondern auch die Chloroplastenmorphologie und einige Lebensstadien nur minimal oder überhaupt nicht vorhanden sind. Für viele Grünalgen ist die Symbiose fakultativ. Das zeigt sich dadurch, dass sie auch alleine vorkommen (Friedl und Bündel 1996).

Grünalgen haben die Fähigkeit schon mit Luftfeuchtigkeit Photosynthese zu betreiben. Deswegen sind bei Flechten, welche an extremen Standorten vorkommen, meistens Grünalgen die Photobionten (Honegger 2009).

1.4. Einteilung nach Wuchsformen

Flechten können unterschiedliche Wuchsformen haben. So gibt es 4 Hauptwuchsformen, welche rein aufgrund des unterschiedlichen Aussehens eingeteilt wurden. Diese Wuchsformen geben keinerlei Information über die Verwandtschaft der einzelnen Flechten, lassen aber Rückschlüsse zum bevorzugten Lebensraum der jeweiligen Art zu. Das ist ein Grund, warum diese frühe Einteilung heute noch benutzt wird. Flechten werden also in Krustenflechten, Blattflechten, Strauch oder Bartflechten und Gallertflechten eingeteilt (Masuch 1993).

Krustenflechten sind über die gesamte Thallusunterseite mit dem Untergrund fest verwachsen. Man kann sie nicht von dem Untergrund lösen, ohne die Flechte zu zerstören (Bündel und Scheidegger 1996). Sie haben meist einen sehr flachen Thallus und einen leicht anderen Schichtaufbau, da ihnen die untere Rinde fehlt und Rhizine von der Medulla mit dem Untergrund verwachsen sind. Das Fehlen der unteren Rinde lässt sich dadurch erklären, dass von unten kein Wasser verloren werden kann. Deswegen kommen diese Flechten auch an Stellen vor, wo durch die erhöhte Sonneneinstrahlung ansonsten zu viel Wasser verloren werden würde. Diese Wuchsform kommt oft auf nackten Stein oder auf Borken vor (Masuch 1993). Es gibt auch einige Krustenflechten, welche endolithisch oder in der Borke wachsen. Diese erkennt man häufig an Verfärbungen im Gestein oder an dem Durchbrechen des Fruchtkörpers durch die Borke. Um es der Flechte zu ermöglichen unter der Steinoberfläche zu wachsen, produzieren sie verschiedene Flechtensäuren, welche

den Stein auflösen können. Endolithische Flechten bilden zum Teil auch gar keine obere Rinde mehr aus (Türk 2016). Manche bilden einen sogenannten Prothallus. Dabei wird der Pilz zuerst ohne Photobiont verbreitet. Diese Prothalli sind meist an der unterschiedlichen Farbe zum restlichen Thallus zu erkennen (Bündel und Scheidegger 1996). Bei dieser Form der Flechten ist die Kontaktform der intrazellulären Haustorien verbreitet (Peveling 1988).

Blattflechten sind wie der Name schon sagt, blattförmig. Sie sind nur mit einem Teil der Unterseite mit dem Substrat verwachsen. Sie sind heteromer aufgebaut, und haben immer eine klar strukturierte Unter- und Oberseite (Bündel und Scheidegger 1996). Die Ränder der sogenannten Loben sind aufgerichtet. Die Verankerung am Substrat übernehmen Rhizinen oder Cilien. Im Gegensatz zur Krustenflechte kann die Blattflechte also auch von unten austrocknen. Aus diesem Grund gibt es eine anders strukturierte Unterseite. Die sogenannte untere Rindenschicht wird, wie der Großteil des Flechtenkörpers, von den Pilzhyphen gebildet (Masuch 1993). Die Oberseite ist durch die obere Rindenschicht abgegrenzt. Diese wird auch durch Pilzhyphen gebildet und direkt darunter liegt die Schicht, in der die Algen eingebettet sind, die sogenannte Algenschicht. Eine besondere Wachstumsform stellen die Nabelflechten dar. Diese sind nur mit einer Mittleren Haftscheibe am Substrat verankert (Türk 2016). Bei den Laubflechten besteht der Kontakt zwischen Myco- und Photobiont meist aus Wand zu Wand Kontakt (Peveling 1988).

Strauchflechten haben einen etwas unterschiedlichen Thallusbau als Blatt- und Krustenflechten. Sie sind nicht so großflächig und wachsen auch in die dritte Dimension. Bei den Strauchflechten halten sich die Algen direkt unter der Oberseite auf um die ganze Flechte herum. Deswegen kann man hier trotz eindeutigen Schichtbau keine eindeutige Ober- und Unterseite feststellen (Feige und Kremer 1979). Strauchflechten können sehr variabel in ihrer Länge sein, von einigen Zentimetern bis hin zu einigen Meter lang. Sie wachsen auch in unterschiedlichen Klimazonen. Von der Wüste bis hin zu Regenwäldern kommen sie auf allen möglichen Substraten vor (Bündel und Scheidegger 1996). Das Aussehen der Strauchflechten kann stark variieren. So wachsen sie zum Teil von der Erde in die Höhe und teilweise als sogenannte Bartflechten von Bäumen herunter. Das Isländisch Moos ist eine der bekanntesten Strauchflechten, da sie in der Medizin verwendet wird. Es ist eine Übergangsform zwischen Strauch- und Blattflechte. Die Ober- und Unterseite der

Loben ist zwar eindeutig zu unterscheiden, jedoch sind diese meist eingerollt und stehen aufrecht vom Substrat ab (Türk 2016).

Bartflechten haben meist einen drehrunden Thallus und gehören deswegen auch zu den Strauchflechten. Sie hängen meist von Bäumen, haben dort entweder eine Haftstelle oder liegen lose auf den Ästen. Diese Flechten sind sehr stark von der Umgebungsluftfeuchtigkeit abhängig, da sie Wasser meist nur über die Luft aufnehmen können (Masuch 1993).

Der Photobiont bei den Gallertflechten ist immer ein Cyanobakterium, meistens von der Gattung *Nostoc*. Sie sind meist schwarz oder braun gefärbt und haben einen homöomeren Thallusbau (Türk 2016). Im trockenen Zustand sind sie nur eine sehr dünne „Haut“. Erst durch Wasseraufnahme quillt der Thallus und die Flechte bekommt eine gallertartige Konsistenz. Im Gegensatz zu den anderen Flechten wird bei dieser Form die äußere Rinde von der Gallerte des Cyanobakteriums gebildet. In Gallertflechten ist auch der Kontakt zwischen Pilz und Alge nicht so eng; sie berühren sich kaum (Masuch 1993)

1.5. Aufbau

1.5.1. Homöomerer Thallus

Bei dieser Art von Thallus ist der Photobiont gleichmäßig im Mycobionten verteilt. Diese Art von Thallus wird oft bei Krustenflechten, Gallertflechten und bei Blattflechten gefunden. Die homöomeren Gallertflechten können sehr viel Wasser absorbieren, was den Transport von CO₂ sehr stark behindern und in extremen Fällen sogar ganz unterbrechen kann (Bündel und Scheidegger 1996).

Bei Gallertflechten ist der Photobiont dominant. Dabei wird der Thallus von Pilzhyphen durchzogen (Masuch 1993).

1.5.2. Heteromerer Thallus

Der Großteil der Flechten, auch einige Krustenflechten, haben einen heteromeren Thallus. Dieser weist eine klare Schichtung auf. Meistens sind diese Thalli eingeteilt in obere Rinde, Algenschicht, Medulla oder Markschicht und untere Rinde. Es gibt nur

ein paar wenige Formen, wo die Algenschicht die Oberfläche des Thallus erreicht. In Normalfall gibt es eine obere Rinde, aus welcher die Photobionten ausgeschlossen sind. Sie besteht aus einem dichten Geflecht aus Pilzhypen. Darunter liegen die Algenschicht und die Medulla. Die Medulla macht in den meisten Strauch und Blatflechten den Großteil des Thallusvolumens aus. Sie besteht aus locker verwobenen Hyphen mit sehr viel Lufträumen dazwischen. Im oberen Abschnitt der Medulla befindet sich die Algenschicht (Bündel und Scheidegger 1996), in dieser Algenschicht werden die Photobionten mal locker, mal fest von den Pilzhypen umspinnen. Im Vergleich zum Pilz wächst der Photobiont sehr schnell. Trotzdem befindet er sich nur ganz streng in der Algenschicht (Masuch 1993). Die Hyphen der Mark- und Algenschicht sind sehr oft überzogen von sekundären Metaboliten, welche die Hyphen hydrophob machen. Durch diese Hydrophobizität wird bewerkstelligt, dass auch bei feuchten Umständen der Gasaustausch gewährleistet ist.

Im Gegensatz zu der oberen Rindenschicht ist die untere Rindenschicht oft stark gefärbt und dafür zuständig das Wasser aufzunehmen (Bündel und Scheidegger 1996).

An der Thallusunterseite können auch sehr kompakte Hyphenstränge vorkommen. Diese dienen meist der Anheftung des Flechtenkörpers an das Substrat und werden Rhizine genannt. Diese haben ihren Ursprung entweder in der unteren Rinde oder im Mark (Masuch 1993).

1.6. Vorkommen

Man schätzt die Flechtenvielfalt mittlerweile auf ungefähr 25.000 Arten. Die meisten dieser Arten haben ein ganz spezifisches Verbreitungsgebiet. Flechten kommen in jeder Vegetationszone und an fast jedem Standpunkt vor. So findet man sogar Arten von der Antarktis bis hin zum tropischen Regenwald, und vom nackten Felsen wo sie keinen Schutz vor der Sonneneinstrahlung haben bis hin zu Standpunkten unter Felsvorsprüngen oder in Borkenritzen, wo sie nur schwer von der Sonnenstrahlung erreicht werden. Sie können also Lebensräume besiedeln die Samenpflanzen nicht besiedeln können, da diese keine Möglichkeiten zur Durchwurzelung haben und somit auch kein Wasser aufnehmen können. Die Flechten haben jedoch keine echten

Wurzeln und nehmen somit das Wasser nicht über die Wurzeln auf. Sie können Wasser über Regen, Tau, aber auch über die Luftfeuchtigkeit aufnehmen. Dabei saugt sich der Thallus wie ein Schwamm mit Wasser voll. Da die Flechte allerdings keine Strategie oder Vorrichtung hat, um das Austrocknen zu verhindern, ist sie voll und ganz auf die Wasserverfügbarkeit in der Umgebung angewiesen. Ist in der Umgebung zu wenig Wasser, trocknet die Flechte aus. Dies ist aber nicht gleichbedeutend damit, dass sie abgestorben ist; Flechten können den ausgetrockneten Zustand jahrelang überleben. In diesem trockenen Stadium kann allerdings keine Stoffwechselaktivität stattfinden, da das dafür wichtige Wasser fehlt. Es wird angenommen, dass dies auch der Grund ist, warum Flechten so langsam wachsen (Wirth *et al.* 2013).

1.7. Sekundäre Metabolite

Primäre Flechtenstoffe werden in der Photosynthese gebildet, dabei bilden Cyanobakterien Glukose und Grünalgen Zuckeralkohole (Masuch 1993). Es werden in Flechten allerdings auch sekundäre Flechtenstoffe gebildet, welche also nicht direkt am Grundstoffwechsel beteiligt sind (Follmann 1968). Zudem kommen die primären Metabolite intrazellulär und die sekundären extrazellulär vor (Elix 1996). Flechtenstoffe können von kleinsten Mengen bis hin zur Hälfte der Trockenmasse vorhanden sein. Sie können verschiedene Arten von Verbindungen sein und zeichnen sich durch ihre Wasserunlöslichkeit und Beständigkeit aus. Viele dieser sogenannten Flechtensäuren gehen verschiedene Farbreaktionen ein und sind teilweise nicht nur familien-, sondern artspezifisch, was dazu geführt hat, dass sie zur Bestimmung der Flechten herangezogen werden (Follmann 1968).

Flechtenstoffe werden auf unterschiedlichen Synthesewegen hergestellt und werden daher unterschiedlichen Stoffklassen zugeordnet. Unter physiologischen Bedingungen liegen die meisten allerdings als Kristalle vor. Zudem haben sie meistens die Eigenschaften von organischen Säuren. Die Metabolite werden sehr oft in der Rindenschicht und der Marksicht angelagert. Die Ablagerung der Flechtenstoffe auf den Hyphen der Marksicht machen diese schwer benetzbar mit Wasser, dies ist wichtig für den Gasaustausch (Türk 2016). Es gibt aber noch andere Aufgaben, welche die sekundären Metabolite übernehmen. Da Flechten langsam wachsen, sind einige als Antibiotikum wirksam. Manche, vor allem aromatische Verbindungen, schützen die

Flechte vor zu viel UV Licht. Es wurde auch nachgewiesen, dass manche Stoffe die Permeabilität des Photobionten erhöhen. Sie können zudem wirksam gegen Fressfeinde sein und eine Toxizität aufweisen. Es wird auch angenommen, dass Flechtenstoffe Komplexe mit Metallen eingehen und somit dem Flechtenthallus Mineralstoffe vom Substrat zur Verfügung stellen (Huneck 1999).

1.7.1. Synthesewege

Alle für Flechten charakteristische, sekundäre Metabolite werden vom Pilz gebildet. Außerdem kommt der Großteil der sekundären Metabolite nur bei Flechten vor, nur eine kleiner Teil auch bei freilebenden Pilzen oder höheren Pflanzen (Elix 1996).

Die Untersuchung der Synthesewege mit markierten Verbindungen hat sich bisher als schwierig erwiesen, da Flechten in Kultur sehr langsam wachsen und teilweise nicht die gesamte Bandbreite an Metabolite aufweisen, wie gleiche, freilebende Arten. Allerdings gab es in den letzten Jahren einige Verbesserungen bei der Kultivierung, welche sehr vielversprechend sind. Die Synthesewege der Metabolite sind nur theoretisch postuliert worden, aufgrund von analogen Produkten, welche in Pilzen vorkommen (Elix und Stocker-Wörgötter 2008). Flechtenstoffe können in vier Kategorien eingeteilt werden, aufgrund ihrer Biosynthese werden jedoch nur auf 3 Wegen sekundäre Metabolite gebildet. (Huneck 1999).

Die primären Metabolite werden von dem Photobionten hergestellt und dem Pilz in Form von Glucose oder Zuckeralkoholen zur Verfügung gestellt. Gehen diese Metabolite in den Pentose-Phosphat-Zyklus ein, können sie im Shikimisäure-Reaktionsweg zu Derivaten der Pulvinsäure (Abbildung 1) umgewandelt werden (Elix und Stocker-Wörgötter 2008).

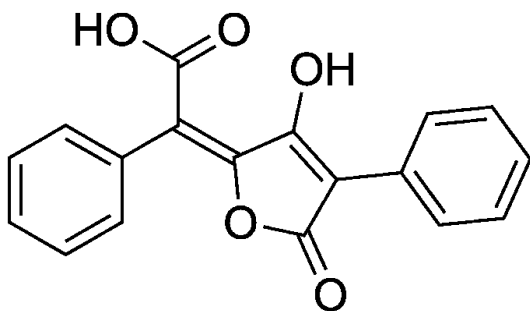


Abbildung 1. Pulvinsäure

Werden die Zucker in die Glykolyse eingespeist und Acetyl Coenzym A umgewandelt, können sie entweder in den Mevalonat-Reaktionsweg eingehen und Carotinoide oder Steroide bilden oder in den Acetyl-Polymalonat-Reaktionsweg verstoffwechselt werden (Elix und Stocker-Wörgötter 2008). Durch den zweiten Reaktionsweg werden aliphatische Fettsäuren, alicyclische und aromatische Verbindungen gebildet, welche die größte Gruppe an Flechtenstoffen ausmachen. Es werden auf diesem Weg Depside (Abbildung 2 a), Depsidone (Abbildung 2 b) und Dibenzofurane (Abbildung 2 c) gebildet, aber nur in symbiotischen Bedingungen (Masuch 1993).

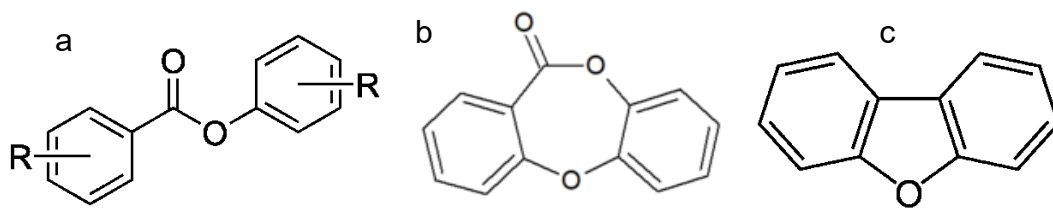


Abbildung 2. Grundgerüst von Depsiden(a), Depsidonen(b) und Dibenzofurane(c)

Diese Reaktionswege laufen auch in nicht lichenisierten Pilzen ab. Es werden in lichenisierten und in unlichenisierten Pilzen die gleichen Vorstufen gefunden. Im Flechtenthallus werden diese dann zum Teil verestert und zu den typischen Flechtensäuren umgewandelt (Masuch 1993).

1.7.2. Usninsäure

Usninsäure wurde das erste Mal 1844 isoliert und ist eine der am besten untersuchten Flechtensäuren. Die chemische Verbindung heißt 2,6-Diacetyl-7,9-dihydroxy-8,9b-dimethyl-1,3(2H,9bH)-dibenzofurandion und gehört zu der Gruppe der Dibenzofurane. Sie ist eine der Flechtensubstanzen, welche kommerziell erhältlich sind, da sie in der Medizin als Antibiotikum, in der Kosmetikindustrie und in der Parfumindustrie zum Einsatz kommt. Usninsäure ist ein gelbes Pigment, welches in zwei Enantiomeren vorkommt. Flechten, welche Usninsäure enthalten, sind früher als Medizin für Tuberkulose, als Schmerzstiller und als Fiebersenker eingesetzt worden. Und tatsächlich wurde herausgefunden, dass beide Enantiomere gegen Gram positive Bakterien und auch gegen Mykobakterien wirken (Ingólfssdóttir 2002).

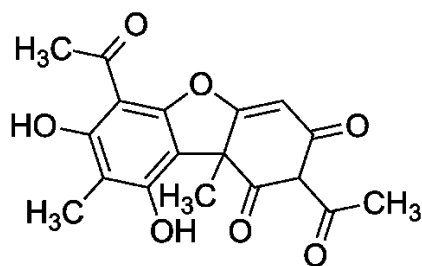


Abbildung 3. Usninsäure

1.7.3. Fumarprotocetrarsäure

Die Fumarprotocetrarsäure hat als Grundgerüst das Depsidon und wird somit auch über den Acetat-Polymalonat Reaktionsweg hergestellt. Dieser sekundäre Metabolit wird sehr häufig in hohen Mengen in Flechten gefunden, welche sehr resistent gegenüber saurer Luftverschmutzung sind. Außerdem kommen Flechten, die viel Fumarprotocetrarsäure enthalten, auf Substraten vor, welche einen niedrigeren pH-Wert haben, wie zum Beispiel in Nadelwäldern in Eurasien und Nordamerika. Außerdem wurde herausgefunden, dass jene Flechten auch eine höhere Toleranz gegenüber schwefelhaltige Lösungen haben (Hauck *et al.* 2009).

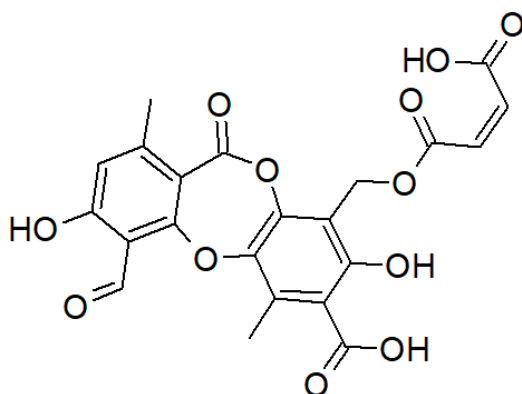


Abbildung 4. Fumarprotocetrarsäure

1.7.4. Stictinsäure

Stictinsäure gehört so wie Fumarprotocetrarsäure zu den Depsidonen. Sie ist nur etwas anders derivatisiert (Masuch 1993). Die Kristalle der Stictinsäure sind leicht gelbe, nadelförmige Kristalle (Zopf 2012). Stictinsäure hat eine antioxidative Wirkung

und es wird mit ihr auch in der Krebsforschung experimentiert (Lohézic-Le Dévéhat *et al.* 2007).

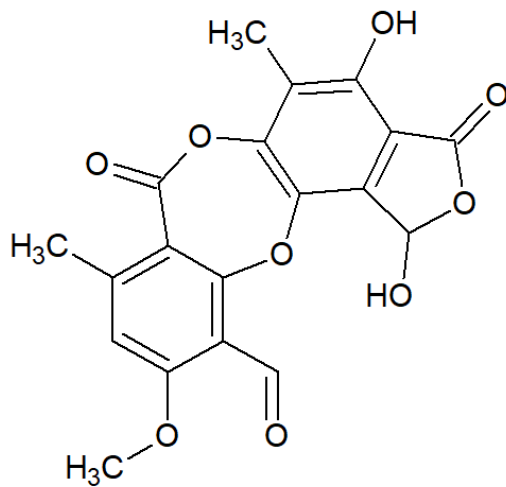


Abbildung 5. Stictinsäure

1.7.5. Norstictinsäure

Norstictinsäure gehört auch zu den Depsidonen und hat im Gegensatz zur Stictinsäure eine Alkohol-Gruppe anstatt einer Ethergruppe (Masuch 1993). Bei Flechten die auf kupferreichen Böden wachsen, wird ein Kupferkomplex mit Norstictinsäure gebildet (Purvis *et al.* 1987). Außerdem wurde in einer Studie mit Mäusen herausgefunden, dass diese Flechtensäure die Proliferation, Migration und das Eindringen von Brustkrebstumorzellen in gesundes Gewebe verhindert (Ebrahim *et al.* 2016).

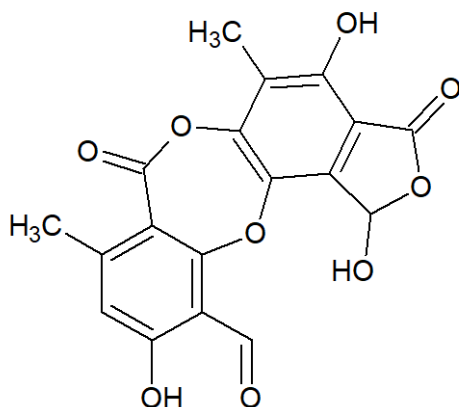


Abbildung 6. Norstictinsäure

1.7.6. Atranorin

Atranorin hat das Grundgerüst eines Depsides (Masuch 1993). Dieser sekundäre Metabolit wird in Flechten gefunden, selten aber auch im Moosen und höheren Pflanzen. Die Substanz wurde von Hesse (1898) zum ersten Mal isoliert und seitdem wurde die biologische und pharmazeutische Aktivität stark untersucht. Durch diese Studien wurde herausgefunden, dass Atranorin nicht nur eine antibiotische Wirkung hat, sondern auch gegen Pilze, Viren und Protozoen wirkt. Außerdem wurde eine antioxidative und eine photoprotective Wirkung gefunden (Studzinska-Sroka *et al.* 2017).

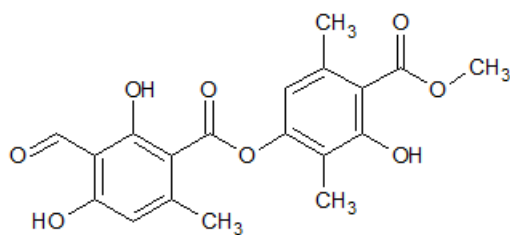


Abbildung 7. Atranorin

1.7.7. Chloratranorin

Chloratranorin gehört auch zu den Depsiden und besitzt die gleiche Struktur wie Atranorin allerdings mit einem zusätzlichen Chloratom (Masuch 1993).

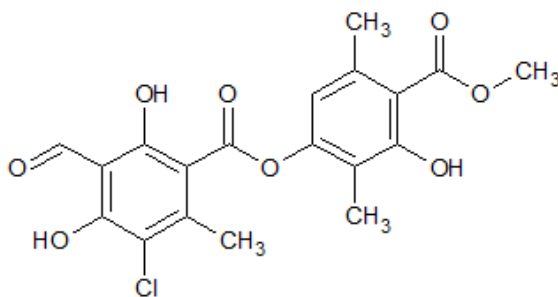


Abbildung 8. Chloratranorin

1.7.8. Physodsäure

Gehört zu den Flechten Substanzen, welche als Grundgerüst das Depsidon haben (Masuch 1993). So wie viele andere sekundäre Metabolite, hat auch Physodsäure eine zytotoxische Wirkung. Diese Zytotoxizität gilt interessanterweise nur für Tumorzellen (Cardile *et al.* 2017).

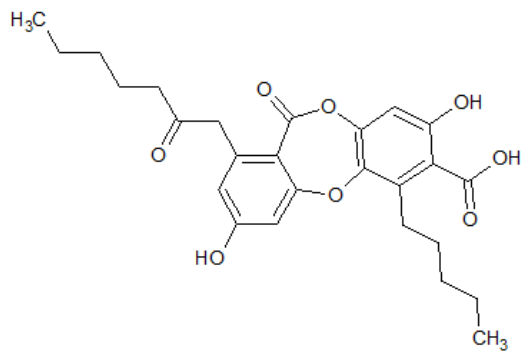


Abbildung 9. Physodsäure

1.7.9. Gyrophorsäure

Gehört zu den Flechtensäuren, welche als Grundgerüst Depside haben (Masuch 1993). Außerdem wurde herausgefunden, dass Gyrophorsäure eine antibakterielle und fungizide Wirkung hat (Bhattacharyya *et al.* 2016).

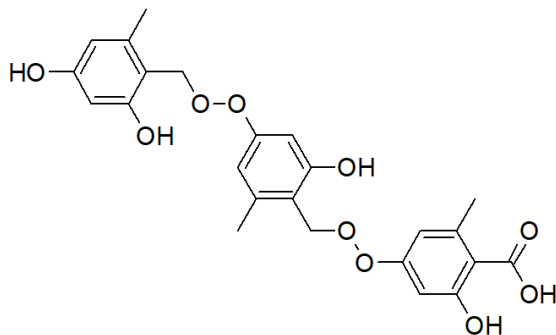


Abbildung 10. Gyrophorsäure

2. Ziele der Arbeit

Bisher wurden Flechtenstoffe, durch Extraktion des gesamten Flechtenthallus gewonnen. Ziel dieser Arbeit ist es, die Flechtensäuren im Thallus zu lokalisieren und dadurch Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion zuzuweisen. Die Lokalisierung erfolgte mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie und Emissionsanalyse (Lambda-scans) von Flechtenquerschnitten. Anschließend wurde mit der Röntgen-Mikroelementanalyse die Elementarzusammensetzung gemessen, um Gegenionen oder ein Komplexionen zu finden, mit welchen die unterschiedlichen Flechtensäuren eventuell Komplexe eingehen könnten.

3. Materialien und Methoden

3.1. Flechten

Die Flechten wurden von Herr Dr. Michal Goga (Pavol Jozef Šafárik University in Košice Slovakei) zur Untersuchung zur Verfügung gestellt. Und mit einem Nikon SMZ 1500 Stereo Mikroskop mit der Kamera Nikon DS-Ri2 aufgenommen.

3.1.1. *Lobaria pulmonaria*

Lobaria pulmonaria wird auch Lungenflechte genannt. Diese Flechte ist sehr anfällig auf Luftverschmutzung und benötigt einen feuchten Lebensraum. Sie kann ein sehr großes Lager ausbilden, dessen Durchmesser eine Größe von 30 cm erreichen kann. Die „Blätter“, welche in diesem Fall Loben genannt werden, sind im feuchten Zustand leuchtend grün und im trockenen Zustand graugrün, die Unterseite ist meist gelbbraun (Abbildung 11 und Abbildung 12) (Türk 2016).

L. pulmonaria kann auch sogenannte Cephalodien mit *Nostoc* ausbilden, das ist ein abgegrenzter Bereich im Flechtenthallus, wo ein zusätzliches Cyanobakterium eingeschlossen ist. Die Lungenflechte wurde auch in großen Mengen gesammelt und als Heilmittel für Lungenkrankheiten, zum Bräunen von Leder und auch als Alternative zu Hopfen beim Bierbrauen (Dobson 2011).



Abbildung 11. Oberseite der Flechte *Lobaria pulmonaria*.



Abbildung 12. Unterseite der Flechte *Lobaria pulmonaria*.

3.1.2. *Pseudovernia furfuracea*

Pseudovernia furfuracea oder auch Gabelflechte (Abbildung 13) ist je nach Alter entweder eine Strauchflechte oder eine Blattflechte. In jungen Jahren ist sie den Blattflechten zuzuordnen, wird aber im Alter immer länglicher und dichotom verzweigt. Sie kommt auf sauren Borken und sauren Böden vor. Je nachdem wie windexponiert sie wächst, ist die Dicke des Thallus unterschiedlich. Bei starker Windexposition ist der Thallus etwas dicker als bei einer schwachen. Wenn der Thallus dicker ist, kann auch mehr Wasser gespeichert werden und somit länger Photosynthese betrieben werden (Türk 2016).

Die Gabelflechte wurde früher zum Stoppen von Blutungen verwendet, aber auch als Färbemittel und bei den alten Ägyptern als Mumifizierungsmittel (Dobson 2011).



Abbildung 13. Die Flechte *Pseudovernia furfuracea*.

3.1.3. *Usnea dasypoga*

Der Thallus der Flechte *Usnea dasypoga* (Abbildung 14) kann grau-grün oder gelblich sein. Sie hat ein hängendes Erscheinungsbild und kann bis zu 30 cm lang werden. Dabei besteht der Thallus nur aus ein paar langen Hauptachsen und der Rest sind

kurze meist rechtwinklig auseinander gehende Nebenachsen, welche nur ungefähr einen Centimeter lang werden. Sie kommt häufig in Hochladwäldern vor, besonders auf Birken oder Koniferen (Dobson 2011).



Abbildung 14. Die Flechte *Usnea dasypoga*.

3.1.4. *Umbilicaria hirsuta*

Umbilicaria hirsuta (Abbildung 15 und Abbildung 16) meistens nur einen Lobus, welcher die Ränder nach unten eingerollt hat und oft leicht eingerissen ist. Sie ist schwach bis dunkel grau oder bräunlich und der Thallus hat viele Rhizine. Diese Flechte wächst meist auf Silikatgestein in feuchten Gebieten (Dobson 2011).



Abbildung 15. Oberseite der Flechte *Umbilicaria hirsuta*.



Abbildung 16. Unterseite der Flechte *Umbilicaria hirsuta*.

3.1.5. *Cladonia foliacea*

Cladonia foliacea (Abbildung 17) hat einen gelb grünen Thallus, welcher tief eingeschnitten ist und eingerollte Ränder hat, die Unterseite ist gelblich. Diese Flechte kommt auf sandigen und sehr sonnenexponierten Standorten vor. *C. foliacea* liebt trockene und kommt exponiert auf Grasflächen vor (Dobson 2011).



Abbildung 17. Die Flechte *Cladonia foliacea*.

3.1.6. *Cladonia furcata*

Die Flechte *Cladonia furcata* (Abbildung 18) kann viele unterschiedliche Erscheinungsformen haben. Sie kann eine büschelige Matte formen, welche braun-grau oder olivgrün, manchmal mit einem violetten Stich, sein kann. Sie kommt meist auf sauren Heiden und am Waldboden vor (Dobson 2011).



Abbildung 18. Die Flechte *Cladonia furcata*.

3.1.7. *Usnea antarctica*

Wie der Name schon sagt, kommt diese *Usnea antarctica* (Abbildung 19) in meeresnahen, antarktischen Gegenden vor (Bokhorst *et al.* 2016).



Abbildung 19. Die Flechte *Usnea antarctica*.

3.2. Schnitte herstellen

Um die einzelnen Schichten des Flechtenkörpers analysieren zu können, müssen von den Flechten zuerst Querschnitte gewonnen werden. Diese wurden mithilfe des Schlittenmikrotoms oder einer Rasierklinge erhalten, die trockenen spröden Flechtenthalli wurden zuerst mit feuchtem Papier befeuchtet. Anschließend wurden die Thalli der Flechten *Umbilicaria hirsuta*, *Cladonia foliacea* und *Pseudovernia furcata* mit der Rasierklinge in dünne Querschnitte geschnitten.

Um mit einem Schlittenmikrotom Schnitte anfertigen zu können, wurde ein scharfes Messer an einem beweglichen Schlitten fixiert. In Abbildung 20 ist dieser Schlitten mit a markiert. Der Probenhalter des Mikrotoms ist mit b gekennzeichnet. Hier wird der Styroporblock eingeklemmt, in welchem sich einer der gut befeuchteten Thalli der anderen Flechten befindet. Um nun Schnitte anzufertigen, wird der Schlitten nach hinten durchgedrückt so oft bis die gewünschte Dicke erreicht ist. Jetzt wird der Schlitten nach vorne gezogen, um einen Schnitt der Flechte zu erhalten (Friedelsheimer *et al.* 2015).

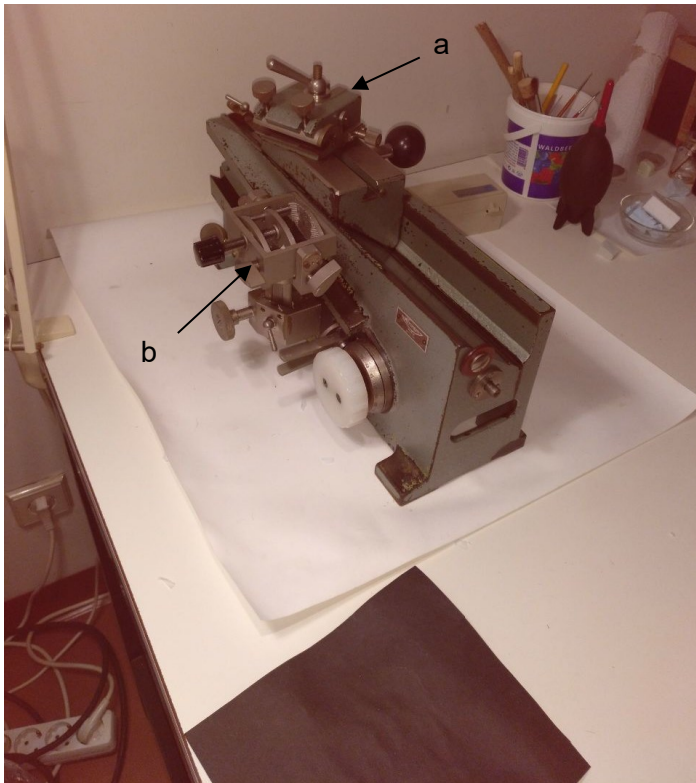


Abbildung 20 Schlittenmikrotom, Schlitten in dem die Klinge montiert ist (a) und die Probenhalterung (b).

3.3. Mikroskopie

3.3.1. Präparatherstellung und Hellfeldmikroskopie

Um Bilder, Fluoreszenz Messungen und Lambdascans machen zu können, mussten die Schnitte auf einen Objektträger überführt werden und unter Zugabe eines Tropfen Wassers mit einem Deckglas abgedeckt werden. Bei der Messung von Lambdascans wurde das Deckglas wasserdicht mit flüssiger Vaseline abgedichtet.

Diese Querschnitte wurden dann mit einem Lichtmikroskop (Nikon Eclipse Ni) unter den Objektiven (4x (numerisch Aperatur:0,13); 10x (numerisch Aperatur:0,45); 20x (numerisch Aperatur:0,75), 40x (numerisch Aperatur:0,75)) mit Fotos im Hellfeld und Fluoreszenzmodus dokumentiert (Nikon DS-Ri2). Es wurde die Funktion des Realtime EDF (extended depth of focus) verwendet, um eine größere Tiefenschärfe zu erzielen.

3.3.2. Fluoreszenzmikroskopie

3.3.2.1. Mechanismus der Fluoreszenz

In Abbildung 21 sind Grundzustand (G) und angeregter Zustand (A) einer fluoreszierenden Substanz mit seinen Unterzuständen dargestellt. Bei

Raumtemperatur liegen normalerweise alle Elektronen im untersten Grundzustand. Wird nun das Molekül mit Photonen der richtigen Energie beschossen, so erhebt sich das Elektron von dem Grundzustand in den angeregten Zustand. Dies ist in Abbildung 21 mit dem blauen Pfeil markiert. Es wird sofort ein kleiner Teil der Energie als Wärme abgegeben, und das Elektron fällt auf den untersten Unterzustand des angeregten Zustands zurück, dies ist gekennzeichnet durch den grauen Pfeil (Borlinghaus 2016). Nach einigen 10-100 ns kommt es zur Emission. Die Emission ist in der Abbildung 21 mit einem grünen, gelben oder roten Pfeil markiert. Bei der Emission wird etwas weniger Energie frei wie zuvor absorbiert wurde. Dadurch wird ein länger welliges Licht ausgesendet, welches eine geringere Energie hat. Diese Verschiebung wird als Stokes' Shift bezeichnet (Mulisch 2015).

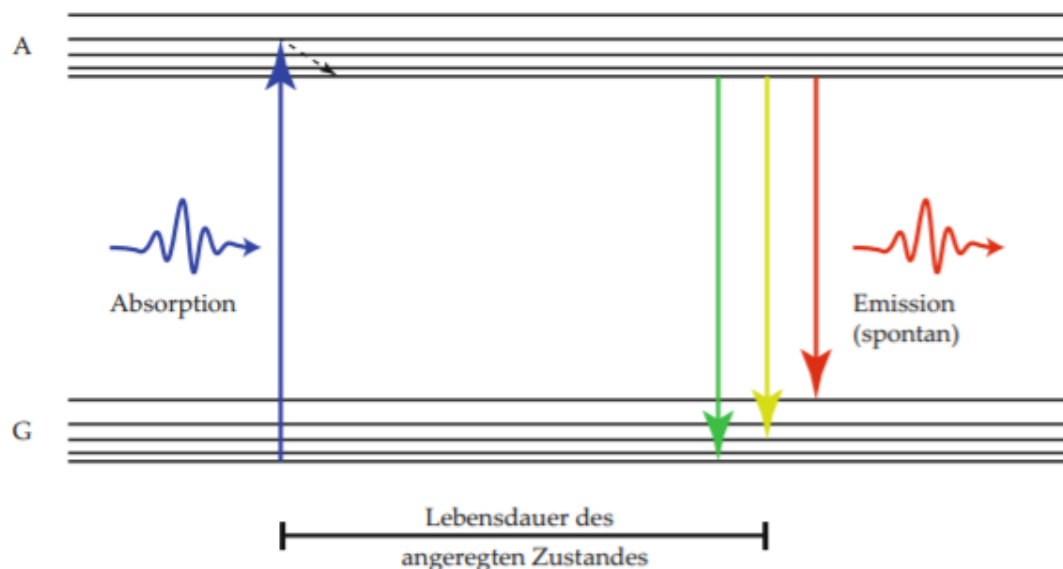


Abbildung 21 Jablonski-Schema für Fluoreszenz. Mit G ist der Grundzustand und seine Unterzustände beschriftet. A ist der Angeregtezustand und seine Unterzustände der blaue Pfeil steht für die Absorption eines Lichtquantes von einem Elektron. Der strichlierte Pfeil für den Verlust von Energie durch Wärmeverlust. Der grüne, gelbe und rote Pfeil beschreibt nun die Emission von Licht wenn das Elektron wieder auf einen der Grundzustände zurück fällt (Borlinghaus 2016).

Um nun sekundäre Metabolite im Flechtenkörper nachzuweisen, wurden die Flechtenquerschnitte mit verschiedenen Wellenlängen bestrahlt, um unterschiedliche fluoreszenzaktive Teile der Flechtenstoffe anzuregen. Dazu wurden verschiedene Filterblöcke verwendet. Für die Bestrahlung mit UV-Licht wurde der UV-1A (Nikon) verwendet, welcher mit einer Wellenlänge zwischen 360nm und 370nm bestrahlt. Dieser Filterblock beinhaltet einen Langpassfilter, welcher eine Wellenlänge ab 390nm passieren lässt. Der blaue Filterblock B-2A (Nikon), bestrahlt zwischen 450nm und 490nm und enthält auch einen Langpassfilter. Dieser lässt Emissionen ab der Wellenlänge von 460nm durch. Zur Bestrahlung mit grünem Licht wurde der Filterblock

G-2A (Nikon) mit einer Bestrahlungswellenlänge von 510nm bis 560nm verwendet, auch dieser Block enthält einen Langpassfilter, welcher Wellenlängen ab 580nm passieren lässt. Die Langpassfilter erlauben eine subjektive Farbwahrnehmung mit freiem Auge und dadurch eine Schätzung der Wellenlänge zu.

3.3.3. Confocal Laser Scanning Mikroskop

Die Proben wurden nun auch im Konfokal Mikroskop (Leica TCS SP₅ DM-6000 CS (CLSM 2)) untersucht. Hierbei war die gewählte Methode die Lambda- Abtastung oder Lambdascan. Die Proben wurden mit Licht verschiedener Wellenlängen bestrahlt und anschließend die Wellenlängen der emittierten Photonen aus der Probe in gewissen Abständen bestimmt. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Abstand der Detektion ca 10nm war. So kam man auf einen Detektionsabstand von 11nm bei der Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 405nm, auf einen Abstand von 9nm bei der Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 476nm und 8nm war der Abstand bei der Bestrahlung mit Grünlicht mit einer Wellenlänge von 514nm. In Abbildung 22 sieht man die emittierten Photonen einer Wellenlänge zugeordnet. Diese Methode wurde gewählt, da hierbei geringe Photonenmengen gemessen wurden und Photomultiplier sensitiver als das menschliche Auge einen Farb- beziehungsweise Wellenlängenbereich der Emission zeigt. Die Ergebnisse der konventionellen Fluoreszenzemission konnte dadurch überprüft werden.

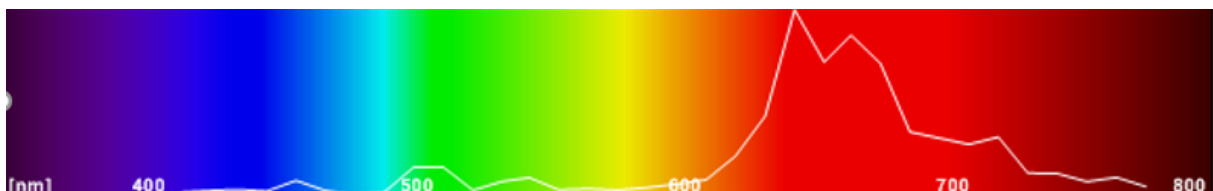


Abbildung 22 Lambda- Abtastung über ein Spektrum gelegt.

3.3.4. Elektronenmikroskopie

3.3.4.1. Funktionsweise der EDX

EDX steht für energiedispersive Röntgenspektroskopie. Dabei wird durch eine Kathode ein Elektronenstrahl generiert. Dieser wird dann durch diverse Elektronenlinsen fokussiert und trifft dann auf die Probe. Die Elektronen haben die Fähigkeit mit der Probe auf verschiedene Art und Weisen wechselzuwirken.

Die wichtige Wechselwirkung für diese Methode ist die elementspezifische Röntgenfluoreszenz (Plattner und Zingsheim 1987).

Damit Röntgenfluoreszenz stattfinden kann, muss analog zur normalen Fluoreszenz Energie in das System gebracht werden. Diese kann eingebracht werden durch höher energetische Röntgenstrahlung oder durch Bestrahlung mit Elektronen. Im Fall der Elektronenmikroskopie sind die Elektronen die Energiequelle. Dabei wird durch Auftreffen der Elektronen ein kernnahes Elektron in ein höheres, unbesetztes Energieniveau angehoben. Beim Wiedezurückfallen dieses Elektrons in das kernnahe Energieniveau wird eine Röntgenquant ausgestrahlt, welches genau den Unterschied der zwei Energieniveaus als Energie besitzt (Demtröder 2010).

Die einzelnen Energieniveaus haben elementspezifische Energien, dadurch können die Energiedifferenzen berechnet werden und somit durch die Messung der Wellenlänge der Röntgenquants das Element bestimmt werden (Australian Microscopy and Microanalysis 2014).

3.3.4.2. Probenvorbereitung

Die elementare Zusammensetzung innerhalb der Flechtenschichten wurde mithilfe der im Elektronenmikroskop durchgeführten energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) Messung ermittelt. Dazu wurden sogenannte Stubs, mit Kohlefolie beklebt und mit den Querschnitten bestückt (Abbildung 23). Unter dem Stereomikroskop wurde die Schnittseitenlage und Vollständigkeit kontrolliert.



Abbildung 23 Stubs beklebt mit Kohlefolie und Flechten Querschnitten für die Elektronenmikroskopie.

Um Proben unter dem Elektronenmikroskop sichtbar zu machen und die Elementarzusammensetzung messen zu können, mussten die Proben mit Kohle bedampft werden. Dazu wurden die Stubs zuerst getrocknet und anschließend mit einem Kohlefaden bedampft (Leica EM MED020). Dazu wurde der Kohlefaden durch eine hohe Spannung zuerst zum Glühen und dann zum Verdampfen gebracht. Nachdem dieser Schritt durchgeführt wurde, konnten die Proben in das Rasterelektronenmikroskop (JEOL IT 300) eingeschleust werden. Von jeder Flechte

wurde vom ganzen Querschnitt und jeder einzelnen Schicht sowohl eine Elementanalyse als auch eine sogenannte Pointmap erstellt, bei welcher die Elemente mit verschiedenfarbigen Punkten auf dem Flechtenthallus dargestellt wurden.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der Lichtmikroskopie

Mittels der Lichtmikroskopie wurden die Querschnitte der einzelnen Flechten mit Fotos dokumentiert und anschließend beschrieben.

4.1.1. *Lobaria pulmonaria*

In Abbildung 24 und Abbildung 25 sind lichtmikroskopische Bilder der Blattflechte *Lobaria pulmonaria* zu sehen. Bei beiden ist die heteromere Schichtung sehr gut zu erkennen. Dabei ist der Thallus gegliedert in eine obere Rindenschicht, gefolgt von der grüngefärbten Algenschicht. Hier findet die meiste Photosynthese statt. Auf die Algenschicht folgt die lockere Medulla. In Abbildung 25 ist gut zu erkennen, dass hier nur ein lockeres Hyphengeflecht vorliegt. Und am unteren Rand sieht man noch die untere Rindenschicht. Hier sind auch sogenannte Rhizine zu erkennen, welche wichtig für die Haftung am Untergrund ist.

In Abbildung 25 ist außerdem ein großer Algeneinschluss zu erkennen. Durch diesen Einschluss bekommt der lichenisierte Pilz zusätzliche Photosyntheseprodukte. Dieser Einschluss wird auch Cephalodium genannt und wird wahrscheinlich durch das Inkorporieren von *Nostoc* gebildet.

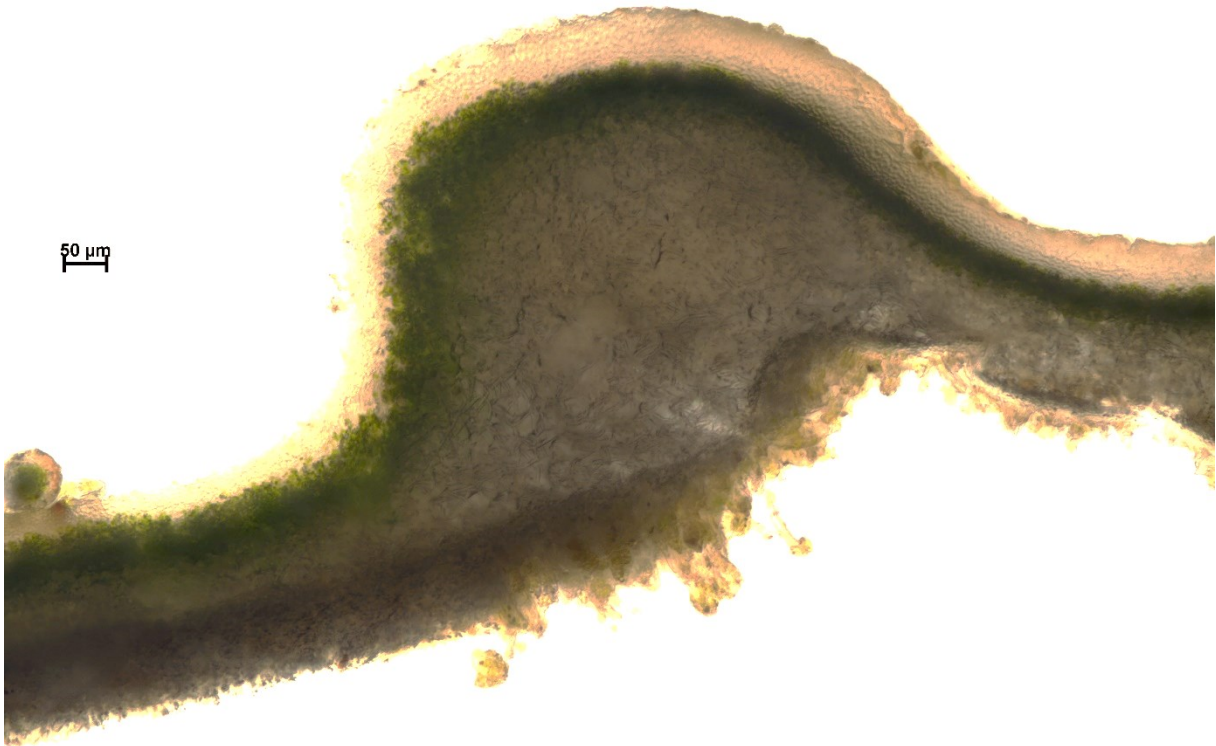


Abbildung 24. Lichtmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts der *Lobaria pulmonaria* gut zu erkennen ist oben die obere Rindenschicht, darunter in Grün die Algenschicht, gefolgt von der lockeren Medulla und darunter die untere Rindenschicht mit Rhizinen.

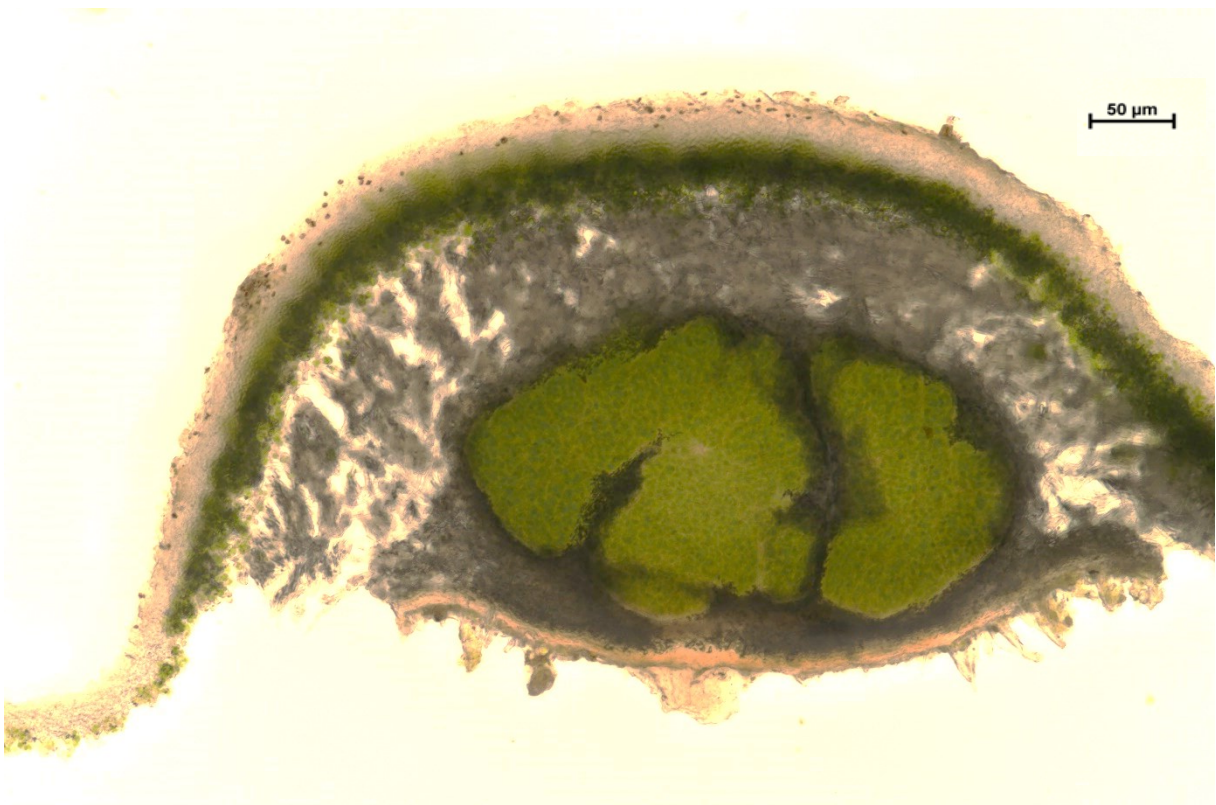


Abbildung 25. Lichtmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts der *Lobaria pulmonaria* hierbei ist wieder die typische Schichtung wie in Abbildung 24 zu erkennen und zusätzlich ein großer Algeneinschluss mit hoher Wahrscheinlichkeit ist das das Cyanobakterium *Nostoc*.

4.1.2. *Pseudovernia furfuracea*

Abbildung 26 und Abbildung 27 zeigen 2 lichtmikroskopische Bilder eines Querschnittes der Flechte *Pseudovernia furfuracea*. Dabei ist bei Abbildung 26 gut zu erkennen, dass es keine eindeutige Abtrennung der Algenschicht gibt. In beiden Abbildungen ist wieder sehr gut das lockere Hyphengeflecht der Medulla zu erkennen. In Abbildung 27 ist zusätzlich die untere und die obere Rinde gut zu erkennen.

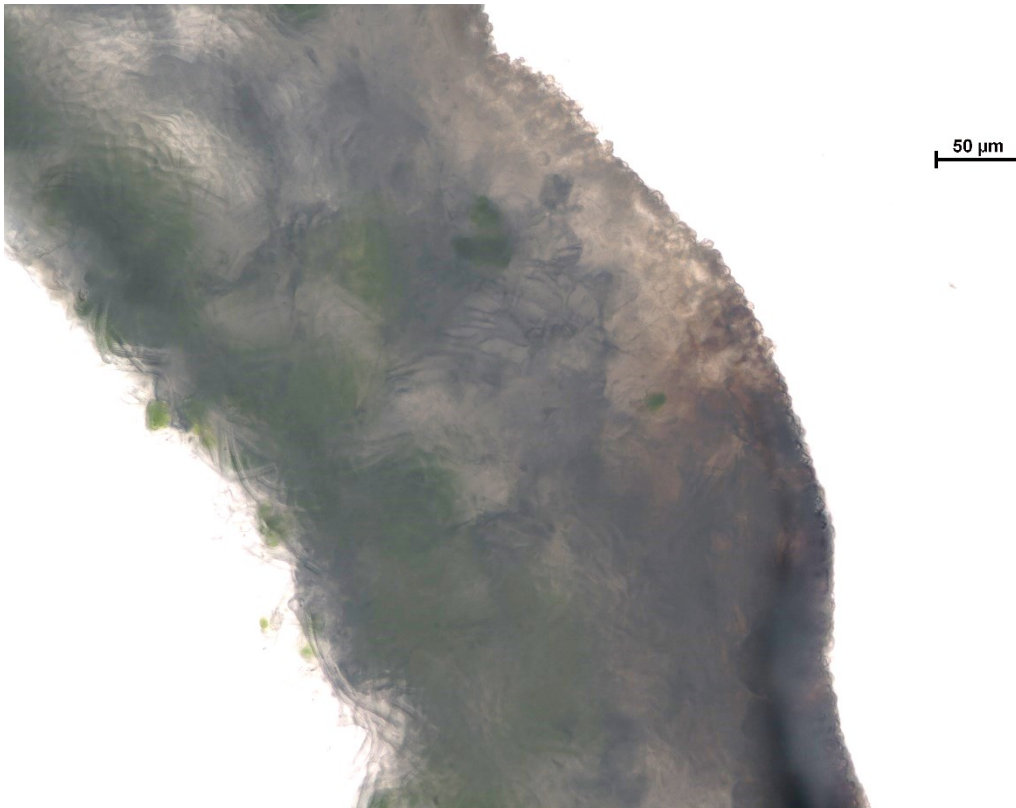


Abbildung 26. Lichtmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts der *Pseudovernia furfuracea*. Es gibt keine streng abgegrenzte Algenschicht, sie sind viel mehr im Thallus verstreut, wenn auch mit etwas höherer Häufigkeit direkt unter der oberen Rindenschicht. Die Algen können erkannt werden durch die grünen Stellen im Thallus.

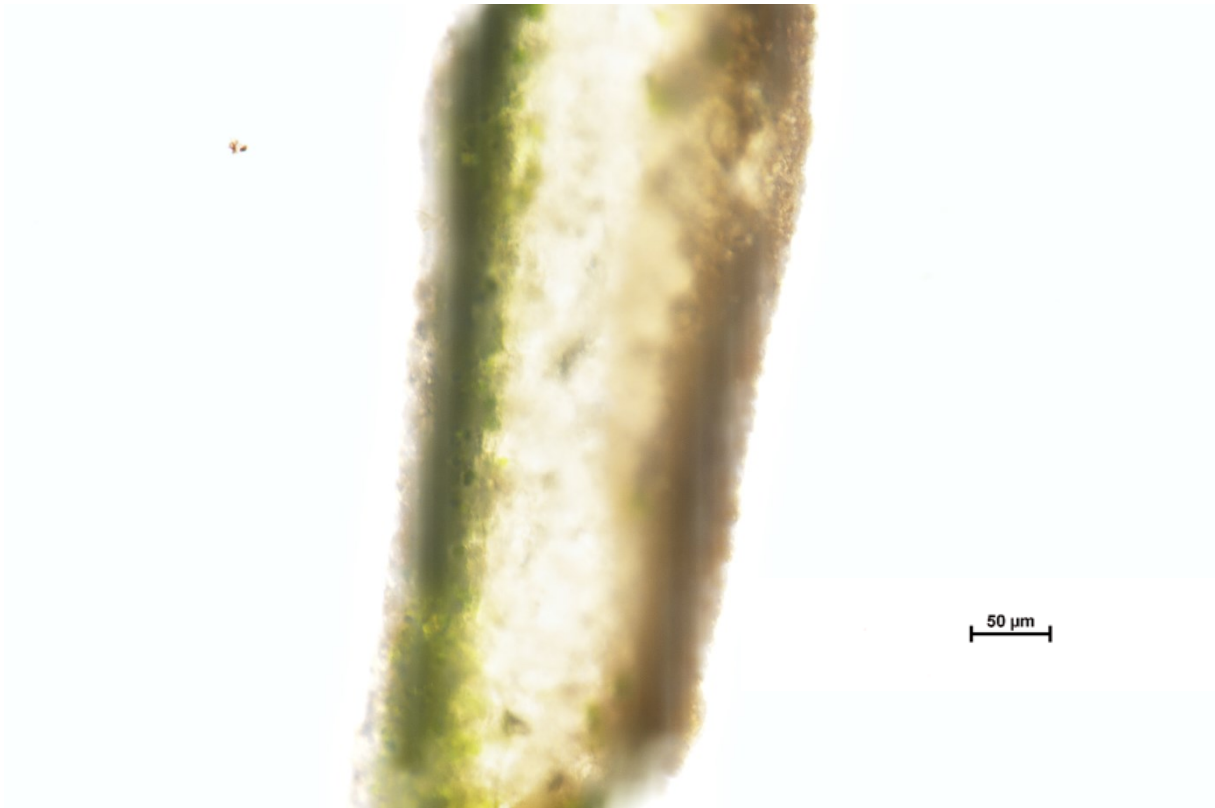


Abbildung 27. Lichtmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts der *Pseudovernia furfuracea*, bei dieser Aufnahme scheinen die Algen jedoch in einer Schicht konzentriert zu sein mit nur wenigen Ausnahmen.

4.1.3. *Usnea dasypoga*

Die zwei Abbildungen zeigen den Querschnitt der Bartflechte *Usnea dasypoga*. Dabei kann man schön außen in braun und dann farblos die äußere Rindenschicht erkennen. Die darunterliegende dunkel erscheinende Schicht ist die Algenschicht, welche in Abbildung 28 nicht durchgängig erscheint. Diese Algenschicht ist gefolgt von der Medulla, welche wieder gut erkennbar aus einem lockeren Geflecht aus Hyphen besteht. Was bei der Bartflechte meistens fehlt, ist die untere beziehungsweise die innere Rindenschicht. Anstelle dieser gibt es den sogenannten Mittelstrang, welcher sowohl in Abbildung 28 als auch in Abbildung 29 gut sichtbar ist.

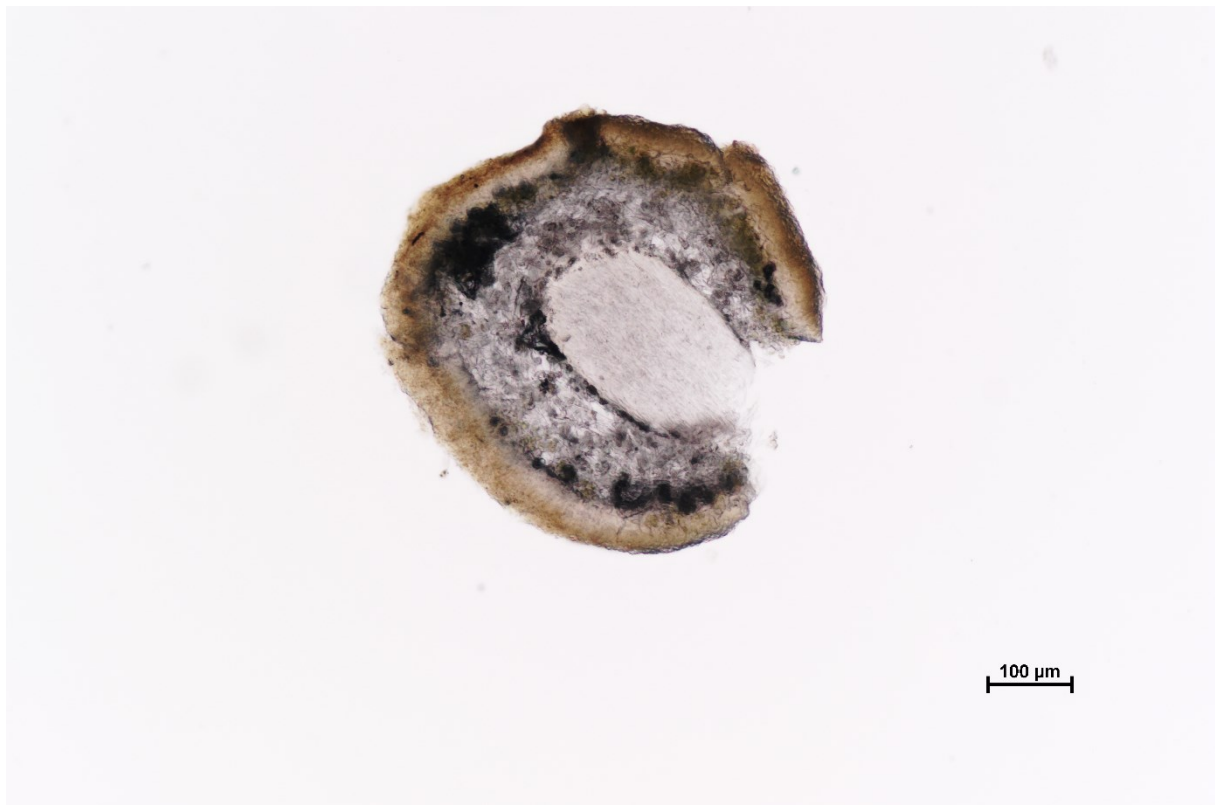


Abbildung 28. Lichtmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts der Flechte *Usnea dasypoga*. Es ist eine gute Schichtung zu erkennen, bestehend aus einer äußeren Rinde, darauf folgt eine dünne Algenschicht und eine Medulla, und in der Mitte ist ein Mittelstrang zu erkennen.

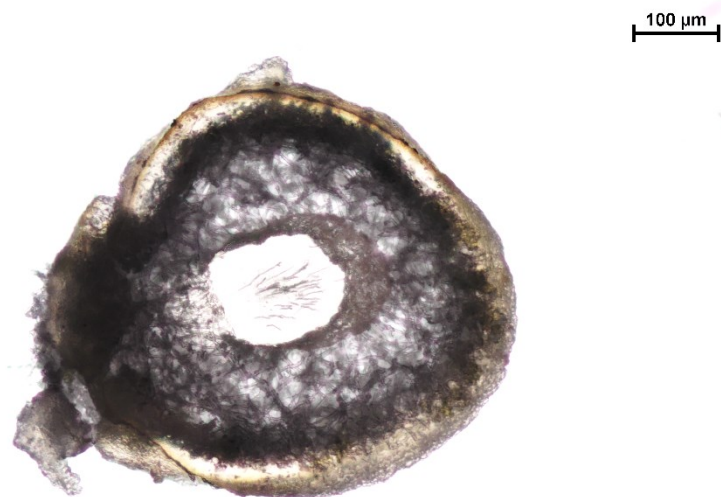


Abbildung 29. Lichtmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts der Flechte *Usnea dasypoga*. Es ist eine eindeutige Schichtung zu erkennen. Begonnen außen mit der äußeren Rindenschicht, gefolgt von der dunklen Algenschicht und der lockeren Medulla. Ganz innen befindet sich die innere Rindenschicht.

4.1.4. *Umbilicaria hirsuta*

In Abbildung 30 ist der Querschnitt der Flechte *Umbilicaria hirsuta* zu sehen. Die obere Rindenschicht ist hier leicht bräunlich und erscheint nur sehr dünn. Die Algenschicht ist darunter angesiedelt und erscheint in einem dunklen Grün. Die Medulla erkennt man sehr gut in weiß und darunter liegt die untere Rindenschicht. Hier sieht man sehr gut, dass sich dort sehr viele Rhizine befinden, welche sehr oft die Aufgabe haben die Flechte am Boden zu befestigen.



Abbildung 30. Lichtmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts der Flechte *Umbilicaria hirsuta*. Die Schichtung erkennt man sehr gut. Oben die obere Rindenschicht gefolgt von der Algenschicht, darunter die Medulla und die untere Rindenschicht an der man sehr gut die vielen Rhizine sehen kann.

4.1.5. *Cladonia foliacea*

In Abbildung 31 und Abbildung 32 sind Querschnitte der Flechte *Cladonia foliacea* zu erkennen. Bei Abbildung 31 kann man sehr schön die einzelnen Schichten erkennen. Oben in leichten Braun ist die obere Rindenschicht zu sehen, gefolgt von der grünlichen Algenschicht. Die Medulla, welche sich direkt darunter befindet, lässt erkennen, dass sie nur aus einem lockeren Hyphengeflecht besteht. Ganz unten ist wieder eine leicht bräunliche Schicht zu erkennen, dies ist die untere Rindenschicht. In der Abbildung 32 Abbildung 32 kann man nur die obere Rindenschicht eindeutig abgrenzen, die darunter liegende Algenschicht kann man erahnen.

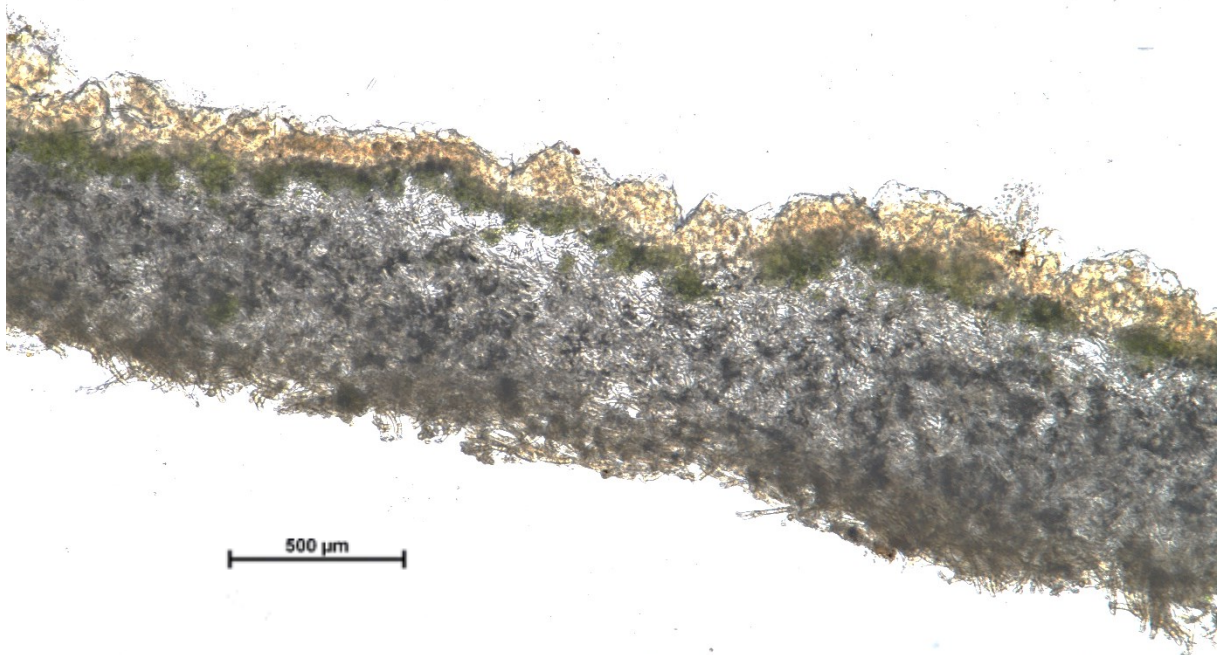


Abbildung 31. Lichtmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts der Flechte *Cladonia foliacea*. Die Schichtung erkennt man gut, dabei ist die obere Rinde braun gefolgt von der Algenschicht in grün, der Medulla und ganz unten in einem Branton die untere Rindenschicht.

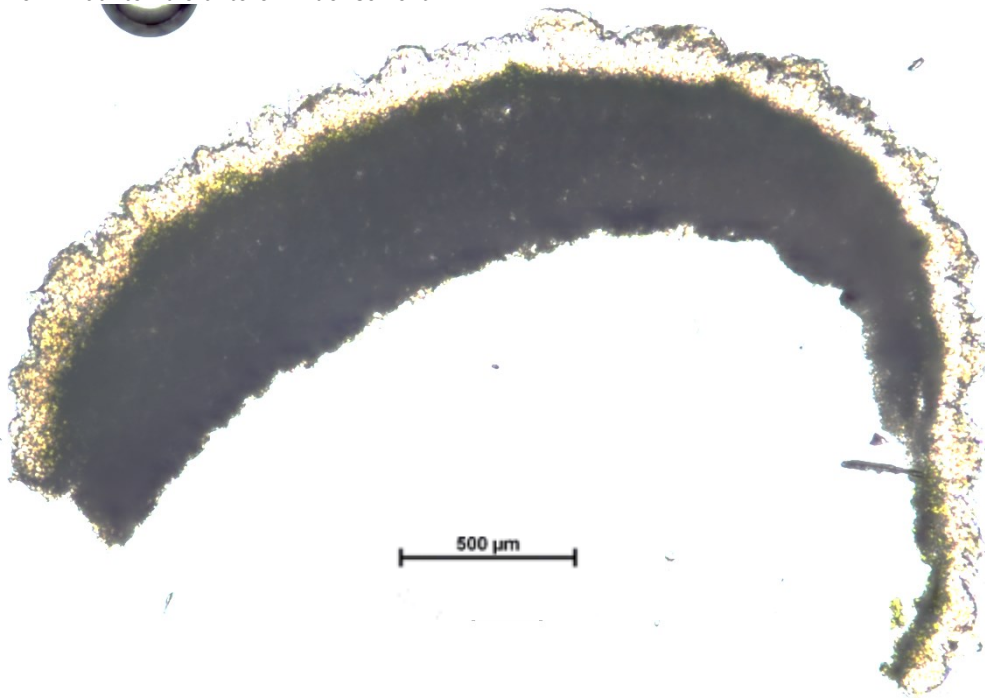


Abbildung 32. Lichtmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts der Flechte *Cladonia foliacea*. Bei diesem Querschnitt ist die obere Rindenschicht sehr gut zu erkennen aber auch ein Teil der Algenschicht.

4.1.6. *Cladonia furcata*

In Abbildung 33 und Abbildung 34 sind zwei Querschnitte der Flechte *Cladonia foliacea* abgebildet. Dabei ist bei beiden Abbildungen ein Teil der äußeren Rindenschicht zu erkennen, gefolgt von der dunklen Algenschicht. Darunter liegt die helle Medulla und ganz innen die innere Rindenschicht, welche ein bisschen dunkler als die Medulla ist, da sie aus einem dichteren Hyphengeflecht besteht.



Abbildung 33. Lichtmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts der Flechte *Cladonia furcata*. Man kann die innere Rindenschicht und Teile der äußeren Rindenschicht erkennen. Dazwischen befindet sich die Algenschicht und weiter innen hell die Medulla.

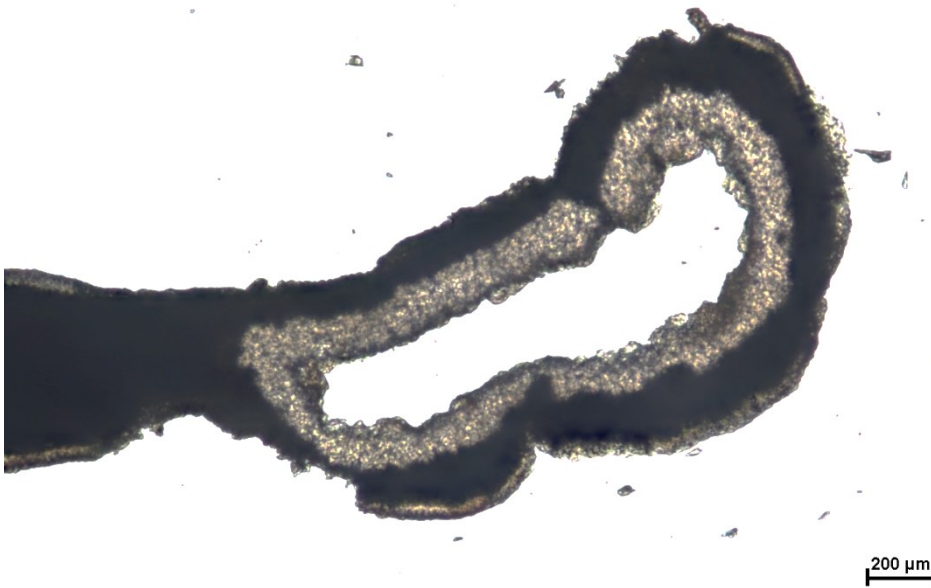


Abbildung 34. Lichtmikroskopischer Aufnahme eines Querschnitts der Flechte *Cladonia furcata*. Mit der gleichen Schichtung wie ist Abbildung 33. Abbildung 33.

4.1.7. *Usnea antarctica*

Auf der Abbildung 36 kann man gut die dicke äußere Rindenschicht erkennen, darunter die dunkle Algenschicht danach kommt die Medulla. Auch der Mittelstrang ist gut sichtbar. Die Abbildung 35 zeigt auch einen kleinen Teil der Oberfläche. Sehr auffällig bei den Querschnitten dieser Flechte ist die sehr dicke äußere Rindenschicht.

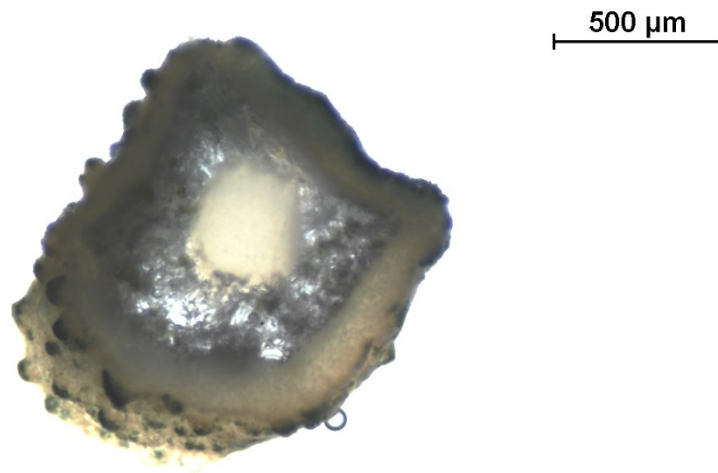


Abbildung 35. Lichtmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts der Flechte *Usnea antarctica*. Zu sehen ist die äußere Rindenschicht und ein Teil der Oberfläche. Weiter innen kann man eine ganz dünne Algenschicht erkennen gefolgt von der Medulla und dem Mittelstrang.

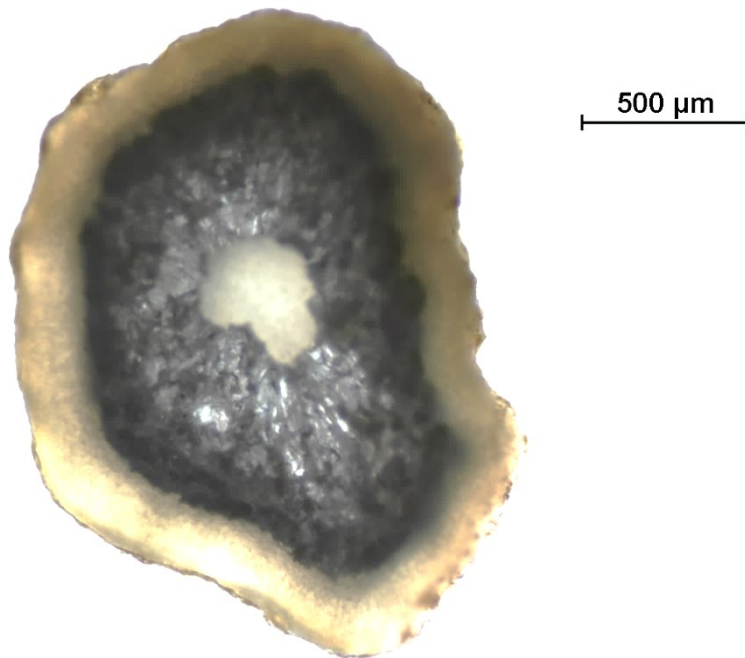


Abbildung 36. Lichtmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts der Flechte *Usnea antarctica*. Es ist wieder die äußere Rinde zu erkennen gefolgt von der Algenschicht. Danach die Medulla und der Mittelstrang.

4.2. Ergebnisse der Elementanalyse

Mittels Elementanalyse wurden die einzelnen Schichten jeder Flechte analysiert und Poitmaps erstellt. Da es aufgrund der fehlenden Farbe unter dem Elektronenmikroskop nicht so einfach war die einzelnen Schichten exakt zu unterscheiden, wurden nicht eindeutig erkennbare Schichten zusammengefasst. Einige Elemente wurden gewählt und in den einzelnen Flechten verglichen. Im Folgenden werden die Elemente Kalium, Silizium, Aluminium, Kalzium, Natrium, Magnesium und Chlor in den verschiedenen Flechten in Diagrammen dargestellt und beschrieben.

4.2.1. Kalium

In Abbildung 37 erkennt man sehr gut, dass sowohl der Kaliumgehalt in den einzelnen Flechten unterschiedlich ist, als auch in den unterschiedlichen Schichten. Bei der Flechte *Lobaria pulmonaria* ist sehr auffällig, dass in jeder einzelnen Schicht die Kaliumkonzentration sehr niedrig ist, außer in der Medulla. Hier steigt sie von unter 0,1 auf 0,4 Gewichtsprozent an.

Im Thallus der Flechte *Umbilicaria hirsuta* ist der Gehalt von Kalium sehr hoch, verglichen mit einigen der anderen Flechten. Allerdings erkennt man sowohl in der oberen Rinde als auch in der Algenschicht einen noch höheren Gehalt an Kalium.

Bei den Flechten *Pseudovernia furfuracea* und *Cladonia foliacea* befindet sich in jeder Schicht relativ wenig Kalium.

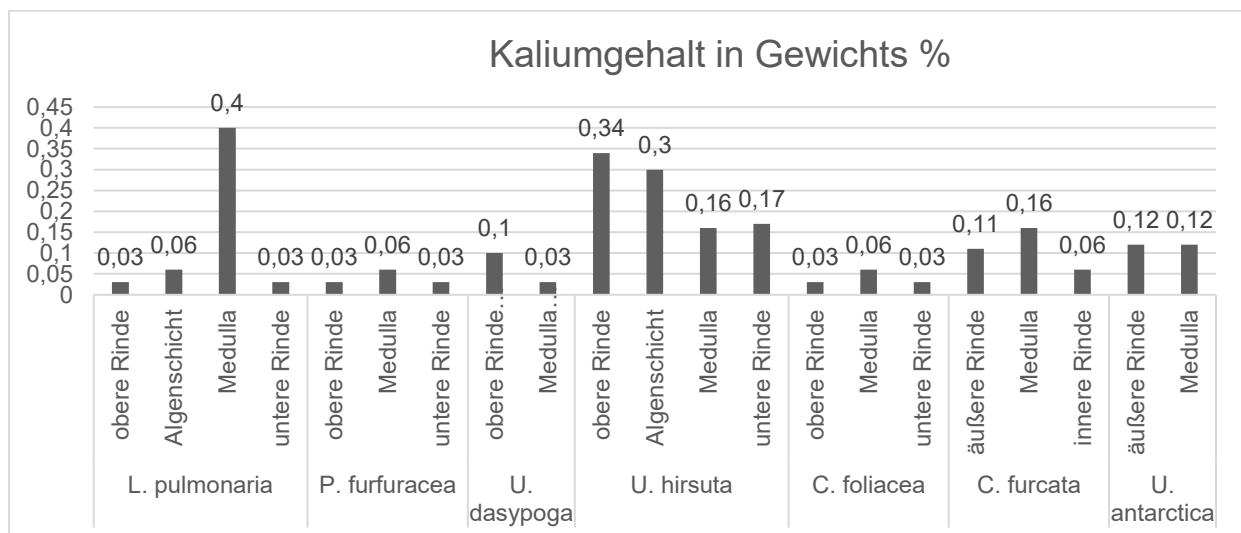


Abbildung 37. In dieser Abbildung ist der Kaliumgehalt in Form von Gewicht% der einzelnen Schichten der Flechten gegenübergestellt

4.2.2. Silizium und Aluminium

Wenn man die Abbildung 38 und Abbildung 39 vergleicht, scheint die Verteilung von Aluminium und Silizium im Thallus der meisten Flechten gleich zu sein, allerdings ist nur die Verteilung ähnlich, die Gewichtsprozent jedoch nicht. Ist in einer Schicht der Flechte der Siliziumgehalt größer als in der anderen, so ist dies auch im Aluminiumgehalt widergespiegelt. Dies könnte deswegen so sein, da in Silikatgesteinen auch sehr viel Aluminium vorkommt. Es gibt nur eine Ausnahme und das ist die Medulla der *Lobaria pulmonaria*. Hier sieht man einen sehr hohen Siliziumgehalt in der Medulla im Vergleich zu den anderen Schichten. Allerdings ist der Aluminiumgehalt fast gleich niedrig wie in der oberen Rinde.

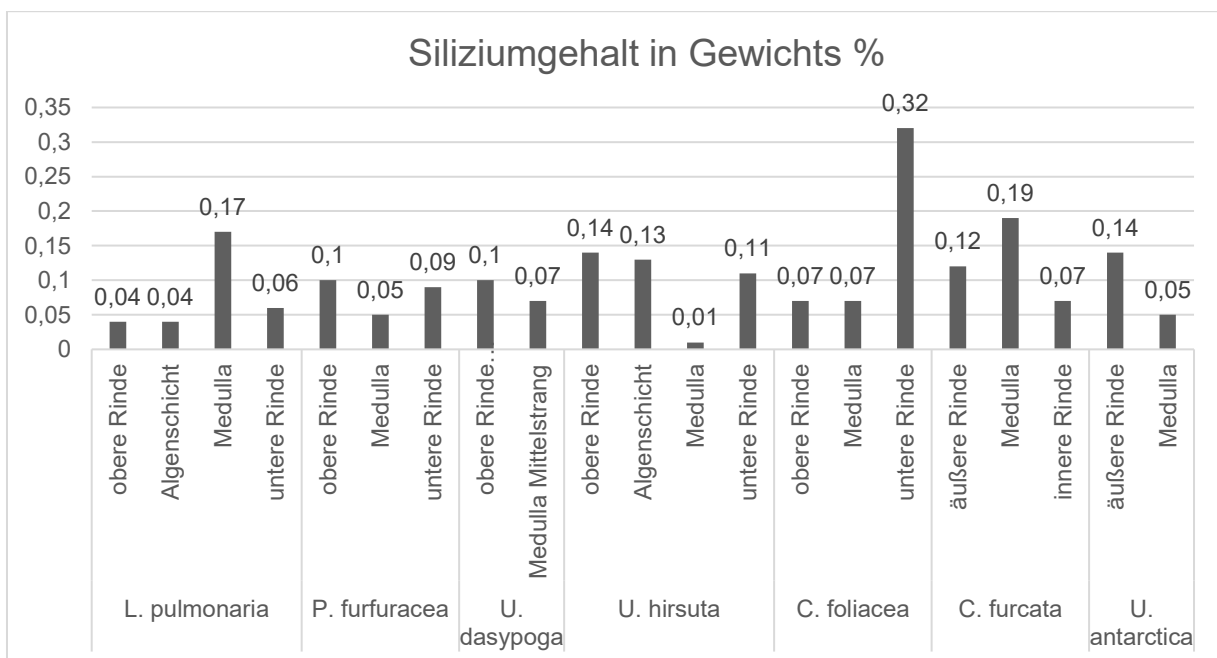


Abbildung 38. In dieser Abbildung ist der Siliziumgehalt in Form von Gewicht% der einzelnen Schichten der Flechten gegenübergestellt.

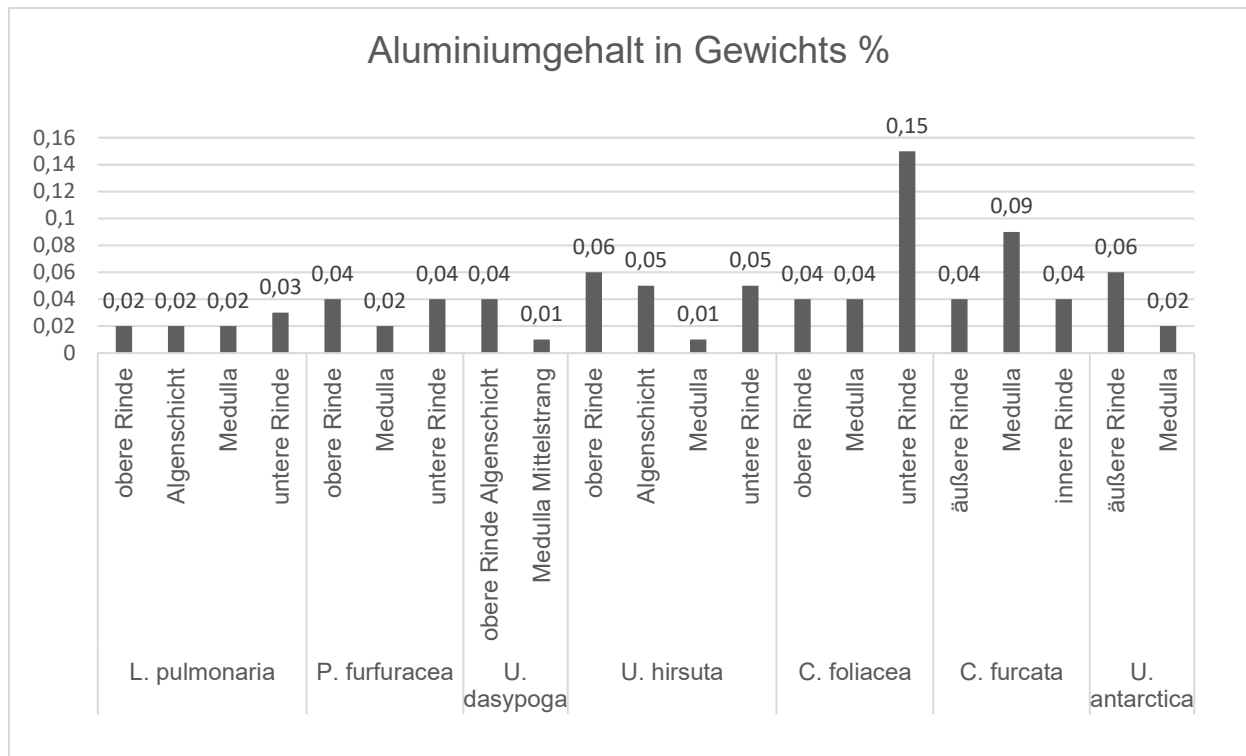


Abbildung 39. In dieser Abbildung ist der Aluminium in Form von Gewichts% der einzelnen Schichten der Flechten gegenüber gestellt.

4.2.3. Kalzium

Der Kalziumgehalt der einzelnen Flechten ist sehr unterschiedlich, wie man in Abbildung 40 gut erkennen kann. So ist in der Flechte *Lobaria pulmonaria*, *Pseudovernia furfuracea*, *Umbilicaria hirsuta* und *Cladonia foliacea* der Gehalt sehr gering. Bei der *Cladonia furcata* kann man erkennen, dass der Kalziumgehalt in der äußeren Rinde und der Medulla um einiges höher ist als in der inneren Rinde. Es ist in Abbildung 40 außerdem sehr gut zu sehen, dass in der Flechte *Usnea antarctica* sehr viel Kalzium in der Medulla ist, mehr als in allen anderen Flechten. Man erkennt auch, dass in der Flechte *Usnea dasypoga* sehr viel Kalzium enthalten ist. Hier ist auch zu erkennen, dass sowohl in der oberen Rinden-/ Algenschicht als auch in der Medulla/ Mittelstrang zirka gleich viel Kalzium enthalten ist. Dadurch, dass die Flechte *Cladonia foliacea* und die *Cladonia furcata* die gleichen sekundären Metabolite beinhaltet, kann durch dieses Element kein Rückschluss auf eine Flechtensäure gezogen werden.

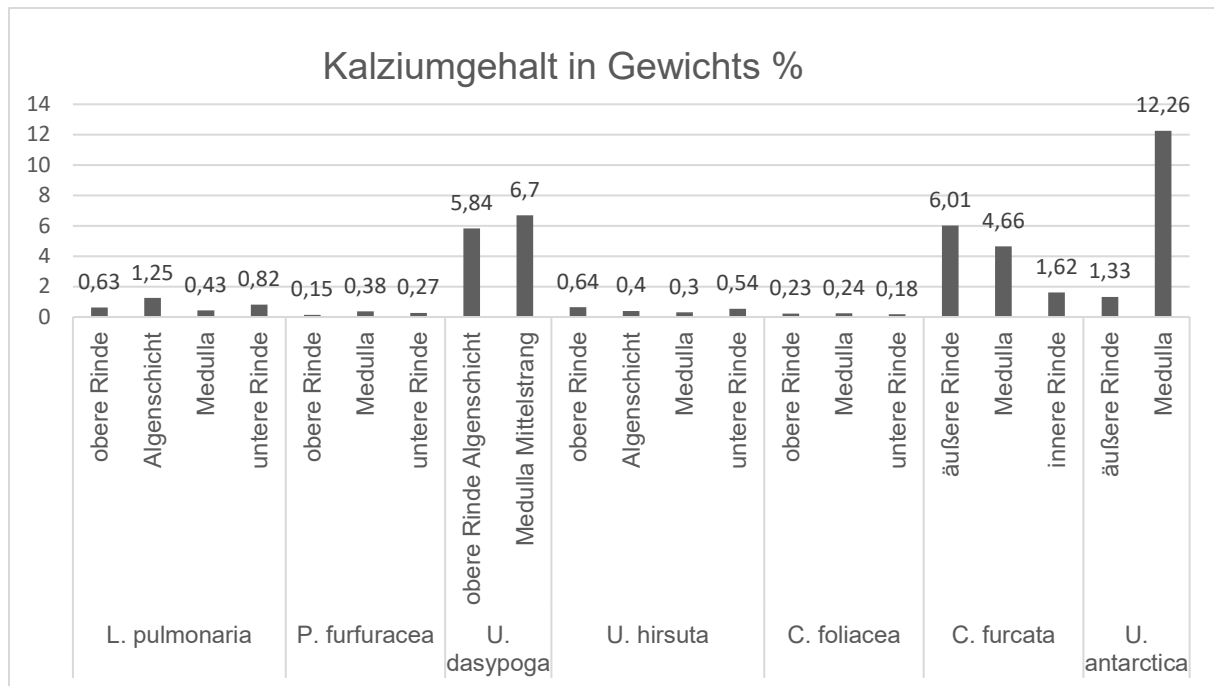


Abbildung 40. In dieser Abbildung ist das Kalzium in Form von Gewicht% der einzelnen Schichten der Flechten gegenübergestellt.

4.2.4. Natrium

Das Erste was in Abbildung 41 ins Auge sticht ist, dass in der Flechte *Usnea dasypoga* kein Natrium enthalten ist. In der *Cladonia furcata* ist in jeder Schicht sehr wenig Natrium enthalten. Sehr viel Natrium ist in der Flechte *Umbilicaria hirsuta* zu finden und in der unteren Rinde von *Pseudovernia furfuracea*. In dieser unteren Rinde ist allerdings auch viel mehr als in dem restlichen Flechtenkörper. Auch bei *Cladonia foliacea* ist in der unteren Rinde mehr Natrium als in dem restlichen Teil der Flechte.

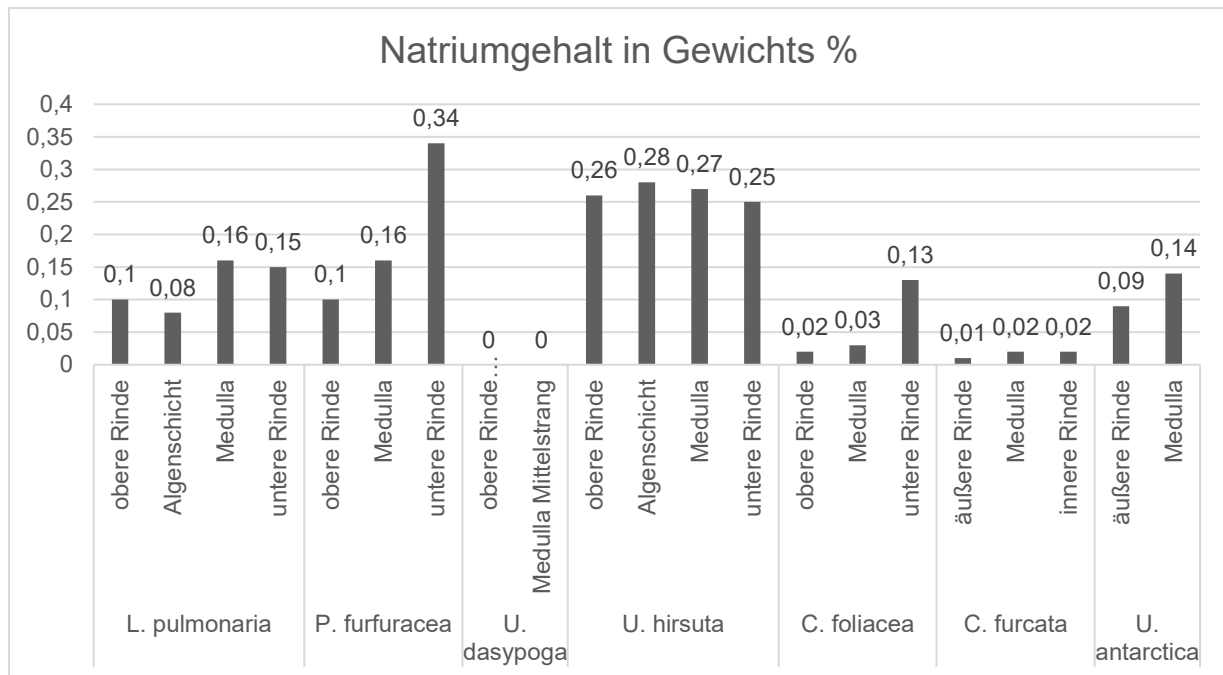


Abbildung 41. In dieser Abbildung ist der Natriumgehalt in Form von Gewicht% der einzelnen Schichten Flechten gegenübergestellt.

4.2.5. Magnesium

In den Flechten *Pseudovernia furfuracea*, *Umbilicaria hirsuta*, *Cladonia foliacea* und *Usnea antarctica* befinden sich in jeder einzelnen Schicht ein geringer Gehalt von Magnesium verglichen mit den anderen Flechten. Was allerdings auffällig bei *P. furfuracea* ist, dass es von der Flechten Unterseite zur Flechten Oberseite immer weniger Magnesium wird. In Abbildung 42 ist auch zu sehen, dass wesentlich mehr Magnesium in der oberen Rinde der Flechte *Usnea dasypoga* ist als im Mittelstrang oder der Medulla. Auch bei *Cladonia furcata* befindet sich außen und in der Medulla mehr Magnesium als innen. Das Bild der Verteilung bei *Lobaria pulmonaria* ist allerdings ein anderes, hier wurde am meisten in der Algenschicht nachgewiesen.

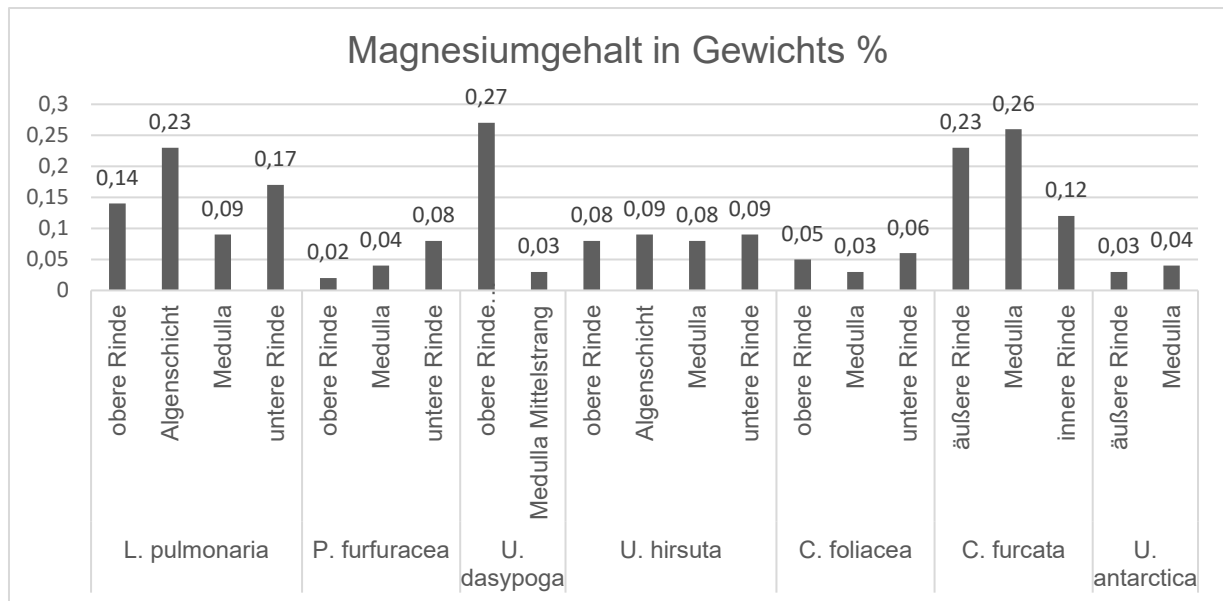


Abbildung 42. In dieser Abbildung ist der Magnesiumgehalt in Form von Gewicht% der einzelnen Schichten Flechten gegenübergestellt.

4.2.6. Chlor

Abbildung 43 zeigt den Chlorgehalt der einzelnen Flechten im Vergleich. Hier ist zu erkennen, dass sich in der oberen Rinde der *Pseudovernia furfuracea* ein sehr hoher Prozentsatz an Chlor finden lässt. Auch in *Umbilicaria hirsuta* ist etwas mehr an Chlor vorhanden als in den anderen Flechten. In *Lobaria pulmonaria* ist am wenigsten Chlor enthalten. Es fällt auch auf, dass in jeder Flechte das Chlor mehr oder weniger gleich verteilt ist über die Schichten, außer bei *P. furfuracea*.

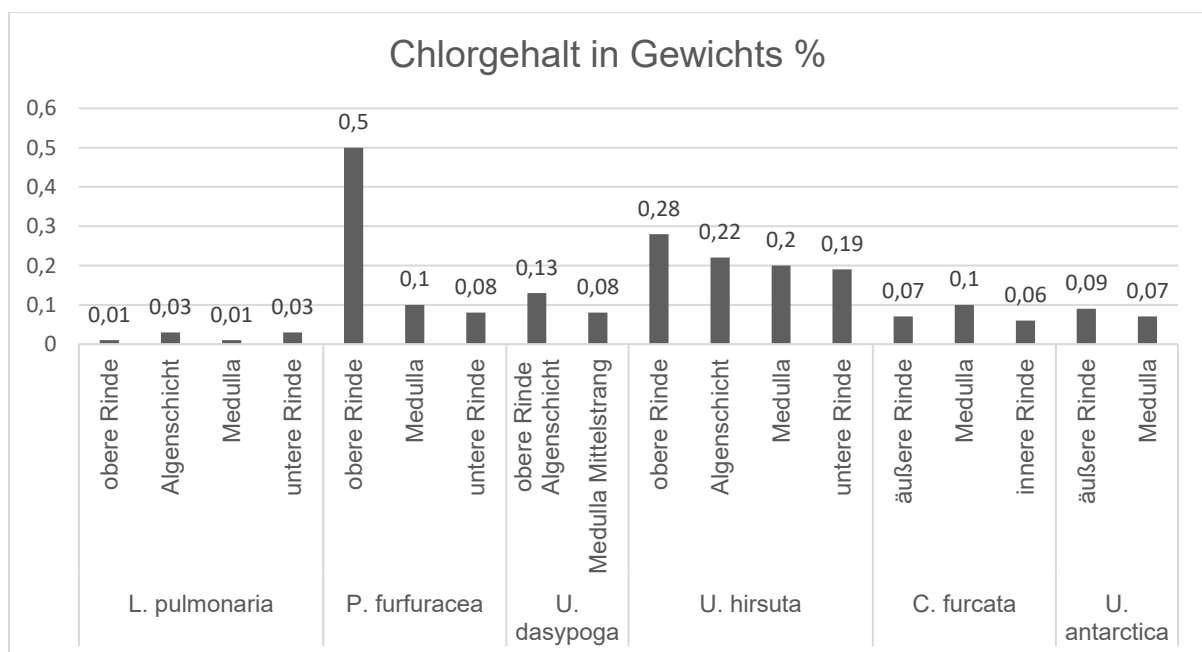


Abbildung 43. In dieser Abbildung ist der Chlorgehalt in Form von Gewicht% der einzelnen Schichten Flechten gegenübergestellt.

4.2.7. Zusammenfassung der Elementanalysen

Wenn man die Elemente direkt vergleicht, dann muss man als erstes die Größen beachten. Bei dem direkten Vergleich zwischen Aluminium und Silizium wurde schon darauf hingewiesen, dass trotz der optischen Ähnlichkeit der Prozentsatz an Silizium immer höher ist. Beim Silizium in er in einem Bereich zwischen 0,01 und 0,32% beim Aluminium zwischen 0,01 und 0,15 %. In Abbildung 40 ist der Kalziumgehalt abgebildet, dabei scheint, dass im Großen und Ganzen fast alle Flechten wenig Kalzium enthalten. Wenn man sich dann allerdings die Skalierung anschaut, erkennt man, dass in allen gemessenen Flechten der Kalziumgehalt von den verglichenen Elementen am höchsten ist. Abgesehen vom Kalzium liegt der Gehalt der verglichenen Elemente immer unter 1%. Wenn man die gleichwertigen Ionen vergleicht, stellt man fest, dass weder Natrium und Kalium als weitere einwertige Ionen eine ähnliche Verteilung haben noch Magnesium und Kalzium als zweiwertige Ionen.

4.3. Ergebnisse Pointmaps

In den sogenannten Pointmaps wurden die ausgewählten Elemente mittels Punkte in einem elektronenmikroskopischen Bild einem Ort zugeordnet. Viele der Elemente sind in einem zu geringen Anteil vorhanden oder in der gesamten Flechte verteilt und führten deswegen nur zu einem diffusen Bild. Auf diesen diffusen Bildern ist kein Ergebnis zu erkennen, hier sind daher nur einige aussagekräftige Bilder dargestellt.

4.3.1. *Lobaria pulmonaria*

Wenn man in Abbildung 44 c und d anschaut, fällt sofort auf, dass Aluminium und Silizium auf den gleichen Stellen zu finden ist. Dies könnte ein Hinweis sein, dass sich hier ein Silikat Mineral befindet. Diese beinhalten meistens sowohl Silizium als auch Aluminium. Außerdem ist im Overlay klar zu erkennen, dass auf der gesamten Flechte Kohlenstoff zu finden ist. Dies ist leicht zu erklären, da die Flechte ein Lebewesen ist und somit zum Großteil aus Kohlenstoff und Wasserstoff besteht. Auf dem elektronenmikroskopischen Bild erkennt man sehr schön die einzelnen Schichten der Flechte. Ganz unten in diesem Bild sieht man auch ein Rizin welches mit einem Pfeil markiert ist.

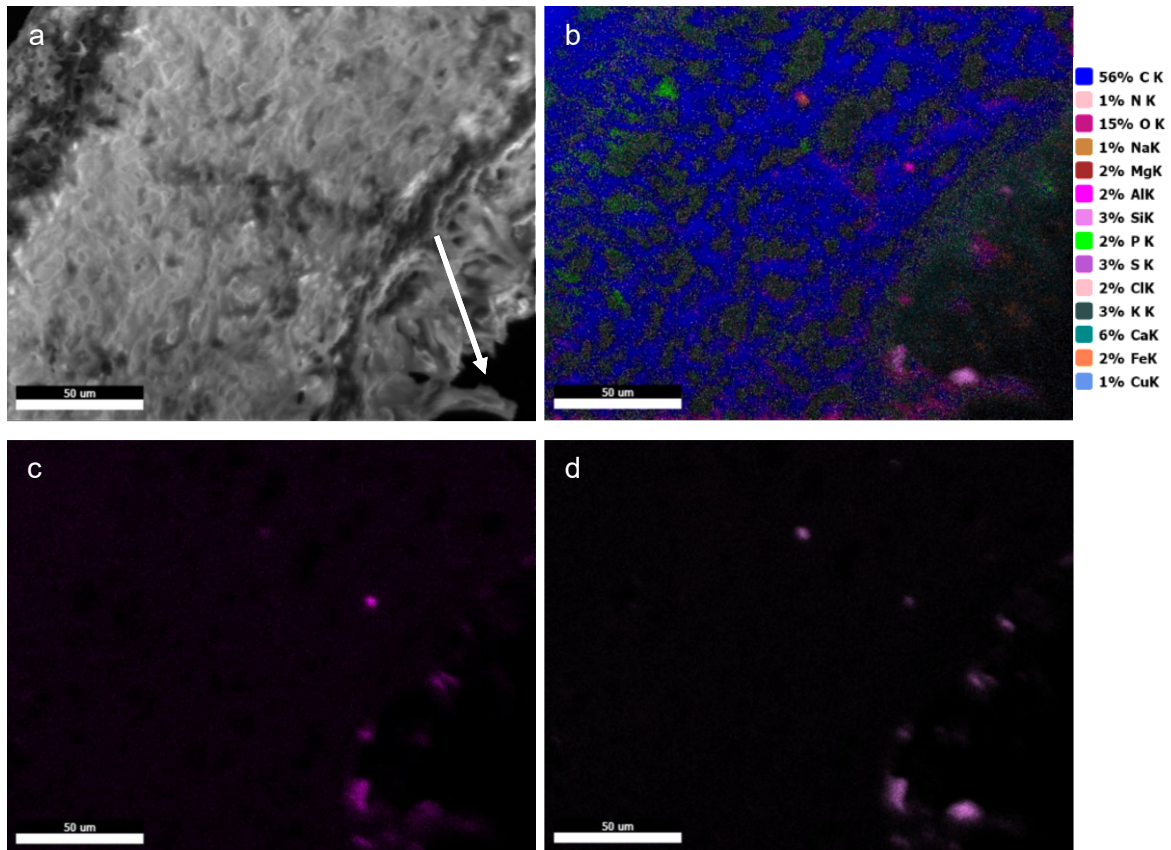


Abbildung 44. Elektronenmikroskopisches Bild der Flechte *Lobaria pulmonaria* (a), Overlay von allen gemessenen Elementen (b), Aluminiumlokalisierung im Flechtenthallus (c), Siliziumlokalisierung im Flechtenthallus (d).

4.3.2. *Pseudovernia furfuracea*

Wenn man Abbildung 45 (c) betrachtet, erkennt man sehr gut, dass sich sowohl in der oberen Rinde als auch in der unteren Rinde viel Chlor befindet. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich der sekundäre Metabolit Chloratranorin in diesen Schichten befindet. *Pseudovernia furfuracea* ist die einzige der untersuchten Flechten, welche diesen Metabolit beinhaltet. Und Chloratranorin ist der einzige zu untersuchende Metabolit, welcher ein Chloratom besitzt. Abbildung 45 (d) zeigt, dass sich Kalzium bevorzugt in der Medulla befindet. Auf Abbildung 45 (b) sieht man wieder ein Overlay. Sogar hier kann man erkennen, dass in der oberen Rinde sehr viel Chlor enthalten ist. Der Hintergrund erscheint deswegen blau, da die Folie als Kohlenstoff besteht. Was man hier auch noch gut erkennen kann, ist, dass sich im Flechtenthallus ebenfalls viel Sauerstoff als Bestandteil von vielen organischen Verbindungen befindet. Abbildung 45 (a) zeigt sehr gut die einzelnen Schichten der Flechte wahrnehmen, angefangen bei einer dicken oberen Rindenschicht und einer dicken

Medulla Schicht aber nur einer dünnen unteren Rinde. Die Algenschicht kann nicht eindeutig abgegrenzt werden.

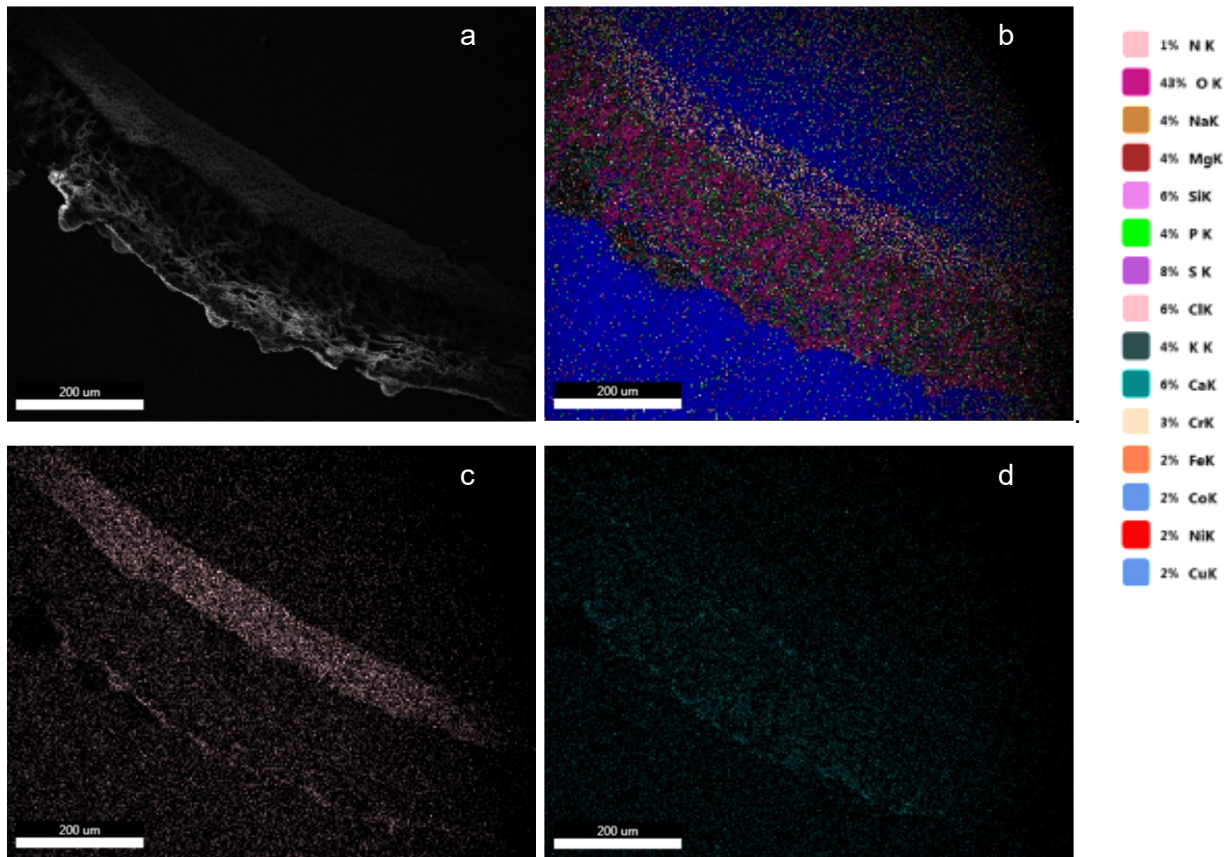


Abbildung 45. Elektronenmikroskopisches Bild der Flechte *Pseudovernia furfuracea* (a), Overlay von allen gemessenen Elementen (b), Chlorlokalisierung im Flechtenthallus (c), Kalziumlokalisierung im Flechtenthallus (d).

4.3.3. *Usnea dasypoga*

Um in Abbildung 46 zu erkennen, wo genau sich das Kalzium befindet, muss man einen direkten Vergleich mit einem der zwei oberen Bilder machen. Beim elektronenmikroskopischen Bild erkennt man sehr gut die äußere Rinde und darunter die Algenschicht beziehungsweise die Medulla. Es ist aber anzunehmen, dass es sich dabei um die Konzentrierung von Kalzium in der Medulla handelt. Dies ist auch sehr gut im Overlay festzustellen. Im Gegensatz dazu befindet sich Magnesium im gesamten Flechtenthallus gleichmäßig verteilt. Was in Abbildung 46 b auch ins Auge sticht, sind die rosa-pinken Flecken, welche sich scheinbar auf die Medulla beschränkt haben. Es ist nicht eindeutig erkennbar, um welches Element es sich dabei handelt. Es könnte sowohl Sauerstoff oder aber auch Aluminium sein. Auf Abbildung 46 f sieht man sehr gut, dass Aluminium ein sehr diffuses Bild ergeben hat und Sauerstoff, welches auf e gezeigt wird, sich wie erwartet über den Flechtenthallus relativ gleichmäßig verteilt.

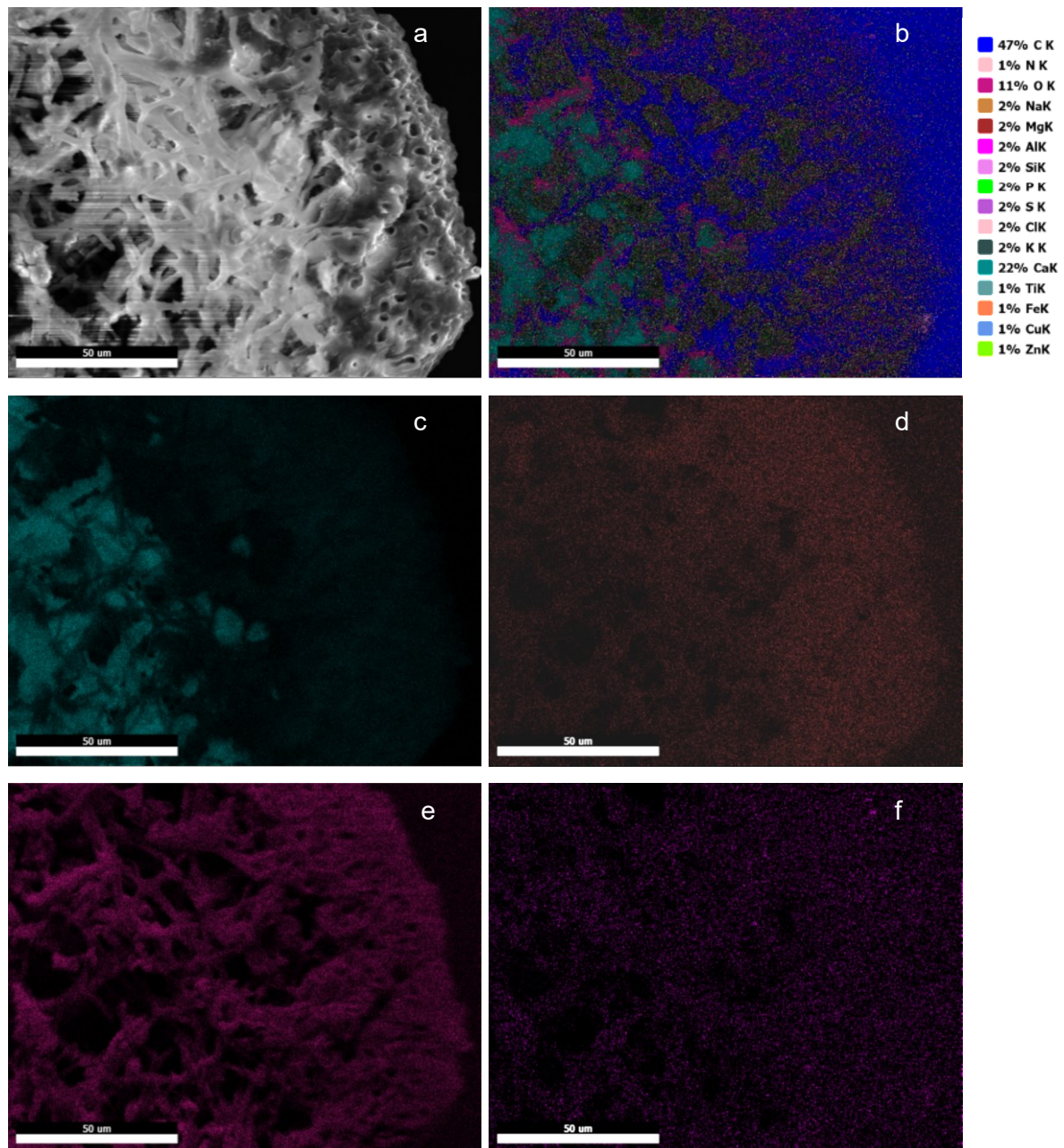


Abbildung 46. Elektronenmikroskopisches Bild der Flechte *Usnea dasypoga* (a), Overlay von allen gemessenen Elementen (b), Kalziumlokalisierung im Flechtenthallus (c), Magnesiumlokalisierung im Flechtenthallus (d), Sauerstofflokalisierung im Flechtenthallus (e), Aluminiumlokalisierung im Flechtenthallus (f).

4.3.4. *Usnea antarctica*

In der Abbildung 47 sieht man auf den vier Bildern die obere Rinde, Teile der Algenschicht und der Medulla der Flechte *Usnea antarctica*. Dabei ist es im Elektronenmikroskop schwer zu sagen, wo sich die Algenschicht genau befindet, da sie sich nicht durch Fluoreszenz oder der grünen Farbe vom Rest abhebt. Es ist auf Abbildung 47 (a) auch ein kleiner Teil der Oberfläche zu erkennen. In Abbildung 47 (c) sieht man, wo sich Kalzium befindet. Dabei ist gut zu sehen, dass sich in der oberen

Rinde und auch an der Oberfläche fast kein Kalzium befindet, erst weiter im Inneren, also in der Medulla. Abbildung 47 (d) zeigt, dass sich Silizium sehr konzentriert an einer kleinen Stelle im Flechtenthallus befindet und eine weitere kleine Stelle an der Oberfläche ist. Aber es fällt sofort auf, dass Silizium nicht homogen in einer Schicht oder gar der gesamten Flechte verteilt ist.

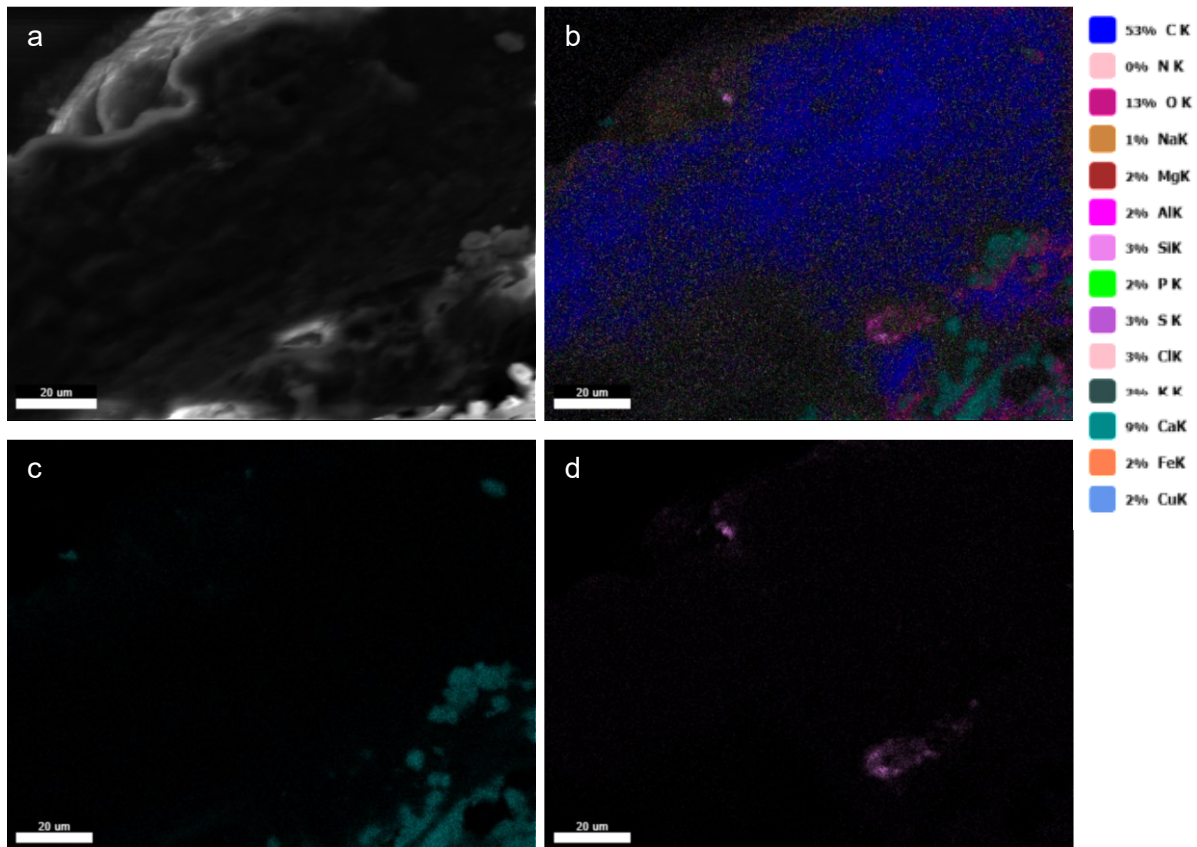


Abbildung 47. Elektronenmikroskopisches Bild der Flechte *Usnea antarctica* (a), Overlay von allen gemessenen Elementen (b), Kalziumlokalisierung im Flechtenthallus (c), Siliziumlokalisierung im Flechtenthallus (d).

4.4. Fluoreszenz und Lambdascan Ergebnisse

Fluoreszenz Bilder und Lambdascans liefern ergänzende Ergebnisse. Der Unterschied ist, dass die Lambdascans genauer sind, da Photonen bei den Lambdascans wesentlich genauer gemessen werden können als die Farbwahrnehmung unserer Augen ist. Die Lambdascans werden auf dem gesamten Querschnitt der Flechte durchgeführt. Bei der Diskussion der Lambdascans wurden immer eine sogenannte region of interest (ROI) ausgewählt und an genau der Stelle der Lambdascan dargestellt.

4.4.1. *Lobaria pulmonaria*

Die Flechte *Lobaria pulmonaria* enthält die sekundären Metabolite Stictinsäure und Norstictinsäure.

UV-Licht

In Abbildung 48 ist ein UV- Fluoreszenzbild der Flechte *Lobaria pulmonaria* zu erkennen. Die Algenschicht knapp unter der oberen Rinde lässt sich gut vom Rest unterscheiden, da sie orange-rotes Licht emittiert. Dadurch hebt sie sich gut von der darüber liegenden blauen oberen Rinde und von der weißen darunterliegenden Medulla ab. Auch der Algeneinschluss, das sogenannte Cephalodium, emittiert rotes Licht, jedoch mit einem anderen Farbton, also auch Wellenlänge als die Algen der Algenschicht.

Die Ergebnisse der Lambdascans sollten nun erwartungsgemäß gleich sein wie bei dem Fluoreszenzbild. Wenn man nun den Scan der UV-Licht Bestrahlung mit 405nm auf der Abbildung 49 a und c vergleicht, sieht man, dass beide Stellen eine Emission von rotem Licht aufweisen, mit einem Peak bei 670nm. Dies ist der Bereich in dem Chlorophyll emittiert. Jedoch erkennt man auf der Abbildung 49 a auch, dass davor bei der Wellenlänge von ungefähr 525nm, 580nm, 600nm und 630nm eine Verbindung emittiert. Dabei entspricht die Wellenlänge 525nm grün, 580nm entspricht gelb, 600nm ist mit der Farbe Orange gleich zu setzen und 630nm entspricht der Farbe Rot. Wenn man sich nun noch mal Abbildung 48 ansieht, erkennt man um den Algeneinschluss herum einige gelbliche oder orange Areale. Diese lassen sich durch die Lambdascans verifizieren und vermuten, dass sich in der Algenschicht weitere emittierende Verbindungen befinden.

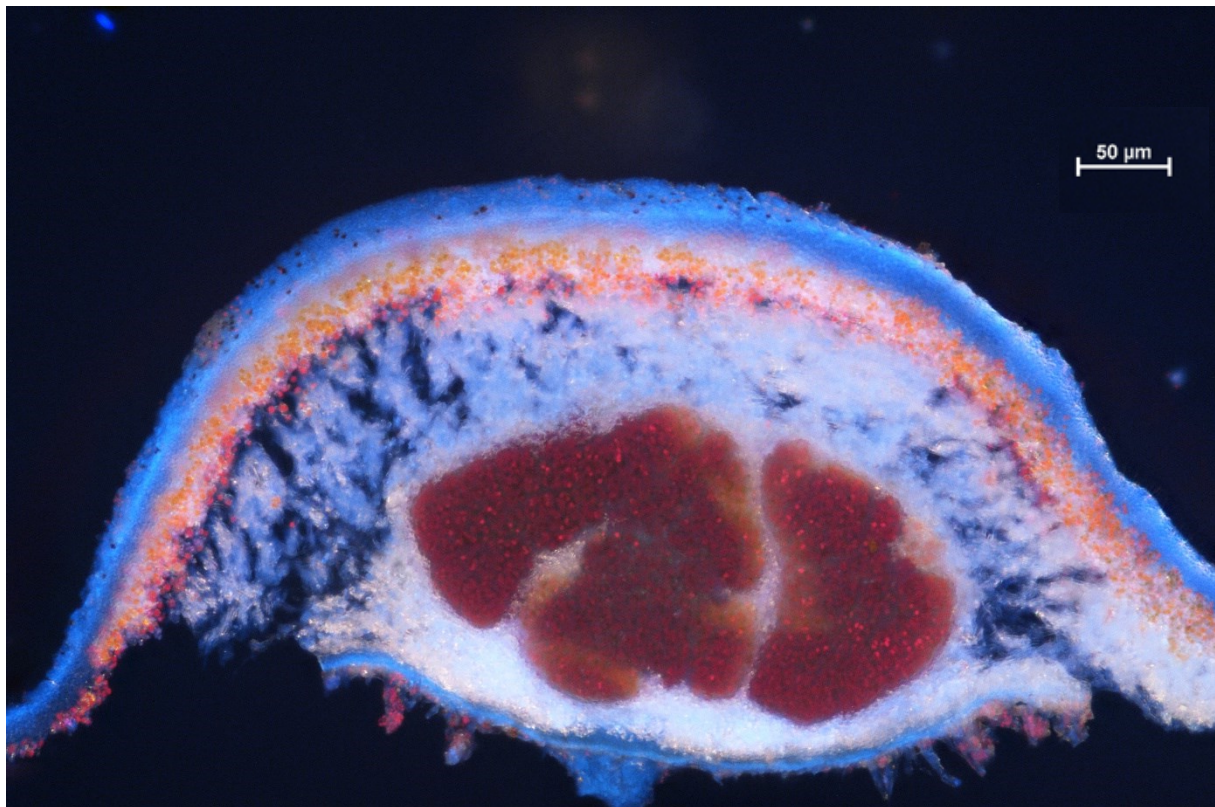


Abbildung 48. Fluoreszenzemissionen der Flechte *Lobaria pulmonaria* bei Bestrahlung mit UV-Licht. Es ist ein großer Algeneinschluss ein sogenanntes Cephalodium zu erkennen, welcher bei *Lobaria pulmonaria* sehr häufig vorkommen. Diese bestehen meist aus dem Cyanobakterium *Nostoc*. Man erkennt sehr gut die orange-rot fluoreszierende Algensicht gleich unter der blauen oberen Rinde. Die Medulla erscheint weiß und das große rote Areal ist das Cephalodium, an dem man auch gut erkennen kann, dass es nicht mit der gleichen Farbe emittiert wie die Algensicht.

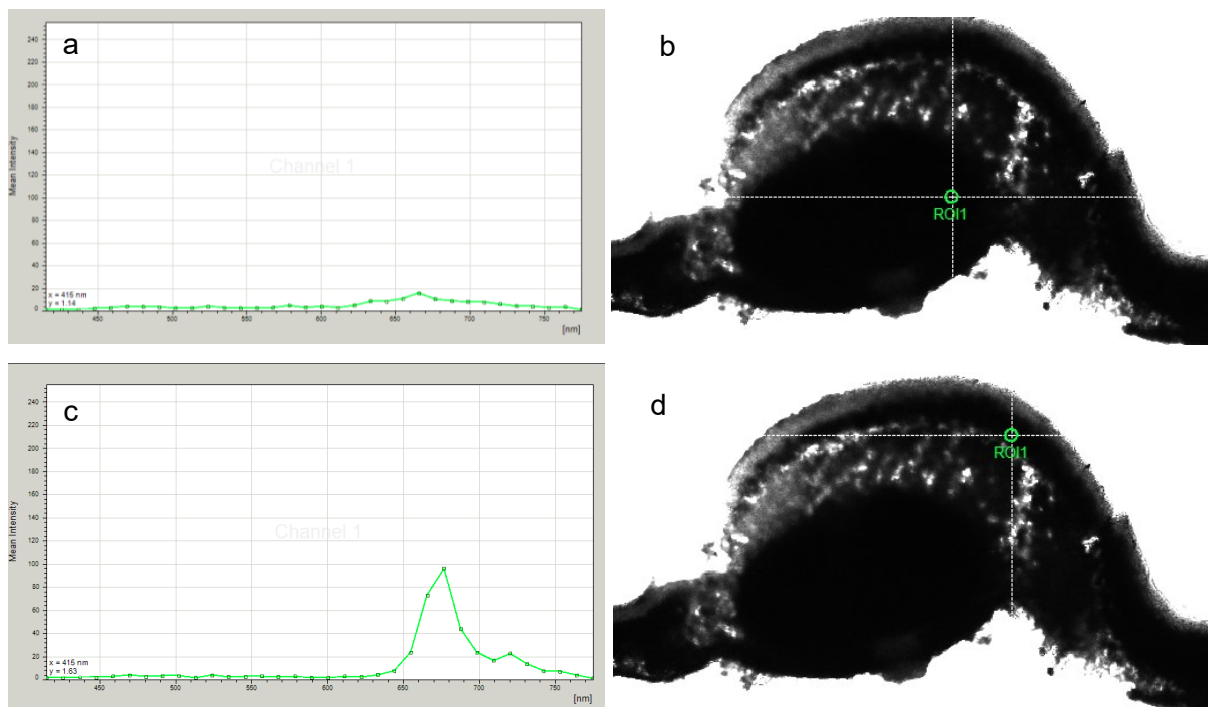


Abbildung 49. In a erkennt man den Lambdascan der Region b mit UV-Licht Bestrahlung. Dabei sieht man auf a kleine Peaks bei 525nm, 580nm, 600nm, 630nm und bei 670nm. In c erkennt man den Lambdascan der Region d mit UV-Licht Bestrahlung. Auf dem Bild c entdeckt man einen sehr eindeutigen Peak bei 670 nm. Diese 4 Bilder sind alle Aufnahmen der Flechte *Lobaria pulmonaria*.

Grünlicht

In der Abbildung 50 lässt sich gut erkennen, dass dieser Algeneinschluss sehr stark emittiert, wenn er mit grünem Licht bestrahlt wird. Außerdem ist zu erkennen, dass die Algenschicht bei dieser Bestrahlungswellenlänge weniger bis nicht emittiert im Gegensatz zu der Bestrahlung mit UV- Licht.

In der Abbildung 51 sieht man den Lambdascan bei der Bestrahlung mit Grünlicht mit der Wellenlänge 514nm. Sehr gut ist zu sehen, dass bei 670nm also dem Emissionsbereich des Chlorophylls sehr wenig emittiert wird und die Peaks bei weitem nicht so groß sind wie bei der Abbildung 49 a. Die Peaks, welche sich bei ungefähr 570 nm und 635 nm befinden, sind dagegen sehr viel höher. Diese könnten einen Hinweis darauf geben, dass sich in jenen Ausschnitten des Flechtenthallus ein sekundärer Metabolit befindet. Allerdings beinhalten Cyanobakterien auch noch andere Farbpigmente, welche eine andere Emissionswellenlänge als Chlorophyll haben. Somit kann dies auch einfach ein anderes Farbpigment sein wie zum Beispiel das Phycocyanin.

Es ist sehr auffällig, dass sich die Lambdascans der Abbildung 49 a und c und Abbildung 51 a sehr stark voneinander unterscheiden. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die beiden Scans mit unterschiedlichen Wellenlängen bestrahlt wurden. Deswegen sind andere Moleküle beziehungsweise Teile des Moleküls zur Fluoreszenz angeregt worden.

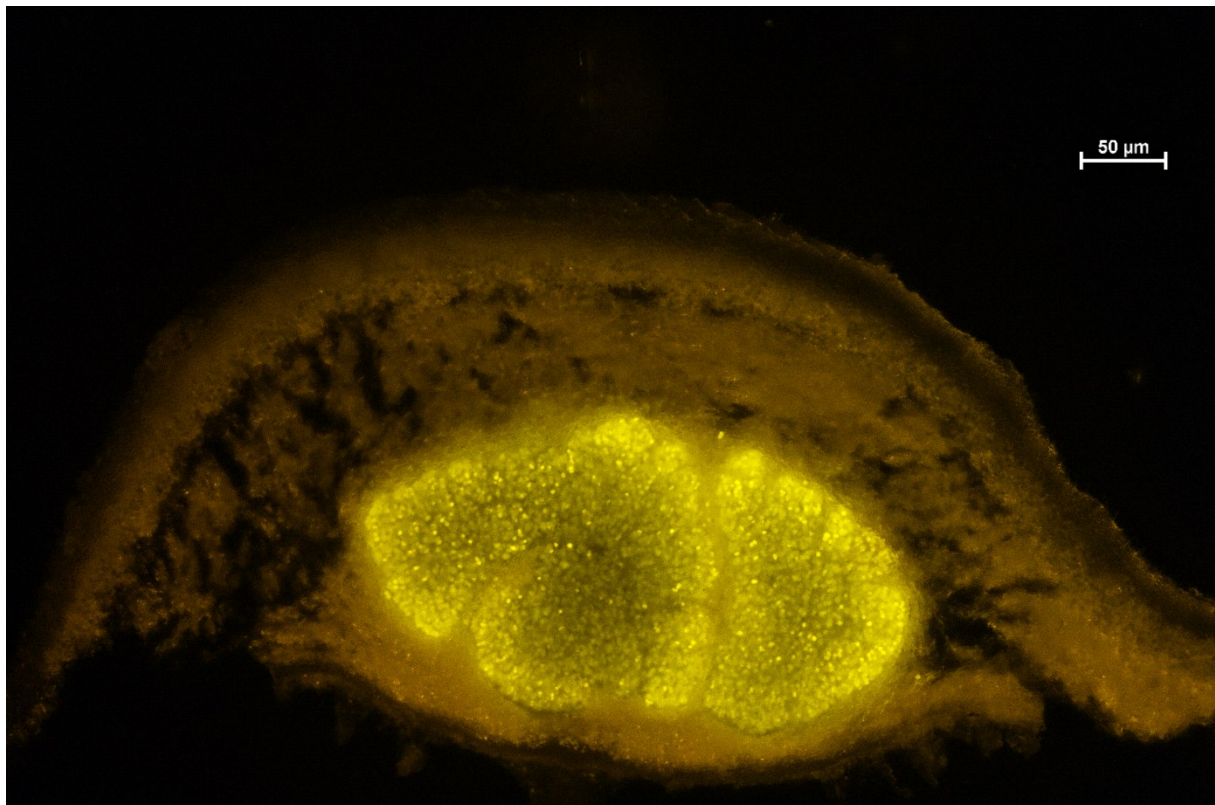


Abbildung 50. Fluoreszenzemissionen der Flechte *Lobaria pulmonaria* bei Bestrahlung mit grünem Licht. Es ist ein großer Algeneinschluss ein sogenanntes Cephalodium zu erkennen, welcher bei *Lobaria pulmonaria* sehr häufig vorkommen. Diese bestehen meist aus dem Cyanobakterium *Nostoc*. Man erkennt diesen sehr gut an dem hell leuchtenden gelben Areal. Außerdem ist zu erkennen, dass die unter UV- Licht sehr stark emittierende Algenschicht dies unter grünem Licht nicht tut.

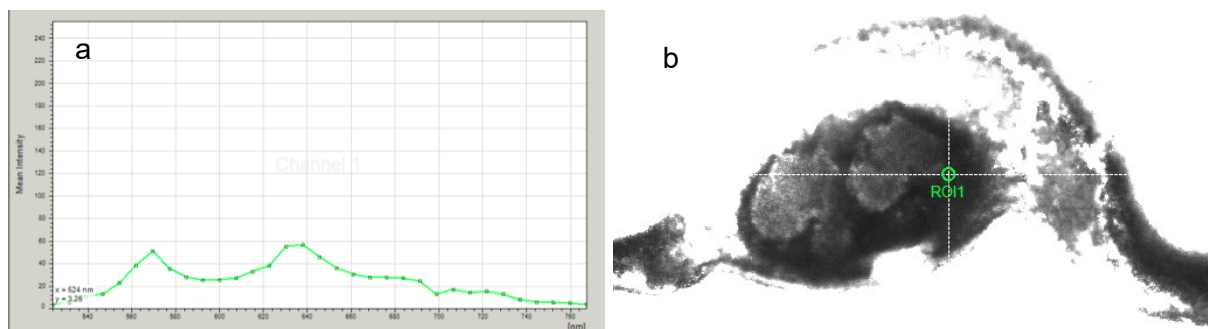


Abbildung 51. In a erkennt man den Lambdascan der Region b bei Grünlicht Bestrahlung. Dabei sieht man auf a Peaks bei 570 nm und 635 nm. Diese 2 Bilder sind alle Aufnahmen der Flechte *Lobaria pulmonaria*.

4.4.2. *Pseudovernia furfuracea*

Die Flechte *Pseudovernia furfuracea* enthält die sekundären Metabolite Atranorin, Chloratranorin und Physodsäure.

UV-Licht

In Abbildung 52. Fluoreszenzemissionen der Flechte *Pseudovernia furfuracea* bei Bestrahlung mit UV- Licht. Man erkennt in Blau die gesamte Medulla, dabei gibt es homöomer verteilte Algen im ganzen Thallus. Diese erkennt man an den roten Stellen im Flechtenquerschnitt. Ganz unten am Bild kann man ein kleines Stück von der Oberfläche der Flechte erkennen. In diesem Fall kann man leider nicht genau eine obere und untere Rindenschicht wahrnehmen. Diese erfasst man dafür sehr gut auf den Elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Abbildung 45.

Abbildung 53 a zeigt einen Lambdascan der Flechte *Pseudovernia furfuracea* bei der Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 405nm. Dabei erkennt man den Chlorophyllemissionspeak bei 670nm, jedoch auch noch weitere, bei 450nm, 470nm und 490nm. Dabei entsprechen alle diese Peaks der Farbe Blau. Auf der Abbildung 53 c stellt man einen Lambdascan derselben Flechte bei Bestrahlung mit der gleichen Wellenlänge wie auf a fest. Hier sieht man allerdings nur sehr kleine Peaks bei 460nm, zwei breite Peaks zwischen 490nm und 500nm, den zweiten zwischen 530nm und 560nm und den Chlorophyllemissionspeak bei 670nm. Dabei entspricht 490nm der Farbe Blau, der breite Peak zwischen 490nm und 500nm Grün und der Peak zwischen 530nm und 560nm der Farbe Gelb.

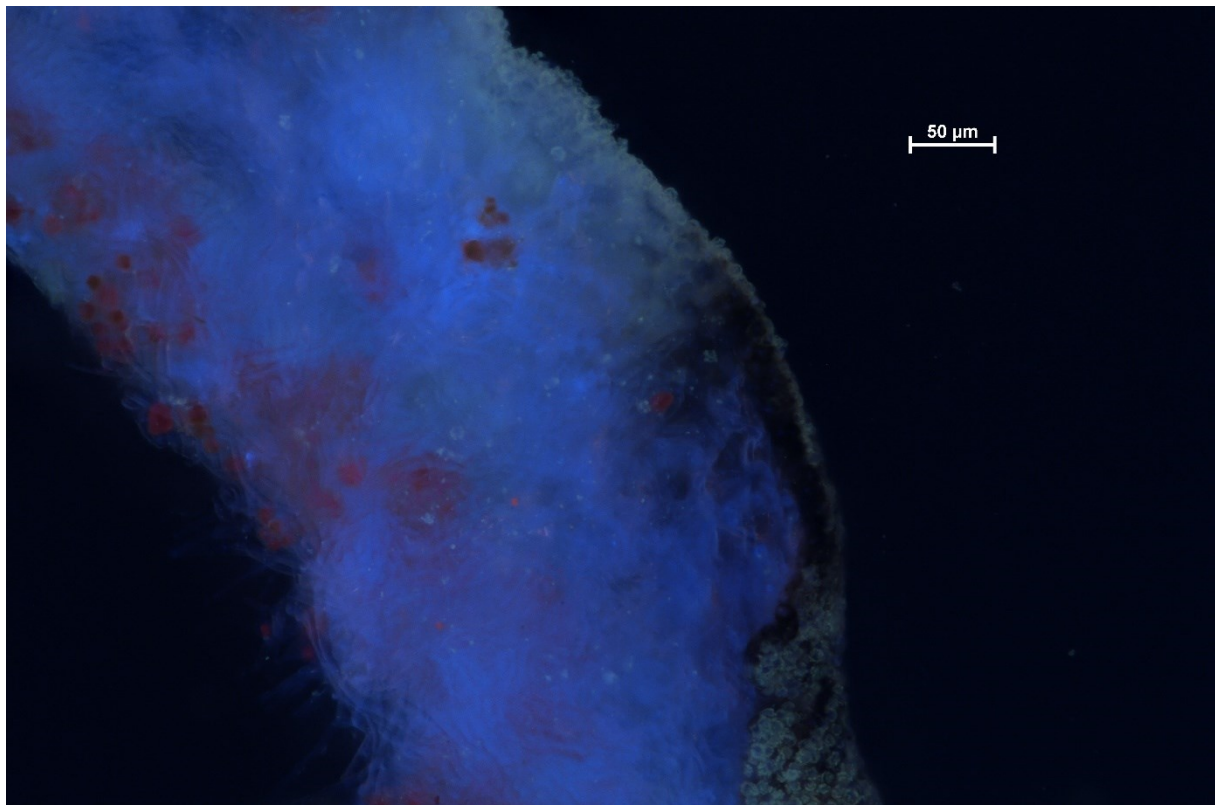


Abbildung 52. Fluoreszenzemissionen der Flechte *Pseudovernia furfuracea* bei Bestrahlung mit UV- Licht. Man erkennt in Blau die gesamte Medulla, dabei gibt es homöomer verteilte Algen im ganzen Thallus. Diese erkennt man an den roten Stellen im Flechtenquerschnitt. Ganz unten am Bild kann man ein kleines Stück von der Oberfläche der Flechte erkennen.

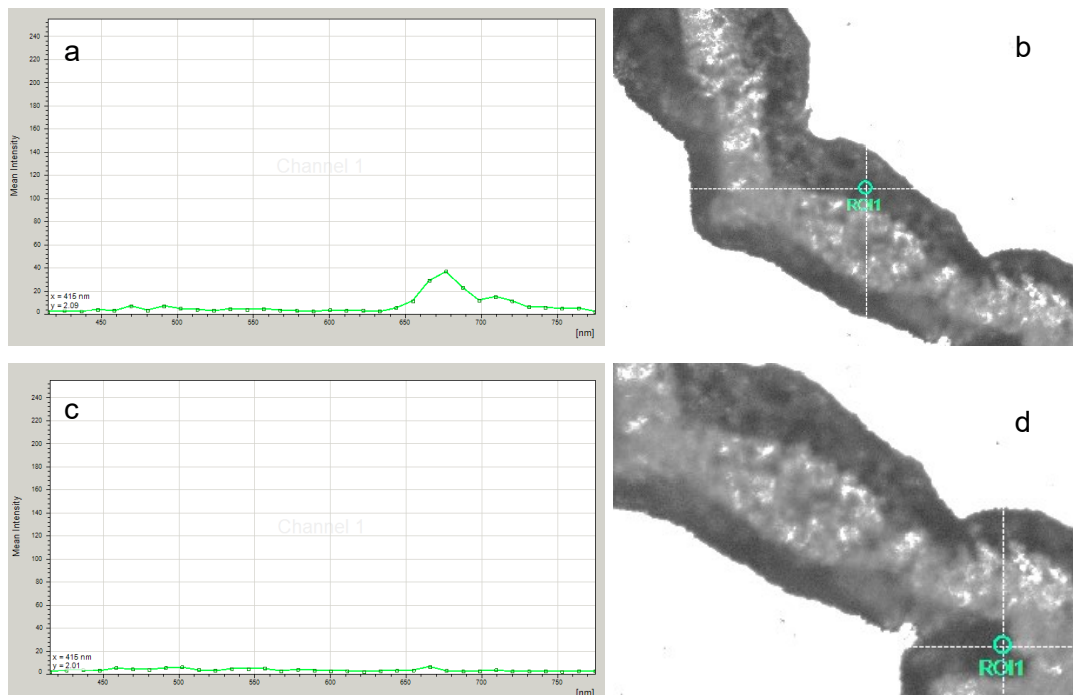


Abbildung 53. In a erkennt man den Lambdascan der Region b mit UV-Licht Bestrahlung. Dabei sieht man auf a mehrere kleine Peaks, bei 450nm, 470nm, 490nm und einen bei 670nm. In c erkennt man den Lambdascan der Region d mit UV-Licht Bestrahlung. Dabei entdeckt man auf c nur sehr kleine Peaks bei 460nm und zwei breite Peaks von 490nm bis 500 nm und von 530nm bis 560nm sowie einen bei 67 nm. Diese 4 Bilder sind alle Aufnahmen der Flechte *Pseudovernia furfuracea*.

4.4.3. *Usnea dasypoga*

Die Flechte *Usnea dasypoga* enthält den sekundären Metabolit Usninsäure.

UV-Licht

In Abbildung 54 entdeckt man die Fluoreszenzemissionen der Flechte *Usnea dasypoga* bei der Bestrahlung mit UV-Licht. Dabei sind die einzelnen Schichten deutlich zu erkennen. Außen sieht man die äußere Rindenschicht, diese emittiert sehr stark hellblaues bis grünlich-türkises Licht. Darunter kann man in Rot die Algenschicht ausmachen. Die direkt darauffolgende Medulla ist etwas dunkler und lässt erahnen, dass sie aus einem lockeren Hyphengeflecht besteht. Der Mittelstrang emittiert dann wieder stärker hellblaues Licht.

In Abbildung 55 a erkennt man den Lambdascan des Mittelstrangs der Flechte *Usnea dasypoga*. Man sieht einen sehr breiten Peak zwischen 430nm und 510nm und einen kleinen bei 525nm. Der breite Peak entspricht den Farben Blau bis Grün. Und der Peak bei 525nm entspricht der Farbe Grün. Auf Abbildung 55 c sieht man den Lambdascan der Algenschicht der Flechte *Usnea dasypoga*. Dabei bemerkt man einen kleinen Peak bei 670nm, welcher der Emissionspeak von Chlorophyll ist. Der breite Peak zwischen 440nm und 550nm entspricht den Farben Blau und Grün. Diese blau- grünliche Farbe kann man auch sehr gut wie oben erwähnt auf der Abbildung 54 feststellen.

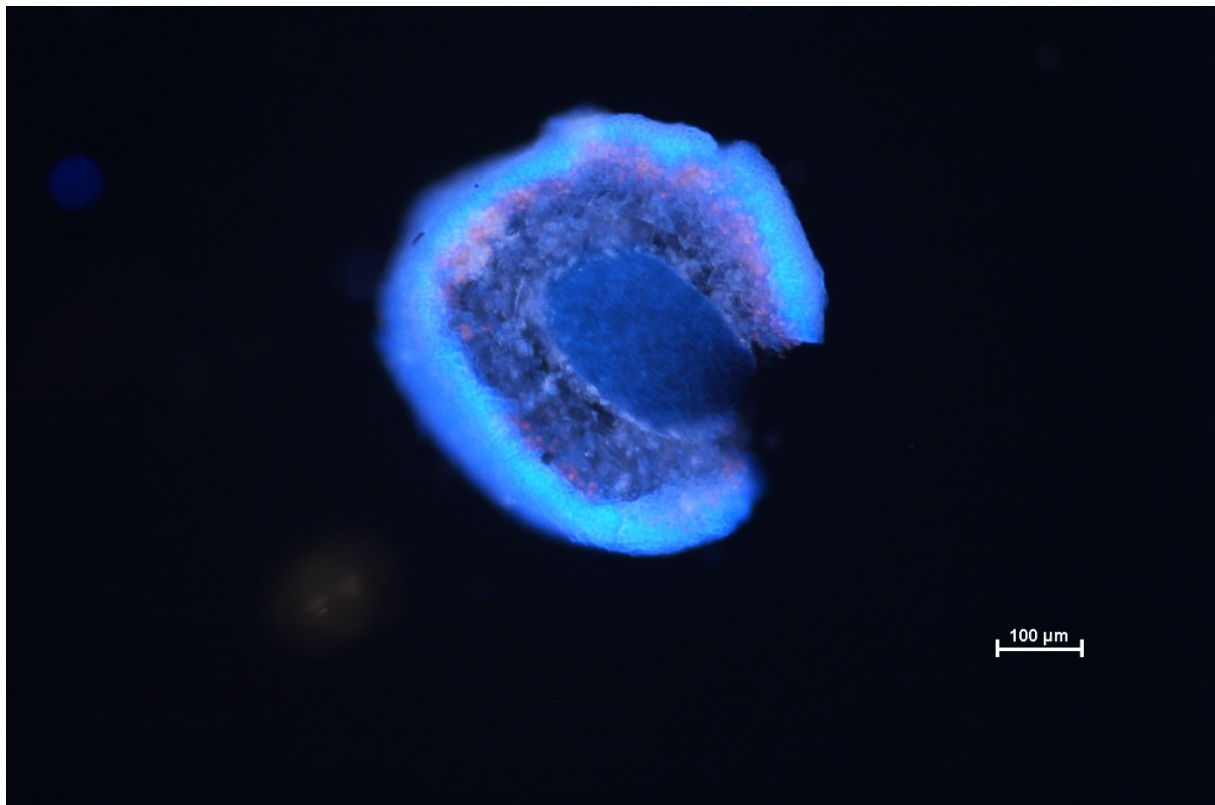


Abbildung 54. Fluoreszenzemissionen der Flechte *Usnea dasypoga* bei Bestrahlung mit UV- Licht. In hellen blau erkennt man sehr gut die äußere Rindenschicht. Darunter liegt die leicht rot fluoreszierende Algenschicht. Die Medulla ist etwas dunkler und man kann gut erahnen, dass sie aus einem lockeren Hyphengeflecht besteht. Der Mittelstrang fluoresziert wieder etwas heller blau.

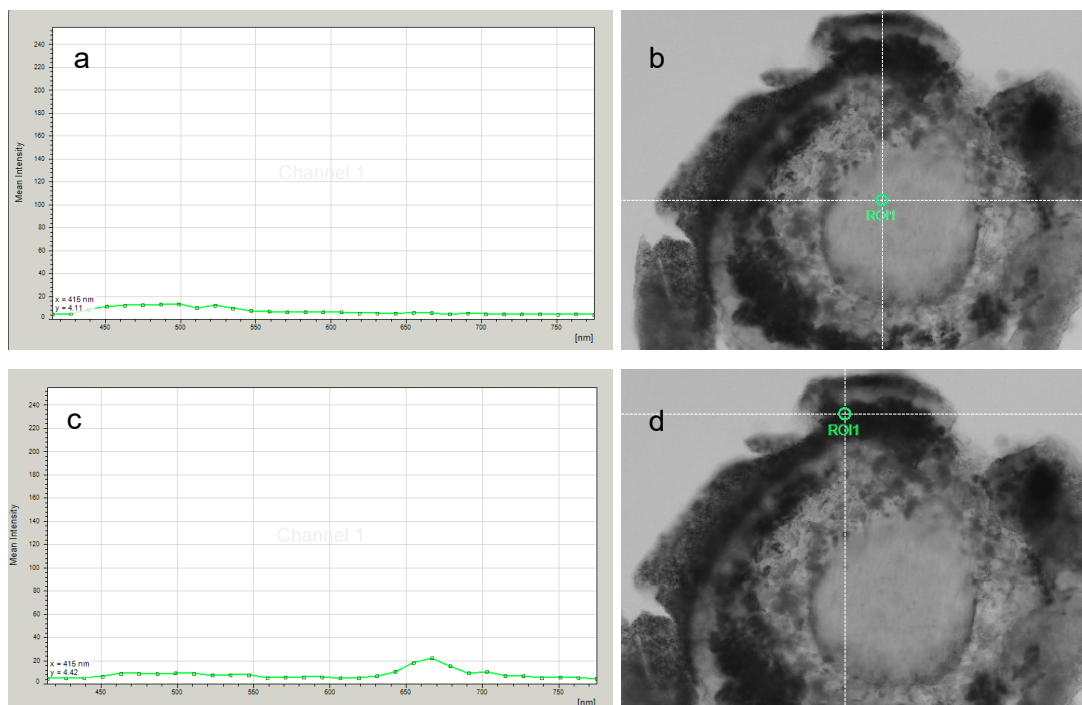


Abbildung 55. In a erkennt man den Lambdascan der Region b mit UV-Licht Bestrahlung. Dabei sieht man auf a einen sehr breiten Peak zwischen 430nm und 510nm und einen kleinen bei 525nm. In c erkennt man den Lambdascan der Region d mit UV-Licht Bestrahlung. Dabei entdeckt man auf c sehr eindeutig einen Peak bei 670nm und einen breiten Peak zwischen 440nm und 550nm. Diese 4 Bilder sind alle Aufnahmen der Flechte *Usnea dasypoga*.

4.4.4. *Umbilicaria hirsuta*

Die Flechte *Umbilicaria hirsuta* enthält den sekundären Metabolit Gyrophorsäure.

UV- Licht

In der Abbildung 56 sieht man die Fluoreszenzemissionen der Flechte *Umbilicaria hirsuta* bei der Bestrahlung mit UV- Licht. Es gibt eine ziemlich einheitliche Emission von oberer Rinde, Medulla und unterer Rinde bzw Rhizinen. Das einzige, was sich eindeutig absetzt, ist die Algenschicht. Die Algen sind sehr gut zu erkennen, an der roten Emission des Chlorophylls.

Wenn man sich nun den Lambdascan Abbildung 57 a anschaut, sieht man sehr gut die Emission des Chlorophylls bei 670nm. Auf c sieht man keine Emission vom Chlorophyll, aber einen breiten Peak zwischen 430nm und 500nm. Dies entspricht den Farben Blau bis leicht grünlich, was auch gut auf der Abbildung 56 zu erkennen ist.

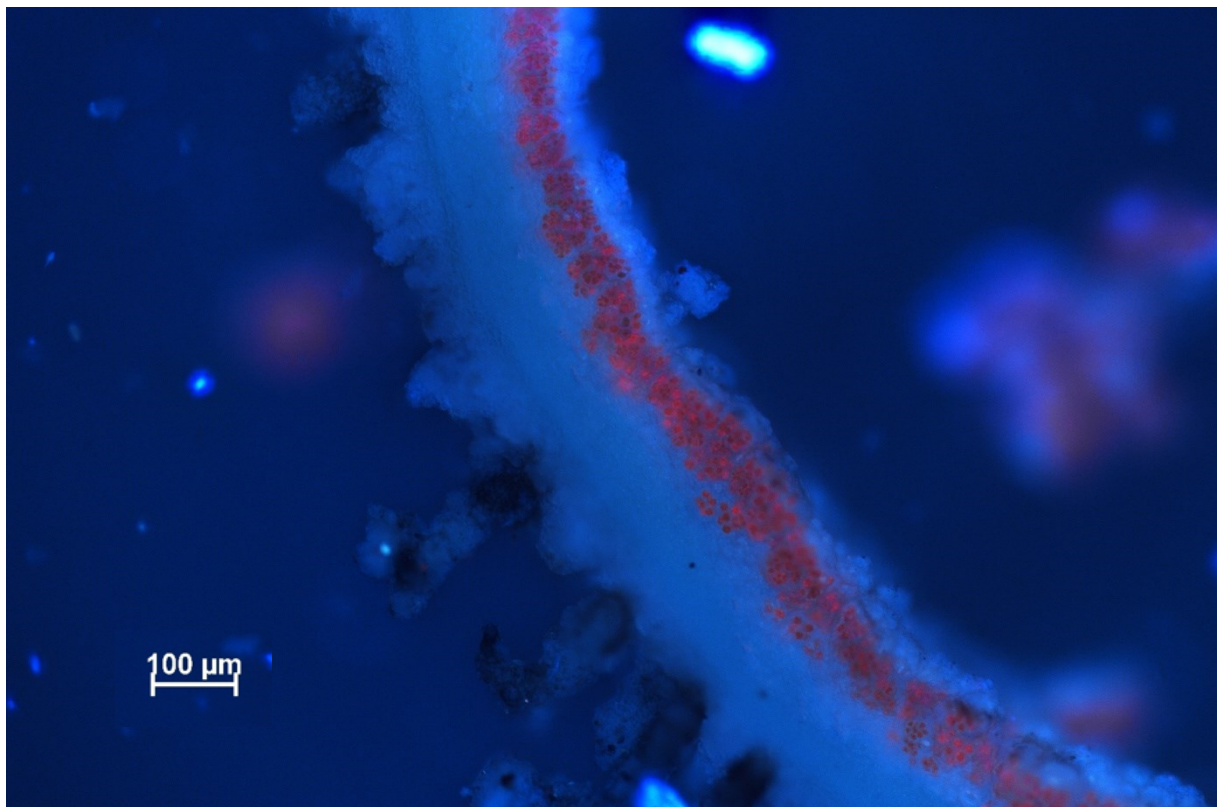


Abbildung 56. Fluoreszenzemissionen der Flechte *Umbilicaria hirsuta* bei Bestrahlung mit UV- Licht. In hellen blau erkennt man sehr gut die obere Rindenschicht. Darunter liegt die rot fluoreszierende Algenschicht. In Hinsicht auf die Emissionsfarben lässt sich fast kein Unterschied zwischen der äußeren Rinde, der Medulla und der unteren Rinde beziehungsweise der Rhizine erkennen.

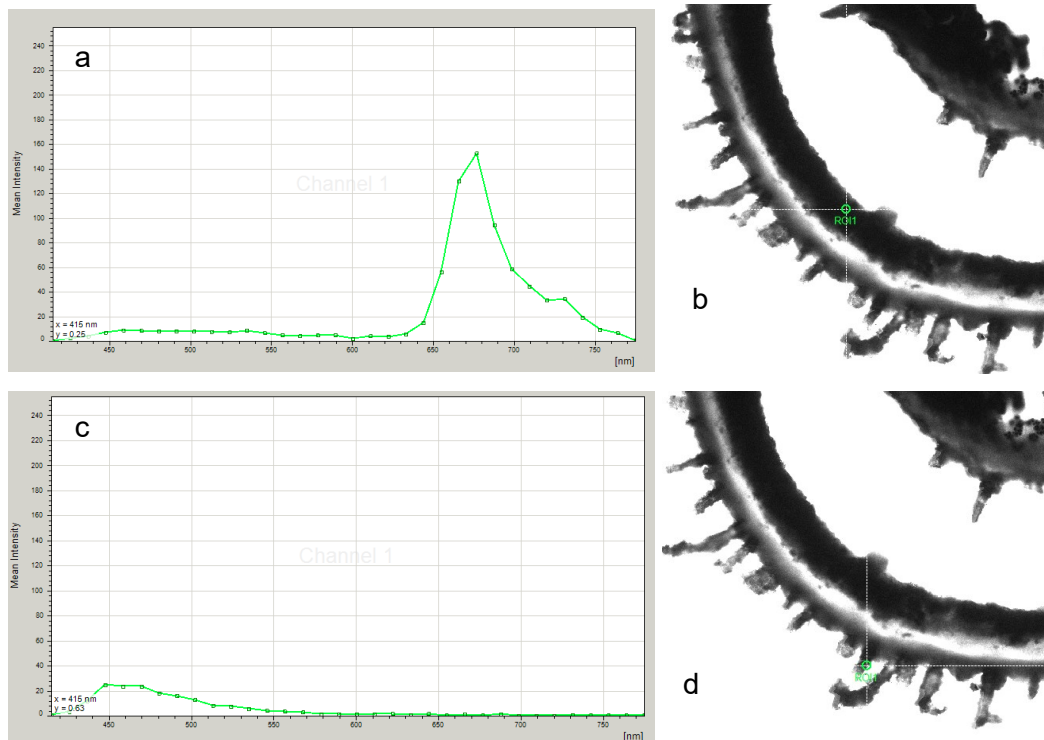


Abbildung 57. In a erkennt man den Lambdascan der Region b mit UV-Licht Bestrahlung. Dabei sieht man auf a einen sehr hohen Peak mit 670nm. In c erkennt man den Lambdascan der Region d mit UV-Licht Bestrahlung. Dabei entdeckt man auf c einen breiten Peak zwischen 430nm und 500nm. Diese 4 Bilder sind alle Aufnahmen der Flechte *Umbilicaria hirsuta*.

Blaulicht

Auf der Abbildung 58 bemerkt man die Fluoreszenzemissionen der Flechte *Umbilicaria hirsuta* bei der Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 470nm. Ganz am oberen Ende erkennt man eine sehr dünne obere Rinde, welche gelblich grün emittiert, darunter die breitere rot leuchtende Algenschicht, gefolgt von der grün emittierenden Medulla und Rhizinen.

In Abbildung 59 a und c sieht man die Ergebnisse der Lambdascans. Dabei ist in a sehr schön die Fluoreszenz der Algen bei 670nm zu erkennen. Bei c kann man beobachten, dass in der Medulla eine Verbindung bei 525nm emittiert. Diese Wellenlänge entspricht Grün, wie man auf Abbildung 58 auch schon sehen konnte. Diese Emissionswellenlänge könnte ein Hinweis auf die Anwesenheit eines sekundären Metaboliten sein.

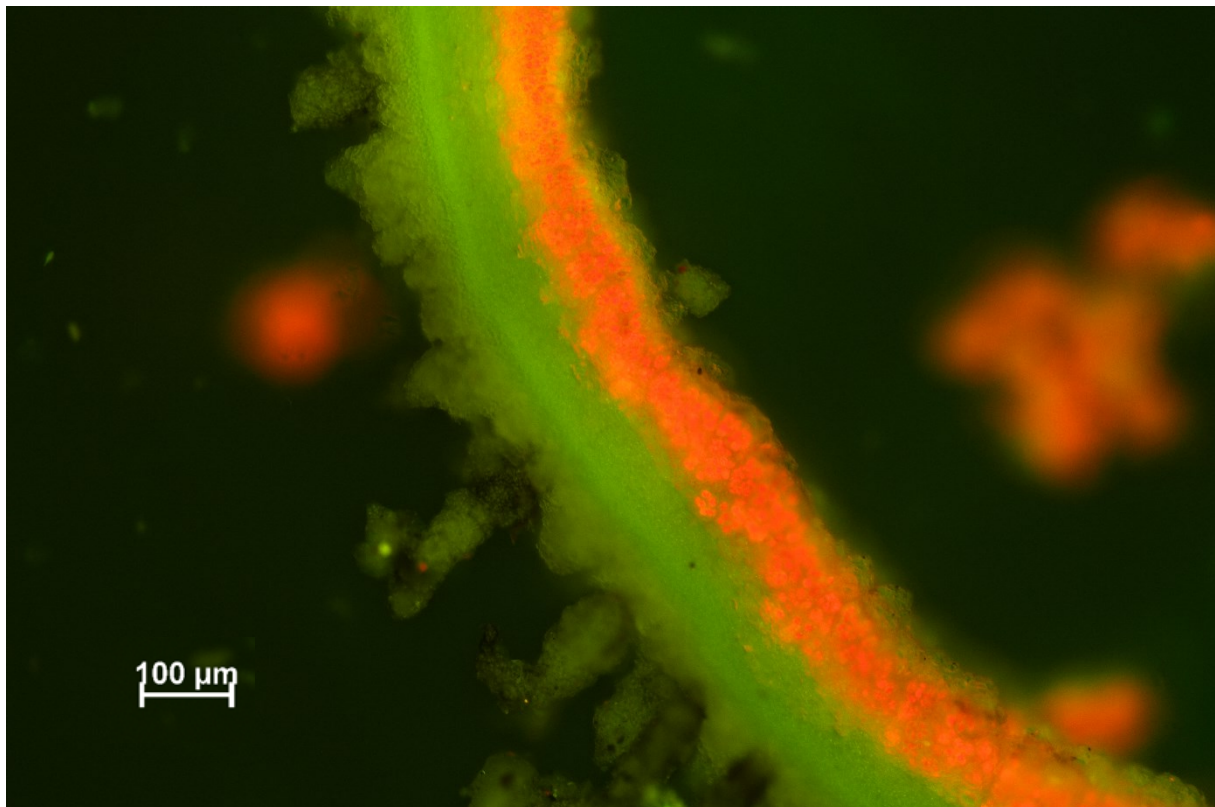


Abbildung 58. Fluoreszenzemissionen der Flechte *Umbilicaria hirsuta* bei Bestrahlung mit Blau- Licht. In einem gelblich grün erkennt man die obere Rinde. Darunter liegt die rot Fluoreszierende Algenschicht. Gefolgt von der grün Emittierenden Medulla und Rhizinen.

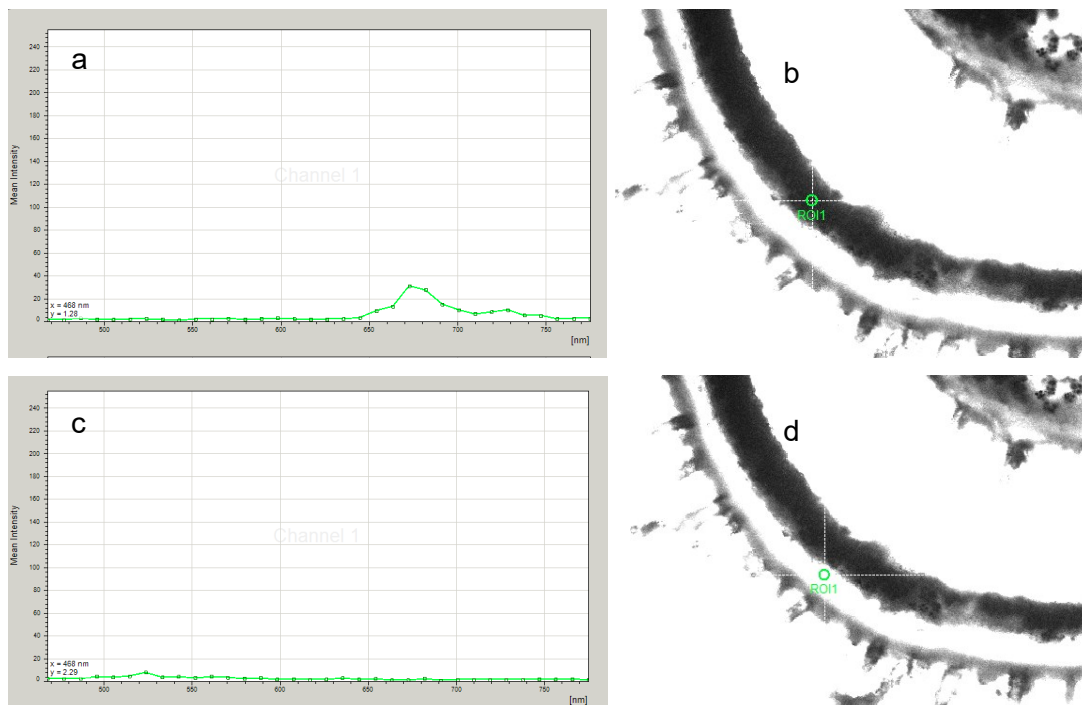


Abbildung 59. In a erkennt man den Lambdascan der Region b mit Blaulicht Bestrahlung. Dabei sieht man auf a einen Peak bei 670nm. In c erkennt man den Lambdascan der Region d mit Blaulicht Bestrahlung. Dabei entdeckt man auf c einen kleinen Peak bei 525nm. Diese 4 Bilder sind alle Aufnahmen der Flechte *Umbilicaria hirsuta*.

4.4.5. *Cladonia foliacea*

Die Flechte *Cladonia foliacea* enthält die sekundären Metabolite Fumarprotocetrarsäure und Usninsäure.

UV-Licht

In der Abbildung 60 erkennt man die Emissionen der Flechte *Cladonia foliacea*, wenn man sie mit UV- Licht der Wellenlänge 365nm bestrahlt. Ganz oben stellt man eine hellblaue nur schwach emittierende Schicht fest. Dies ist die obere Rindenschicht, welche an manchen Flecken rote Stellen aufweist, was auf die Anwesenheit von Algen hindeutet. Darunter sieht man in orange-rot die Emission der Algen, gefolgt von der in ganz hellem Blau emittierenden Medulla. Und der etwas stärker emittierenden unteren Rindenschicht.

Auf Abbildung 61 a, c und e entdeckt man die gemessenen Lambdascans. Dabei ist in a ein Lambdascan, welcher in der Algenschicht aufgenommen worden ist, abgebildet, deswegen auch der große Peak bei 670nm, welcher der Emission der Algen entspricht. Man kann auf diesem Lambdascan allerdings auch weitere Peaks beobachten, nämlich bei 450nm, einen breiten Peak zwischen 480nm und 520nm, einen bei 560nm und einen kleinen bei 610nm. Diese einzelnen Wellenlängen entsprechen Farben, 450nm entspricht der Farbe Blau, sowohl der Peak von 480nm bis 520nm und der bei 560nm entsprechen der Farbe Grün. 610nm ist gleichzusetzen mit Orange. In der Abbildung 60 sieht man in der Algenschicht alles nur in orange- rot, der Grund dafür ist, dass die rote Algenemission sehr viel stärker ist. In Abbildung 61 c sieht man den Lambdascan der oberen Rindenschicht, dabei wurde ein Punkt gewählt, an dem auch die Emission der Algen bei der Wellenlänge von 670nm sichtbar ist. Allerdings gibt es noch weitere Peaks zu sehen, bei 470nm, zwischen 480nm und 520nm einen breiten Peak. Dabei entspricht die Wellenlänge 470nm Blau, der Peak von 480nm bis 520nm und der bei 525nm Grün. Jener bei 580nm ist gleich der Farbe Gelb. In dem Fluoreszenzbild der Abbildung 60 sieht man die obere Rinde hellblau, wahrscheinlich, weil der blaue Peak bei 470nm der höchste ist. Auf der Abbildung 61 e ist der Lambdascan der unteren Rindenschicht abgebildet. Im abgebildeten Schnitt waren auch in der unteren Rindenschicht Algen eingebettet, dies erkennt man durch den Peak bei 670nm. Es sind allerdings noch weitere Peaks zu erkennen, nämlich bei 450nm und 540nm sowie zwei breitere Peaks zwischen 470nm und 510nm und einen zwischen 580nm und 600nm. Die Wellenlängen entsprechen folgenden Farben:

450nm entspricht Blau, 470nm bis 510nm Blaugrün, 540nm entspricht Grün und 580nm bis 600nm entspricht Gelb.

Es ist auffällig, dass sich in jeder einzelnen Schicht ein breiter Peak irgendwo zwischen 470nm und 520nm befindet. Eventuell könnte dies ein Hinweis auf einen sekundären Metaboliten sein. Dies kann aber noch mit der Flechte *Cladonia furcata* abgeglichen werden, weil diese genau die gleichen sekundären Metabolite enthält. Und weiters kann man eine Unterscheidung machen aufgrund des Vorhandenseins von Unsinsäure, da diese auch in der Flechte *Usnea dasypoga* und *Usnea antarctica* vorhanden ist.

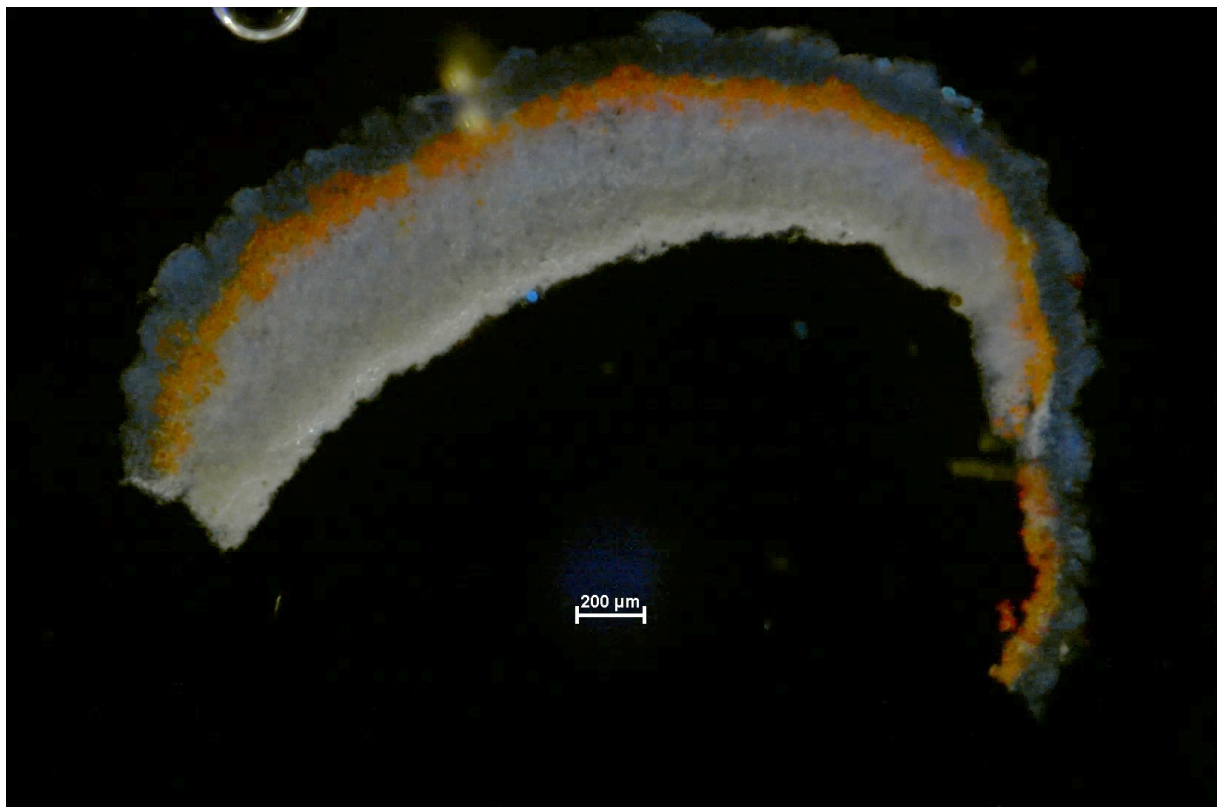


Abbildung 60. Fluoreszenzemissionen der Flechte *Cladonia foliacea* bei Bestrahlung mit UV- Licht. In blau erkennt man die obere Rindenschicht. Diese emittiert schwach hat aber an verschiedenen Stellen rote Stellen, welche auf das Vorhandensein von Algen hinweisen. Darunter erkennt man in orange- rot die Emission der Algen. Gefolgt von der Medulla welche in sehr hellen Blau emittiert und der unteren Rinde welche noch ein bisschen heller ist.

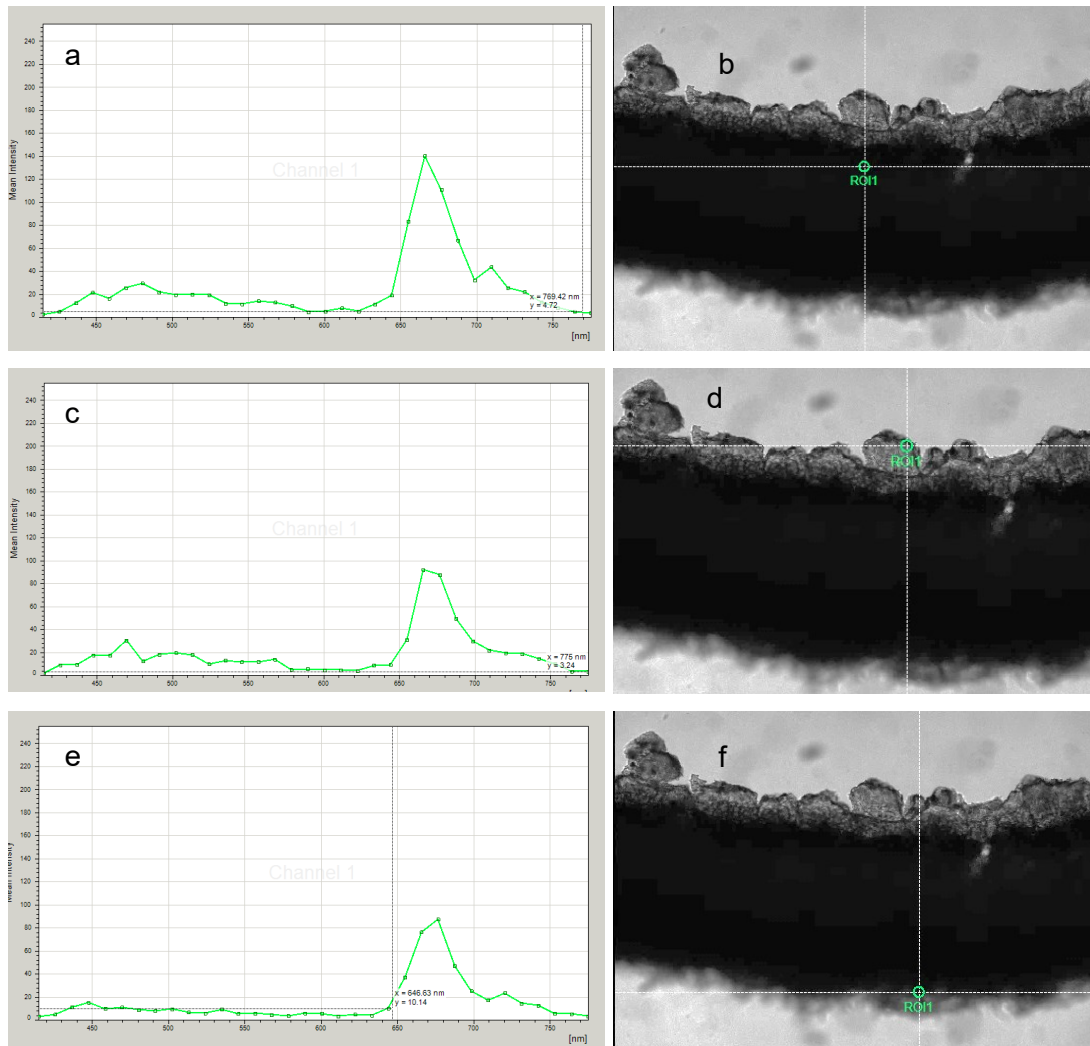


Abbildung 61. In a erkennt man den Lambdascan der Region b mit UV-Licht Bestrahlung. Dabei sieht man auf a einen kleinen Peak bei 450nm, einen breiten Peak zwischen 480nm und 520nm, einen weiteren bei 560nm einen bei 610nm und einen bei 670nm. In c erkennt man den Lambdascan der Region d mit UV-Licht Bestrahlung. Dabei erkennt man auf c einen Peak bei 470nm, einen breiten Peak zwischen 480nm und 520nm einen zweiten breiten Peak zwischen 525nm und 580nm und einen Peak bei 670nm. In e erkennt man den Lambdascan der Region f mit UV-Licht bestrahlt. Man erkennt auf e einen Peak bei 450nm, einen breiten Peak zwischen 470nm und 510nm einen Peak bei 540nm, einen breiten zwischen 580nm und 600nm und einen bei 670nm. Diese 6 Bilder sind alle Aufnahmen der Flechte *Cladonia foliacea*.

Grünlicht

Auf Abbildung 62 erkennt man die Fluoreszenzemissionen der Flechte *Cladonia foliacea* bei der Bestrahlung mit grünem Licht. Man sieht, dass die obere Rindenschicht nur schwache Emission zeigt, die Medulla dagegen etwas mehr und die untere Rindenschicht am stärksten emittiert. Der gesamte Flechtenquerschnitt emittiert allerdings in einer sehr ähnlichen Farbe, welche man als gelbliches grün beschreiben kann.

In der Abbildung 63 a sieht man den Lambdascan der Algenschicht der *Cladonia foliacea* bei der Bestrahlung mit grünem Licht. Dabei entdeckt man einige Peaks. Am

stärksten ausgeprägt ist der Peak bei 670nm. Das ist der Chlorophyllpeak. Weiterhin findet man bei 530nm, zwischen 540nm und 570nm und bei 605nm. Wenn man diesen Wellenlängen wieder Farben zuordnet erhält man für den Peak bei 530nm und dem von 540nm bis 570nm die Farbe Grün und für den bei 605nm die Farbe Orange. Auf der Abbildung 63 c sieht man den Lambdascan der oberen Rindenschicht. Es ist wieder der charakteristische Emissionspeak des Chlorophylls bei 670nm zu sehen. Jedoch sieht man davor auch kleine Peaks bei 550nm, 575nm, 590nm und 610nm. Hier entspricht dann 550nm Grün, 575nm und 590nm der Farbe Gelb und 610nm Orange.

Es fällt auf, dass die Peaks der Lambdascans in der Abbildung 63 a und c sehr unterschiedlich sind. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich in den zwei Schichten unterschiedliche sekundäre Metabolite befinden.

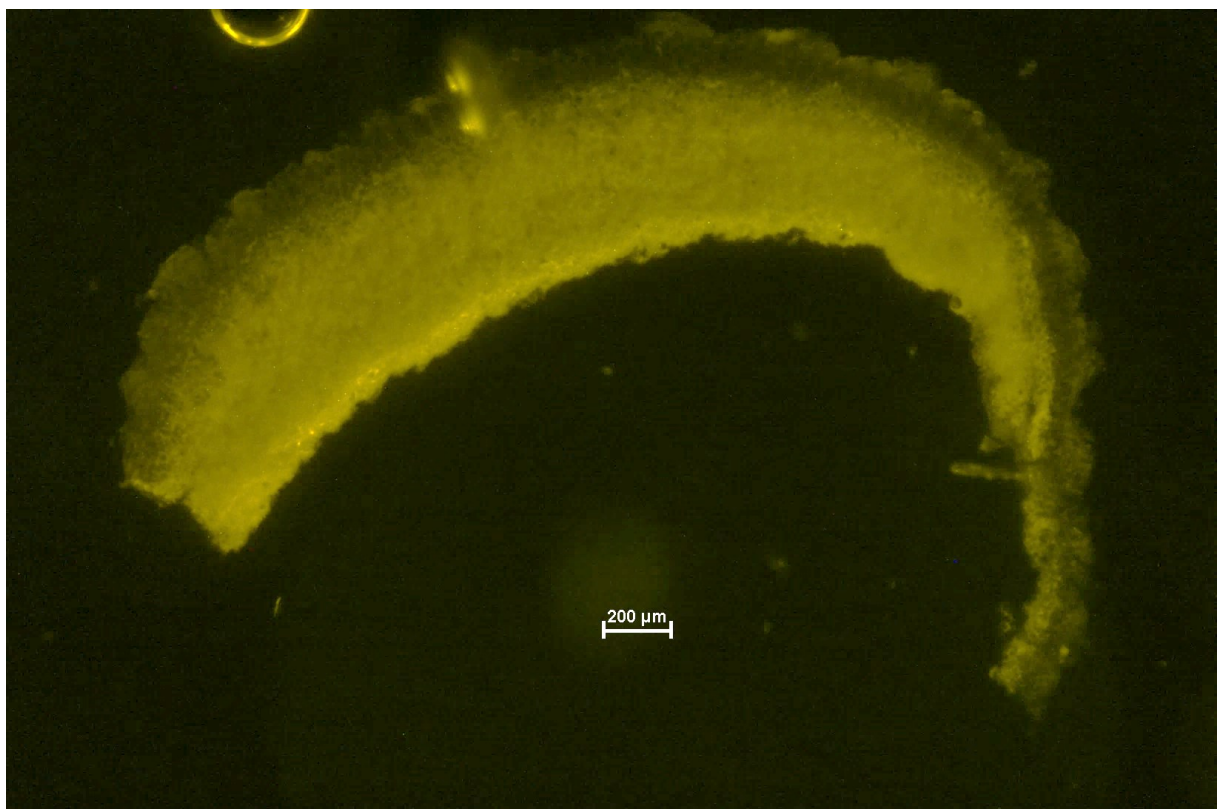


Abbildung 62. Fluoreszenzemissionen der Flechte *Cladonia foliacea* bei Bestrahlung mit Grünlicht. Man erkennt, dass der gesamte Querschnitt des Flechtenthallus in gelblichgrün emittiert. Jedoch emittiert die obere Rinde deutlich weniger stark als die untere Rinde. Dazwischen befindet sich die Medulla, welche in der in Hinsicht auf die Stärke der Emission etwas weniger als die untere Rindenschicht emittiert allerdings deutlich mehr als die obere Rinde.

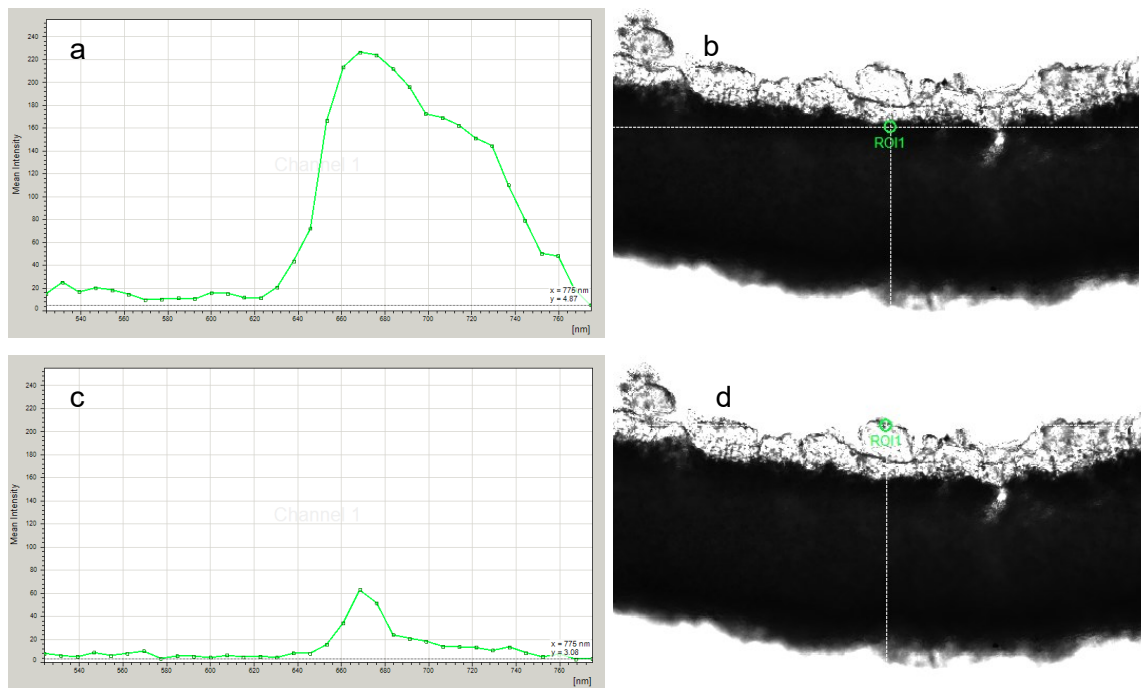


Abbildung 63. In a erkennt man den Lambdascan der Region b mit Grünlicht Bestrahlung. Dabei sieht man auf a einen Peak bei 530nm einen breiten Peak von 540nm bis 570nm, einen bei 605nm und einen bei 670nm. In c erkennt man den Lambdascan der Region d mit Grünlicht Bestrahlung. Dabei entdeckt man auf c einen Peak bei 550nm, einen bei 575nm einen bei 590nm einen bei 610nm und einen bei 670nm. Diese 4 Bilder sind alle Aufnahmen der Flechte *Cladonia foliacea*.

4.4.6. *Cladonia furcata*

Die Flechte *Cladonia furcata* enthält die sekundären Metabolite Fumarprotocetrarsäure und Usninsäure.

UV-Licht

In der Abbildung 64 erblickt man die Fluoreszenzemissionen der Flechte *Cladonia furcata* bei der Bestrahlung mit UV- Licht der Wellenlänge 365nm. Es ist außen, wenn man ganz genau schaut, eine sehr dünne äußere Rinde zu erkennen, welche leicht gelblich emittiert. Darunter liegen die Algen. In diesem Fall sind sie nicht in einer durchgehenden Schicht organisiert, sondern sie befinden sich an einzelnen nicht unbedingt miteinander verbundenen Stellen konzentriert. Diese Algen zeigen allerdings trotzdem die typische rote Emission des Chlorophylls. Auf die Algenschicht folgt weiter innen die weißlich hellblaue Medulla, und ganz innen ist eine blaue dicke innere Rindenschicht zu erkennen.

In Abbildung 65 a erkennt man den Lambdascan der Algenschicht der Flechte *Cladonia furcata*. Auf diesem kann man bei 670nm den Peak der Chlorophyllemission ausmachen. Weiters beobachtet man zwei breite Peaks, einen von 460nm bis 500nm

und den zweiten von 520nm bis 550nm. Dabei entspricht der erste der Farbe Blau und der zweite der Farbe Grün. Auf Abbildung 64 erkennt man die Algenschicht allerdings nur in rot-orange, dies ist der Fall, weil viel mehr rotes Licht emittiert wird. Die Abbildung 65 c zeigt den Lambdascan der unteren Rindenschicht. Der Peak der Chlorophyllemission ist viel kleiner aber noch zu sehen bei 670nm. Aber man sieht davor Peaks zwischen 440nm und 510nm und zwischen 530nm und 570nm, sowie einen kleinen bei 520nm. Der breite Peak zwischen 440nm und 510nm entspricht der Farbe Blau die anderen der Farbe Grün.

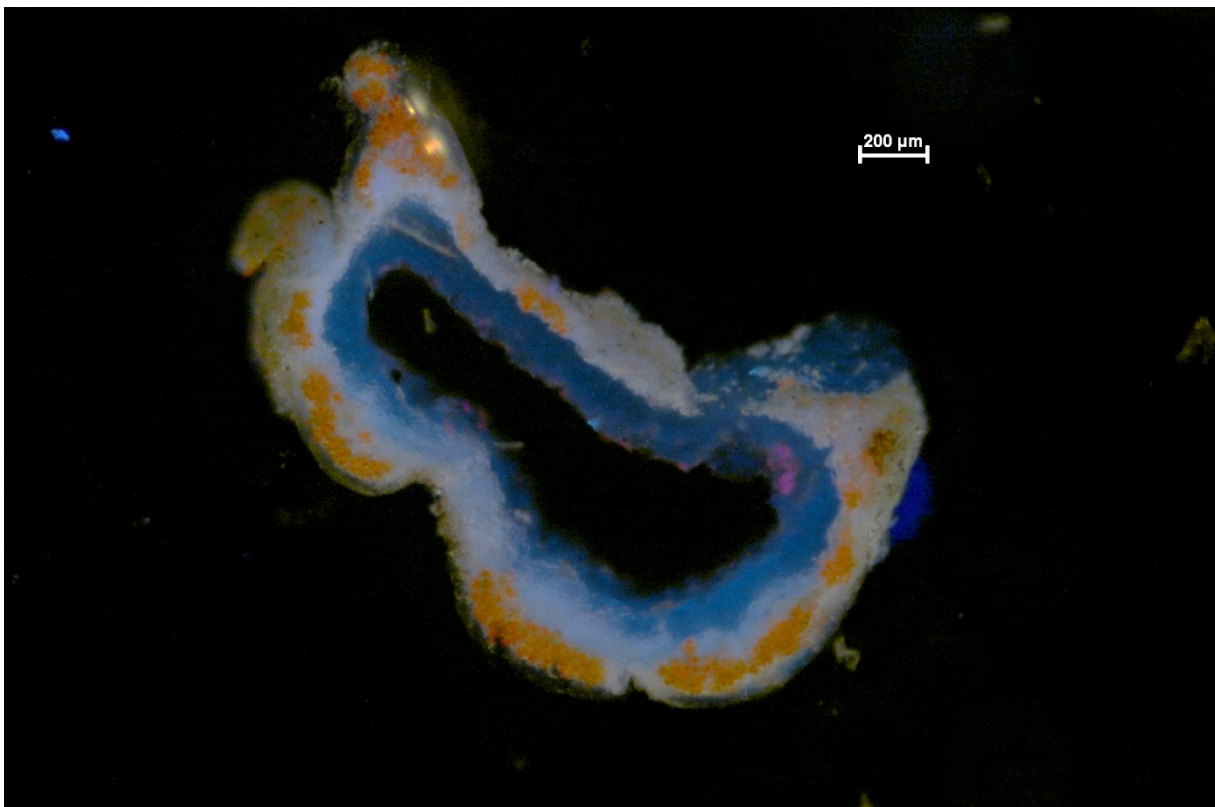


Abbildung 64. Fluoreszenzemissionen der Flechte *Cladonia furcata* bei Bestrahlung mit UV- Licht. In blau erkennt man die innere Rindenschicht, die darauffolgende weißlich hellblaue Schicht ist die Medulla. In orangerot erkennt man die Algen, welche in diesem Fall nicht in einer durchgehenden Schicht vorkommen, sondern an einigen Stellen konzentriert vorkommen. Die äußere Rindenschicht ist in diesem Fall nur schwer zu erkennen, weil sie nur sehr dünn ist.

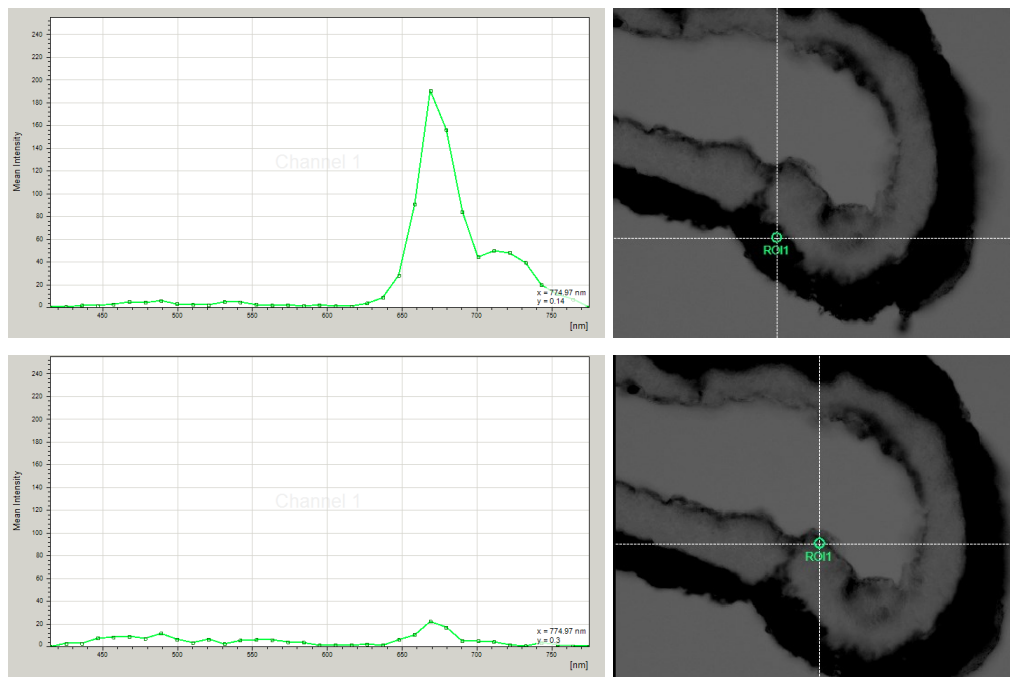


Abbildung 65. In a erkennt man den Lambdascan der Region b mit UV-Licht Bestrahlung. Dabei sieht man auf a zwei breite Peaks, einen von 460nm bis 500nm und den zweiten von 520nm bis 550nm und einen Peak bei 670nm. In c erkennt man den Lambdascan der Region d mit UV-Licht Bestrahlung. Dabei entdeckt man auf c zwei breite Peaks zwischen 440nm und 510nm und den zweiten von 530nm bis 570nm. Weiter Peaks liegen bei 520nm und bei 670nm. Diese 4 Bilder sind alle Aufnahmen der Flechte *Cladonia furcata*.

Grünlicht

Auf der Abbildung 66 erkennt man die Fluoreszenzemissionen bei Grünlicht Bestrahlung der Flechte *Cladonia furcata*. Dabei sieht man, dass der gesamte Flechtenquerschnitt in gelblichem Grün emittiert. Wenn man genau hinsieht, bemerkt man die obere Rindenschicht, welche nur sehr schwach emittiert. Darunter liegt die Medulla, diese emittiert, am stärksten. Ganz innen sieht man eine sehr schwach emittierende aber etwas dickere Schicht. Dies ist die innere Rindenschicht.

Abbildung 67 a zeigt den Lambdascan der Algenschicht der Flechte *Cladonia furcata* bei der Bestrahlung mit Grünlicht der Wellenlänge 515nm. Auf diesem Lambdascan sind zwei breite Peaks zu erkennen, der eine von 525nm bis 580nm und der zweite von 585nm bis 620nm. Dabei entspricht der erste Peak Grün und der zweite gelb-orange. Es gibt auch wieder den sehr großen Peak der Chlorophyllemission bei 670nm. Auf der Abbildung 67 c sieht man den Lambdascan der unteren Rindenschicht. Wieder entdeckt man bei 670nm den Chlorophyllpeak. Aber hier auch noch einen kleinen kurz vor dem Chlorophyllpeak bei 620nm, diese Wellenlänge entspricht der Farbe Orange. Weiters erkennt man 3 breite Peaks, den ersten von 525nm bis 550nm, den zweiten zwischen 550nm und 585nm und den dritten von 585nm bis 615nm. Der

erste entspricht der Farbe Grün, der zweite Gelbgrün und der dritte Gelborange. Wenn man die Abbildung 66 sieht, spiegeln sich darin die gemessenen Farben auch sehr gut wieder.

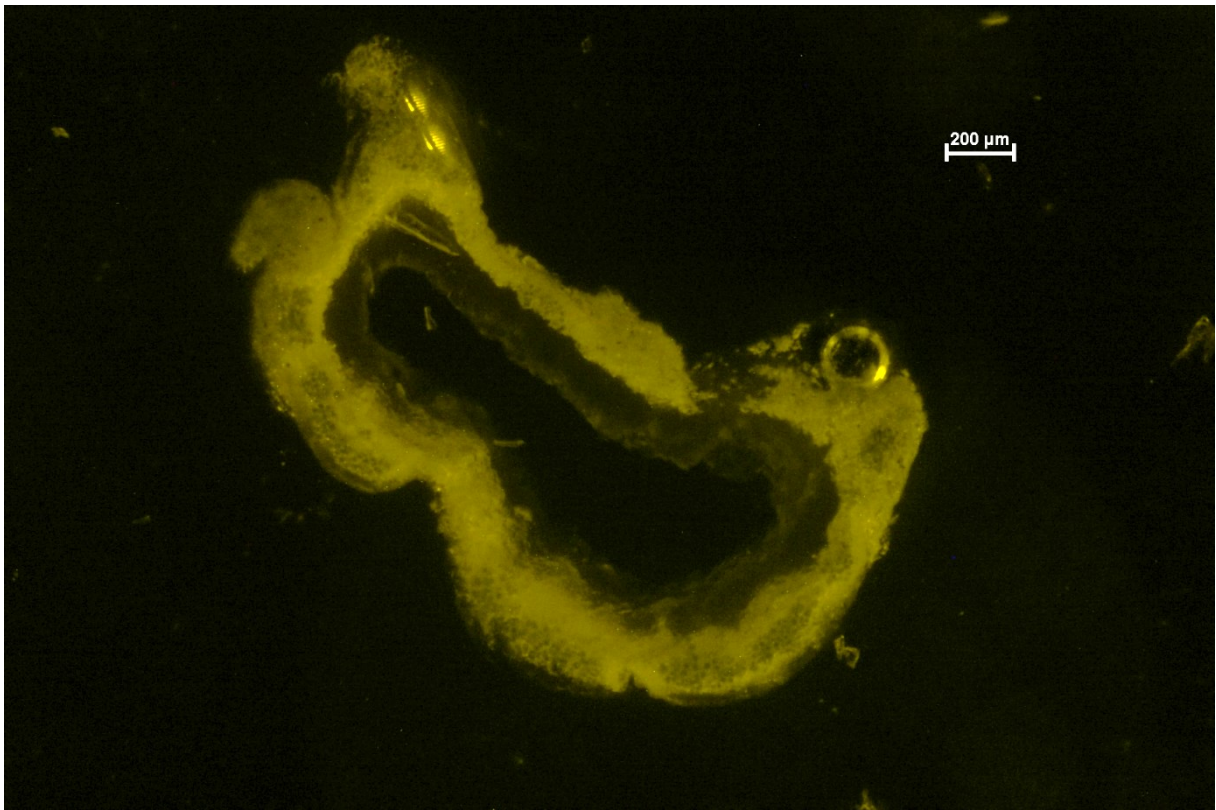


Abbildung 66. Fluoreszenzemissionen der Flechte *Cladonia furcata* bei Bestrahlung mit Grünlicht. Der gesamte Flechtenquerschnitt emittiert in einem gelblichen grün. Dabei ist zu erkennen, dass die innere und äußere Rindenschicht sehr schwach emittiert und die Medulla sehr viel stärker.

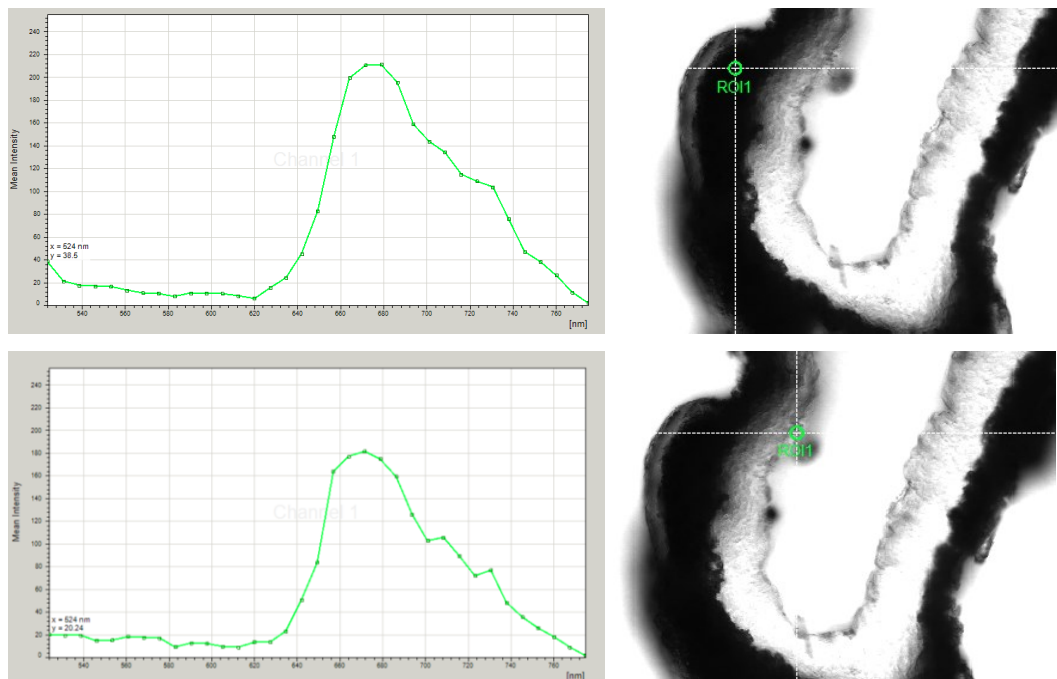


Abbildung 67. In a erkennt man den Lambdascan der Region b mit Grünlicht Bestrahlung. Dabei sieht man auf a zwei breite Peaks, einen von 525nm bis 580nm und den zweiten von 585nm bis 620nm und einen Peak bei 670nm. In c erkennt man den Lambdascan der Region d mit Grünlicht Bestrahlung. Dabei entdeckt man auf c drei breite Peaks zwischen 525nm und 550nm, den zweiten von 550nm bis 585nm und den dritten zwischen 585nm und 615nm. Zwei weitere Peaks liegen bei 620nm und 670nm. Diese 4 Bilder sind alle Aufnahmen der Flechte *Cladonia furcata*.

4.4.7. *Usnea antarctica*

Die Flechte *Usnea antarctica* enthält den sekundären Metaboliten Usninsäure.

UV- Licht

Abbildung 68 zeigt die Fluoreszenzemissionen der Flechte *Usnea antarctica* bei der Bestrahlung mit UV- Licht. Dabei erkennt man ganz außen eine relativ dicke äußere Rindenschicht, diese ist nur als blau- grüner dunkler Schatten zu erkennen. Darunter lassen sich vereinzelt rote Stellen erkennen (mit Pfeilen in Abbildung 68 markiert), diese zeigen wo sich die Algen aufhalten. Diese roten Stellen sind umrandet von einer dicken in hellblau bis türkis emittierenden Medulla. Ganz in der Mitte sieht man auch eine etwas gelblichere Schicht. Dies ist der Mittelstrang der Flechte.

Auf der Abbildung 69 a sieht man den Lambdascan der Flechte *Usnea antarctica* mit der Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 405nm. Dies ist eine Aufnahme der Algenschicht, da man sehr schön bei 670nm den Emissionspeak des Chlorophylls erkennen kann. Man erkennt allerdings noch weitere Peaks, einen bei 440nm dies entspricht der Farbe Blau und einen breiten Peak von 450nm bis 600nm, welcher Wellenlängen von Blau, Grün und Gelb enthält. Abbildung 69 c zeigt den Lambdascan

der gleichen Flechte mit der gleichen Wellenlänge, allerdings diesmal in der oberen Rindenschicht. Sofort fällt auf, dass die Chlorophyllemission gar nicht vorhanden ist, allerdings sieht man einen breiten Peak von 440nm bis 550nm. Dieser entspricht den Farben Blau und Grün. Im Vergleich mit dem Fluoreszenzemission auf der Abbildung 68 sieht man, dass diese beiden Ergebnisse sehr gut übereinstimmen. Die Emission ist auch dort sehr schwach zu sehen und entspricht den Farben Blaugrün.

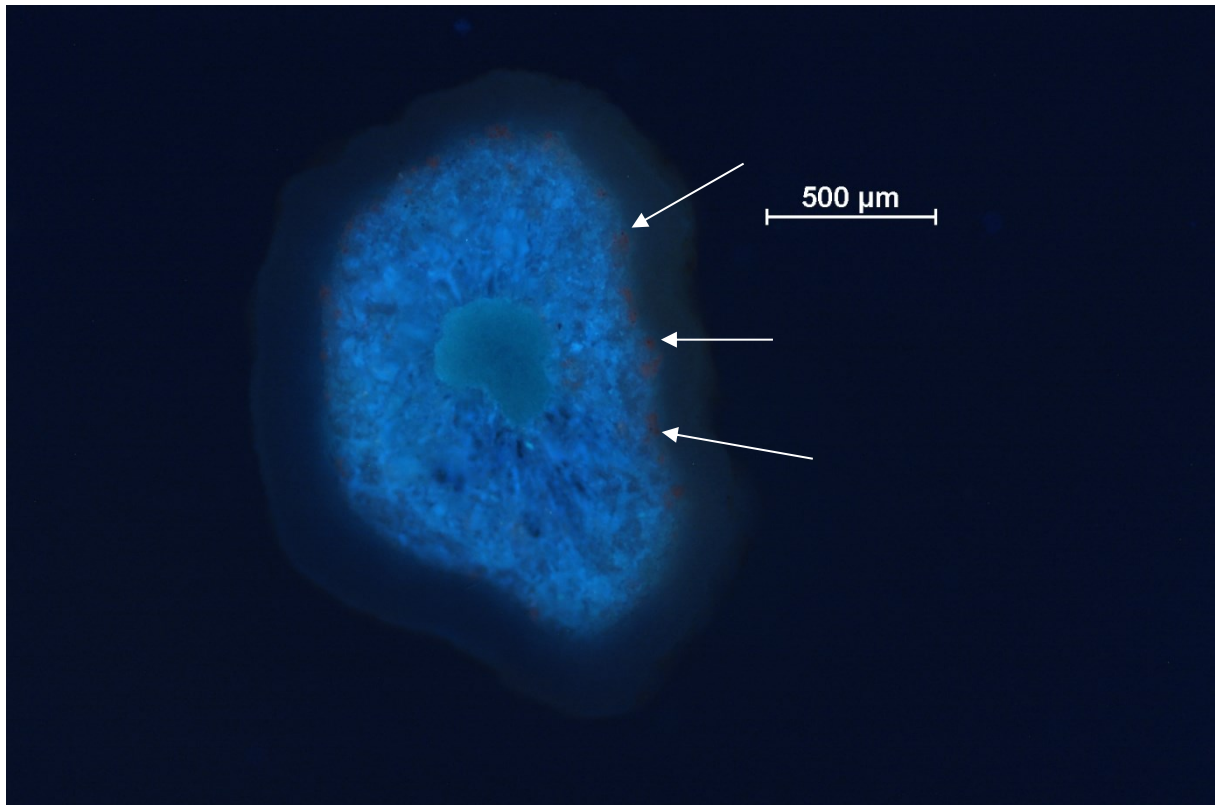


Abbildung 68. Fluoreszenzemissionen der Flechte *Usnea antarctica* bei Bestrahlung mit UV-Licht. Man erkennt die dicke äußere Rindenschicht nur ganz leicht, da sie wenig emittiert. Darunter sieht man vereinzelte rote Stellen, welche mit Pfeilen markiert wurden, diese zeigen wo sich die Algen befinden. Die in hellblau bis türkis emittierende Medulla. Diese emittiert sehr stark. Der Mittelstrang wieder etwas weniger und auch in einer etwas anderen Farbe.

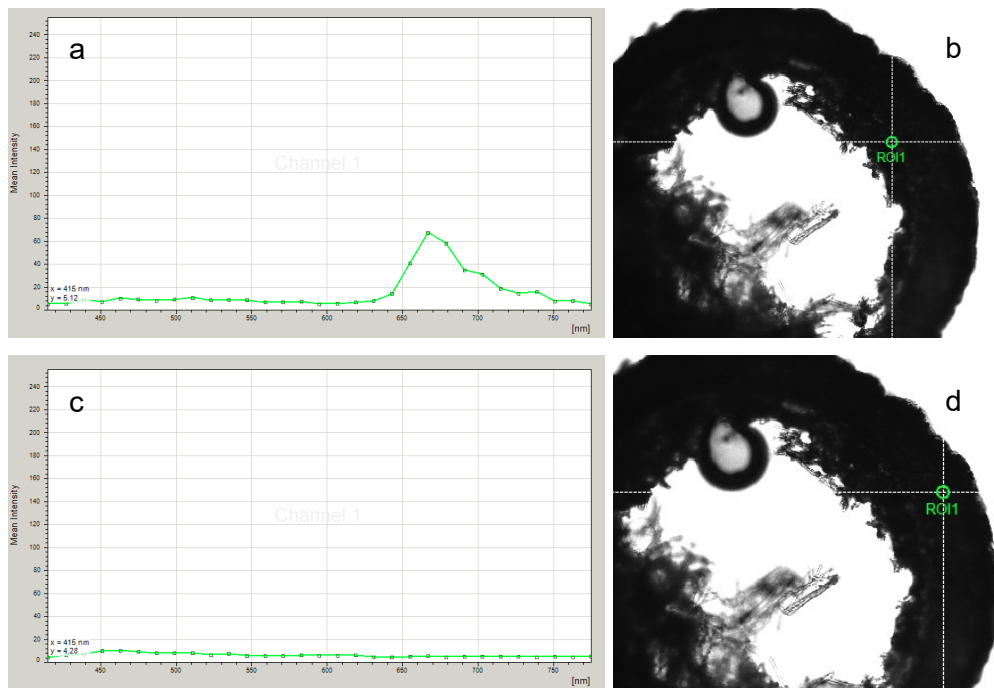


Abbildung 69. In a erkennt man den Lambdascan der Region b mit UV-Licht Bestrahlung. Dabei beobachtet man auf a einen Peak bei 440nm einen sehr breiten von 450nm bis 600nm und einen bei 670nm. In c erkennt man den Lambdascan der Region d mit UV-Licht Bestrahlung. Dabei sieht man auf c nur einen breiten Peak zwischen 440nm und 550nm. Diese 4 Bilder sind alle Aufnahmen der Flechte *Usnea antarctica*.

Blaulicht

Abbildung 70 zeigt die Fluoreszenzemission der Flechte *Usnea antarctica* bei der Bestrahlung mit Blaulicht mit der Wellenlänge 470nm. Ganz außen ist eine sehr schwach emittierende dicke Schicht zu erkennen. Diese Schicht ist die äußere Rindenschicht, welche in gelblich-grün emittiert. Darunter erkennt man rote Stellen, welche sich sogar bis zum Mittelstrang durchziehen. Dies sind die Algen, welche die für das Chlorophyll typische rote Emission zeigen. Diese rot emittierenden Algen sind eingebettet in einer sehr stark gelblichgrün emittierenden Schichte, welche die Medulla ist. Ganz in der Mitte erkennt man den Mittelstrang. Dieser emittiert auch aber wieder etwas schwächer als die Medulla.

Auf der Abbildung 71 a ist der Lambdascan der Flechte *Usnea antarctica* bei der Bestrahlung mit Blaulicht der Wellenlänge 476 nm zu erkennen. Diese Messung wurde in der Algenschicht durchgeführt. Man nimmt einen breiten Peak zwischen 486nm und 515nm wahr, welcher die Wellenlängen von Blauen und auch Grünen Licht beinhaltet. Zudem gab es noch Peaks bei 600nm, 620nm und 670nm. Die ersten zwei entsprechen der Farbe Orange und der dritte der Farbe Rot. 670nm ist wieder die typische Emissionswellenlänge des Chlorophylls. In der Abbildung 71 c sieht man die

gleiche Flechte mit der gleichen Bestrahlungswellenlänge, nur ist hier das Spektrum der oberen Rinde abgebildet. Hier ist nur ein breiter Peak zu erkennen zwischen 535nm und 560nm. Dieser Peak entspricht der Farbe Grün. Auch in der Abbildung 70 erscheint die obere Rindenschicht grüner als die Medulla.

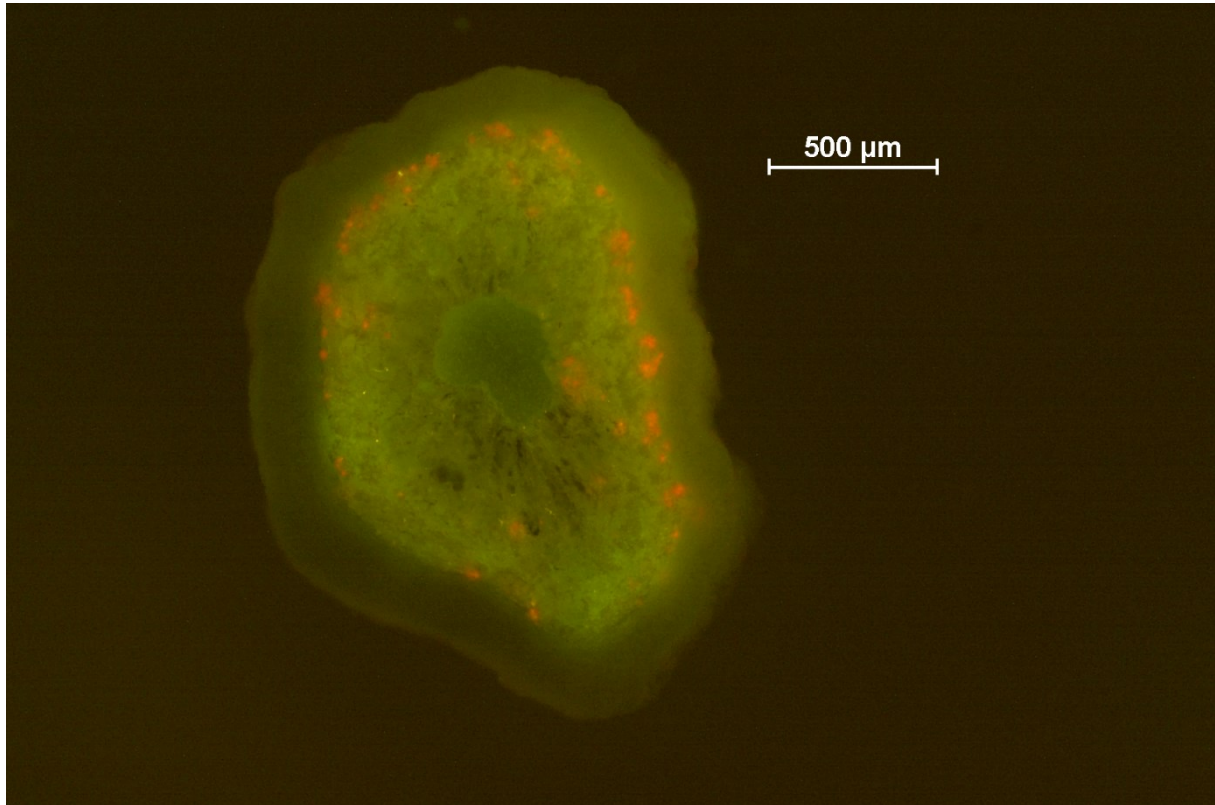


Abbildung 70. Fluoreszenzemissionen der Flechte *Usnea antarctica* bei Bestrahlung mit Blaulicht. Man erkennt die dicke äußere Rindenschicht nur ganz leicht, da sie wenig emittiert. Darunter erkennt man vereinzelt rote Stellen, welche sich sogar bis zum Mittelstrang verteilen an manchen Stellen. Diese roten Stellen sind eingebettet in eine grünlichgelb emittierende Medulla. Ganz innen liegt der Mittelstrang welcher auch schwach grünlichgelbes Licht emittiert.

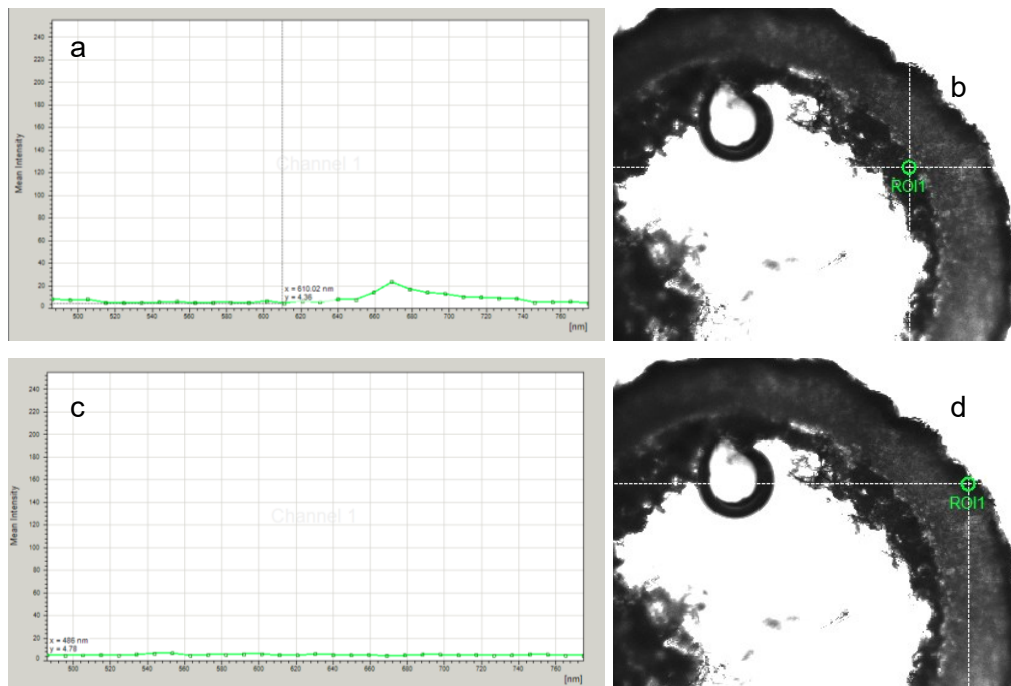


Abbildung 71. In a erkennt man den Lambdascan der Region b mit Blaulicht Bestrahlung. Dabei erkennt man auf a einen breiten Peak von 486nm bis 515nm. Zudem noch Peaks bei 600nm, 620nm und 670nm. In c erkennt man den Lambdascan der Region d mit Blaulicht Bestrahlung. Dabei erkennt man auf c nur einen breiten Peak zwischen 535nm und 560nm. Diese 4 Bilder sind alle Aufnahmen der Flechte *Usnea antarctica*.

5. Diskussion der Ergebnisse

Durch Zusammenführung der verschiedenen Techniken aus Kapitel 4 wird nun versucht, die einzelnen sekundären Metabolite zu lokalisieren. Dazu wurde auf die detailliertesten Methoden, Elektronenmikroskopie und Lambdascans, im Speziellen geachtet.

5.1. Usninsäure

Diese Säure kam am häufigsten in den untersuchten Flechten vor. Sie war vorhanden in der *Usnea dasypoga*, *Cladonia foliacea*, *Cladonia furcata* und *Usnea antarctica*. Usninsäure (Abbildung 3) hat, gut zu erkennen, einen aromatischen Ring. Dies bedeutet, dass diese Verbindung UV- Licht absorbieren kann, und dies ist eventuell ein Indikator dafür, dass dieser Metabolit in der oberen oder äußeren Rinde der oben genannten Flechten vorkommen könnte (Huneck 1999). Es wird außerdem angenommen, dass Usninsäure vom Pilz dazu verwendet wird, um die Zellteilung des Photobionten zu kontrollieren (Calcott *et al.* 2018). Demnach wurde dieser Metabolit in der Algenschicht gesucht.

Wir können also davon ausgehen, dass diese Flechtensäure sowohl UV- Licht absorbiert, als auch in der Algenschicht vorkommt. Deswegen wurden in Abbildung 72 nur die Peaks bei UV Licht Bestrahlung der Algenschicht abgebildet. Sofort sieht man die Emissionswellenlänge des Chlorophylls bei 670nm. Allerdings fällt auch auf, dass jede einzelne Flechte eine Emission zwischen 480nm und 520nm hat. Dies ist ein möglicher Emissionsbereich der Usninsäure.

<i>Usnea dasypoga</i>				
UV Licht (405nm) Algenschicht				
440-550nm	670nm			
<i>Cladonia foliacea</i>				
UV Licht (405nm) Algenschicht				
450nm	480 - 520nm	560nm	610nm	670nm
<i>Cladonia furcata</i>				
UV Licht (405nm) Algenschicht				
460 - 500nm	520 - 550nm	670nm		
<i>Usnea antarctica</i>				
UV Licht (405nm) Algenschicht				
440nm	450-600nm	670nm		

Abbildung 72. Tabelle mit den Peaks der Lambdascans bei der Bestrahlung mit UV Licht der Flechten *Usnea dasypoga*, *Cladonia foliacea*, *Cladonia furcata* und *Usnea antarctica*.

5.2. Fumarprotocetrarsäure

Diese Säure ist in den zwei Flechten *Cladonia foliacea* und *Cladonia furcata* enthalten. Fumarprotocetrarsäure hat, wie man auf Abbildung 4 erkennen kann, auch einen aromatischen Ring. Allerdings ist dieser Metabolit nicht so stark UV- absorbierend wie die Usninsäure (Bhattacharyya *et al.* 2016). Es hat sich herausgestellt, dass dieser sekundär Metabolit sowohl einen Einfluss auf das Wachstum von höheren Pflanzen nehmen kann als auch auf die Entwicklung von Insektenlarven (Huneck 1999).

Hier lässt sich nicht so einfach erkennen, wo sich im Flechtenthallus der sekundäre Metabolit befinden sollte. Deswegen sind in Abbildung 73 alle diskutierten Peaks aufgelistet. Da diese Flechtensäure das Wachstum von höheren Pflanzen hemmen soll, wird bei der Flechte *Cladonia foliacea* die untere Rindenschicht genauer untersucht. Der Peak bei 670nm wird nicht diskutiert, da es sich dabei um die Emission des Chlorophylls handelt. Man erkennt bei der unteren Rindenschicht der Flechte *Cladonia foliacea* bei der Bestrahlung mit UV- Licht einen breiten Peak zwischen 580 und 600nm. Allerdings ist dieser Peak bei der Flechte *Cladonia furcata* nicht zu erkennen. Doch sowohl in der Algenschicht und der unteren Rindenschicht der Flechte *Cladonia foliacea* als auch bei der inneren Rindenschicht der Flechte *Cladonia furcata* ist eine Emission bei 450nm was darauf hinweisen könnte, dass sich in diesen Bereichen die Fumarprotocetrarsäure befindet. Es gibt allerdings noch weitere Überschneidungen bei den Wellenlängen 480-500nm in allen mit UV-Licht bestrahlten Bereichen. Bei der Diskussion der Usninsäure wurde jedoch angenommen, dass diese zwischen 480 und 520nm emittiert. Da Usninsäure auch ein Metabolit dieser beiden Flechten ist, wird dieser Peak wahrscheinlich durch die Usninsäure entstanden sein, allerdings auch bei einer Wellenlänge von 540nm bei der beiden bestrahlten Abschnitten der *Cladonia furcata* und bei der oberen und unteren Rindenschicht der *Cladonia foliacea*. Aber auch im Bereich von 560nm zeigen beide Flechten Emissionen. Dies sind alles potentielle Emissionswellenlängen dieses sekundären Metabolits Fumarprotocetrarsäure.

Wenn man sich nun die Peaks der Bestrahlung mit Grünenlicht in der Abbildung 73 ansieht, erkennt man das beide Flechten Emissionswellenlängen bei 530 beziehungsweise bei 550nm haben. Emissionen zwischen den Wellenlängen 550 und 570nm findet man sowohl in der Algenschicht der *Cladonia foliacea* als auch in der inneren Rindenschicht und der Algenschicht der *Cladonia furcata*. Auch bei 590nm und bei 610nm lässt sich ein Peak bei der oberen Rindenschicht der *Cladonia foliacea*

sowie bei beiden Bereichen der *Cladonia furcata* finden. Dies sind auch mögliche Hinweise auf die diskutierte Flechtensäure.

<i>Cladonia foliacea</i>				
UV Licht (405nm) obere Rindenschicht				
470nm	480-520nm	525-580nm	670nm	
UV Licht (405nm) Algenschicht				
450nm	480 - 520nm	560nm	610nm	670nm
UV Licht (405nm) untere Rindenschicht				
450nm	470-510nm	540nm	580-600nm	670nm
Grünlicht (514nm) obere Rindenschicht				
550nm	575nm	590nm	610nm	670nm
Grünlicht (514nm) Algenschicht				
530nm	540-570nm	605nm	670nm	
<i>Cladonia furcata</i>				
UV Licht (405nm) Algenschicht				
460 - 500nm	520-550nm	670nm		
UV Licht (405nm) innere Rindenschicht				
440 -510nm	530- 570nm	620nm	670nm	
Grünlicht (514nm) Algenschicht				
525-580nm	585- 620nm	670nm		
Grünlicht (514nm) innere Rindenschicht				
525-550nm	550-585nm	585-615nm	620nm	670nm

Abbildung 73. Tabelle mit den Peaks der Lambdascans bei der Bestrahlung mit UV Licht und Grünlicht der Flechten *Cladonia foliacea* und *Cladonia furcata*.

5.3. Stictinsäure

Stictinsäure ist ein sekundärer Metabolit, welcher von den untersuchten Arten nur in der Flechte *Lobaria pulmonaria* vorkommt. Wie man in Abbildung 5 erkennen kann, gibt es in dieser Verbindung wieder aromatische Ringe, in diesem Fall sogar zwei, also kann diese Verbindung wieder UV-Licht absorbieren (Huneck 1999). Diese Flechtensäure hat wieder eine abschreckende Wirkung gegenüber Herbivoren, ist aber auch antibakteriell (Bhattacharyya et al. 2016). Bei diesem sekundären Metaboliten ist es schwierig zu sagen, welcher Emissionspeak zu welchem sekundären Metabolit gehört, weil in der Flechte *Lobaria pulmonaria* auch Norstictinsäure vorkommt. Dieser ist, wie auf Abbildung 6 zu erkennen der Stictinsäure sehr ähnlich, und diese beiden Säuren kommen auch in keiner der anderen untersuchten Flechten vor. Daher können die Emissionen nicht verglichen werden. Somit sind die Peaks in Abbildung 74 bei 525nm, 580nm, 600nm, 570nm potentielle Peaks für eine der zwei Flechtensäuren. Der Peak bei 670nm kommt wieder durch das

Chlorophyll zustande. Die Peaks bei 630nm und 635nm kommen durch etwas anderes zustande. Da die Flechte *Lobaria pulmonaria* sehr gerne Cephalodien bildet, liegt die Vermutung sehr nahe, dass hier die Gattung *Nostoc* eingeschlossen wurde. Da diese allerdings zu den Cyanobakterien gehört, haben diese auch andere photosensitive Verbindungen wie Phycocyanin. Dies emittiert auch eine andere Wellenlänge als das Chlorophyll, nämlich bei circa 630nm (Ogashawara und Li 2019). Da ungefähr diese Wellenlänge emittiert, wird die Vermutung bestätigt, dass es sich bei diesem Einschluss zumindest um ein Cyanobakterium handelt.

<i>Lobaria pulmonaria</i>				
UV Licht (405nm) Algeneinschluss				
525nm	580nm	600nm	630nm	670nm
UV Licht (405nm) Algenschicht				
670nm				
Grünlicht (514nm) Algeneinschluss				
570nm	635nm			

Abbildung 74. Tabelle mit den Peaks der Lambdascans bei der Bestrahlung mit UV Licht und Grünlicht der Flechten *Lobaria pulmonaria*.

5.4. Atranorin und Chloratranorin

Atranorin und Chloratranorin sind zwei sekundär Metabolite, welche in der Flechte *Pseudovernia furfuracea* vorkommen. Wenn man die Abbildung 7 und Abbildung 8 miteinander vergleicht, sieht man, dass der einzige Unterschied zwischen diesen zwei Metaboliten ein Chloratom ist, Chloratranorin hat also ein zusätzliches Chloratom, welches dem Atranorin fehlt.

Atranorin kommt meistens in der oberen Rindenschicht vor (Bhattacharyya *et al.* 2016) und absorbiert die UV- Strahlung. Das Licht, was von der Verbindung emittiert wird, nutzt dann wiederum die Alge für die Photosynthese (Calcott *et al.* 2018).

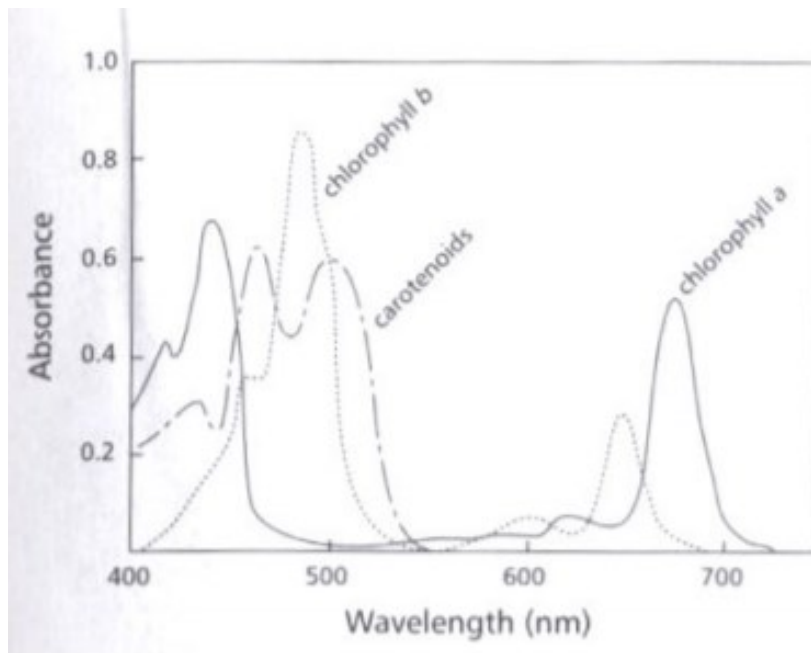


Abbildung 75. Absorptionsspektrum des Chlorophylls und von Carotinoiden (Kommareddy und Anderson 2005).

In Abbildung 75 sieht man das Absorptionsspektrum des Chlorophylls a und b. Wenn jetzt die Algen das emittierte Licht vom sekundär Metabolit Atranorin zur Photosynthese verwenden, muss die Verbindung in dem Wellenlängenbereich emittieren, welches die Algen für die Photosynthese benötigen. Und wie oben schon erwähnt, wird von der Verbindung gut UV- Licht absorbiert. Daher werden in Abbildung 76 die Peaks des Lambdascans bei UV-Licht Bestrahlung aufgelistet. Man sieht sofort, dass in der Algenschicht sowohl die Peaks bei 450nm als auch 470nm und 490nm in dem Bereich liegen, in dem Chlorophyll a und b absorbiert. Es könnten also alle drei Peaks des Atranorin sein. In der unteren Rindenschicht ist ein Peak zwischen 530nm und 560nm. In diesem Wellenlängenbereich wird nicht so gut absorbiert. Deshalb muss das eine andere Verbindung sein. Möglicherweise emittiert hier das Chloratranorin.

<i>Pseudovernia furfuracea</i>			
UV Licht (405nm) Algenenschicht			
450nm	470nm	490nm	670nm
UV Licht (405 nm) untere Rindenschicht			
460nm	490-500nm	530-560nm	670nm

Abbildung 76. Tabelle mit den Peaks der Lambdascans bei der Bestrahlung mit UV Licht der Flechte *Pseudovernia furfuracea*.

Da aber Chloratranorin einen entscheidenden Unterschied zum Atranorin hat, nämlich das Chloratom, kann man diesen optimal in der Pointmap auf der Abbildung 45 (c) lokalisieren. Hier sieht man sehr gut, dass sich das Chlor primär in der oberen Rindenschicht/ Algenschicht und in der unteren Rindenschicht befindet. Dazwischen

in der Medulla ist viel weniger Chlor gefunden worden. Auch in der Tabelle der Abbildung 43 sieht man eindeutig, dass in der oberen Rindenschicht am meisten Chlor gefunden wurde. Allerdings scheint es hier, als würde in der unteren Rindenschicht nicht so viel Chlor enthalten sein. Dies könnte womöglich dadurch erklärt werden, dass sie sehr dünn ist und deswegen bei der Elementanalyse nicht exakt nur die untere Rindenschicht gemessen werden konnte.

Diese zwei Ergebnisse lassen sehr stark vermuten, dass sich die Verbindung Chloratranorin in der oberen Rindenschicht beziehungsweise in der Algenschicht befindet und eventuell auch in der unteren Rindenschicht.

5.5. Physodsäure

Der sekundäre Metabolit Physodsäure ist auch in der Flechte *Pseudovernia furfuracea* zu finden. Da man in der Abbildung 9 erkennt, dass Physodsäure einen aromatischen Ring enthält, wird diese Verbindung jedenfalls UV-Licht absorbieren (Huneck 1999). Diese Flechtensäure sollte sich in der Medulla befinden (Bhattacharyya *et al.* 2016). Es ist durchaus möglich, dass dieser Metabolit jener ist, welcher in Abbildung 76 mit der Wellenlänge emittiert, die von den Algen nicht zur Photosynthese genutzt werden kann. Also der Peak zwischen 530nm und 560nm.

5.6. Gyrophorsäure

Dieser sekundäre Metabolit kommt von den untersuchten Flechten nur in der *Umbilicaria hirsuta* vor. Wie in Abbildung 10 zu erkennen, beinhaltet diese Verbindung einen aromatischen Ring und kann dadurch auch UV-Licht absorbieren (Huneck 1999). Es wurde herausgefunden, dass diese Verbindung gegen Bakterien und Pilze wirken soll (Bhattacharyya *et al.* 2016). Außerdem könnte diese Verbindung als Reservestoff dienen, da er diese Funktion bei nichtlichenisierten Pilzen hat (Follmann 1968).

In der Abbildung 77 erkennt man alle Peaks, die von der Flechte *Umbilicaria hirsuta* emittiert werden, bei der Bestrahlung mit UV-Licht und mit Blaulicht. Der Peak bei 670nm ist wieder der Emissionspeak von Chlorophyll. Allerdings sieht man sowohl in den Rhizinen als auch in der Medulla Peaks bei anderen Wellenlängen. Diese deuten sehr stark auf die Anwesenheit eines sekundären Metaboliten hin. In diesem Fall ist

es daher eindeutig, dass die Gyrophorsäure nicht in der Algenschicht vorkommt, da man dort nur einen Peak erkennen kann.

<i>Umbilicaria hirsuta</i>				
UV Licht (405nm) Algenschicht				
670nm				
UV Licht (405nm) Rhizine				
430-500nm				
Blaulicht (476nm) Algenschicht				
670nm				
Blaulicht (476nm) Medulla				
525nm				

Abbildung 77. Tabelle mit den Peaks der Lambdascans bei der Bestrahlung mit UV Licht und Blaulicht der Flechten *Umbilicaria hirsuta*.

5.7. Silizium und Aluminium

Der Zusammenhang zwischen den Elementen Silizium und Aluminium ist nicht nur bei dem Vergleich der Abbildung 38 und der Abbildung 39 auffällig, sondern auch bei den Pointmaps der Flechte *Lobaria pulmonaria*, welche auf der Abbildung 44 (c) und (d) zu sehen ist. Dies ist ein Zeichen, dass diese Flechte auf Silikatgestein gewachsen ist und die Flechte etwas von diesem Silikatgestein aufgenommen hat. Dies ist die wahrscheinlichste Erklärung, da in sehr vielen Silikatmineralen Aluminium und Silizium vorkommen. Wie zum Beispiel in den Mineralen Andalusit (Al_2SiO_5), Topas ($\text{Al}_2\text{SiO}_5(\text{OH},\text{F})_2$) und auch in diversen Granaten. All diese Minerale und noch weitere haben Silizium und Aluminium in ihrer Summenformel (McCann und Valdivia Manchego 2015) und erklären sowohl das gleiche Muster bei den Gewichtsprozent, als auch die gleiche Verteilung im Flechtenthallus.

5.8. Lichtmikroskopische Bilder

Bei den lichtmikroskopischen Aufnahmen sieht man bei allen untersuchten Flechten sehr gut die Schichtstruktur. Dabei gibt es nur einen Ausreiser, und zwar eine Aufnahme der Flechte *Pseudovernia furfuracea* hat auf der Abbildung 27 einen heteromeren Thallus Aufbau und auf der Abbildung 26 einen homöomeren.

Einen homöomeren Thallusaufbau haben nur Krusten-, Gallert-, und Blatfflechten (Bündel und Scheidegger 1996). Dieser Unterschied im Thallusbau zwischen den zwei Aufnahmen lässt sich eventuell dadurch erklären, dass die Flechte *P. furfuracea* je

nach Alter unterschiedlich eingeteilt wird. So wird sie als junge Flechte zu den Blattflechten gezählt und wenn sie älter ist zu den Strauchflechten (Türk 2016).

Auffällig ist außerdem, dass die drehrunden Bart- und Strauchflechten einen unterschiedlichen Aufbau haben. So haben die Flechten *Usnea dasypoga*, und *Usnea antarctica* einen schön zu erkennenden Mittelstrang. Die Flechte *Cladonia furcata* allerdings, obwohl sie auch einen kreisrund geschlossenen Thallus hat, jedoch nicht. Bei ihr erkennt man sehr gut die untere Rindenschicht auf Abbildung 33.

Die Flechten *Lobaria pulmonaria*, *Umbilicaria hirsuta* und *Cladonia foliacea* zeigen eine sehr gut erkennbare heteromere Schichtung.

Schon bei der lichtmikroskopischen Aufnahme der *L. pulmonaria* erkennt man auf Abbildung 25 einen auffälligen Einschluss. Es wurde gleich davon ausgegangen, dass es sich hierbei um ein Cephalodium von *Nostoc* handelt, was später auch nachgewiesen wurde.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Das eindeutigste Ergebnis erhielt man bei dem sekundär Metabolit Chloratranorin. Hier konnte auf den Pointmaps eindeutig festgestellt werden, wo sich eine höhere Konzentration an Chlor im Flechtenquerschnitt befindet. Dies lässt dann direkt darauf zurückführen, dass sich dieser Metabolit in der oberen und unteren Rindenschicht befindet, da sie Chlor in der Strukturformel enthält. Alle anderen untersuchten sekundär Metabolite wurden durch ein Ausschlussverfahren bestimmt und lokalisiert, da es keine Tabellenwerte zu den Emissionswellenlängen der einzelnen sekundären Metaboliten gibt. So wurden im Fall der Usninsäure und der Fumarprotocetrarsäure die Lambdascans der Flechten, in denen bekannt war, dass sich eine dieser zwei Säuren befindet, verglichen und damit die Peaks der Flechtensäuren gefunden. Außerdem wurden bei den Flechtensäuren, welche nur in einer Flechte vorhanden waren, ohne Literaturwerte den etwaigen Emissionswellenlängen zuzuordnen und sie somit zu lokalisieren. In der Flechte *Lobaria pulmonaria* wurde durch den Lambdascan erkannt, dass es sich bei dem großen Algeneinschluss um ein Cephalodium von einem Cyanobakterium handelt, meistens beinhalten sind diese Cephalodien Vertreter von *Nostoc*.

Ein weiteres Ergebnis war, dass alle dieser Flechten wahrscheinlich auf Silikatgestein gewachsen sind, da die Gewichts % von Aluminium und Silicium ein ähnliches Muster in den einzelnen Schichten der Flechten zeigen.

Es sollte auch durch Usninsäure und Norstictinsäure mehr Kalium aufgenommen werden (Huneck 1999). Demnach sollte in den Flechten *Lobaria pulmonaria*, *Unsea dasypoga*, *Cladonia foliacea*, *Cladonia furcata* und *Usnea antarctica* mehr Kalzium zu finden zu sein. Dies konnte jedoch bei der Elementanalyse nicht nachgewiesen werden.

Wenn man nun in diesem Forschungsfeld weiter arbeiten möchte, müsste man zuerst die Emissionswellenlängen der einzelnen gereinigten sekundär Metabolite ermitteln. Erst wenn man diesen Schritt getan hat, kann man genau sagen, welcher sekundär Metabolit sich wo befindet, beziehungsweise wo eine Verbindung mit der gleichen Wellenlänge emittiert. Vielleicht kann man durch diese Ergebnisse dann auch Rückschlüsse dahin gehend ziehen, welche Aufgaben diese Flechtensäuren haben. Bei manchen sekundären Metaboliten ist es schon bekannt, so wie bei Atranorin, was die Alge vor zu viel Strahlung schützt und gleichzeitig Licht emittiert, welches von dem

Photobionten zur Photosynthese verwendet werden kann. Oder aber Usninsäure, welches die Alge daran hindert sich zu schnell und zu viel zu vermehren.

Bei anderen Flechtenmetaboliten allerdings weiß man noch nicht genau, warum die Flechte sie überhaupt synthetisiert. Vielleicht könnte aufgrund der Position im Flechtenkörper ein Rückschluss darauf gezogen werden, was für Aufgaben die Flechtensäure haben könnte.

7. Literaturverzeichnis

Australian Microscopy and Microanalysis (2014): Characteristic X-rays. Online verfügbar unter <https://myscope.training/legacy/analysis/eds/xraygeneration/characteristic/>, zuletzt geprüft am 13.08.2019.

Berg, Gabriele; Riedel, Katharina; Grube, Martin (2016): Flechten-Mikrobiom: eine alte Symbiose neu entdeckt. In: *Biospektrum* 22 (1), S. 12–15. DOI: 10.1007/s12268-016-0648-5.

Bhattacharyya, Shantanu; Deep, Pratibha, Rani; Singh, Sunita; Nayak, Binata (2016): Lichen secondary metabolites and its biological activity 6, S. 29–44. Online verfügbar unter <http://ajptr.com/archive/volume-6/december-2016-issue-6>, zuletzt geprüft am 16.09.2019.

Bokhorst, Stef; Convey, Peter; Huiskes, Ad; Aerts, Rien (2016): *Usnea antarctica*, an important Antarctic lichen, is vulnerable to aspects of regional environmental change. In: *Polar Biol* 39 (3), S. 511–521. DOI: 10.1007/s00300-015-1803-z.

Borlinghaus, Rolf Theodor (2016): Konfokale Mikroskopie in Weiß. Optische Schnitte in allen Farben. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-49359-5>.

Büdel, Burkhard (2010): Flechten. Der Erfolg einer Symbiose. In: *Biologie in unserer Zeit* 40 (5), S. 322–333. DOI: 10.1002/biuz.201010431.

Bündel, Burkhard; Scheidegger, C. (1996): Thallus morphology and anatomy. In: Thomas H. Nash und Thomas H. Nash (Hg.): *Lichen Biology*. Cambridge: Cambridge University Press, S. 37–64.

Calcott, Mark J.; Ackerley, David F.; Knight, Allison; Keyzers, Robert A.; Owen, Jeremy G. (2018): Secondary metabolism in the lichen symbiosis. In: *Chemical Society reviews* 47 (5), S. 1730–1760. DOI: 10.1039/c7cs00431a.

Cardile, V.; Graziano, A. C. E.; Avola, R.; Piovano, M.; Russo, A. (2017): Potential anticancer activity of lichen secondary metabolite physodic acid. In: *Chemico-biological interactions* 263, S. 36–45. DOI: 10.1016/j.cbi.2016.12.007.

Demtröder, Wolfgang (2010): *Experimentalphysik*. 4., überarb. Aufl. Berlin: Springer (Springer-Lehrbuch).

Dobson, Frank S. (2011): *Lichens. An illustrated guide to the British and Irish species*. Sixth revised and enlarged edition. Slough, England: The Richmond Publishing Co.Ltd.

Ebrahim, Hassan Y.; Elsayed, Heba E.; Mohyeldin, Mohamed M.; Akl, Mohamed R.; Bhattacharjee, Joydeep; Egbert, Susan; El Sayed, Khalid A. (2016): Norstictic Acid Inhibits Breast Cancer Cell Proliferation, Migration, Invasion, and In Vivo Invasive Growth Through Targeting C-Met. In: *Phytotherapy research : PTR* 30 (4), S. 557–566. DOI: 10.1002/ptr.5551.

Elix, J. A.; Stocker-Wörgötter, E. (2008): Biochemistry and secondary metabolites. In: Thomas H. Nash und Thomas H. Nash (Hg.): *Lichen Biology*. Cambridge: Cambridge University Press, S. 104–133.

Elix, J. A. (1996): Biochemistry and secondary metabolites. In: Thomas H. Nash und Thomas H. Nash (Hg.): Lichen Biology. Cambridge: Cambridge University Press, S. 154–180.

Feige, Guido B.; Kremer, Bruno P. (1979): Flechten - Doppelwesen aus Pilz und Alge. Vorkommen, Lebensweise, Bestimmung. 2. Aufl. Stuttgart: Franckh (Kosmos-Praxis für Naturfreunde).

Follmann, Gerhard (1968): Flechtensymbiose und Flechtenstoffe. In: *Bulletin de la Société Botanique de France* 115 (sup2), S. 161–167. DOI: 10.1080/00378941.1968.10838626.

Friedelsheimer, Bernd; Büchl-Zimmermann, Simone; Welsch, Ulrich (2015): Schnittpräparation für die Lichtmikroskopie. In: Maria Mulisch und Ulrich Welsch (Hg.): Romeis - Mikroskopische Technik. Heidelberg: Springer Berlin, S. 99–120.

Friedl, Thomas; Bündel, Burkard (1996): Photobionts. In: Thomas H. Nash und Thomas H. Nash (Hg.): Lichen Biology. Cambridge: Cambridge University Press, S. 8–23.

Hale, Mason E. (1977): The biology of lichens. 2nd ed., [repr.]. London [etc]: Edward Arnold.

Hauck, Markus; Jürgens, Sascha-René; Huneck, Siegfried; Leuschner, Christoph (2009): High acidity tolerance in lichens with fumarprotocetraric, perlatolic or thamnolic acids is correlated with low pKa1 values of these lichen substances. In: *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* 157 (10), S. 2776–2780. DOI: 10.1016/j.envpol.2009.04.022.

Honegger, Rosmarie (2009): Lichen-Forming Fungi and Their Photobionts. In: Holger B. Deising (Hg.): The Mycota, Bd. 5. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 307–333.

Honegger, Rosmarie (1996): Mycobionts. In: Thomas H. Nash und Thomas H. Nash (Hg.): Lichen Biology. Cambridge: Cambridge University Press, S. 24–36.

Huneck, S. (1999): The Significance of Lichens and Their Metabolites. In: *Naturwissenschaften* 86 (12), S. 559–570. DOI: 10.1007/s001140050676.

Ingólfssdóttir, K. (2002): Usnic acid. In: *Phytochemistry* 61 (7), S. 729–736. DOI: 10.1016/S0031-9422(02)00383-7.

Kommareddy, Anil R.; Anderson, Gary A.: Mechanistic modeling of a Photobioreactor system. In: 2005 ASAE Annual International Meeting.

Laursen, Gary A.; Seppelt, Rodney D. (2010): Common Interior Alaska Cryptogams. Fungi, Lichenicolous Fungi, Lichenized Fungi, Slime Molds, Mosses, and Liverworts. Fairbanks: University of Alaska Press.

Lohézic-Le Dévéhat, Françoise; Tomasi, Sophie; Elix, John A.; Bernard, Aurélie; Rouaud, Isabelle; Uriac, Philippe; Boustie, Joël (2007): Stictic acid derivatives from the lichen *Usnea articulata* and their antioxidant activities. In: *Journal of natural products* 70 (7), S. 1218–1220. DOI: 10.1021/np070145k.

Masuch, Georg (1993): Biologie der Flechten. Heidelberg: Quelle & Meyer Vlg; UTB (UTB für Wissenschaft Uni-Taschenbücher, 1546).

- McCann, Tom; Valdivia Manchego, Mario (2015): Geologie im Gelände. Das Outdoor-Handbuch. Berlin: Springer Spektrum (Lehrbuch). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-8274-2383-2>.
- Mueller, Gregory M.; Bills, Gerald F.; Foster, Mercedes S. (2008): Biodiversity of Fungi. Inventory and monitoring methods. Boston [etc.]: Elsevier Academic.
- Mulisch, Maria (2015): Fluoreszenzfärbungen. In: Maria Mulisch und Ulrich Welsch (Hg.): Romeis - Mikroskopische Technik. Heidelberg: Springer Berlin, S. 283–291.
- Ogashawara, Igor; Li, Lin (2019): Removal of Chlorophyll-a Spectral Interference for Improved Phycocyanin Estimation from Remote Sensing Reflectance. In: *Remote Sensing* 11 (15), S. 1764. DOI: 10.3390/rs11151764.
- Peveling, Elisabeth (1988): Beziehungen zwischen den Symbiosepartnern in Flechten. In: *Naturwissenschaften* 75 (2), S. 77–86. DOI: 10.1007/BF00368409.
- Plattner, Helmut; Zingsheim, Horst-Peter (1987): Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie. Ein kritischer Leitfaden zur biologischen Ultrastrukturforschung für Biologen und Mediziner. Stuttgart: Fischer.
- Purvis, O. W.; Elix, J. A.; Broomhead, J. A.; Jones, G. C. (1987): The Occurrence of Copper—norstictic Acid in Lichens from Cupriferous Substrata. In: *The Lichenologist* 19 (2), S. 193–203. DOI: 10.1017/S0024282987000161.
- Studzinska-Sroka, Elzbieta; Galanty, Agnieszka; Bylka, Wieslawa (2017): Atranorin - An Interesting Lichen Secondary Metabolite. In: *Mini reviews in medicinal chemistry* 17 (17), S. 1633–1645. DOI: 10.2174/1389557517666170425105727.
- Türk, Roman (2016): Nationalpark Hohe Tauern - Flechten. 1. Auflage. Innsbruck, Wien: Tyrolia-Verlag (Nationalpark Hohe Tauern, wissenschaftliche Schriften).
- Wirth, Volkmar; Hauck, Markus; Schultz, Matthias; Bruyn, Uwe de; Bültmann, Helga; John, Volker *et al.* (2013): Die Flechten Deutschlands. Stuttgart: Ulmer.
- Zachariah, Sonia Anna; Varghese, Scaria (2018): The Lichen Symbiosis: A Review. In: *International Journal of Scientific Research and Review* 7 (3), S. 1160–1169. Online verfügbar unter http://www.ijssr.org/down_1262.php.
- Zopf, Wilhelm (2012): Flechtenstoffe in chemischer, botanischer, pharmakologischer und technischer Beziehung. [S.I.]: UNIKUM.

8. Anhang Elementanalyse

Lobaria pulmonaria

	obere Rindenschicht	Medulla
Element	Gewichts%	Gewichts%
C	55,54	53,15
N	7,82	6,5
O	35,3	39,06
Na	0,1	0,16
Mg	0,14	0,09
Al	0,02	0,02
Si	0,04	0,17
P	0,12	0,13
S	0,11	0,1
Cl	0,01	0,01
K	0,06	0,05
Ca	0,63	0,43
Fe	0,05	0,05
Cu	0,07	0,07
	Algenschicht	untere Rindenschicht
Element	Gewichts%	Gewichts%
C	65,57	62,86
N	10,76	9,65
O	21,48	25,83
Na	0,08	0,15
Mg	0,23	0,17
Al	0,02	0,03
Si	0,04	0,06
P	0,2	0,08
S	0,23	0,13
Cl	0,03	0,03
K	0,06	0,03
Ca	1,25	0,82
Fe	0,02	0,08
Cu	0,04	0,09

8.1. Elementanalyse *Pseudovernia furfuracea*

	obere Rindenschicht	untere Rindenschicht	Medulla
Element	Gewichts%	Gewichts%	Gewichts%
C	62,33	64,35	55,01
N	4,73	5,67	4,37
O	31,77	28,68	39,59
Na	0,1	0,34	0,16
Mg	0,02	0,08	0,04
Al	0,04	0,04	0,02
Si	0,1	0,09	0,05
P	0,02	0,05	0,02
S	0,11	0,23	0,08
Cl	0,5	0,08	0,1
K	0,03	0,03	0,06
Ca	0,15	0,27	0,38
Fe	0,05	0,05	0,04
Cu	0,06	0,04	0,09

8.2. Elementanalyse *Usnea dasypoga*

	obere Rindenschicht/ Algenschicht	Medulla/ Mittelstrang
Element	Gewichts%	Gewichts%
C	51,63	47,02
N	3,46	2,61
O	37,83	43,06
Na	0	0
Mg	0,27	0,03
Al	0,04	0,01
Si	0,1	0,07
P	0,09	0,06
S	0,16	0,05
Cl	0,13	0,08
K	0,1	0,03
Ca	5,84	6,7
Ti	0,04	0,01
Mn	0,05	0,06
Fe	0,06	0,04
Cu	0,13	0,12
Zn	0,06	0,05

8.3. Elementanalyse *Umbilicaria hirsuta*

	obere Rindenschicht	Medulla
Element	Gewichts%	Gewichts%
C	64,65	71,83
N	5,76	5,11
O	26,88	21,74
Na	0,26	0,27
Mg	0,08	0,08
Al	0,06	0,01
Si	0,14	0,01
P	0,22	0,08
S	0,37	0,1
Cl	0,28	0,2
K	0,34	0,16
Ca	0,64	0,3
Fe	0,11	0,04
Co	0,05	0,02
Cu	0,14	0,06
	Algenschicht	untere Rindenschicht
Element	Gewichts%	Gewichts%
C	72,68	64,64
N	0	5,96
O	25,35	27,35
Na	0,28	0,25
Mg	0,09	0,09
Al	0,05	0,05
Si	0,13	0,11
P	0,15	0,24
S	0,17	0,23
Cl	0,22	0,19
K	0,3	0,17
Ca	0,4	0,54
Fe	0,09	0,07
Co	0,03	0,03
Cu	0,07	0,09

8.4. Elementanalyse *Cladonia foliacea*

	obere Rindenschicht	untere Rindenschicht	Medulla
Element	Gewichts%	Gewichts%	Gewichts%
C	62,49	56,09	53,83
O	36,88	42,7	45,23
Na	0,02	0,13	0,03
Mg	0,05	0,06	0,03
Al	0,04	0,15	0,04
Si	0,07	0,32	0,07
P	0,03	0,04	0,1
S	0,03	0,08	0,08
K	0,03	0,03	0,06
Ca	0,23	0,18	0,24
Fe	0,07	0,13	0,12
Co	0,02	0,03	0,06
Cu	0,05	0,05	0,12

8.5. Elementanalyse *Cladonia furcata*

	Algenschicht/Medulla	innere Rindenschicht	äußere Rindenschicht
Element	Gewichts%	Gewichts%	Gewichts%
C	55,01	64,35	58,95
N	4,37	5,67	4,73
O	39,59	28,68	28,71
Na	0,16	0,34	0,01
Mg	0,04	0,08	0,23
Al	0,02	0,04	0,04
Si	0,05	0,09	0,12
P	0,02	0,05	0,13
S	0,08	0,23	0,31
Cl	0,1	0,08	0,07
K	0,06	0,03	0,11
Ca	0,38	0,27	6,01
Tl	0	0	0,06
Fe	0,04	0,05	0,09
Cu	0,09	0,04	0,27
Zn	0	0	0,16

8.6. Elementanalyse *Usnea antarctica*

	obere Rindenschicht	Medulla
Element	Gewichts%	Gewichts%
C	47,13	37,26
N	2,55	1,57
O	48,05	48,05
Na	0,09	0,14
Mg	0,03	0,04
Al	0,06	0,02
Si	0,14	0,05
P	0,06	0,03
S	0,09	0,03
Cl	0,09	0,07
K	0,12	0,12
Ca	1,33	12,26
Fe	0,14	0,13
Cu	0,12	0,22