

Jahr 1990	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 3
----------------------------	--	-------------------------

Untersuchungen von Flechten

Von Dr. Felix Schumm

1. Vorbemerkung

Beim Mikroskopikertreffen 17.05.-01.06.1985 in Einsiedeln (Schweiz) habe ich ein Praktikum über Flechten abgehalten. Damals wurde mein Manuskript leider nicht ausgeteilt. Vielleicht besteht bei unseren Mitgliedern dennoch Interesse, eine gekürzte Fassung zu erhalten.

Ich hatte die Übungen nicht nach Themen wie vegetativer Bau, Schlauchstrukturen etc. gegliedert, sondern an ausgeteilten Flechten die jeweils interessanten und gut zu beobachtenden Eigentümlichkeiten besprochen. Präparative Bemerkungen sind bei den einzelnen Arten und im Anhang zu finden.

2. Xanthoria parietina

Die Gestalt der Flechten wird meist durch den Pilz bestimmt. Die Pilze bilden ein Flechtwerk (Plectenchym;), das locker oder dicht, mal aus langgestreckten Zellen, mal aus kurzen rundlichen Zellen aufgebaut ist. Manches Flechtwerk kann, wenn es fertig ausgebildet ist, aussehen wie ein richtiges Gewebe (Parenchym;) und wird dann Paraplectenchym; oder Pseudoparenchym; genannt.

Die Algen sind in den Flechten meist unter der oberen Rinde in einer besonderen Schicht zu finden (heteromerer Thallus;). Es gibt allerdings auch Flechten, in denen die Algen gleichmäßig verteilt und dann oft auch formbestimmend für den Flechtenkörper sind (homöomerer Thallus;).

Zur Untersuchung ist es nötig, mit einer Rasierklinge möglichst dünne Schnitte durch eine Flechte herzustellen. Meist ist es günstiger, die Flechte trocken zu schneiden. Ist sie jedoch zu hart, muss man sie vor dem Schneiden befeuchten. Besonders dünne Schnitte erhält man recht rasch mit der in folgendem Kasten dargestellten Methode.

Jahr 1990	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 3
----------------------------	--	-------------------------

An Schnitten durch Xanthoria erkennt man:

1. Obere Rindenschicht (stark mit gelber Chrysophansäure inkrustiert)
2. Algenführende Schicht ("Gonidien;schicht") Es handelt sich um Trebouxia; Algen. Zum genauen Beobachten der Algen muss der Schnitt mit Präpariernadeln fein zerzupft oder gequetscht werden, bis man einige Algenzellen aus dem Verband herausgelöst hat und diese mit der Ölimmersion beobachten kann.
3. Markschrift, bestehend aus lockerem Plectenchym
4. untere Rindenschicht
5. Wurzelfasern (Rhizinen;)

Herstellung von Flechtenquerschnitten mit Histowachs:

Eine Messerspitze Histowachs wird auf einen Objektträger gegeben und mit einem Feuerzeug zum Schmelzen gebracht. In das noch flüssige Histowachs drückt man ein ca 4 mm langes trockenes (!!) Thallusstückchen der zu schneidenden Flechte und wartet, bis das Wachs erkaltet ist. (Um das Abkühlen zu beschleunigen, kann man den Objektträger auf den Objektisch des Mikroskops legen, wodurch die Wärme rasch abgeleitet wird). Dann schneidet man mit einer ggf. halbierten Rasierklinge, am besten unter dem Binokular, dünnste Scheibchen ab. Die Schnitte werden mit dem Skalpell oder ähnlichem direkt auf einen anderen Objektträger in einen Tropfen Wasser übertragen. Das Histowachs löst sich in Wasser auf, und man kann die Schnitte nach Auflegen eines Deckgläschens sofort untersuchen. Will man von den Schnitten ein Dauerpräparat in Gray-Wess herstellen, muss man zuvor vorsichtig unter dem Deckglas so viel Wasser durchsaugen, bis das Histowachs entfernt ist, da dieses sonst mit Gray-Wess einen aus vielen Tröpfchen bestehenden Niederschlag bilden würde. Bevor man ein Dauerpräparat anfertigt, sollte der Schnitt möglichst keine Luftblasen enthalten. Ggf. mit einem Feuerzeug aufkochen lassen.

Jahr 1990	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 3
----------------------------	--	-------------------------

Einen solchen Flechtenthallus, der einen "Rücken-Bauchbau" aufweist bezeichnet man als dorsiventral;. Er ist typisch für alle Blattflechten und Krustenflechten.

Da die Zellwände der Pilze aus Chitin;, diejenigen der Algen hingegen aus Zellulose bestehen, weisen wir die Verschiedenheit der Membranen durch folgende Reaktion nach

Zellulose Nachweis
<p>Unter dem Deckglas Lugolsche Lösung; durch saugen. Daraufhin Schwefelsäure durch saugen (2 Teile Schwefelsäure, 1 Teil Wasser). Die Zellwände der Algen quellen auf und verfärben sich blau. Die Zellwände der Pilze bleiben braun und werden nicht blau. Die Reaktion erfordert etwas Geschick und ist nicht sofort an allen Algenzellen gut zu beobachten.</p>

Viele Flechtenpilze haben im Zusammenleben mit der Alge die Eigenschaft entwickelt, ganz besondere "Flechtensäuren;" zu bilden, die sonst in dieser Weise im Pflanzenreich kaum vorkommen. Viele verfärben sich mit

- Kalilauge
- Chlorkalk
- Paraphenylendiamin

in charakteristischer Weise. Dies verwendet man als Hilfsmittel beim Bestimmen von Flechten. Manche dieser Flechteninhaltsstoffe lassen sich in geeigneten Lösungsmitteln umkristallisieren und erzeugen dann spezifische Kristallformen, die ebenfalls zur Identifizierung der Arten verwendet werden können.

Wir fertigen anschließend einen Schnitt durch die schüsselförmigen Fruchtkörper (Apothecien;) von Xanthoria an. In den dünnen Schnitten, die man u.U. kräftig quetschen muss, sieht man die Schläuche (Asci;) mit jeweils 8 eigentümlichen Sporen. Die Sporen sind zweizellig und besitzen eine dicke Scheidewand, die von einer zarten Kanüle durchzogen ist (polardiblastische Sporen;). Sie sind typisch für die Familie: Teloschistaceae (Caloplaca, Blastenia, Xanthoria etc.)

Jahr 1990	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 3
----------------------------	--	-------------------------

Parietin-Nachweis:

Wir extrahieren auf dem Objektträger einige Brösel von *Xanthoria parietina* mit Benzol oder Aceton. Beim Eindunsten bilden sich schöne, in Wasser unlösliche, gelbe Parietinkristalle (C₁₆H₁₂O₅). Saugt man unter dem Deckglas nun Kalilauge hindurch, so lösen sich diese Kristalle unter starker Rotfärbung auf. Später kristallisieren wieder rote Nadeln aus der alkalischen Lösung aus. Diese starke Rotfärbung mit Kalilauge kann man auch direkt durch Auftupfen von Kalilauge auf ein Flechtenstückchen beobachten.

Weiterhin sieht man, dass der Rand der Schüsseln Algen enthält und praktisch dieselbe Struktur besitzt wie der Thallus (*margo thallinis*;). Das Gewebe, aus dem die Schläuche entstehen (*Hypothecium*;), ist bei dieser Art hell und durchscheinend.

Lactophenol-Anilinblau:

Eines der in der Pilzkunde am häufigsten zur Untersuchung verwendeten Reagenzien ist: Lactophenol-Anilinblau. Es hellt auf und färbt in der Regel das Pilzplasma an. Sporen können damit oft deutlicher erkannt werden. In manchen Fällen ist die Anzahl der Sporenfächer erst in diesem Mittel sicher zu sehen, da vorher Öltropfen eine Mehrzelligkeit vortäuschen können, die gar nicht vorhanden ist. Setzt man dem Reagenz außer Anilinblau auch noch etwas Säurefuchsin zu, so kommt es manchmal zu reizvollen Doppelfärbungen.

3. *Cladonia furcata* m. *subrangiformis*

Diese bodenbewohnende Strauchflechte wächst auf trockenen, sonnigen Kalkhängen (*Xerobrometen*). In den grundständigen weißen Geschwüren der Stengel werden überschüssige Calciumionen offenbar in Form von Calciumoxalat ausgeschieden. Der sächsische Flechtenforscher Alwin Schade hat nachgewiesen, dass eine ganze Reihe

von Flechtenarten bei einem Überangebot von Kalk solche Calciumoxalatekretionen bilden können. Die gezeigte Flechte wurde, bevor Dr. Schade diese weißen Gallen richtig gedeutet hatte, als eine besondere Art behandelt. In manchen Büchern geschieht dies heute noch!

Calciumoxalat-Nachweis:

Wir fertigen durch die Oxalatgallen dicke Handschnitte an, legen sie auf dem Objektträger in einen Wassertropfen und bedecken mit einem Deckglas. Dann saugt man unter dem Deckglas Schwefelsäure hindurch. Nach einiger Zeit bilden sich an den entsprechenden Stellen Gipsnadeln.

Viele Cladonien enthalten Fumarprotocetrarsäure. Sie ist meist in der Algenzone und der Rinde gespeichert und verleiht der Flechte einen bitteren Geschmack.

Fumarprotocetrarsäure-Nachweis:

Unter dem Deckglas wird eine frisch angesetzte alkoholische Lösung von Paraphenylendiamin durchgesaugt. Es reichen Spuren von Paraphenylendiamin zum Nachweis aus. Vorsicht, Paraphenylendiamin ist giftig und gibt auf der Haut sowie auf Papier etc. erst nach einiger Zeit hervortretende braune Flecke. Statt die Lösung frisch anzusetzen, kann man auch die Rezeptur von Steiner benutzen. Positiver Nachweis: Rotfärbung in den entsprechenden Flechtzonen.

Während Xanthoria einen dorsiventralen Aufbau zeigte, ist Cladonia radiär gebaut. Alle Cladonien sind hohl. Eine andere radiär gebaute Flechte, die Bartflechte Usnea, hat dagegen ein sehr festes Stranggeflecht (Strangplectenchym;) als Mark und ist daher für Zugbelastung (Wind in Bäumen) gut ausgerüstet. Mit Hilfe der Histowachsmethode ist es leicht möglich, auch ohne Mikrotom Längsschnitte durch ein Stückchen einer Bartflechte zumachen.

4. Collema oder Leptogium spec.

Collema hat Blaualgen aus der Gattung Nostoc als Symbiosepartner. Im Schnitt sind die kettenförmigen Nostocfäden zu sehen. Blaualgen sind sehr ursprüngliche Organismen und enthalten wie Bakterien keine Kerne (Procaryonten). Einzelne Zellen der Nostoc sind etwas farblich abweichend und verdickt. Es sind Heterocysten, mit denen Nostoc; Luftstickstoff binden kann, eine Fähigkeit, die nicht viele Organismen besitzen (weitere sind Strahlenpilze z.B. als gallenbildende Symbiosepartner in Erlenwurzeln oder das Bacterium radicolium in Lupinen und anderen Fabaceae).

Wir können in den Nostoczellen jedoch Volutinkugeln (Nukleoproteid, enthält Ribonukleinsäure, Polyphosphate, Lipoproteide) nachweisen:

Volutinanfärbung bei Nostoc:
Anfärben mit wässriger Methylenblaulösung;. Gegebenenfalls unter mikroskopischer Kontrolle mit stark verdünnter Schwefelsäure (ca 1%) differenzieren, bis nur noch das Volutin dunkelblau ist. Betrachtung mit Ölimmersion erforderlich!

Es sei noch eine Doppelfärbung mitgeteilt, die allerdings nur an aufgeklebten Mikrotomschnitten gute Ergebnisse leistet (s. nächste Seite).

5. Lecidella elaeochroma

Lecidella (Lecidea) elaeochroma (Schwarznapfflechte) ist eine sehr häufige Krustenflechte auf Laubholzrinde. Auf einem grau grünlichen, rissig warzigem Thallus wachsen die Apothecien, die eine schwarze Scheibe und einen schwarzen Rand besitzen.

Wir fertigen Längsschnitte durch ein Apothecium an. Mit einer Rasierklinge (ich benutze halbierte Rasierklingen) schneiden wir dazu von den noch auf der Rinde festgewachsenen Apothecien dünne Scheibchen herunter. Günstig ist es, wenn man das Schneiden unter dem Binokular verfolgen kann.

Schnitte in Wasser untersuchen:

Anilinblau - Bismarckbraun:
<p>Objekt: Collema tenax in Pfeiffer fixiert, in Paraffin über Methylbenzoat eingeschlossen, Schnitte etwa 6 - 10 µm dick, mit Eiweißglycerin aufgeklebt und Kollodiumhäutchen abgesichert.</p> <p>Kollodiumhäutchen:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 100 % Isopropanol 2. 0.2 % Kollodiumlösung 3. 70 % Spiritus 5 min zum Härten 4. Wasser <p>Färbung:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Anilinblau- Lactophenol Die Farbe färbt sehr selektiv die Nostoczellen an das Hyphenplasma wird schwächer angefärbt 2. Wasser 3. Bismarckbraunlösung (in ca. 50 % Spiritus) Die Farbe färbt die Gonidien nicht, sondern färbt die sonst unsichtbare Gallerte zwischen Pilzhyphen und Algenzellen 4. Wasser 5. Spiritus 70%, 94% 6. Isopropanol, Xylol, Cädax <p>Ergebnis: Die Nostoczellen sind blaugefärbt unter der Ölimmersion hat ihr Plasma eine wabige Struktur, Volutinkörper sind nicht selektiv angefärbt. Das Pilzhyphenplasma ist ebenfalls schwach bläulich und granuliert angefärbt. Die Gallerte ist gelb bis orange und einzelne Abscheidungszone sind in bestimmten Fällen gut zu erkennen.</p>

Jahr 1990	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 3
----------------------------	--	-------------------------

Nur der äußerste Rand des Gehäuses, das die Fruchtschicht (Hymenium) umschließt, ist bei dieser Art schwarz gefärbt. Bei anderen Arten der Gattung Lecidea ist auch die ganze Schicht unter den Schläuchen (Hypothecium) kohlschwarz. Im Gegensatz zu Xanthoria ist der schwarze Scheibenrand völlig algenfrei und wird offenbar durch ein ganz anderes Pilzgeflecht aufgebaut als das restliche Lager der Flechte. Ein solcher, vom Fruchtwewebe aufgebauter, algenfreier Scheibenrand wird "Eigenrand" (margo proprius;) genannt.

Die Sporen von Lecidea sind einzellig, durchscheinend, eiförmig und liegen zu 8 in den Schläuchen.

Mit Gray-Wess, das man unter dem Deckglas durchsaugt, lassen sich von gelungenen Schnitten gut ungefärbte Dauerpräparate herstellen.

6. Buellia punctata

Buellia punctata bildet winzige, unauffällige, schwarze punktförmige Fruchtscheibchen auf einem dünnen grauen Lager aus. Sie kommt vor allem auf Alleebäumen in sonniger, warmer Lage vor. Wir stechen mit einem Skalpell ein Fruchtscheibchen ab und fertigen ein Quetschpräparat an. Schnitte sind nicht nötig, da beim Quetschen, die Fruchtschicht meist genügend ausgebreitet wird. Interessant sind die dunklen zweizelligen Sporen und die am Ende braungefärbten, kugelförmig verdickten Füllfäden (Paraphysen;), die charakteristisch für alle Buelliaceae sind.

7. Graphis scripta

Wir schneiden die schriftförmigen Fruchtkörper quer zu ihrer Längsachse und untersuchen in Lactophenol-Anilinblau. Im mitgeschnittenen Lager findet man die Alge Trentepohlia;. Die Sporen dieser Art sind parallel-mehrzellig mit linsenförmigen Sporenfächern. Allerdings erwischt man häufig Flechtenproben, in denen alle Sporen schon ausgestreut sind, so dass keine vollen Asci mehr zu entdecken sind. In Quetschpräparaten ist nicht viel zu sehen!

8. Verzeichnis der verwendeten Chemikalien

Gentianaviolett

Messerspitze Farbstoff in Aqua dest. auflösen. Die genaue Konzentration ist unwichtig

Gray-Wess (Einschlußmittel)

Polyvinylalkohol	2 g
Glycerin	5 ml
Milchsäure	5 ml
Wasser	10 ml

im Wasserbad mehrere Stunden erhitzen, bis sich alles gelöst hat

Histowachs III

Polyäthylenglycol Smp. 56-58 C (zu beziehen bei Chroma Stuttgart)

Jodjodkali

Jod	1 g
Kaliumjodid	2 g
Aqua dest.	300 ml

Kalilauge (zur Aufhellung von Schnitten)

Kaliumhydroxyd	10 g
Aqua dest.	100 ml

Lactophenol:

Phenol krist	20 g
Milchsäure	20 g
Glycerin	40 g
Wasser	20 g

Lugolsche Lösung siehe Jodjodkali

Methylenblau

Messerspitze Farbstoff in Aqua dest auflösen. Die genaue Konzentration ist unwichtig

Jahr 1990	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 3
----------------------------	--	-------------------------

Paraphenyldiamin n. Steiner

Paraphenyldiamin	1 g
Natriumsulfit	10 g
Aqua dest.	100 ml

Schwefelsäure

Es genügt technische Schwefelsäure

weniger wichtig sind:

Chloralhydrat (zur Aufhellung von Schnitten)

Chloralhydrat	50 g
Aqua dest	25 ml

Phosphormolybdänsäure (zur Haltbarmachung von Gentianaviolett und anderen basischen Anilinfarbstoffen gegen nachfolgende Alkoholbehandlung)

Phosphormolybdänsäure	5 g
Aqua dest	100 ml

Jahr 1990	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 3
----------------------------	--	-------------------------

9. Literatur

- Bertsch, K.: Flechtenflora von Südwestdeutschland. (1964) Stuttgart (Ulmer)
- Braune et al.: Pflanzenanatomisches Praktikum 2. (1982) Stuttgart (G. Fischer)
- Esser, K.: Kryptogamen (1976) Berlin (Springer)
- Follmann, G.: Flechten (1960) Stuttgart (Franckh)
- Gams, H.: Kleine Kryptogamenflora Band 3, Flechten (1976) Stuttgart (G.Fischer)
- Hale, M.: The Biology of Lichens (1983) London (Arnold)
- Henssen, A und Jahns, H.M.:
Lichenes (1974) Stuttgart (Thieme)
- Hök, v.C.: Algen (1978) Stuttgart (Thieme)
- Migula, W.: Einführung in die mikroskopische Untersuchung der Flechten. Mikroskopie für Naturfreunde (1927) S.33-41, 47-57, 85-92
- Poelt, J.: Bestimmungsschlüssel europäischer Flechten. (1969) Lehre (Cramer)
- Schömmel, F.: Kryptogamenpraktikum (1949) Stuttgart (Franckh)
- Schumm, F.: Präparation der Flechten. Mikrokosmos (1965) S.125-127; - Bau und Untersuchung der Schriffflechte. Mikrokosmos (1968) S.78-79; - Die Becherflechte *Cladonia furcata*. Mikrokosmos (1971) S.45-46; - Die Nettphotosynthese von Flechtentransplantaten als Maß für die Immissionsbelastung der Luft. Angew.Botanik 53, 31-39 (1979)
- Wirth, V.: Flechtenflora (1980), Stuttgart (Ulmer); - Flechten (1980), Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde, Serie C (Allgemeinverst. Aufsätze), Nr.12