Har sekundære forbindelser i *Hypogymnia physodes* en UV-B skjermende funksjon, og er det en sammenheng mellom innholdet av disse og lysforholdene langs en naturlig lys-skyggegradient?



Av Marius Lind

Cand. scient oppgave i plantefysiologi Institutt for naturforvaltning Norges landbrukshøgskole 2003



FORORD

Tiden kom da hovedfagsoppgave skulle velges. Jeg var på søk etter spennende problemstillinger innen plantefysiologi, da Knut Asbjørn Solhaug foreleser og inspirator gjennom flere botanikk og plantefysiologikurs viste meg veien inn i en spennende økofysiologisk verden med sekundære forbindelser i lav som tema.

Takk til Knut Asbjørn Solhaug for ideer, inspirasjon og god veiledning før og under arbeidet med hovedfagsoppgaven. Yngvar Gauslaa kom raskt inn i bildet og har vært en utfyllende inspirasjonskilde og medspiller. Sammen har de vært pionerer på arbeid med sekundære forbindelser i lav og spørsmål knyttet til hvilke funksjoner disse har. De hadde fortsatt mange ubesvarte spørsmål på dette feltet og foreslo en hovedfagsoppgave som var veldig relevant og ikke minst svært interessant. Mulighetene for nye og spennende funn var absolutt tilstede. Det å få komme inn i et etablert forskermiljø er spennende og lærerikt. Knut Asbjørn Solhaug og Yngvar Gauslaa har inspirert og oppmuntret gjennom hele prosessen og har vært til uvurderlig støtte og hjelp underveis. Deres iver og genuine interesse for faget har satt sine varige spor.

Jeg vil spesielt takke Knut Asbjørn Solhaug for utstått tid og min frustrasjon med å få figurer og annet over i Word dokument. Det har blitt mange stunder foran din datamaskin. Takk også for hjelp til statistikkberegninger og praktisk hjelp og veiledning på lab. Jeg har satt stor pris din åpne dør der du alltid har tatt deg tid når det skulle være. Jeg kommer til å savne atmosfæren i Urbygningen og på klimalaben.

Takk til Yngvar Gauslaa for hjelp til statistiske beregninger og hjelp til bildemanipulering av hemisfæriske fotografier.

Hovedfagstiden har vært inspirerende og givende. Det føles godt å ha fullført et slikt arbeid, et arbeid som for meg har åpnet for mange nye muligheter og interesser.

Takk også til Randi, Sigurd og Jostein som har støttet meg og holdt ut perioder med mye fokus på arbeid med hovedfagsoppgaven.

Forsidebilde av Per-Anders Esseen.

Ås, 16.12.2003

SAMMENDRAG

UV-absorberende forbindelser i lav har ofte blitt knyttet til en UV-skjermende funksjon. *Hypogymnia physodes* (vanlig kvistlav) er en vanlig forekommende bladlav som inneholder fire fargeløse lavsyrer. Atranorin er lokalisert i barken, physodessyre, physodalsyre og protoceterarsyre er margpigmenter. Innhold av lavsyrer i 75 thalli samlet i fem habitat langs en lokal lys-skyggegradient, fra eviggrønne boreale skoger gjennom løvfellende habitat til isolerte trær og åpent strandberg ble studert for å se på sammenhengen mellom lavsyreinnhold og lysforhold langs en lokal lys-skyggegradient. Lavsyrene kan ekstraheres fra levende thalli med aceton og er behandlet som en blanding.

Et lite utvalg thalli fra strandberg viste tegn på langvarig fotoinhibering. Men resultatene for hele lys-skyggegradienten viste at det var små forskjeller mellom de ulike habitat og at verken thalli fra åpne eller skyggefulle habitat var mer eller mindre utsatt for fotoinhibering.

Selv om beregninger av stedsfaktor (gjenspeiler hvor åpent kvist- og bladverket er relativt til en åpen himmel) kun var basert på sommerbilder vil en tydelige gruppering i skyggefulle og åpne habitat gjenspeiles selv om stedsfaktorverdier korrigeres for vinterhalvåret.

Lavsyreinnholdet i *H. physodes* kan ikke forklares av lysforholdene alene. En kombinasjon av spesifikk thallusvekt, vannholdingskapasitet og fordeling av direkte og indirekte sollys er bestemmende for innholdet av lavsyrer.

Det var en dårlig sammenheng mellom stedsfaktorer og innhold av lavsyrer i *H. physodes* thalli. Det var imidlertid en sterk sammenheng mellom spesifikk thallusvekt og stedsfaktorer, noe som ga en gruppering i åpne og skyggefulle habitat med kraftige thallus i åpne habitat og mindre kraftige i skyggefulle habitat. Thalli fra lysutsatte habitat er derfor godt beskyttet mot UV-B stråling gjennom stabile tørre perioder i form av god refleksjonsevne. Det er mulig at høy spesifikk thallusvekt, som gir tykke thalli med god refleksjonsevne, er en like viktig del av lysbeskyttelsen som lavsyreinnholdet.

Gjennomsnitts absorbansspektre ved 200-500 nm for *H. physodes* thalli fra hvert av de 5 ulike habitat langs lys-skyggegradienten viste at det relative forholdet mellom de ulike lavsyrene er konstant, uavhengig av habitat. En slik sammenheng kan tyde på en økofysiologisk betydning for alle de fire lavsyrene. Det er mulig at lavsyrene i *H. physodes* har flere samtidige funksjoner. En slik flerfunksjon kan godt tenkes å bli indusert av en enkelt faktor alene, noe som ville være en fordel for laven.

Hypogymnia physodes thalli fra strandberg hadde et mye lavere innhold av klorofyll. Det er mulig at det har skjedd en degradering av klorofyllet, men årsaken til dette er ikke kjent.

Selv med UV-B stråling som var 3 ganger maksimalt nivå av det som normalt måles på vanlige klare sommerdager, ble det ikke påvist noen særlig skade i PSII i *H. physodes* thalli som var UV-B eksponert kontinuerlig i 5 døgn. Acetonekstraherte thalli hadde et restinnhold av lavsyrer på 1-3 %. Et restinnhold i denne størrelsesorden er ikke nok til å beskytte laven mot UV-B relaterte skader. Kontinuerlig PAR eksponering kombinert med UV-B eksponering og fukting kan ha gitt stresseffekter som vises som nedsatt effekt i PSII. Temperatur, PAR og

fukting kan være like viktige faktorer for stressinduserte reaksjoner i lav som økt UV-B stråling.

Etter 10 døgn med ekstremt høyt UV-B strålingsnivå ble det vist en generell nedgang i effektiviteten i PSII. Men det var ikke mulig å se noen signifikante forskjeller i respons på ulik behandling og dermed skille ut en eventuell effekt som viser at lavsyrene har en UV-B skjermende funksjon. Derfor er det ingen ting som tyder på en klar UV-B skjermende funksjon for lavsyrene i *H. physodes*.

Det var kun en beskjeden resyntese av lavsyrer i *H. physodes* thalli på omtrent 3 - 6% av det opprinnelige innholdet, uavhengig av behandling. Ut fra resultatene her å dømme kan kriteriet om lavsyresyntese indusert av UV-B stråling ikke sees å ha blitt oppfylt.

INNHOLD

FORORD	II
SAMMENDRAG	III
INNHOLD	V
FORKORTELSER V	III
1 INNLEDNING	1
1.1 Stråling fra solen, ozon og liv på jorden	1
1.2 Beskyttelse mot UV-B stråling	2
1.3 Skadelige effekter av UV-B	3
1.4 Lavsymbiosen	4
1.5 Sekundære forbindelser hos lav	5
1.6 Tilnærming til oppgaven	6
1.7 Klorofyll-fluorescens	8
2 MATERIALER OG METODER	9
2.1 Studieorganisme	9
2.2 Studieområder	9
2.3 Innsamling av laven	12
2.4 Fotografering-stedsfaktorer	13
2.5 Klorofyll-fluorescens	15
2.6 Vekt og størrelsesparametere	15

2.9 Acetonekstraksjon av <i>Hypogymnia physodes</i>	16
2.10 UV-B toleranse	17
2.11 Induksjon av lavsyresyntese i thalli fra granskog og strandberg	19
2.12 Tynnsjiktkromotografi	19
2.13 Statistiske analyser	20

3 RESULTATER	21
3.1 Acetonekstraksjon av <i>Hypogymnia physodes</i> thalli fra granskog og strandberg	21
3.2 Klorofyll-fluorescensmålinger (F_v/F_m) for <i>Hypogymnia physodes</i> thalli fra granskog og strandberg	22
3.3 Lys-skyggegradienten	22
3.4 Innhold av lavsyrer i <i>Hypogymnia physodes</i> thalli fra 5 ulike habitat langs lys-skyggegradienten	23
3.5 Absorpsjonsspektre for <i>Hypogymnia physodes</i>	30
3.6 PSII kvanteutbyttet langs lys-skyggegradienten	32
3.7 Innhold av klorofyll langs lys-skyggegradienten	33
3.8 UV-B toleranse i PSII i <i>Hypogymnia physodes</i> thalli fra granskog og strandberg (5 døgn)	34
3.9 UV-B toleranse i PSII for <i>Hypogymnia physodes</i> thalli fra granskog og strandberg (10 døgn)	38
3.10 Induksjon av lavsyresyntese i <i>Hypogymnia physodes</i> thalli fra granskog og strandberg	46
4 DISKUSJON	47
4.1 Acetonekstrahering av Hypogymnia physodes	47
4.2 PSII kvanteutbyttet for <i>Hypogymnia physodes</i> langs lys-skyggegradienten	48
4.3 Lys-skyggegradienten	48

4.4 Innhold av lavsyrer i <i>Hypogymnia physodes</i> thalli fra 5 ulike habitat langs lys-skyggegradienten	49
4.5 Effekt av stedsfaktorverdier på innholdet av lavsyrer og morfologi i <i>Hypogymnia physodes</i>	50
4.6 Absorpsjonsspektra for <i>Hypogymnia physodes</i>	51
4.7 Innhold av klorofyll langs lys-skyggegradienten	53
4.8 UV-B toleranse i PSII i <i>Hypogymnia physodes</i> thalli fra granskog og strandberg (5 døgn)	53
4.9 UV-B toleranse i PSII for <i>Hypogymnia physodes</i> thalli fra granskog og strandberg (10 døgn)	54
4.10 Induksjon av lavsyresyntese i <i>Hypogymnia physodes</i> thalli fra granskog og strandberg	55
5 KONKLUSJON	57
6 REFERANSER	58
7 APPENDIKS	65

FORKORTELSER

- **PAR** = photosynthetic active radiation = fotosyntetisk aktiv stråling
- **PSII** = photosystem II = fotosystem II
- F_v/F_m = mål på maksimalt kvanteutbytte for PSII
- **ISF** = Indirect Site Factor = indirekte stedsfaktor
- **DSF** = Direct Site Factor = direkte stedsfaktor
- **GSF** = Global Site Factor = global stedsfaktor
- **STW** = spesific thallus weight = spesifikk thallus vekt
- **ANOVA** = Analysis of Variance = variansanalyse
- **SE** = Standard Error = standardfeil
- **p** = Probability = sannsynlighet
- TLC = Thin Layer Chromotography = tynnsjiktkromotografi
- **UV** = Ultraviolet Radiation = ultrafiolett stråling

1 INNLEDNING

1.1 Stråling fra solen - ozon - mulighet for liv

Stråling fra solen ved den ytre grense av jordens atmosfære, inneholder en stor andel bølgelengder (λ) kortere enn synlig lys (400-700 nm). Bølgelengder i området 100-400 nm, utgjør den ultrafiolette (UV) del av spekteret. De korteste av disse bølgelengder (UV-C, 100-280 nm) blir i all vesentlighet blokkert (absorbert) av atmosfærisk oksygen (O₂) og ozon (O₃). Bølgelengder i UV-B området (280-315 nm) blir effektivt absorbert av ozon men ikke fullstendig, mens UV-A bølgelengder (315-400 nm) bare svakt blir absorbert av ozon og når derfor lettere jordens overflate (Madronich *et al.*, 1998). Mengden av UV-B stråling som når overflaten på jorden er derfor sterkt avhengig av ozoninnholdet i stratosfæren. Synlig lys eller fotosyntetisk aktivt lys (PAR) går gjennom ozonlaget upåvirket.

Ozon blir dannet av oksygen i stratosfæren, der diatomære molekyler med oksygen blir splittet når de samvirker med fotoner fra UV-C stråling, slik at et enkelt oksygenmolekyl koples med O_2 og danner O_3 . Ozonet utgjør et tynt lag av atmosfæren, 10-30 km over jordens overflate som beskytter livet på jorden mot de skadelige effektene av ultrafiolett stråling fra solen.

Av biologiske grunner blir UV-området delt i tre band. UV-A båndet blir i liten grad påvirket av ozonlaget, og på mange områder er den biologiske virkningen av bølgelengder i dette området liknende det vi ser for synlig lys (400-700 nm). UV-A er synlig for noen insekt-, fugl- og fiskearter. UV-B stråling har en sterk og stort sett skadelig effekt på biologiske systemer. UV-C stråling har en viktig rolle som fornyer av ozonlaget.

Da ozon spiller en så viktig rolle i skjermingen av UV-stråling, vil enhver potensiell svekkelse av den stratosfæriske ozonkonsentrasjon være bekymringsfull da dette fører til en økning av de korte energirike bølgelengdene i UV-B området av spekteret som når jordoverflaten. Ozon konsentrasjonen i stratosfæren har blitt svekket, da særlig de siste 30 år, som en konsekvens av utslipp av forbindelser med klor, brom, hydrogen og nitrogen oksider i atmosfæren. Bruken av klorfluorkarboner (KFK) som aerosoldrivgasser og for eksempel skumplast, har ført til en opphopning av disse forbindelsene i stratosfæren. Etter hvert som disse gassene stiger, blir de utsatt for stadig økende stråling fra solen som splitter dem i frie kloratomer som effektivt ødelegger ozon ved å binde seg til og splitte ozonmolekylene (Molina & Rowland 1974).

Nivåene av nær-bakke UV-B stråling er ikke bare kontrollert av stratosfærisk ozon. Solens høyde på himmelen, aerosoler, skyer og barometertrykk er også faktorer som påvirker nivåene av UV-B (Björn, 1999). Som en følge av at strålingen fra solen har en lenger vei å gå før den når høyere breddegrader, mottar polare regioner mye mindre UV-B stråling enn tropiske regioner (Caldwell *et al.*, 1980), men siden svekkelsen av ozonlaget er sterkest over polene vil den høyeste relative økningen av UV-B stråling fra solen mye med breddegrad, lengdegrad, sesong, og tid på dagen, men også langs lokale lys-skyggegradienter. Denne naturlige variasjonen av UV-B nivåer på jorda overskrider i stor grad den økning av UV-B stråling fra solen som man

forventer med en svekkelse av ozonlaget i stratosfæren. Derfor er UV-B forholdene for landbasert planteliv i dag ganske variable, både i rom og tid.

1.2 Beskyttelse mot UV-stråling

I urtiden mens jorden var forholdsvis ung (for omtrent 3.8×10^9 år siden), mottok jorden veldig høye doser med UV-stråling. Det er beregnet at solen den gang avga omtrent 10000 ganger mer UV enn i dag (Canuto *et al.*, 1982). Cyanobakterier var antakelig blant de første fotosyntetiske organismer som bosatte jorden for rundt tre milliarder år siden. Med manglende eller lave konsentrasjoner av O₂ og O₃, mottok jorden antakelig høye doser UV-C og UV-B stråling. Derfor er det sannsynlig at disse tidlige organismene var begrenset til akvatiske økosystemer (Lowry *et al.*,1980; Canuto *et al.* 1982; Caldwell 1979). Her ble UV-B strålingen filtrert av substanser som var i løsning eller lå som sjikt i vannkolonnen og fungerte som et eksternt filter som hindret UV-gjennomtrenging. For å drive fotosyntese var disse organismene avhengig av synlig lys som de mottok samtidig med livstruende UV-stråling i mye høyere doser enn i dag. I cyanobakterier finner man de enkleste og evolusjonært de eldste skjermingsforbindelsene, scytonemin og mycosporinliknende aminosyrer (MMA). Da disse absorberer i UV-C, UV-B og UV-A området (Klisch *et al.*, 2002) er det antatt at cyanobakteriene overlevde og senere koloniserte mer eksponerte habitat på grunt vann og på landejorden (se Buffoni Hall, 2002).

Evolusjonen av landbasert planteliv ble muliggjort gjennom utvikling av et ozonlag som fungerte som et eksternt UV-filter i jordens stratosfære. Landbasert planteliv utviklet seg fra akvatiske omgivelser omtrent langs linjen av encellete alger-multicellulære algercharophycean alger-moser-bregner-gymnospermer-angiospermer. Utvilkingen av plante- og dyreliv skjedde parallelt med endringene i sammensetningen av troposfæren og stratosfæren. Det er nå allment akseptert at utvikling av metabolisme for polyfenoler, som delvis er indusert av UV-B, har spilt en viktig rolle for evolusjonen av landplanter. Flavonoider og lignin, begge produkter av denne metabolismen, opptrer hos gymnospermer og angiospermer, men mangler i de fleste alger. Enklere fenoler opptrer i lavere planter, slik som sphagnumsyre og disse har kanskje virket som UV-filter i opprinnelsen til de vaskulære plantene, og hjulpet overgangen av planteliv fra aquatiske omgivelser, hvor UV-B strålingen er svakere som følge av at vannkolonnen svekker strålingen, til landlige omgivelser med sterkere UV-B stråling fra solen (Rozema *et al.*, 2001).

Lav mangler flavenoider selv om de produserer et unikt spekter av sekundære forbindelser med aromatiske strukturer. Sekundære metabolitter i lavere organismer har blitt sett på som rester av en tidlig biokjemisk evolusjon (Zahner *et al.*, 1983). Det er antydet at landbasert liv bare kunne vært mulig etter utvikling av et symbiotisk samspill mellom semi-akvatiske grønnalger og sopp (Wright, 1990). Sett i lys av dette er det mulig at noen av de tidligste organismer på land har vært lav (Hawksworth, 1994).

1.3 Skadelige effekter av UV-B stråling

UV-B stråling (280-320 nm) er en allestedsnærværende stressfaktor for levende organismer på jorden. Fotosyntetiske organismer er stasjonære og direkte avhengig av stråling fra solen og derfor spesielt utsatt for skadelige virkninger av UV stråling. Som en følge av svekkelsen av ozonlaget i stratosfæren har dette problemet blitt verre i Antarktis, men økt UV-B stråling har også blitt rapportert på den nordlige halvkule (Kerr & McElroy, 1993; Jokela *et al.*; 1995; Madronich *et al.*, 1995; Rex *et al.*, 1997). Under de siste tiår har effektene av UV-stråling (UVR) på naturlige økosystemer fått mye oppmerksomhet, og særlig ved breddegrader mot polene, som vist ved langtidsstudier utført i Nord Sverige (Björn *et al.*, 1999), Sør Argentina (Ballarè *et al.*, 2001) og den Antarktisk halvøy (Huskies *et al.*, 1999).

De tendenser vi nå ser til svekkelse av ozonlaget med økt UV-B stråling og mulige effekter av dette, er basert på målinger gjort de siste tiår. For å få et lengre perspektiv på effektene av økt UV-B stråling, er det viktig å ta hensyn til UV-B strålingsnivåer i tidligere tider. Under evolusjonen av landplanter var konsentrasjonen av atmosfærisk oksygen lavere enn i dag (Garcia-Pichel, 1998). Om ozonlaget var mye mindre under de tidligere fasene av livet på landejorden er usikkert. Det er likevel klart at UV-B nivåene i begynnelsen av utviklingen av livet på jorden overskred de nivåer vi finner i dag.

Hvordan påvirket tidligere UV-B strålenivåer utviklingen av liv? Har tilpasningen til fortidens UV-B stråling blitt bevart eller er den tapt?

Mange studier tar for seg vaskulære planter og bryofytter, men type og retning av effekter er ofte sterkt variable, avhengig av artene som er studert. Effekter av UV-B stråling på lav er ikke særlig godt beskrevet. Mange lavtaxa lever i eksponerte habitat ved store høyder og ved breddegrader nær polene, hvor den biologiske påvirkningen av UV-stråling først blir synlig som følge av den høydebaserte gradienten av ozon som gir relativt store endringer i nivåene av UV-B stråling sammenliknet med de ved lavere høyder (Buffoni Hall, 2001).

DNA, proteiner og membraner, hemming av fotosyntesen og vekst er noen av de direkte og indirekte målområder for UV-B stråling (Caldwell *et al.*, 1995, Jansen *et al.*, 1998). Absorbering av UV-B stråling i DNA kan utløse dannelsen av syklobutan-pyrimidin dimerer (CPDer) og pyrimidin (6-4)-pyrimidione dimerer [(6-4)-fotoprodukter] (Britt 1996). Pyrimidin dimerene kan fungere som blokkering av transkripsjonen og replikasjonen av DNA, og er derfor sterkt toksiske. En av mekanismene for å fjerne disse, er den direkte reverseringen av UV-indusert DNA skade med fotolyaser (Sancar, 1994), som opptrer når organismer blir eksponert for stråling som inneholder bølgelengder i det blå (typisk 400-500 nm) og/eller UV-A området (315-400 nm) av spekteret. Fotolyaser har blitt funnet i både dyr- og planteriket, i bakterier (Sancar *et al.*, 1984), sopp (Eker *et al.*, 1994) og i alger (Petersen *et al.*, 1999). Selv om mye forskning har blitt utført på DNA skade og reparasjonsmekanismer i mange organismer på tvers av ulike riker, er det lite man vet om dette området når det gjelder lav.

Planter har respondert på stress som følge av UV-stråling ved utvikling av effektive mekanismer for reparasjon av påført skade og ved akkumulasjon av UV-skjermende pigmenter som forhindrer skade (Jordan, 1996; Cockell & Knowland, 1999). Lav var en tidlig kolonisator av landejorden og har derfor antakelig gjennomlevd tider med et høyere nivå av UV-B stråling enn i dag. Hvordan har lav utviklet beskyttelse mot slike forhold og har lav

beholdt disse egenskapene frem til i dag? Mer enn 700 sekundære forbindelser er kjent i lavdannende sopp (S. Huneck og I. Yoshimura, 1996). Noen av de UV-skjermende forbindelsene er konstitutive, mens andre kanskje kan bli indusert av UV-stråling (Beggs & Wellmann, 1994). Selv om stoffene man finner hos de ulike grupper organismer er svært forskjellige, ser det ut til at skjermingen mot UV-stråling er universell (Cockell & Knowland, 1999).

1.4 Lavsymbiose

Lav er per definisjon en symbiotisk organisme, bestående av en soppkomponent (mykobiont) og en eller flere fotosyntetiske komponenter (fotobionter), som kan være en grønnalge eller en cyanobakterie. Generelt eksisterer lav som avgrensede thalli, men samspillet mellom de ulike partnerne kan være veldig komplekst og kan involvere hele tre riker. De kan derfor ikke sees som individuelle genetisk og evolusjonært. I et økologisk perspektiv er lav enda mer komplekst og derfor ser noen lav som et økosysytem i miniatyr (Farrar, 1976a). I det nære fysiologiske samspillet i en lav er mykobionten vanligvis den dominerende part. Mykobionten er en hetereotrof organisme som får sin karbonnæring fra fotobionten. Hos grønnalgelav består strømmen av karbon som går fra fotobiont til mykobiont av polyoler (sukker alkoholer) slik som erythritol, ribitol og mannitol, og i form av glukose hvis det er en cyanolav (Smith & Douglas, 1987). Dette er en nødvendig fordel for mykobionten, men det er ikke klarlagt hvilke fordeler fotobionten har av dette samspillet. Av varierende grad er lavsymbiosen nødvendig for de ulike partene som er involvert. Grønnalgen *Trebouxia* som man finner i omtrent 20% av all lav, finner man sjelden som frittlevende. Mens *Nostoc, Trentepholia og Syntonema* ofte opptrer både som frittlevende og lavdannende.

Lavsymbiose er en stor suksess som har fått en utbredelse i nesten alle terrestriske habitat fra tropene til polare regioner. Som følge av denne symbiosen har både mykobionten og fotobionten ekspandert inn i mange habitat hvor de hver for seg ville vært sjeldne eller fraværende. De fleste frittlevende alger og cyanobaterier er avhengig av akvatiske eller i det minste veldig fuktige terrestriske habitat, men som part i lav opptrer de i store mengder også i habitat som ofte er tørre. Soppen kan forsterke vannopptaket som følge av dens lave vannpotensial og den reduserer lysintensiteten betraktelig som fotobionten utsettes for. Sterk lysintensitet har ulike effekter på fotobionten (Demmig-Adams *et al.*, 1990b) og derfor utgjør lavdannelse en mekanisme som kan sørge for at fotobionter kan ekspandere til omgivelser med et regime av sterkt lys. Slik sett gir lavdannelsen også fordeler for fotobionten.

Lav blir i løpet av levetiden eksponert for kumulative nivåer av stråling fra solen fordi de generelt lever lenge og fordi de eksponerte celler ikke blir fornyet så raskt som i vaskulære planter (Bjerke, 2003). Normalt blir lav utsatt for de høyeste dosene med stråling når de er uttørket, og kan som følge av uttørking ikke drive aktiv reparasjon. Lav er derfor antakelig mer avhengig av beskyttende skjerming enn organismer som er homiohydriske (opprettholder konstant vannbalanse) (Solhaug *et al.*, 2003). Som hos poikilohydriske organismer varierer vannstatusen hos lav passivt med de miljømessige forhold i omgivelsene. Ved solskinn eller tørre forhold mister lav vannet raskt og blir fysiologisk inaktive. Når de gjenvinner fuktigheten ved nedbør, tåke eller dugg, kan de ta opp igjen den fotosyntetiske aktiviteten og respirasjonen i løpet av minutter og bli metabolisk aktive.

Fuktede thalli kan være veldig følsomme for sterkt lys (Demmig-Adams *et al.*, 1990) og høye temperaturer (Lange, 1953), mens uttørkede lav antas å være eksepsjonelt motstandsdyktige mot ekstreme klimatiske forhold. Lav i tørket tilstand har vanligvis ikke målbar gassutveksling og det oppstår en utkopling mellom fotosystem II (PSII) og lyshøstings sentrene (LHC) (Lange *et al.*, 1989). Tørkede thalli har en reduksjon i mengde lys som slipper gjennom overbarken (Büdel *et al.*, 1996) og en sterkere lysrefleksjon (Gauslaa *et al.*, 1984). Til tross for tilsynelatende hardførhet og stabilitet hos tørr lav, er det noen studier som viser at de kanskje ikke er så motstandsdyktige mot stress i tørr tilstand. Lufttørkede arter av ordenen Peltigerales er veldig følsomme for sterkt lys (Gauslaa *et al.*,1999) og til moderat høye temperaturer (MacFarlane, 1980). Gauslaa & Solhaug (1999) viste at *Lobaria pulmonaria* er en art som er følsom for sterkt lys i lufttørket tilstand. Ved store høyder mottar tørre thalli høye stråledoser over lengre perioder. Da det ser ut til at reparasjonsmekanismene er inaktive i tørre thalli, er det mulig at skade kan akkumulere over tid.

1.5 Sekundære forbindelser i lav

En UV-beskyttende funksjon hos lav har foreløpig blitt tillagt sekundære forbindelser også kalt lavforbindelser (f.eks Fahselt, 1994; Bacherau & Asta, 1997; Huneck, 1999). Dette er en heterogen gruppe forbindelser med ulik biosyntetisk syntesevei som man kun finner i lav (Huneck & Yoshimura, 1996). De fleste lavforbindelser absorberer UV-B stråling sterkt og fargede forbindelser, pigmenter som parietin, absorberer i tillegg deler av den fotosyntetisk aktive strålingen (PAR) (Hill & Woolhouse, 1966). Noen få veldig vanlige forbindelser finner man i høye konsentrasjoner i barken på lav som danner en skjerm over fotobiontsjiktet, mens hoveddelen av forbindelsen er lokalisert i fotobiontsjiktet i den øvre del av margen (Fahselt & Alstrup, 1997). Lavforbindelser har derfor et potensial til å beskytte mot ulike effekter av UV-B stråling. Likevel er de økologiske betydningene av sekundære forbindelser i lav komplekse og ofte bygd på gjetninger.

Mange av de sekundære forbindelsene i lav er fenoler. Disse fenolene i lav er krystaller som er avsatt av sopp komponenten hovedsakelig på utsiden av sopp hyfene (Fahselt, 1994). De fleste av de sekundære metabolittene man finner i lav er utledet fra acetyl-polymalonyl synteseveien, men noen kommer fra shikimic acid og mevalonic acid synteseveiene. Av de acetyl-polymalonyl utledete forbindelsene er aromatiske produkter særlig godt representert, de mest karakteristiske er dannet ved binding av to eller tre orcinol eller β -orcinol-type fenol enheter gjennom ester, eter og karbon-karbon bindinger. Den store majoriteten av depsider, depsidoner, dibenzofuraner, usninsyre og depsoner ser alle ut til å bli produsert ved slike mekanismer og alle er karakteristiske for lav. Andre aromatiske forbindelser av acetylpolymalonyl opprinnelse slik som kromoner, xanthoner og anthraquinoner, er antakelig dannet ved intern syklisering av enkle, foldete polyketidekjeder og er ofte identiske eller analoge til produkter hos ikke lavdannende sopper eller høyere planter (Elix, Lichen Biology, 1996). Fenoler i andre organismer, slik som i f.eks landlevende alger (Hanelt *et al.*, 1997), bryofytter (Markham *et al.*, 1990) og vaskulære planter (Rozema *et al.*, 1997a) har kanskje også en rolle i forsvaret mot UV-stråling.

Eksperimentelle studier med hensyn på lavfenoler og UV-stråling er tvetydige. Bacherau & Asta, (1997) fant en signifikant nedgang i det totale fenolinnholdet når UV-B stråling ble filtrert ut og at filtrering av UV-A stråling ikke hadde noen effekt på det totale innholdet av

fenoler hos *Cetraria islandica*. Men ved eksponering til både UV-A og UV-B stråling var fenolinnholdet i tre ulike lav mindre enn med UV-A alene, og det ble foreslått at fenoler ble degradert eller endret til en viss grad av UV-B (Swanson & Fahselt 1997; BeGora & Fahselt 2001).

1.6 Tilnærming til oppgaven

I følge Cockell og Knowland (1999) er det fire kriterier som bør oppfylles for å teste om en sekundær forbindelse i lav har en UV-skjermende rolle eller ikke:

- 1. Forbindelsen må absorbere den respektive strålingen.
- 2. Skjermingseffekten må demonstreres in vivo.
- 3. Biosyntese av produktet bør bli indusert av den relevante strålingen.
- 4. Forbindelsen bør gi beskyttelse mot skade fra den respektive strålingen og denne beskyttelsen må kunne skilles fra aktiviteten til andre mekanismer slik som DNA reparasjon.

Det finnes flere andre hypoteser for hvilken rolle lavforbindelser kan ha. Antibeitebeskyttelse og antibiotika er noen av de mer kjente hypoteser. Det er derfor viktig å tilnærme seg en analyse av lavforbindelser etter de kriterier som er listet opp her.

Lecanorales er en lavdannede sopporden med utbredelse i varierte habitat. *Hypogymnia physodes* (vanlig kvistlav) er en meget vanlig art av denne ordenen. Dette er en bladlav med en *Trebouxia* grønnalge som fotobiont. Vanlig kvistlav inneholder atranorin, physodessyre, physodalsyre, protocetrarsyre (Lavflora; Krog, Østhagen og Tønsberg 1994). Løst i etanol eller metanol absorberer alle disse forbindelsene UV-B stråling sterkt (<u>Figur 1</u>) og oppfyller derfor kriterie 1.



Figur 1 Absorpsjonsspektra for lavsyrer i *Hypogymnia physodes;* atranorin, physodessyre, physodalssyre og protocetrarsyre løst i etanol.

Atranorin er et depsid lokalisert i barken hos kvistlav. De tre andre; physodessyre, physodalsyre og protocetrarsyre, er depsidoner lokalisert i margsjiktet og i soralene. Felles for de fire lavsyrene er deres opphav i acetyl-polymalonyl synteseveien. Lokaliseringen av atranorin i barken og de tre andre i margsjiktet over fotobionten, sammenfaller med en skjermende rolle for begge symbionter (kriterie 2) men dette er ikke vist *in vivo* for *H. physodes*.

Denne studie tar for seg noen viktige sider ved kriterie 3 og 4, hovedsakelig i et feltrelatert perspektiv ved å analysere en naturlig gradient av stråling fra solen. Ved å måle innholdet av lavsyrer i *H. physodes* thalli fra fem ulike habitat med stor forskjell i stråling fra solen, fra tett granskog til åpent strandberg, har induksjon av lavsyresyntese i felt blitt studert (kriterie 3). Gradienten inkluderte svak fotosyntetisk aktiv stråling (PAR) tilsynelatende nær lyskompensasjonspunktet for fotosyntesen i *H. physodes* og nær maksimal PAR (og UV-B) ved boreale breddegrader. Klorofyllinnhold og spesifikk thallusvekt er karakteristikker som påvirkes av stråling fra solen. Derfor ble disse kvantifisert. For å teste om lavsyrene hadde en beskyttende rolle mot UV-B skade i fotobionten (kriterie 4), ble thalli med ulikt lavsyreinnhold samlet langs en naturlig lys-skyggegradient eksponert for kunstig UV-B stråling.

Lav er unike studieorganismer fordi mange lavforbindelser kan ekstraheres ut fullstendig fra levende thalli med aceton (Solhaug & Gauslaa 1996, 2001; Lange *et al.*, 1997) og slik muliggjøre testing av hypotesen om en beskyttende rolle av sekundære forbindelser mot UV-stråling hos lav.

1.7 Klorofyll-fluorescens

Klorofyll-fluorescens er en mye brukt metode for å måle stress i fotosynteseapparatet i fotosyntetiserende organismer. Når et klorofyllmolekyl absorberer fotoner blir elektroner i klorofyllmolekylet eksitert til et høyere energinivå. Klorofyllmolekylet kan komme tilbake til grunntilstanden ved enten å overføre energien i de eksiterte elektronene til et annet klorofyllmolekyl slik at vi får en fotokjemisk reaksjon (fotooksidering), eller ved å omdanne energien til lys (fluorescensemisjon) eller til varme (varmetap). Den største delen av fluorescensemisjonen fra klorofyllmolekyler kommer fra fotosystem II (PSII). Ser man på PS II som en helhet, kan eksitasjonsenergien kun ta tre veier; via fotokjemisk reaksjon som fører til elektrontransporten, som varmetap eller som fluorescensemisjon. Disse tre mulighetene konkurrerer med hverandre. Fluorescensen vil derfor være maksimal hvis de to andre prosessene er minimale. Hvis fluorescensen blir redusert som følge av fotokjemiske reaksjoner, kaller man dette for "photochemical quenching" og hvis varmetap reduserer fluorescensen kalles dette for "non-photochemical quenching".

Når et blad som har stått mørkt, plutselig belyses, vil fluorescensen i løpet av noen tidels sekunder stige fra et grunnivå F_0 til en maksimal verdi F_m . Differansen mellom F_0 og F_m kalles variabel fluorescens F_v . For friske blad ligger forholdet F_v/F_m normalt mellom 0.75 og 0.85. F_v/F_m er et mål på maksimalt kvanteutbytte for PSII og er dermed godt korrelert med maksimalt kvanteutbytte i fotosyntesen. En reduksjon i F_v/F_m er mye brukt som en indikasjon på skade i fotosyntetiserende vev ved ulike former for stress, slik som for eksempel kjemikalie påvirkning og UV-stråling (UV-B).

2 MATERIALER OG METODER

2.1 Studieorganisme

Det ble gjort forundersøkelser der ulike arter lav ble vurdert som egnede til forsøkene. Tidlig ble *Parmelia sulcata* vurdert. Dette er et medlem av den lavdannende soppordenen Lecanorales. Lecanorales er en orden med utbredelse i varierte habitat. *P. sulcata* (Bristlav, inneholder atranorin og salazinsyre) dekket den lokale lysgradienten for forsøket. Det viste seg at det var vanskelig å finne store nok kvanta uskadde thalli til å utføre forsøkene. Valget falt da på *Hypogymnia physodes* (Figur 2) som også er et meget vanlig medlem av Lecanorales. Vanlig kvistlav er en bladlav med en *Trebouxia* grønnalge som fotobiont. Vanlig kvistlav inneholder atranorin, physodessyre, physodalsyre, protoceterarsyre (Lavflora; Krog, Østhagen og Tønsberg 1994). Løst i etanol eller metanol absorberer alle disse forbindelsene UV-B stråling sterkt (Figur 1). Vanlig kvistlav har en utbredelse som dekker den lokale lys-skyggegradienten valgt for forsøket og det var lett å samle inn store nok kvanta i alle 5 habitat til forsøkene.



Figur 2 Hypogymnia physodes thalli på bjørkestamme (Bètula pubèscens).

2.2 Studieområder

H. physodes thalli ble samlet inn i fem ulike habitat i SØ Norge. De thalli som ble samlet i habitat med løvskog, furuskog, granskog og isolerte trær hadde barkvoksende thalli (corticolous). All lav ble samlet fra stammen på trærne i disse habitat. Thalli fra strandberg vokste direkte på berggrunnen (saxicolous). Habitat med barkvoksende thalli var lokalisert i Akershus, Ås og thalli fra strandberg var lokalisert i Østfold, Moss, Jeløya (Figur 3).



Figur 3 Kart over studieområder der *Hypogymnia physodes* thalli ble samlet inn. Thalli fra strandberg ble samlet på sydvest kysten av Jeløya, Moss. Barkvoksende thalli ble samlet i fire habitat i Ås, Akershus. De ulike habitat er merket av med rødt på kartet.

Løvskog:

Løvskog, tilnærmet uten innslag av bartrær. Hovedsakelig bjørk (*Bètula pubèscens*) med innslag av rogn (*Sorbus* aucupària) og osp (*Pòpulus trèmula*). Området er lokalisert sydvest for Ås sentrum i Follo, Norge. Høyde over havet; 100 meter. Kartreferanse; 59°39'20''N og 10°47'30''E (Figur 3 og 4).



Figur 4 Løvskoghabitat, lokalisert på Ås, Akershus

Furuskog:

Furuskog (*Pinus sylvèstris*), tilnærmet uten innslag av andre trearter. Området er lokalisert sydvest for Ås sentrum i Follo, Norge. Høyde over havet; 134 meter. Kartreferanse; 59°38'50''N og 10°47'35''E (Figur 3 og 5).



Figur 5 Furuskoghabitat, lokalisert på Ås, Akershus

Granskog:

Eldre granskog (*Picea àbies*), tilnærmet uten innslag av andre trearter. Området er lokalisert sydvest for Ås sentrum i Follo, Norge. Høyde over havet; 110 meter. Kartreferanse; 59°39'20''N og 10°47'00''E (Figur 3 og 6).



Figur 6 Granskog habitat, lokalisert på Ås, Akershus

Isolerte trær:

Allè med frittstående asal (*Sorbus h'ybridia* eller *S. Intermèdia*). Tilnærmet 360° fri horisont, med bladverk samlet i en krone. Området er lokalisert sydøst for Ås sentrum i Follo, Norge. Høyde over havet; 100 meter. Kartreferanse; 59°39'50''N og 10°48'00''E (<u>Figur 3 og 7</u>).



Figur 7 Habitat med isolerte trær, lokalisert på Ås, Akershus

Åpent strandberg

Lavabergart (porfyr) i klippeformasjon langs vestkyst av Jeløya ved Moss, Norge. Høyde over havet; 5 meter. Kartreferanse; 59°25'21''N og 10°35'20''E (<u>Figur 3 og 8</u>).



Figur 8 Åpent strandberg habitat lokalisert på Jeløya, Østfold

2.3 Innsamling av laven

På hver lokalitet ble trær med egnede thalli valgt ut og merket. Friske thalli med minst mulig skade som var robuste nok for videre behandling ble i størst mulig grad valgt for forsøkene. Thalli ble merket med små stifter med farget hode. Det ble valgt ut ett enkelt thallus fra hvert utvalgte tre (eller hvert enkelt sted på strandberg). Hvert thallus var mellom 5-10 cm² og det ble samlet inn 15 thalli fra hvert habitat. Totalt 75 thalli for de 5 habitatene. Laven ble samlet inn i tilfeldig høyde og himmelretning på hvert utvalgte tre. Alle thalli ble samlet fra bakkenivå opp til ca. 2 meter. Ingen av de utvalgte trær var nærmere hverandre enn 10 meter. Kravet om 10 meters avstand ble ikke ansett som nødvendig for thalli samlet inn på strandberg, da området var tilnærmet uten vegetasjon. Laven ble samlet inn med en flat bøyelig smørekniv som var slipt skarpt i tuppen. Sprayflaske med destillert vann ble brukt for å dusje laven slik at den skulle løsne lett fra substratet uten å bli skadet. Innsamlede thalli ble lagt i ferdig merkede konvolutter for arkivering og oppbevaring.

På hvert enkelt funnsted (hvert enkelt tre eller hvert sted på strandberg) ble kompassretning beregnet. En plate ble lagt parallelt med thallus. Kompasset ble lagt inntil denne og kompasskiven deretter dreiet slik at kompassnål og rød pil sammenfalt. Antall grader ble så lest av. For hver enkelt thallus ble helningsgrad beregnet. Dette ble gjort med et vater og en vinkel ved hjelp av trigonometri. Relaskopsum ble beregnet i løvskog, furuskog og granskog (ikke aktuelt for isolerte trær og strandberg) ved hjelp av et relaskop. Relaskopet har en liten plate med sikteskår festet til en 50 cm lang lenke. Lenkeenden holdes inntil kinnbenet, lenken med platen strekkes ut til en siktlinje der man ser gjennom sikteskåret. Ved å telle alle trær som helt dekker sikteskåret når man dreier 360 grader ved hvert aktuelt tre, får man et gjennomsnitt på grunnflatesummen i en bestand, nærmere bestemt summen av alle snittflater i brysthøyde innenfor et bestemt areal. Blir oppgitt som kvadratmeter snittflate per hektar skogareal. Fra alle fem habitat ble det samlet rikelig med ekstra lav til forforsøk og andre forsøk utenom ekstraksjonsforsøket. Thalli ble samlet inn tilfeldig i hvert habitat. All lav fra løvskog, furuskog, granskog og isolerte trær ble samlet inn på samme dag (13.07.01) for å få tilnærmet like forhold. Lav fra habitat 5 på Jeløya ble samlet inn en annen dag (14.07.01) med mest mulig like forhold grunnet praktiske problemer (ville tidsmessig ikke vært gjennomførbart). Umiddelbart etter innsamling ble laven lagt til tørk i konvolutter på ett mørkt sted (PAR 1-2 μ mol fotoner m⁻² s⁻¹) ved romtemperatur i 2 dager.

2.4 Fotografering-stedsfaktorer

Bildeanalyse av digitale hemisfæriske fotografier (Roxburgh and Kelly, 1995) ble brukt til å kvantifisere strålingsklimaet i de ulike habitat for *H. physodes*, under geometrisk komplekse trekroner. Digitale hemisfæriske fotografier ble tatt fra en horisontal posisjon nærmest mulig stedet der hvert enkelt thalli ble samlet, med den magnetiske nordpol indikert (Figur 9). Fotografier ble tatt med et Nikon Coolpix 950 kamera med en Nikon Fisheye Converter FC-E8, montert i et stativ som nivellerer seg selv (type SLM2, Delta-T Devices, Burwell, Cambridge, UK). Bildene ble tatt relativt kort tid etter innsamling. Problemer med å plassere stativet med fiskeøyelinsa helt inntil hvert thallus på funnsted, kan være grunnlag for en feilkilde når man ser på sammenheng mellom stedsfaktorer og innhold av lavsyrer.



Figur 9 Hemisfærisk fotografi.

For optimale resultater er det best å ta bilder i jevnt overskyet vær uten særlig kontraster i skydekket. Kraftig mørke skyer mot klar himmel vil by på problemer da dataprogrammet for bildemanipulering lett vil oppfatte skyer som vegetasjon eller annen obstruksjon. Sterkt sollys på klare dager vil kunne gi problemer i form av at trekroner kan bli "visket" ut. Bildene fra Jeløya ble tatt 18.08.01 i klart vær med solskinn. Da problemet med trekroner ikke var aktuelt her ute ble det antatt at disse bildene ikke ville by på kontrast problemer. Bildene fra løvskog ble tatt 19.08.01 i delvis skyet vær (ikke optimalt). Bildene ble tatt forholdsvis tidlig på dagen når solen sto lavt, slik at eventuelle problemer med kontraster kunne minimeres. Bildene fra granskog ble tatt 20.08.01 ved jevnt overskyet vær. Bildene fra furuskog ble tatt 21.08.01 ved jevnt overskyet vær. De fleste av bildene fra isolerte trær ble tatt 22.08.01 ved delvis overskyet vær, mens resten ble tatt 23.08.01 i jevnt overskyet vær.

Bildene ble analysert ved hjelp av dataprogrammet HemiView 2.1 (Delta-T Devices, Burwell, Cambridge, UK) for å kunne beregne direkte, indirekte og global stedsfaktor (Anderson, 1964).

ISF = Indirect Site Factor: Andelen av diffus solstråling som når en gitt lokalitet, relativt tilen lokalitet uten noen hindringer på himmelen. Verdier for denne spenner fra 0 til 1, hvor 0står for fravær av diffus solstråling (himmelen helt tildekket) og 1 er den diffuse solstrålingman får på en åpen lokalitet (ingen tildekking av himmelen).

DSF = Direct Site Factor: Andelen av direkte solstråling som når en gitt lokalitet, relativt til det man finner i en lokalitet uten noen hindringer på himmelen. Verdiene spenner fra 0 til 1, hvor 0 står for fravær av direkte stråling og 1 er den direkte strålingen man får på en åpen lokalitet (ingen tildekking av himmelen).

GSF = Global Site Factor: Andelen av global stråling (global solar radiation=The sum of the energy flux densities for direct, diffuse, and reflected radiation is known as total or global radiation.) under en plante krone relativt til det man finner under åpen himmel ("total site factor" of Anderson 1964). Kalkulert som direkte pluss diffus stråling, der reflektert stråling er ignorert.

For å unngå å bruke en blanding av norske og engelske ord, har indirekte, direkte og global

stedsfaktor blitt brukt som erstatning for de engelske termene. Forkortelsene vil derfor bli de samme både for engelske og norske utrykk. Stedsfaktor er et uttrykk som antakelig ikke har blitt benyttet før i andre sammenhenger.

2.5 Klorofyll-fluorescens

Før måling av klorofyll-fluorescens ble thalli dusjet med destillert vann og satt bort i hydrert tilstand i 48 timer ved 18 °C og lav PAR (4-5 µmol fotoner m⁻² s⁻¹). På dette vis elimineres de fleste effektene av tilfeldig variasjoner i lyset som følge av lokal skygging på det tidspunktet laven ble samlet. Det vil likevel tas hensyn til mulige irreversible nivåer av fotoinhibering fra sterkt lysstress de siste dager eller uker før innsamling. F_v/F_m målt med PAM 2000 (Walz, Effeltrich, Germany). Reduksjon i F_v/F_m forårsaket av nedregulering av PSII eller mildere former av fotoinhibering, reverseres etter 10 timer med svakt lys (Ögren, 1994). Derfor vil data som viser reduksjon i F_v/F_m vise langvarig fotoinhibert skade på PSII.

2.6 Vekt og størrelsesparametere

Thallusareal ble målt i fuktig tilstand med en bladareal måler (LI-3100 Area Meter, LI-COR, inc. Lincoln, NE, USA). Vannmettet vekt ble målt (\pm 1 mg) ved å dusje på forhånd fuktede thalli med destillert vann, der overskuddsvann forsiktig ble ristet av. Tørrvekt ble målt (\pm 0.1 mg) etter lagring av lufttørkede thalli i eksikator ved 20 °C i 24 timer i mørke. Spesifikk thallusvekt (STW) er uttrykt som mg tørrvekt cm⁻¹.

2.7 Lavsyreinnhold

De fire lavsyrene i *H. physodes*; atranorin, physodessyre, physodalsyre og protocetrarsyre (Lavflora; Krog og Tønsberg 1994) ble ekstrahert fra thalli som først var lufttørket og siden tørket i eksikator (Solhaug og Gauslaa, 2001). Hvert thallus ble ekstrahert 4(8)×30 minutter med 5 ml 100% aceton. Absorpsjonsspektra (200-500 nm) ble målt med et spektrofotometer (UV-210 PC, UV-VIS scanning spectrophotometer, Shimadzu Analytical Instruments Div. Kyoto, Japan) og absorbansen ved 310 og 210 nm ble notert.

2.8 Klorofyllkonsentrasjoner

Etter acetonekstrahering ble thalli lagt 12 timer mørkt for avdamping av aceton. Alle thalli ble fuktet med destillert vann og overført til separate reagensrør med skrukork og tilsatt 5 ml 100% DMF (N,N-dimetylformamid). Rørene ble satt i stativ med aluminiumsfolie pakket tett rundt for å unngå lys. Etter 5 døgn på kjølerom ble det tatt ut 1 ml prøve fra hvert rør. Denne ble fortynnet med 2 ml DMF og overført til kvartskyvette for absorbansmåling i spekterfotometer ved 647, 664 og 750 nm (750 nm ble brukt som kontroll). Mengde klorofyll a og b ble beregnet (Porra *et al.* 1998).

2.9 Acetonekstraksjon av Hypogymnia physodes

5 thalli fra granskog og 5 thalli fra strandberg ble valgt ut tilfeldig til et forforsøk. Granskog hadde de antatt laveste og strandberg de antatt høyeste stedsfaktorer. Dette ble gjort for å få en indikasjon på innholdet av de sekundære forbindelser i de thalli som var sterkest skygge- og restinnholdet disse acetonekstraksjonen. lystilpasset, og av etter Tidligere acetonekstraheringsforsøk med Xanthoria parietina thalli viste at man etter 4 ekstraksjoner med 5 minutters intervall fikk ut det meste innholdet av parietin (Solhaug & Gauslaa 1996). Imidlertid viste Solhaug et al. (2003) at det for saxicouløse X. parietina thalli som hadde dobbelt så høy spesifikk thallusvekt, var det nødvendig å øke ekstraheringstiden til 10 minutter. Selv med en slik forlenget ekstraheringstid var det omtrent 1-2% av det opprinnelige innholdet med parietin tilbake i thalli. Det ble bestemt at det for forsøket med H. physodes skulle utføres 8 gjentatte ekstraksjoner for å være sikker på at alle aktuelle stoffer var ute ved endt forsøk. Hvert thallus var på omtrent 1-2 cm² og ble veid som tørre før ekstraksjon. Hvert enkelt thallus ble lagt i hvert sitt begerglass med 5 ml aceton (Aceton puriss, min. 99.5%) i 30 minutter. Acetonekstraktet ble så overført til et reagensrør med skrukork, og blandet godt. Fra hvert av disse rør ble 1 ml prøve tatt ut og overført til et nytt reagensrør. Disse ble satt i vannbad til fordamping. Den første ekstraksjonsserien ble fortynnet med 5-10 ml ren etanol, avhengig av hvor høy absorpsjonstopp man fikk ved første måling i spekterfotometer. Spekterfotometeret er nøyaktig til en absorbans på omtrent 2.5. Ved høyere absorpsjon enn dette ble prøvene ytterligere fortynnet. Omtrent 1 ml prøve ble overført til en kvartskyvette og absorbansspektre ble målt i spekterfotometer ved 200-500 nm. Absorbansen ble lest av ved 310 nm og 210 nm, der 310 nm er den biologisk mest relevante bølgelengden. Referansekyvette med ren etanol. Etter en større nedgang i toppen kan man tilsette 3 ml etanol til de resterende rør. Acetonekstraktene i rør med skrukork ble satt på kjøling for oppbevaring.

All innsamlet lav fra de fem ulike habitat ble tørket i svakt lys (PAR 1-2 µmol fotoner m⁻² s⁻¹) ved romtemperatur i 2 dager. Thalliene ble lagt under press i denne tiden da tørrefleksjon skulle måles. Eventuelle barkrester fra substratet ble fjernet med pinsett og skalpell. Dette ble gjort for å unngå ekstraksjon av eventuelle forbindelser i barkfragmentene. Hvert av 75 merkede thalli som skulle acetonekstraheres hadde en størrelse på minst 1-2 cm². Tørrefleksjon ble målt to steder på hvert thallus. Thalliene ble fuktet med destillert vann fra sprayflaske. Laven ble fuktet slik at det rant av den og ristet lett før måling av våtrefleksjon. Også her ble det foretatt to målinger på hvert thallus. Resultatene fra refleksjonsmålingene Ble ikke brukt i oppgaven. Mens laven fremdeles var fuktig, ble våtareal målt. Laven ble arrangert i system på flere lag med godt fuktet trekkpapir i bunnen av en plastboks (30×20×5 cm) med et lokk delvis dekkende. Ble satt i vekstkammer ved 15°C, PAR 4-5 µmol fotoner m⁻² s⁻¹, i 48 timer fra fuktetidspunkt. F_v/F_m ble målt 2 ganger for hvert thallus, på to forskjellige steder med PAM 2000. Ble luftørket i 2 døgn og overført til eksikator i ytterligere 2 døgn uten lys. Tørrvekt ble målt.

Da forforsøket viste at mesteparten av de sekundære forbindelsene var ekstrahert ut etter 4 ganger, ble 75 thalli fra 5 ulike habitat acetonekstrahert tilsvarende i dette forsøket. Det man eventuelt fikk ut ved videre ekstraksjon ble ansett som neglisjerbart. Acetonekstraktene ble satt på kjøling i rør med skrukork for oppbevaring. Thalli skulle siden klorofyllekstraheres. For oppbevaring ble konvoluttene med lav pakket ned i en eske med plast rundt og lagt i fryser ved -20°C. Før klorofyll-fluorescensmåling ble laven tint, lagt i

plastbokser med filtrerpapir som ble dynket med destillert vann. Laven ble dusjet med destillert vann og satt i vekstkammer i 48 timer ved svakt lys (PAR 1-2 µmol fotoner m⁻² s⁻¹) og 15°C. Laven ble fuktet etter ett døgn for å holde kontinuerlig fuktighet. Deretter ble F_V/F_M målt med PAM 2000.

2.10 UV-B toleranse

Det ble utført to forsøk i vekstkammer ved 12 °C for å teste UV-B toleranse hos H. physodes. I det første forsøket (5 døgn) ble 4 x 20 thalli valgt ut tilfeldig der hvert av de fire settene inneholdt 10 thalli fra granskog og 10 thalli fra strandberg. Halvparten av thalli fra hvert av de to habitat ble acetonekstrahert. Thalli var på forhånd lufttørket i 2 dager. Thalli ble arrangert på fuktet filterpapir i fire separate plastbokser (30×20×5 cm). Armaturer med Q-panel UV-B fluoriserende rør ble arrangert over et bord med jevn avstand til hverandre og i jevn høyde over bordet. Strålingsnivået ble målt med SKU 430 sensor (280-315 nm, Skye instruments Ltd, Powys, UK) slik at strålingen ble jevnest mulig fordelt på oppsettet. Tre av settene ble plassert i forskjellig avstand fra UV-rørene for å oppnå tre ulike nivå UV-B stråling (1.4 Wm⁻², 2.3 Wm⁻², 3.3 Wm⁻²). De tre settene ble eksponert for de ulike nivå UV-B stråling og PAR (150 μ mol fotoner m⁻² s⁻¹) kontinuerlig i 120 timer under en tynn UV-C skjermende folie av cellulose-acetat, som var plassert omtrent 1 cm over øvre kant av boksene. Den UV-C skjermende folien slipper gjennom UV-B og UV-A stråling. Settene med thalli ble rotert 180 ° en gang i døgnet for å eliminere effektene av romlig variasjon under lampene i løpet av den tiden de ble eksponert for kunstig UV-B stråling fra Q-panel UV-B fluoriserende rør i et vekstkammer. Det fjerde settet ble satt i svakt lys (PAR 4-5 μ mol fotoner m⁻² s⁻¹) ved romtemperatur uten å bli eksponert for UV-B stråling (kontroll). Alle thalli ble dusjet med destillert vann en gang i døgnet under forsøket. Etter strålebehandling ble de fire settene fuktet og satt i vekstkammer i 48 timer (fuktet igjen etter 24 timer) ved 18 °C og svakt lys (PAR 4-5 μ mol fotoner m⁻² s⁻¹) før F_v/F_m ble målt med PAM 2000. Dette for å gjenopprette normal funksjon etter eventuell reversibel fotoinhibering (Figur 10).



Figur 10 Eksperimentelt oppsett for UV-B toleranseforsøk i *Hypogymnia physodes* thalli med ulike nivå UV-B stråling (1.4 Wm⁻², 2.3 Wm⁻², 3.3 Wm⁻²) i 5 døgn.

Da det ikke ble observert noen skade på thalli i første forsøk ble det satt i gang ett nytt forsøk der laven skulle eksponeres for det høyeste nivået med UV-B stråling (3.3-3.8 Wm⁻²) og en fordobling av eksponeringstiden fra 5 til 10 døgn. Det ble i tillegg gjort flere forandringer. Som følge av antatte problemer med de høve kantene på boksene i form av mulige endrete lokale temperaturer og endrete strålingsforhold i kant av boksene, ble lokkene til disse benyttet (kanthøyde mindre enn 1 cm). Temperatur ble målt med termoelementer og et infrarødt måleapparat på ulike steder, både over og under lavthallus. Temperaturen var stabil for hele måleområdet. I det andre forsøket ble fire tilsvarende sett som over preparert. Sett 1 ble fuktet og eksponert for PAR + UV-B stråling. Sett 2 ble fuktet og eksponert for PAR. Sett 3 ble eksponert for PAR + UV-B men ikke fuktet. Sett 4 ble ikke fuktet og kun eksponert for PAR. Sett 1 og 3 ble skjermet med UV-C filtrende folie. Sett 2 og 4 ble skjermet med et celluloseacetat filter som filtrer ut all UV-stråling. Sett 1 og 3 ble eksponert for UV-B stråling mellom 3.3 - 3.8 Wm⁻² kontinuerlig i 240 timer. For å eliminere effektene av romlig variasjon under lampene ble disse byttet om og rotert 180 grader for hvert døgn i perioden. Acetatfilteret ble skiftet ut etter 5 døgn da skjermingseffekten avtar med tiden. Alle thalli ble eksponert for PAR (150µmol fotoner m⁻² s⁻¹) kontinuerlig i 240 timer. Laven ble testet for effektivitet i PSII, F_v/F_m med PAM 2000 etter samme prosedyre som tidligere. Laven som var acetonekstrahert og fuktet ble lufttørket og satt i eksikator for videre forsøk, hvor resyntese av sekundære forbindelser skulle undersøkes (Figur 11).



Figur 11 Eksperimentelt oppsett for UV-B toleranseforsøk i *Hypogymnia physodes* thalli med høyeste nivå UV-B stråling $(3.3 - 3.8 \text{ Wm}^{-2})$ i 10 døgn.

2.11 Induksjon av lavsyresyntese i *Hypogymnia physodes* thalli fra granskog og strandberg

For å undersøke om UV-B stråling hadde en effekt på gjendannelse av lavsyrer i *H. physodes* var 5 thalli fra strandberg og 5 thalli fra granskog blitt acetonekstrahert 4 ganger og eksponert for PAR (150µmol fotoner m⁻² s⁻¹) + UV-B (3.3-3.8 Wm⁻²) kontinuerlig i 240 timer. Et tilsvarende sett thalli var acetonvasket (4 ganger à 30 minutter) og fuktet, men disse ble kun eksponert for PAR (150µmol fotoner m⁻² s⁻¹). De fire ekstraktene fra hvert enkelt thalli ble slått sammen i en målesylinder og fortynnet til 25 ml. Hver av disse ble vendt omtrent 10 ganger for å blandes. 1 ml prøve ble tatt ut av hver sylinder for inndamping i reagensrør. Etter inndamping ble det tilsatt 5 ml ren etanol til hvert rør. Disse ble blandet godt og overført til kvartskyvette for måling av absorbans i spekterfotometer ved 200-500 nm. Absorpsjonstopp ved 310 og 210 nm ble lest av. Referansekyvette med ren etanol. Prøvene ble fortynnet ytterligere ved behov hvis absorpsjonstopp var høyere enn 2.5.

2.12 Tynnsjiktkromotografi

For å skille de ulike lavsyrene og lage et absorpsjonssspekter for hver enkelt av dem ble tynnsjikt kromotografi (TLC) utført (White & James, 1985). Ved tynnsjiktkromotografi separeres de ulike lavsyrene ved at de løste forbindelsene vandrer med ulik lengde (hastighet)

oppover en tynnsjiktplate av silikagel (Silikagel på aluminium). De ulike forbindelsene ble identifisert ved en kombinasjon av fargereaksjoner med ulike reagenser, oppgitte Rf-verdier og ved bruk av en UV-lampe som kunne indikere hvor båndene var plassert på tynnsjikt plata.

H. physodes thalli fra tilfeldige habitat og lysforhold ble samlet inn. Laven ble lufttørket 1 døgn. Det ble beregnet at man trengte omtrent 1 gram tørrvekt i 30 ml aceton for å få en passe konsentrasjon av lavsyrene til å sette på tynnsjiktplatene. En plate ble merket med blyantstrek 1 cm fra basis og en strek 15 cm fra denne. Acetonekstraktet med lavsyreblandingen ble avsatt som en stripe i hele bredden av plata langs1 cm streken. Dette ble gjort med et mikroglassrør for å få en jevnest mulig avsetting i hele lengden, slik at det skulle være mulig å få en tilnærmet lik fordeling av forbindelser i hele lengden av plata. Oppgitte Rf-verdier og fargereaksjoner for de ulike lavsyrene ble sammenliknet for å finne den blandingen med elueringsvæske som kunne skille de ulike lavsyrene best (Toluen : dioxan : acetic acid; 180 : 60 : 8 ml (T.D.A)) (White & James, 1985). Denne blandingen ble helt i et elueringskar. Tynnsjiktplata ble satt i karet og sto til væskefronten nådde 15 cm streken. Plata ble så lufttørket. Det ble avveket fra metoden ved å bruke tynnsjiktplater uten UV-indikator og ved å sette av en stripe av acetonekstraktet i stedet for punkter.

På tynnsjiktplata ble det funnet 7 bånd. 2 cm av hvert bånd ble avskrapt slik at man kunne få et omtrentlig mengdeforhold mellom de ulike stoffene. 4 av båndene ble identifisert som de fire aktuelle lavsyrene, mens 3 bånd ikke ble identifisert. Alle 7 bånd ble løst i etanol og absorbans spektre (200-500 nm) for hver enkelt lavsyre ble målt i spekterfotometer.

2.13 Statistiske analyser

Habitatspesifikke forskjeller i stedsfaktorer og thalluskarakteristikker ble analysert ved bruk av en-veis ANOVA. Koplete parameteranalyser ble utført med 3 eller 4-veis ANOVA, SYSTAT versjon 10. ANOVA- variansanalyse sammenlikner variasjonen innad i gruppene med variasjonen mellom gruppene. Forutsetter at variasjon innad i gruppene er tilnærmet like stor. F-verdi = variasjon mellom gruppene/variasjon innad i gruppene. Hvis variasjonen mellom gruppene er betydelig større enn variasjonen innad i gruppene får vi en stor F-verdi. P-verdien viser om det er signifikante forskjeller mellom gruppene. For å finne forskjeller mellom habitat (hvilke som er forskjellige fra hvem) ble det foretatt en multippel sammenligningstest (Student-Newman-Keuls metode). Regresjonsanalyser er utført med lineær regresjonsmodell. Alle testene ble utført med SigmaStat version 1.0 (Jandel Scientific). Gjennomsnittene er vist med ± standard feil (SE).

3 RESULTATER

3.1 Acetonekstraksjon av Hypogymnia physodes fra granskog og strandberg

H. physodes thalli fra habitat med antatt lavest (granskog) og høyest (strandberg) stedsfaktor ble valgt for å få en indikasjon på det totale innholdet av lavforbindelser (atranorin, physodessyre, physodalsyre og protocetrarsyre) og hvor mange acetonekstraksjoner som ville være nødvendig for å ekstrahere ut alt av disse forbindelsene. Ekstraheringstiden i dette forsøket var 30 minutter og antall ekstraksjoner bestemt til 8(7). Absorbansspektre ble målt i spekterfotometer ved 200-500 nm, for å se på hvor stor mengde lavsyrer som ble ekstrahert ut for hver ekstraksjon. Absorbansen ble lest av ved 310 nm. <u>Figur 12</u> viser mengde lavsyrer man får ut for hver av de 8 ekstraksjonene av thalli fra granskog og for hver av de 7 ekstraksjonene av thalli fra strandberg. Etter 4 ekstraksjoner var nivået av sekundære forbindelser sunket til omtrent en hundredel av den mengden man får ut på første ekstraksjon. Ekstraksjonene fra 5-7 for thalli fra granskog utgjorde et lavsyreinnhold på 1.1 % av det opprinnelige innhold og ekstraksjonene 5-8 for strandberg 2.7 % av det opprinnelige innholdet. Absorbansen er relatert til tørrvekt.



Figur 12 Absorbans i enkeltekstrakter ved gjentatte ekstraksjoner av *Hypogymnia physodes* thalli fra granskog og strandberg. Absorbansen er beregnet for xxml etanol i forhold til xxmg tørrvekt. n=5 og standardfeil er vist.

Absorbansen/transmisjonen i acetonekstraherte thalli ble beregnet på bakgrunn av den totale absorbansen for 75 thalli fra 5 ulike habitat (<u>Figur 13 og Tabell 3</u>). Dette ble gjort for å vurdere om restinnholdet etter 4 ekstraksjoner hadde en teoretisk evne til å beskytte laven mot potensielt skadelige effekter av UV-B stråling. Beregningene ble utført med en gjennomsnittsverdi på 2 % restinnhold for alle thalli (<u>Tabell 1</u>).

Tabell 1 Beregnet absorbans/transmisjon i *Hypogymnia physodes* thalli etter acetonekstraksjon fra 5 ulike habitat med gjennomsnittlig 2 % restinnhold av lavsyrer. Absorbans og transmisjon i prosent.

	Løv	<u>Furu</u>	<u>Gran</u>	Isolerte trær	Strand berg	
<u>Transmisjon</u>	41	20	65	26	21	
<u>Absorbans</u>	59	80	35	74	79	

3.2 Klorofyll-fluorescensmålinger (F_v/F_m) for *Hypogymnia physodes* thalli fra granskog og strandberg

H. physodes thalli fra habitat med antatt lavest (granskog) og høyest (strandberg) stedsfaktor ble valgt ut. F_v/F_m målingene av thalli fra granskog og strandberg ble utført for å se på stressnivået hos lav fra de to ytterpunktene i lys-skygge gradienten. Thalli fra strandberg hadde signifikant (P = 0.00194) lavere F_v/F_m verdier (0.64 ± 0.015) enn thalli fra granskog (0.69 ± 0.005) etter acetonekstraksjonen. Det ble ikke utført noen målinger for maksimalt kvanteutbytte i PSII før acetonekstraksjonen. Den signifikant lavere F_v/F_m verdien for thalli fra strandberg kan tyde på fotoinhibering som er av mer langvarig art.

3.3 Lys-skyggegradienten

Granskog hadde de laveste stedsfaktorverdier. Isolerte trær og strandberg hadde de høyeste målte stedsfaktorer. Det er et markant skille i stedsfaktorverdier mellom løvskog, furuskog og granskog på den ene siden, og stedsfaktorer fra åpne habitat (isolerte trær og strandberg) på den andre siden (<u>Tabell 2</u>). Grunnflatesummen viser tettheten i skog bestandene som kvadratmeter snittflate per hektar skog. Granskog har størst tetthet, noe som reflekteres i lave sitefactors. Løvskog og furuskog kommer ganske likt ut i tetthet (<u>Tabell 2</u>).

Det er kun foretatt målinger i sommerhalvåret. Da vegetasjon i form av dekkende trekroner ikke forekom rundt de åpne strandberg ble det antatt at sommerbildene herfra også kunne gjelde for vinterforhold. Alle *H. physodes* voksesteder i furuskog og granskog var skygget av eviggrønne *P. sylvestris* og *P. abies*. Det er derfor rimelig å anta at stedsfaktorverdier fra disse habitat ikke ville endret seg mye i løpet høsten. Imidlertid må man regne med en vesentlig økning i stedsfaktorer for bladfellende habitat (løvskog og isolerte trær) i løpet av høsten. Grupperingen i åpne og skyggefulle habitat kom også tydelig frem når innhold av lavsyrer ble plottet mot stedsfaktorer (Figur 26-29). Det er liten eller ingen overlapping mellom de to grupperingene. Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks viser at det er en statistisk signifikant forskjell mellom habitatene (Tabell 2). For å skille ut gruppen eller

gruppene som skiller seg fra andre ble en multippel sammenlikningsmetode brukt: Student-Newman-Keuls metode viste hvilke habitat som var forskjellige fra andre (<u>Tabell 2</u>).

Tabell 2 Utregnede stedsfaktorer basert på sommer-bilder fra *Hypogymnia physodes* lokaliteter samlet fra 5 ulike habitat langs en naturlig lys-skyggegradient. Tallene viser gjennomsnitt \pm SE (n=15). ISF= indirekte stedsfaktor, DSF=direkte stedsfaktor, GSF=global stedsfaktor. Gjennomsnitt fulgt av samme bokstavkode i en rad var ikke signifikant forskjellige for p < 0.05 med Student-Newman-Keuls metode. Gjennomsnittlig kvadratmeter snittflate per hektar av skogarealene (GRF=grunnflate sum) er oppgitt som gjennomsnitt \pm SE (n=15).

	Løvskog	Furuskog	Granskog	Isolerte trær	Strandberg	p(ANOVA)
ISF	0.174 ± 0.023(a)	0.268 ± 0.009(b)	0.152 ± 0.009(a)	0.770 ± 0.017(c)	0.792 ± 0.036(c)	2.51E-012
DSF	0.194 ± 0.041(a)	0.141 ± 0.021(b)	0.082 ± 0.019 (a) 0.940 ± 0.012(c)	0.782 ± 0.052(c)) 2.40E-011
GSF	0.189 ± 0.033(a)	0.211 ± 0.011(b)	0.112 ± 0.013(c)	0.906 ± 0.012(d)	0.785 ± 0.045(d)	6.82E-012
GRF	14.43 ± 0.86	16.36 ± 0.68	27.43 ± 0.87			

3.4 Innhold av lavsyrer i *Hypogymnia physodes* fra 5 ulike habitat langs lys-skygge gradienten

Innholdet av lavsyrer i *H. physodes* thalli fra de ulike habitat ble målt som absorbans ved 200-500 nm og relatert til tørrvekt og areal. De fire lavsyrene; atranorin, physodessyre, physodalsyre og protocetrarsyre er behandlet som en blanding. Målingene for absorbans per enhet areal viser at det er signifikante forskjeller i innholdet av lavsyrer mellom de tre skyggefulle habitat (løvskog, furuskog og granskog), mens innholdet av lavsyrer i de to åpne habitat, isolerte trær og strandberg, ikke er signifikante forskjellige (Figur 13) (Tabell 3). Innholdet av lavsyrer per vektenhet viser at det er signifikante forskjeller mellom furuskog, granskog og isolerte trær, mens løvskog og strandberg ikke er forskjellige (Figur 13) (Tabell 3). (Tabell 3). De ulike responsene på innhold av lavsyrer per enhet areal og per enhet vekt langs lys-skyggegradienten, er hovedsakelig en følge av forskjell i spesifikk thallusvekt (vekt per enhet areal). Thalli fra åpne habitat (isolerte trær og strandberg) hadde signifikant høyere vekt per enhet areal (nær dobbelt) enn noen fra de andre habitat (Tabell 3).



Figur 13 Absorbans ved 310 nm relatert til tørrvekt og areal i *Hypogymnia physodes* thalli fra 5 habitat (n=15 i hvert habitat) langs en naturlig lys-skyggegradient. Gjennomsnitt og standardfeil for gjennomsnitt er gitt for hvert habitat separat. Det er signifikante forskjeller i innholdet av lavsyrer mellom habitatene og ulike bokstavkoder viser hvilke habitat som er signifikant forskjellig fra de andre ved p < 0.05 med Student-Neuman-Keuls metode.

Tabell 3 Målte variabler i 75 *Hypogymnia physodes* thalli samlet fra 5 habitat langs en naturlig lys-skyggegradient. Tallene viser gjennomsnitt \pm SE (n=15). Gjennomsnitt fulgt av ulike bokstavkoder i en rad er signifikant forskjellige ved p < 0.05 med Student-Neuman-Keuls metode.

	Løvskog	Furuskog	Granskog	Isolerte trær	Strandberg	p(ANOVA)
Spesifikk thallus vekt/ mg cm ⁻²	12.6 ± 0.57 (a)	14.2 ± 0.50 (b)	12.30 ± 0.68 (a)	22.19 ± 1.11(c)	22.51 ± 0.86 (c)	9.02E-011
$F_{\rm v}/F_{\rm m}$ etter 48t ved svakt lys	0.708 ± 0.004 (a)	0.662 ± 0.008 (b)	0.710 ± 0.004 (a)	0.700 ± 0.005 (c)	0.661± 0.007 (b)	1.27E-013
Total klorofyll/ µmol m ⁻²	518 ± 24 (a)	534 ± 26 (b)	497 ± 27 (b)	511 ± 26 (c)	246 ± 16 (d)) 4.4E-7
Total klorofyll∕ µmol g⁻¹	4.18 ± 0.19 (a)	3.79 ± 0.19 (a)	4.19 ± 0.30 (b)	2.36 ± 0.14 (c)	1.10 ± 0.07 (d)	4.74E-011
Klorofyll <i>a/b</i> forholdet	2.72 ± 0.09 (a)	1.99 ± 0.09 (b)	3.59 ± 0.15 (c)	4.20 ± 0.10 (d)	2.71 ± 0.16 (a)	4.38E-011
Abs310/vekt	305.31 ± 11.85(a)	496.82 ± 47.14(b)	156.24 ± 9.11(c)	266.64 ± 8.66(d)	300.59 ± 10.98(a) 5.09E-011
Abs310/areal	3.85 ± 0.24(a)	6.94 ± 0.59(b)	1.87 ± 0.09(c)	5.92 ± 0.36(d)	6.72 ± 0.30(d)) 6.92E-011

Det var en sammenheng mellom innhold av lavsyrer per enhet areal og stedsfaktorer (Figur 14) (Tabell 4). Data fra alle habitat passet en vanlig lineær regresjonslinje (Figur 14). Indirekte stedsfaktorer beregnet fra sommerbildene forklarte 28% av variasjonen i innholdet av lavsyrer. Regresjonen var sterkere for indirekte stedsfaktor sammenliknet med direkte stedsfaktor (Tabell 4) (Figur 14). Thalli fra skogshabitat (løvskog, furuskog og granskog) og thalli fra åpne habitat (isolerte trær og strandberg) fordelte seg i to grupper langs regresjonslinjen (Figur 14-17).

Tendensen til gruppering mellom skyggefulle habitat og åpne habitat gikk igjen i hele datasettet. Det var ingen signifikant sammenheng mellom innholdet av lavsyrer per enhet vekt og stedsfaktorer når man ser alle habitatene under ett (Tabell 4)(Figur 15). Skiller man ut de 3 habitat i skog (løvskog, furuskog og granskog), viser disse en signifikant sammenheng mellom innholdet av lavsyrer per vektenhet og indirekte stedsfaktor (Tabell 4) (Figur 15). Denne sammenhengen finner man ikke mellom direkte stedsfaktor og innholdet av lavsyrer per vektenhet i tilsvarende tre habitat (Tabell 4)(Figur 16). For thalli fra de tre skogshabitat var det en sammenheng mellom innholdet av lavsyrer på arealbasis og indirekte stedsfaktor men ikke for direkte stedsfaktor (Tabell 4). Det var en sterk sammenheng mellom spesifikk thallusvekt og stedsfaktorer for alle habitat under ett og for de tre skog habitatene alene (Tabell 4)(Figur 17).



Figur 14 Innholdet av lavsyrer i 75 *Hypogymnia physodes* thalli målt som absorbans ved 310 nm per arealenhet langs en naturlig lys-skyggegradient, basert på indirekte stedsfaktorer (diffust sollys) og direkte stedsfaktorer (direkte sollys) i følgende habitat: løvskog, furuskog, granskog, isolerte trær og strandberg.



Figur 15 Innholdet av lavsyrer i 75 *Hypogymnia physodes* thalli målt som absorbans ved 310 nm per vektenhet langs en naturlig lys-skyggegradient, basert på indirekte stedsfaktorer (diffust sollys) i følgende habitat: løvskog, furuskog, granskog, isolerte trær og strandberg.



Figur 16 Innholdet av lavsyrer i 75 *Hypogymnia physodes* thalli målt som absorbans ved 310 nm per vektenhet langs en naturlig lys-skyggegradient, basert på direkte stedsfaktorer (direkte sollys) i følgende habitat: løvskog, furuskog, granskog, isolerte trær og strandberg.


Figur 17 Sammenheng mellom spesifikk thallusvekt og stedsfaktorer i 75 *Hypogymnia physodes* thalli langs en naturlig lys-skyggegradient, beregnet på indirekte stedsfaktorer (diffust sollys) og direkte stedsfaktorer (direkte sollys) i følgende habitat: løvskog, furuskog, granskog, isolerte trær og strandberg.

Ser man på sammenhengen mellom innholdet av lavsyrer på arealbasis og stedsfaktorer (ISF og DSF) innad i hvert enkelt habitat, er det bare i thalli fra løvskog man finner en sammenheng (Tabell 4). For spesifikk thallusvekt og direkte stedsfaktorer, er det en sammenheng kun i thalli fra løvskog (Tabell 4).

Tabell 4 Sammenheng mellom stedsfaktorer (ISF = indirekte stedsfaktor og DSF = direkte stedsfaktor) og Absorbans 310 nm (på arealbasis og vektbasis). Sammenheng stedsfaktorer og spesifikk thallusvekt (STW). Lineær regresjonsmodell: tall i fet skrift viser \mathbf{r}^2 . Tall i fet kursiv viser signifikante \mathbf{r}^2 verdier. Signifikans nivå er 95 %.

		Løvskog	Furuskog	Granskog	Isolerte trær	Strandberg	Alle habitat	Skogs habitatene
Areal basis	ISF	0.282 p=0.0388	0.115 <i>p</i> =0.217	0.00119 <i>p</i> =0.0903	0.0311 <i>p</i> =0.529	0.00146 <i>p</i> =0.892	0.276 p<0.0001	0.43 7 p<0.0001
	DSF	0.268 P=0.0481	0.0883 <i>p</i> =0.282	0.00946 <i>p</i> =0.730	0.0568 <i>p</i> =0.392	0.0230 <i>p</i> =0.589	0.178 p<0.0002	0.0245 <i>p</i> =0.305
Vekt basis	ISF DSF	0.0523 <i>p</i> =0.412 0.0117 <i>P</i> =0.7017	0.0793 <i>p</i> =0.309 0.0534 <i>p</i> =0.4075	0.0971 p=0.258 0.0588 p=0.384	0.161 <i>p</i> =0.1377 0.208 <i>p</i> =0.0873	0.147 <i>p</i> =0.158 0.211 <i>p</i> =0.0853	0.0003 <i>p</i> =0.887 0.0136 <i>p</i> =0.318	0.321 p<0.0001 0.0091 p=0.5337
STW	ISF	0.202 <i>p</i> =0.0931	0.0046 <i>p</i> =0.810	0.190 <i>p</i> =0.1045	0.194 <i>p</i> =0.1007	0.140 <i>p</i> =0.169	0.699 p<0.0001	0.218 p=0.0012
	DSF	0.316 p=0.0293	0.0018 <i>p</i> =0.8807	0.0735 <i>p</i> =0.3285	0.00101 <i>p</i> =0.9104	0.0617 <i>p</i> =0.372	0.670 p<0.0001	0.0890 p=0.0466

3.5 Absorpsjonsspektre for Hypogymnia physodes

Gjennomsnitts absorbansspektra (200-500 nm) basert på acetonekstrakter for *H. physodes* thalli løst i etanol fra hvert av de 5 habitatene ble beregnet og normalisert slik at absorbansen ved 310 nm ble satt lik 1. Spektrene ble lagt oppå hverandre for å få en indikasjon på om forholdet mellom de ulike lavsyrene var konstant uavhengig av forskjeller i økologiske faktorer slik som lysforhold i de ulike habitat. *H. physodes* inneholder fire ulike lavsyrer: atranorin, physodessyre, physodalsyre og protocetrarsyre. Gjennomsnitts absorbansspektre for hvert av de 5 habitatene sammenfaller godt når de er lagt oppå hverandre (Figur 18). Dette antyder at det relative mengdeforholdet mellom de ulike lavforbindelser er konstant uavhengig av habitat.

Da de ulike lavsyrene hittil var blitt behandlet som en blanding, var det interessant å undersøke de enkelte lavsyrer. For å undersøke nærmere om thalli faktisk inneholdt de fire lavsyrene og få en antydning om mengdeforholdet mellom dem, ble tynnsjiktkromtografering utført. Tynnsjiktkromotografering (TLC) ble utført for å skille de ulike lavsyrene og lage et absorpsjonsspekter for hver enkelt av dem. Det ble funnet 7 bånd på tynnsjiktplatene. Hvert bånd ble løst i etanol slik ekstraktene fra de 5 habitatene var. Fire av båndene ble identifisert til å være de aktuelle lavsyrene, mens 3 bånd ikke ble identifisert (<u>Figur 19 og Figur 1</u>). Ett samlespekter for de ulike lavforbindelsene som ble funnet ved tynnsjiktkromotografi ble normalisert på samme vis som gjennomsnittsspektrene for de 5 ulike habitatene var.

Dette samlespekteret ble sammenliknet med et gjennomsnittsspekter for alle 5 habitat. De to spektrene sammenfalt godt (<u>Figur 20</u>)



Figur 18 Gjennomsnitts absorpsjonsspektra ved 200-500 nm for lavsyrer fra hvert enkelt av 5 ulike habitat (n = 15) i 75 *Hypogymnia physodes* thalli langs en naturlig lysskyggegradient. Lavsyrene er løst i etanol. Spektrene er normalisert slik at absorbansen ved 310 nm er lik 1.



Figur 19 Absorpsjonsspektra ved 200-500 nm viser 7 ulike bånd separert ved tynnsjiktkromotografi fra *Hypogymnia physodes* thalli løst i etanol. 4 bånd er identifisert som atranorin, physodessyre, physodalsyre og protocetrarsyre, mens 3 bånd er uidentifisert.



Figur 20 Samlet absorbansspekter for innhold av lavforbindelser i *Hypogymnia physodes* thalli løst i etanol. Enkeltspektrene er separert ved tynnsjiktkromotografi og summert til et samlespekter. Samlespekteret er normalisert slik at absorbansen ved 310 nm er lik 1 og sammenliknet med et gjennomsnittsspekter for alle 5 habitat.

3.6 PSII kvanteutbyttet langs lys-skyggegradienten

Klorofyll-fluorescensmålinger av acetonekstraherte *H. physodes* thalli målt i etterkant av en 48 timer hvileperiode med svakt lys viser at thalli fra furuskog og strandberg har signifikant lavere F_v/F_m verdier (p=1.27E-013), sammenliknet med de andre habitat (<u>Figur 21 og Tabell 3</u>). Selv om thalli fra furuskog og strandberg har lavere F_v/F_m verdier, er det ingen tegn på fotoinhibering i disse thalli.



Figur 21 Klorofyll-fluorescens målt i acetonekstraherte *Hypogymnia physodes* thalli samlet fra 5 habitat langs en naturlig lys-skyggegradient, etter 48 timer hvileperiode i svakt lys. Gjennomsnitt og standard feil av gjennomsnitt er gitt for hvert habitat separat (n=15). Gjennomsnitt med lik bokstavkode er ikke signifikant forskjellige.

3.7 Innhold av klorofyll langs lys-skyggegradienten

Klorofyllkonsentrasjoner for *H. physodes* i nmol ml⁻¹ (etter formel fra PORRA et al., 1989).

I DMF

(1)	Chl a:	$13.43*A^{663.8}$ –	$-3.47*A^{646.8}$	
	0111	00 00* 646.8	- 20x + 663.8	

(2) Chl b: $22.90*A^{646.8} - 5.38*A^{665.3}$

Dette ble brukt til å beregne gjennomsnittlig klorofyll/areal (klorofyll a+b/areal) i μ mol m⁻² og gjennomsnittlig klorofyll/vekt (klorofyll a+b/vekt) i μ mol g⁻¹, samt klorofyll a/b forholdet (<u>Figur 22</u>), klorofyll a/b forholdet og klorfyll/GSF forholdet (<u>Tabell 3</u>), for hvert av de 5 habitat. Klorofyll/areal forholdet er beregnet i mmol m⁻². Det er signifikante forskjeller mellom habitatene (*p*=0.000000440). Gjennomsnittlig klorofyllinnhold i thalli fra åpent strandberg ligger betydelig lavere enn for de 4 andre habitat.



Figur 22 Klorofyllkonsentrasjoner per arealenhet i 75 *Hypogymnia physodes* thalli fra 5 habitat langs en naturlig lys-skyggegradient, i følgende habitat: løvskog, furuskog, granskog, isolerte trær og strandberg. Gjennomsnitt og standard feil av gjennomsnitt er regnet ut for hvert av de 5 habitat (n=15).

3.8 UV-B toleranse i PSII for *Hypogymnia physodes* thalli fra granskog og strandberg (5 døgn)

 F_v/F_m ble målt i *H. physodes* thalli fra granskog og strandberg etter 48 timer ved svakt lys. Tre sett thalli var eksponert for PAR (150 µmol fotoner m⁻² s⁻¹) + tre ulike nivåer UV-B stråling: 1.4 Wm⁻², 2.3 Wm⁻², og 3.3 Wm⁻², kontinuerlig i 120 timer. Et kontroll sett var kun eksponert for PAR (4-5 µmol fotoner m⁻² s⁻¹). Det var en signifikant nedgang i F_v/F_m når thalli var acetonekstrahert (Figur 23, 26 og Tabell 5). Det var også en signifikant nedgang i F_v/F_m når thalli ble eksponert for økende dose UV-B stråling (Figur 24, 26 og Tabell 5). For koplete parametere var det en sammenheng mellom HABITAT og økende UV-B eksponering (Figur 25). For lav som ikke ble eksponeret for UV-B hadde thalli fra strandberg lavere F_v/F_m verdi, sammenliknet med thalli fra granskog (Figur 25). Ved økende nivå av UV-B lå F_v/F_m verdier for thalli fra strandberg på samme nivå eller litt over thalli fra granskog (Figur 25).

Source	df	F-ratio	P
HABITAT	1	0.053	0.818
ACETON	1	16.818	0.000
UV	3	21.195	0.000
HABITAT*ACETON	1	0.071	0.790
HABITAT*UV	3	2.995	0.033
ACETON*UV	3	0.938	0.424
HABITAT*ACETON*UV	3	0.771	0.512

 Tabell 5
 ANOVA resultater for UV-B toleranse i Hypogymnia physodes thalli: 5 døgn

Forklaring til koder: Habitat 3 = granskog Habitat 5 = strandberg + Acetonekstrahering = 1 -Acetonekstrahering = 0 -UV = 0 +UV (1.4 Wm⁻²) = 1 +UV (2.3 Wm⁻²) = 2 +UV (3.3 Wm⁻²) = 3





Figur 23 Effekt av acetonekstrahering på *Hypogymnia physodes* thalli fra granskog og strandberg vist som endring i F_v/F_m .





Figur 24 Effekt av økende UV-B eksponering på *Hypogymnia physodes* thalli fra granskog og strandberg vist som endring i F_v/F_m .



Least Squares Means

Figur 25 Sammenheng mellom økende UV-B eksponering og habitat på *Hypogymnia physodes* thalli fra granskog og strandberg vist som endring i F_v/F_m



Figur 26 Klorofyllfluorescensmålinger i *Hypogymnia physodes* thalli fra granskog og strandberg, enten acetonekstrahert (+A) eller ikke acetonekstrahert (-A), etter behandling med PAR (150 μ mol fotoner m⁻² s⁻¹) + UV-B eksponering i vekstkammer med tre ulike UV-B nivå i 5 døgn. Kontroll ble kun eksponert

for PAR (4-5 μ mol fotoner m⁻² s⁻¹) i samme tidsrom. Gjennomsnitt og standard feil av gjennomsnitt er gitt for hvert habitat separert.

3.9 UV-B toleranse i PSII for *Hypogymnia physodes* thalli fra granskog og strandberg (10 døgn)

I dette forsøket ble tiden for UV-B eksponering økt til 10 døgn, mot 5 døgn tidligere. Thalli ble eksponert for PAR (150 μ mol fotoner m⁻²s⁻¹) + UV-B med strålenivåer i området 3.3-3.8 Wm⁻². Halvparten av thalli ble fuktet. Klorofyll-fluorescensmålinger for *H. physodes* viser at det er flere faktorer som samvirker for de effekter man ser som endring i F_v/F_m verdier for thalli fra granskog og strandberg (Figur 27-33 og Tabell 6). Det er signifikante effekter av UV-B eksponering, fukting og ulike habitat når man ser på disse faktorer separat (Figur 27-33) (Tabell 6). Det er en generell nedgang i Fv/Fm verdier når laven eksponeres for UV-B stråling(Tabell 6)(Figur 30).En slik generell nedgang i effektivitet i PSII ser man også når laven fuktes(Tabell 6)(Figur 31). Det er habitatspesifikke forskjeller i F_v/F_m verdier der granskog generelt har lavere F_v/F_m verdier (<u>Tabell 6</u>)(Figur 32). Acetonekstrahering gir ingen effekt i form av endring i Fv/Fm verdier når den behandles separat (Tabell 6)(Figur 33). Det er en signifikant sammenheng mellom UV-B eksponering og fukting der nedgangen i F_v/F_m verdi først opptrer når laven er fuktet. I tørr tilstand får man ingen effekt av UV-B (Figur 27) (Tabell 6). Videre ser man en sammenheng mellom UV-B eksponering eksponering, fukting og habitat. Det er vist at effekten av UV-B eksponeringen er avhengig fukting men det er kun thalli fra strandberg som får en nedgang i F_v/F_m verdier når de blir fuktet og utsatt for UV-B eksponering (Figur 28) (Tabell 6). UV-B eksponering, fukting og acetonekstrahering viser også en sammenheng. Her ser man at effekten av UV-B eksponering og fukting kun inntreffer i thalli som ikke er acetonekstraherte (Figur 29 og Tabell 6).

Source	df	F-ratio	P
UV	1	8.587	0.005
TV	1	57.088	0.000
HABITAT	1	161.371	0.000
ACETON	1	0.515	0.476
UV*TV	1	4.641	0.035
UV*HABITAT	1	0.258	0.613
UV*ACETON	1	2.048	0.157
TV*HABITAT	1	2.064	0.156
TV*ACETON	1	0.301	0.585
HABITAT*ACETON	1	0.743	0.392
UV*TV*HABITAT	1	4.424	0.039
UV*TV*ACETON	1	5.842	0.019
UV*HABITAT*ACETON	1	1.723	0.194
TV*HABITAT*ACETON	1	1.200	0.277
UV*TV*HABITAT*ACETON	1	1.335	0.252

Tabell 6 ANOVA resultater for UV-B toleranse i *Hypogymnia physodes* thalli: 10 døgn

Forklaringer til koder: +UV = 1 -UV = 0 +Acetonekstrahering=1 -Acetonekstrahering=0 TØRR=0 VÅT=1 Habitat 1=Strandberg Habitat 2=Granskog



Figur 27 Sammenheng mellom UV-B eksponering og fukting i *Hypogymnia physodes* thalli fra granskog og strandberg, vist som endring i F_v/F_m verdi.



Least Squares Means

Figur 28 Sammenheng mellom UV-B eksponering, fukting og habitat i *Hypogymnia physodes* thalli fra granskog og strandberg, vist som endring i F_v/F_m verdi.



Figur 29 Sammenheng mellom UV-B eksponering, fukting og acetonekstrahering i *Hypogymnia physodes* thalli fra granskog og strandberg, vist som endring i F_v/F_m verdi.



Figur 30 Klorofyll-fluorescensmålinger i *Hypogymnia physodes* thalli fra granskog og strandberg som enten er eksponert for PAR + UV-B eller kun PAR. De er enten acetonekstraherte (+A) eller ikke acetonekstraherte (-A), og halvparten av thalliene er fuktet. UV-B stråledoser lå mellom $3.3-3.8 \text{ Wm}^{-2}$.



Figur 31 Klorofyll-fluorescensmålinger i *Hypogymnia physodes* thalli fra granskog og strandberg som enten er eksponert for PAR + UV-B eller kun eksponert for PAR. De er enten acetonekstraherte (+A) eller ikke acetonekstraherte (-A), og halvparten av thalliene er fuktet. Tørre thalli vises mot våte thalli. UV-B stråledoser lå mellom 3.3-3.8 Wm⁻².



Figur 32 Klorofyll-fluorescensmålinger i *Hypogymnia physodes* thalli fra granskog og strandberg som enten er eksponert for PAR + UV-B eller kun eksponert for PAR. De er enten acetonekstraherte (+A) eller ikke acetonekstraherte (-A), og halvparten av thalliene er fuktet. De to habitatene vises mot hverandre. UV-B stråledoser lå mellom $3.3-3.8 \text{ Wm}^{-2}$.



Figur 33 Klorofyll-fluorescensmålinger i *Hypogymnia physodes* thalli fra granskog og strandberg som enten er eksponert for PAR + UV-B eller kun eksponert for PAR. De er enten acetonekstraherte (+A) eller ikke acetonekstraherte (-A), og halvparten av thalliene er fuktet. Ekstraherte thalli vises mot uekstraherte thalli. UV-B stråledoser lå mellom 3.3-3.8 Wm⁻².

3.10 Induksjon av lavsyresyntese i *Hypogymnia physodes* thalli fra granskog og strandberg

For å se på mulig resyntese av lavsyrer i H. physodes, var 5 thalli fra strandberg og 5 fra granskog fra boks 1 i UV-forsøk 2 (10 døgn) blitt acetonvasket 4 ganger, fuktet og eksponert for PAR (150 μ mol fotoner m⁻² s⁻¹) + UV-B stråling i 10 døgn (n=10). Fra boks 2 i det samme forsøket var et tilsvarende sett lav acetonvasket og fuktet, men disse ble kun eksponert for PAR (150 μ mol fotoner m⁻² s⁻¹) (n=10). De 20 individene ble veid som tørre og hvert enkelt av disse ble acetonekstrahert i 5 ml aceton, 4 ganger, med 30 minutters intervall. Absorbansen ble målt ved 310 nm. Innholdet av lavsyrer funnet etter 10 døgn med de ulike behandlinger ble sammenliknet med verdier fra ekstraksjonsforsøket med 75 thalli fra 5 habitat. Fuktede thalli fra granskog som ble eksponert for PAR + UV-B stråling gjennom 10 døgn resyntetiserte 4.4 % av sitt opprinnelige lavsyretinnhold (Figur 34). Thalli fra strandberg som hadde fått tilsvarende behandling resyntetiserte 3.7 % (Figur 34). Fuktede thalli fra granskog som kun var eksponert for PAR, resyntetiserte 5.8 % av sitt opprinnelige lavsyreinnhold mens thalli fra strandberg med tilsvarende behandling resyntetiserte 3.1 % (Figur 34). I forforsøket med acetonekstrahering ble thalli fra granskog og strandberg ekstrahert henholdsvis 7 og 8 ganger. For å få reelle verdier for resyntesen, ble restinnholdet etter de fire første ekstraksjoner (ekstraksjonene fra 5-7) trukket fra resynteseverdiene. Restinnholdet i thalli fra granskog var 1.1 % og restinnholdet i thalli fra strandberg var 2.7 %. ANOVA test viste at det ikke var signifikante forskjeller i resyntesen mellom de ulike behandlingene (P = 0.916).



Figur 34 Induksjon av lavsyresyntese i fuktede *Hypogymnia physodes* thalli i vekstkammer i 10 døgn. Thalli ble eksponert for PAR (150 μ mol fotoner m⁻² s⁻¹og 24 timer fotoperiode) eller PAR + UV-B (3.3-3.8 W m⁻² UV-B i 24 timer). Error bars viser ± standard feil og n = 5.

4 DISKUSJON

Mange studier har relatert UV-absorberende lavforbindelser til UV-beskyttelse. Cockell og Knowland (1999) har satt fram fire kriterier som bør oppfylles for å teste om en sekundær forbindelse i lav har en skjermende funksjon eller ikke:

- 1. Forbindelsen må absorbere den respektive strålingen.
- 2. Skjermingseffekten må demonstreres in vivo.
- 3. Biosyntese av produktet bør bli indusert av den relevante strålingen.
- 4. Forbindelsen bør gi beskyttelse mot skade fra den respektive strålingen og denne beskyttelsen må kunne skilles fra aktiviteten til andre mekanismer slik som DNA reparasjon.

I denne oppgaven er innhold av lavsyrer i *Hypogymnia physodes* thalli langs en naturlig lysskyggegradient studert. Induksjon under eksperimentelle forhold ble undersøkt ved eksponering med kunstig UV-B stråling. En UV-B beskyttende funksjon for de sekundære forbindelser hos fotobionten ble studert ved å eksponere thalli med eller uten innhold av lavsyrer for kunstig UV-B stråling.

4.1 Acetonekstrahering av *Hypogymnia physodes*

Som tilnærming til acetonekstrahering som metode, ble et forforsøk utført for å se på restinnhold av lavsyrer etter ekstraksjon med aceton. Lav fra granskog og strandberg ble benyttet da disse ble antatt å utgjøre ytterpunkter i lys-skyggegradienten. For *H. physodes* thalli ble det vist at selv med 30 minutter ekstraheringsintervall og 8 (7) ekstraksjoner, utgjorde restinnholdet av blandingen med atranorin, physodessyre, physodalsyre og protocetrarsyre, 1-3 % etter 4 ekstraksjoner. Acetonekstraheringsforsøk med *Xanthoria parietina* thalli viste at det meste av parietininnholdet var ute etter 4 ekstraksjoner med 5 minutters intervall (Solhaug & Gauslaa 1996). Men Solhaug *et al.* (2003) viste at det for saxicouløse *X. parietina* thalli, som har dobbelt så høy spesifikk thallusvekt, var nødvendig å øke ekstraheringstiden til 10 minutter. Selv med en forlenget ekstraheringstid var restinnholdet av parietin på 1-2 % av det opprinnelig innholdet tilbake i thalli. At det fremdeles var et restinnhold i denne størrelsesorden etter ekstrahering av *H. physodes* thalli, var en observasjon som kunne ha konsekvenser for vurderingen av UV-B toleransen ved PSII i thalli som var acetonekstrahert. Er et slikt restinnhold tilstrekkelig for å gi laven en teoretisk beskyttelse mot skadelige effekter av UV-B stråling?

For å få et svar på dette ble absorbansen/transmisjonen i acetonekstraherte thalli beregnet på bakgrunn av den totale absorbansen for 75 thalli fra 5 ulike habitat (Figur 13)(Tabell 3). Beregninger ble utført med en gjennomsnittsverdi på 2 % restinnhold for alle thalli (Tabell 1). Det totale innhold av lavsyrer i thalli før ekstrahering vil kunne gi tilnærmet fullstendig absorpsjon av UV-B stråling uavhengig av habitat. Thalli fra granskog som hadde det laveste innholdet av lavsyrer i utgangspunktet, hadde en absorbans på kun 35 % med et restinnhold på 2%. Thalli fra furuskog som hadde det høyeste innholdet av lavsyrer før

ekstraksjon, hadde en absorbans på 80%. En absorbans på 80 % som ble vist for thalli fra furuskog, kan teoretisk gi en viss beskyttelse. Men det er ikke sikkert at de resterende mengder med lavsyrer er jevnt fordelt, noe som øker faren for transmisjon av UV-B stråling ned til fotobiontsjiktet.

Denne beregningen viser bare om en løsning av de aktuelle lavsyrer i *H. physodes* har et potensial til å beskytte mot UV-B stråling. Mange av de sekundære forbindelsene i lav er fenoler som er krystaller avsatt av soppkomponenten, hovedsakelig på utsiden av sopphyfene (Fahselt 1994). Stoffene vil sannsynligvis absorbere mindre som krystaller enn når de er i løsning og derfor vil denne beregningen overestimere beskyttelsen mot UV-B stråling. Man kan derfor konkludere med at et restinnhold av lavsyreblandingen i denne størrelsesorden i liten eller ingen grad kan beskytte fotobiontsjiktet mot skadelige effekter av UV-B stråling.

4.2 PSII kvanteutbyttet for *Hypogymnia physodes* langs lys-skyggegradienten

For å få en indikasjon på effektiviteten i PSII hos lav i ytterpunktene av lysskyggegradienten, ble thalli fra habitat med antatt lavest (granskog) og høyest (strandberg) stedsfaktorverdi valgt til F_v/F_m målinger. Acetonekstraherte thalli fra granskog hadde de høyeste F_v/F_m verdier (0.69 ± 0.005) sammenliknet med thalli fra strandberg (0.64 ± 0.015). Det var signifikante forskjeller mellom de to habitatene (P = 0.00194). Lave F_v/F_m verdier for soleksponerte thalli fra strandberg tyder på fotoinhibering av mer langvarig art.

Klorofyll-fluorescensmålinger av acetonvaskede thalli fra 5 ulike habitat langs hele lysskyggegradienten viste at det er lite som skiller de ulike habitat i F_v/F_m verdier. Thalli fra furuskog og strandberg lå litt lavere i F_v/F_m verdier sammenliknet med de 3 andre habitat (<u>Figur 21 og Tabell 3</u>). De fleste målinger for *H. physodes* hadde en F_v/F_m verdi på rundt 0.7. For mørkeadapterte individ av *Lobaria pulmonaria* med vitale fotobiontceller er F_v/F_m verdier ofte omkring 0.73 - 0.78 (Nybakken *et al.*, 2000). Ingen av F_v/F_m målingene for *H. physodes*, verken de som var målt i ytterkant av lys-skyggegradienten, eller de målt langs hele gradienten, lå på et nivå som for vitale *L. pulmonaria*. Det ble derfor antatt at F_v/F_m verdier på rundt 0.7 viser vitale *H. physodes* thalli.

Det er lite sannsynlig at F_v/F_m verdier på rundt 0.66 hos thalli fra furuskog og strandberg reflekterer varig fotoinhibert skade, sett i forhold til F_v/F_m verdier på rundt 0.7 som mål på vitale *H. physodes* thalli. Uansett var det ingen tendens til at thalli fra åpne habitat lå høyere eller lavere i F_v/F_m verdier når man ser på datasettet for hele lys-skyggegradienten. Man kan derfor ikke trekke noen konklusjoner på om thalli fra åpne habitat var mer eller mindre utsatt for fotoinhibering.

4.3 Lys-skyggegradienten

Stedsfaktormålinger ble foretatt for å kunne vurdere om innholdet av lavsyrer viste en sammenheng med lysforhold langs lys-skyggegradienten. Resultatene av stedsfaktormålingene viste at granskog hadde de laveste verdiene. Isolerte trær og strandberg hadde høyest målte stedsfaktorverdier. Det var et markant skille i stedsfaktorverdi mellom

løvskog, furuskog og granskog på den ene siden og stedsfaktorverdi fra åpne habitat (isolerte trær og strandberg) på den andre siden (Tabell 2). Beregningene av stedsfaktor var kun basert på sommerbilder (Tabell 2). Det var derfor ikke mulig å få et fullstendig bilde av lysforholdene for hele året i de ulike habitat valgt i forsøket. Strandberghabitatet hadde ikke noen dekkende vegetasjon. Jeg har derfor antatt at sommerbildene fra strandberg også kan gjelde for vinterforhold. Alle H. physodes voksesteder i furuskog og granskog var skygget av respektivt eviggrønne Pinus sylvestris og Picea abies. Det er derfor rimelig å anta at stedsfaktorverdi fra disse habitat ikke ville endret seg mye i løpet høsten (Gauslaa & Ustvedt, 2003). Imidlertid viste Gauslaa & Ustvedt, (2003) at det kunne være en vesentlig økning i stedsfaktor for bladfellende habitat (løvskog og isolerte trær) i løpet av vinterhalvåret. Sammenliknet med disse resultatene ville stedsfaktorverdi for de to eviggrønne H. physodes habitat endret seg lite gjennom høsten. For habitat med løvskog og isolerte trær er det mulig at verdiene ville vært en del høyere som følge av løvfall i løpet av høsten. Stedsfaktorverdi for isolerte trær lå i utgangspunktet høyt og ville uansett grupperes i åpne habitat selv uten vinterbilder (Tabell 2). Stedsfaktorverdi for løvskog ville antakelig økt en del men likevel havne i gruppen med skyggehabitat (Tabell 2). Det kan derfor konkluderes med at den tydelige grupperingen i skyggefulle og åpne habitat som gjenspeiles i stedsfaktorverdier for forsøket, likevel ville bli opprettholdt selv med korrigering av verdier for vinterhalvåret.

4.4 Innhold av lavsyrer i *Hypogymnia physodes* fra 5 ulike habitat langs lys-skygge gradienten

På forhånd var det forventet at innholdet av lavsyrer skulle vise en sammenheng med lysforhold langs lys-skyggegradienten. Stedsfaktorverdier viste at det var en klar todeling i åpne- kontra skyggefulle habitat. Det var derfor forventet at lavsyreinnholdet i det minste skulle avspeiles i denne todelingen. Innholdet av lavsyrer per arealenhet i thalli fra furuskog var høyest sammenliknet med innholdet i thalli fra alle andre habitat (<u>Tabell 3</u>). Siden furuskog ikke hadde de høyeste stedsfaktorverdier (<u>Tabell 2</u>) men likevel det høyeste innholdet av lavsyrer, er det grunn til å anta at lysforholdene alene ikke kan forklare innholdet av lavsyrer. Dette til tross for at det var vist en svak sammenheng mellom disse faktorer (<u>Figur 14</u>).

Det er vist at syntese av lavsyrer ikke kan finne sted når laven er uttørket (Nybakken, 2003). Thalli fra furuskog hadde en spesifikk thallusvekt som var signifikant høyere sammenliknet med thalli fra løvskog og granskog, men mye lavere enn thalli fra åpne habitat (Tabell 3). Individer med høy spesifikk thallusvekt har stor evne til å lagre vann (Nybakken *et al.*, 2000). Kombinasjonen av en forholdsvis lav spesifikk thallusvekt og lave stedsfaktorverdier for thalli fra furuskog skulle tilsi et innhold av lavsyrer som var lavere sammenliknet med thalli fra åpne habitat med mye lys og høy spesifikk thallusvekt. At thalli fra furuskog likevel hadde et lavsyreinnhold som var så høyt kan kanskje delvis forklares i fordelingen av indirekte og direkte (Tabell 2). En kombinasjon av forholdsvis høy spesifikk thallusvekt (høyere sammenliknet med de to andre skogshabitat) og en høy andel indirekte sollys, kan ha bidratt til at thalli fra furuskog ikke har vært så utsatt for direkte sollys med påfølgende uttørking. Laven kan da hatt mulighet for en betydelig syntese av lavsyrer.

Thalli fra løvskog hadde en signifikant lavere spesifikk thallusvekt og en større andel direkte sollys sammenliknet med thalli fra furuskog (<u>Tabell 2 og 3</u>), noe som kan ha resultert i mindre syntese av lavsyrer. Da beregning av stedsfaktorverdier kun var basert på sommerbilder var det sannsynlig at løvskogshabitat var blitt eksponert for betydelige lysnivåer høst og vår (Gauslaa & Ustvedt, 2003). Det er også sannsynlig at andelen direkte sollys i disse periodene har vært forholdsvis høy som følge av løvfelling og manglende løvverk tidlig på våren. Thalli fra løvskog kan derfor ha vært utsatt for betydelig uttørking i denne perioden, med påfølgende inaktivt synteseapparat.

Thalli fra granskog hadde det laveste innhold av lavsyrer per arealenhet (Tabell 3). Selv om thalli fra granskog også hadde fordelaktig fordeling av sollvset med liten andel direkte sollvs. var stedsfaktorverdiene mye lavere sammenliknet med alle andre habitat (Tabell 2). Lav fra fotosyntetisk granskog mottok derfor svak stråling (PAR) muligens nær lyskompensasjonspunktet for fotosyntesen i H. physodes. Thalli fra lyseksponerte habitat (isolerte trær og strandberg) hadde også et høyt innhold av lavsyrer sammenliknet med thalli fra granskog og løvskog. Thalli fra åpne habitat hadde en spesifikk thallusvekt som var nær dobbelt av thalli fra skyggehabitat. En høy spesifikk thallusvekt kan ha bidratt til å opprettholde god vannstatus. Kombinert med høye stedsfaktorverdier og derav mye sollys kan dette ha gitt stor synteseaktivitet i perioder, slik at det samlet sett ble en betydelig produksjon av lavsyrer. Det er mulig at det relativt høye innholdet av lavsyrer kombinert med god vannstatus og god refleksjonsevne gir en optimal tilpasning til lyseksponerte habitat. Lavsyreinnholdet kan derfor ikke forklares av lysforholdene alene. Det er mer sannsynlig at det er en kombinasjon av faktorer der spesifikk thallusvekt, vannholdingskapasitet og fordeling av direkte og indirekte sollys er bestemmende for innholdet.

4.5 Effekt av stedsfaktorverdier på innholdet av lavsyrer og morfologi i *Hypogymnia* physodes

Resultatene fra dette forsøket viste at habitat-spesifikke direkte og indirekte stedsfaktorer beregnet fra hemisfæriske bilder bare til en viss grad samsvarte med innholdet av lavsyrer per arealenhet i individuelle thalli (Figur 14)(Tabell 4). Det er ingen sammenheng mellom innholdet av lavsyrer per vektenhet og stedsfaktorer når man ser på alle fem habitat langs lysskyggegradieten under ett. Det var en svak sammenheng når man ser på de tre skogshabitat separat (Figur 15). Ser man på sammenhengen mellom innhold av lavsyrer på arealbasis og stedsfaktorer (ISF og DSF) innad i hvert enkelt habitat, er det bare i thalli fra løvskog man finner en sammenheng (Tabell 4). Det var forventet at det generelt skulle være en relativt god sammenheng mellom lysforholdene og innholdet av lavsyrer langs lysgradienten slik det ble observert for Xathoria parietina thalli. Gauslaa og Ustvedt, (2003) viste at det var en sterk sammenheng mellom habitatspesifikke direkte og indirekte stedsfaktorer og innholdet av parietin i individuelle X. parietina thalli. Felt og vekstkammereksperimenter har klart vist at UV-B er nødvendig for syntese av parietin i parietinfrie X. parietina thalli (Solhaug et al., 2003) selv om denne studien ikke skilte mellom UV og PAR effekter. Den dokumenterte UV-B induksjonen av parietinsyntese kan ikke utelukke at parietin kan ha som hovedfunksjon å beskytte mot overskudds PAR. Derfor vil en manglende korrelasjon bare implisere at målinger av UV-B absorberende forbindelser ikke nødvendigvis er en god indikator på UV-B toleranse (Phoenix et al., 2002).

Gauslaa & Ustvedt (2003) viste at det var en sterkere korrelasjon med stedsfaktorer basert på sommerbilder sammenliknet med vinterbilder. Dette tyder på at sterk stråling fra solen er den mest avgjørende faktor for produksjon av lavsyrer gjennom perioder med høy aktiv metabolisme som følge av fordelaktige temperaturer. Syntese av lavsyrer skjer kun ved økologiske forhold som tillater en betydelig netto fotosyntese, som vist i felttransplantasjoner med parietinfrie thalli (Solhaug & Gauslaa, 1996) og i laboratorieeksperimenter (Solhaug *et al.*, 2003).

Det var ingen god sammenheng mellom lysforholdene og innholdet av lavsyrer i H. physodes thalli. Det ble derimot vist en sterk sammenheng mellom spesifikk thallusvekt og stedsfaktorer. Det var en tendens til gruppering mellom thalli i skog (løvskog, furuskog og granskog) på den ene side og åpne habitat (isolerte trær og strandberg) på den andre. Tendensen var sterkest koplet mot indirekte stedsfaktor (Figur 17). Thalli fra åpne habitat hadde nær dobbelt så høy spesifikk thallusvekt sammenliknet med thalli fra skogshabitat (Tabell 3). Individer med høy spesifikk thallusvekt har stor evne til å lagre vann (Nybakken et al., 2000). Med en bedre vannstatus er det derfor mulig at laven kan holde seg lengre fuktig og således holde seg metabolsk aktiv selv med mye lys i habitatet. Det vil likevel være fordelingen av indirekte og direkte sollys i habitatet som er avgjørende. Lav i habitat med mye åpen himmel men lite direkte sollys holder seg forholdsvis lenge fuktig mens laver i mer soleksponerte habitat tørker raskere ut til tross for et tykkere thallus (Nybakken et al., 2000). For thalli fra åpne habitat ser det ut til at høy stedsfaktor gir en fordelaktig vekst i form av kraftigere thalli sammenliknet med thalli fra skogshabitat (Figur 17). Thalli fra lyseksponerte habitat har høy spesifikk thallusvekt men ikke det høyeste innhold av lavsyrer (Tabell 3). Det er mulig at thalli fra lyseksponerte habitat investerer mer i form av kraftigere thallus på bekostning av et mindre innhold av lavsyrer. Et kraftig thallus vil generelt være mer robust med en god vannholdingskapasitet og ha et tykkere cortex med bedre refleksjonsevne sammenliknet med mindre kraftige thallus. Tørkede thalli har en reduksjon i mengde lys som slipper gjennom overbarken (Büdel et al., 1996) og en sterkere lysrefleksjon (Gauslaa, 1984). Gjennom stabile tørre perioder vil derfor absorpsjon gjennom øvre del av cortex være redusert mye av strukturelle endringer slik at beskyttelse med sekundære UV-B absorberende fenoler antakelig være mindre påkrevd enn i perioder med høy fuktighet og strålingsfluktuasjoner.

Mine resultater indikerer at konsentrasjonene av lavsyrer i *H. physodes* ikke er nært korrelert med strålingsnivå av UV-B. Det ser ut til at stedsfaktorverdier gjenspeiler en gruppering i åpne- kontra skyggefulle habitat heller enn en trinnvis gradering av lysforholdene. Lav som vokser i de respektive gruppene er best tilpasset dette, med høy kontra lav spesifikk thallusvekt. Det er mulig at høy spesifikk thallusvekt, som gir tykke thalli med god refleksjonsevne, er en like viktig del av lysbeskyttelsen som lavsyreinnholdet. Innholdet av lavsyrer er antakelig avhengig av en kombinasjon av faktorer, der fordelingen av direkte og indirekte lys står sentralt.

4.6 Absorpsjonsspektra for *Hypogymnia physodes*

Noen få veldig vanlige forbindelser finner man i høye konsentrasjoner i barken på lav, som danner en skjerm over fotobiontsjiktet, mens hoveddelen av forbindelsene er lokalisert i fotobiontsjiktet i den øvre del av margen (Fahselt & Alstrup, 1997). Lavforbindelser har derfor et potensial til å beskytte mot ulike effekter av UV-B stråling. Likevel er de økologiske

betydningene av sekundære forbindelser i lav komplekse og ofte bygd på gjetninger.

H. physodes inneholder fire ulike lavsyrer. Atranorin er et depsid, lokalisert i barken hos kvistlav. De tre andre lavsyrene physodessyre, physodalsyre og protocetrarsyre er depsidoner som er lokalisert i margsjiktet. Felles for disse fire lavsyrene er deres opphav i acetylpolymalonyl synteseveien. Gjennomsnitts absorbanspektre basert på en blanding av de ulike lavsyrene ekstrahert fra thalli for hvert av de 5 ulike habitatene langs den lokale lysskyggegradienten, sammenfalt godt når de ble lagt oppå hverandre (Figur 18). Dette viser at det relative mengdeforholdet mellom de ulike lavforbindelsene var konstant uavhengig av habitat. Atranorinets lokalisering i barken og den sterke absorbansen i UV-B regionen (Figur 1) passer godt med en UV-B skjermende funksjon. Plasseringen av de tre andre lavsyrene i margsjiktet, og sterk absorbans i UV-B regionen, samsvarer også med en UV-B skjermende rolle.

Det var påfallende at det relative mengdeforholdet mellom de fire lavsyrene i *H. physodes* var så konstant på tvers av den lokale lys-skyggegradienten. Det er mulig at dette konstante forholdet kan forklares i et felles opphav i acetyl-polymalonyl synteseveien, der alle de fire lavsyrene utledes fra samme opphav. Men Bjerke (2003) viste at det for divaricatsyre og usninsyre i *Ophioparma ventosa*, som begge har felles opphav i acetyl-polymalonyl synteseveien, ikke var noen slik sammenheng. Divaricatsyre er et didepsid som akkumuleres primært i margen på *O. ventosa*. Divaricatsyre har absorpsjonsmaksima i UV-C regionen og absorberer ikke så effektivt i UV-B regionen som usninsyre (Bjerke, 2003). Mengden av divaricaticsyre i *O. ventosa* viste stor variasjon og var ikke korrelert med verken mengde usninsyre eller strålingsregimer (Bjerke, 2003). Da depsider ofte antas å være vekst regulatorer og antibeitestoffer (Huneck, 1999), har Bjerke (2003), foreslått at syntese av divaricatsyre blir indusert av noen biotiske faktorer og ikke av abiotiske faktorer slik som UVR.

Atranorin er et depsid, men i *H. physodes* er dette lokalisert i barken hvor en lysbeskyttende funksjon er en mer sannsynlig funksjon. Fenoler i lav er sekundære metabolitter med flere potensielle fysiologiske og økologiske funksjoner. Det vil være fordelaktig for en lav å kunne dekke flere funksjoner med de samme lavsyrene. Det er derfor mulig at lavsyrene i *H. physodes* har flere funksjoner, der disse skjermer laven mot UV-B stråling samt beskytter mot for eksempel beiting. En slik dobbeltfunksjon kan godt tenkes å bli indusert av UV-B alene, noe som ville være en fordel for laven.

Hyvarinen *et al.* (2000) viste at konsentrasjonen av fenolforbindelser var høyere i sorediate enn i ikke-sorediate lobeender hos *Vulpicida pinastri* og *Hypogymnia physodes*. De påpekte at disse resultater var i samsvar med optimal forsvarsteori (optimal defence teory, ODT) som forutsier høyere lokalisering av fenoler i strukturer som er av stor betydning for fitnessen til en individuell genet eller ramet. Både seksuelle (*X. parietina* apothecier) og aseksuelle (soredier hos *V. Pinastri* og *H. physodes*) reproduktive strukturer hadde høyere innhold av fenoler sammenliknet med somatisk vev.

Ved tynnsjiktkromotografi ble det funnet 7 bånd, der fire ble identifisert som de aktuelle lavsyrene oppgitt i litteratur (Huneck & Yoshimura, 1996). Tre av båndene ble ikke identifisert, men disse hadde ingen relevans for problemstillingen med en lysbeskyttende rolle da ingen av disse absorberte i UV-B området (<u>Figur 19</u>). Absorpsjonsspektrene fra tynnsjiktkromotografien viste at alle de fire lavsyrene i *H. physodes* bidro i samme størrelsesorden til absorbansen i UV-B området (<u>Figur 19</u>). Et summespekter for alle 7 bånd funnet i ekstrakter fra *H. physodes* thalli sammenfalt godt med gjennomsnittsspekteret for de 5 habitatene langs lys-skyggegradienten (<u>Figur 20</u>). Dette tyder på et samspill mellom alle de impliserte lavsyrer i *H. physodes*, og at dette samspillet er viktig for en eventuell fysiologisk og økologisk funksjon.

4.7 Klorofyllinnhold langs lys-skyggegradienten

Klorofyllinnhold er en karakteristikk som responderer på solstråling. Det ble vist at gjennomsnittlig klorofyllinnhold i *H. physodes* thalli fra strandberg lå betydelig lavere enn for de 4 andre habitat (Figur 22 og Tabell 3). Gauslaa & Ustvedt, (2003) viste det motsatte av dette for *Xanthoria parietina*, med det høyeste klorofyllinnholdet i de mest lyseksponerte thalli. Det er mulig at klorofyllet i *H. physodes* thalli har blitt degradert. Det ser likevel ikke ut til at det lave innholdet av klorofyll har påvirket thalli fra strandberg hva gjelder vekst og vitalitet i nevneverdig grad. Disse thalli er de kraftigste og har et lavsyreinnhold som er blant de høyeste målt langs lys-skyggegradienten. Thalli fra alle andre habitat hadde et mye høyere innhold av klorofyll, uavhengig av lysforholdene. Dette indikerer at det må være flere faktorer enn lysforhold som bestemmer innholdet av klorofyll i lav.

Det er blitt vist at mange lav er følsomme for økte SO₂ konsentrasjoner, da høye nivåer forårsaker klorofyll degradering (Pearson & Skye 1965; Rao & LeBlanc 1966; LeBlanc & Rao, 1973), som resulterer i en nedbrytning av symbiosen mellom mykobionten og fotobionten. SO₂ er giftigere for laven når pH er lav (Hill 1971; Puckett *et al.* 1973; Manrique *et al.* 1989), men lav pH i fravær av SO2 ser også ut til å påvirke noen lav (Gauslaa *et al.* 1996). Gauslaa *et al.*, (1996) viste at F_v/F_m forholdet hos *Lobaria pulmonaria* sank med synkende pH i prøver fra boreale skoger som var påvirket av sur nedbør i SØ Norge, noe som tydet på at lav pH hadde en effekt på det optimale kvanteutbyttet i PSII. Da det ikke er gjort noen undersøkelser med hensyn på SO₂ nivåene og pH nivået for de ulike habitat, er det ingen holdepunkter for å si noe om en sammenheng mellom SO₂ konsentrasjoner på funnstedene og klorofyllinnhold i *H. physodes*. Man kan kun konstatere at innholdet av klorofyll er mye lavere i thalli fra strandberg og anta at dette skyldes en form for degradering.

4.8 UV-B toleranse i PSII for *Hypogymnia physodes* thalli fra granskog og strandberg (5 døgn)

En UV-B beskyttende funksjon for de sekundære forbindelsene hos fotobionten ble studert ved å eksponere thalli med eller uten innhold av lavsyrer, for kunstig UV-B stråling. Thalli fra de to habitatene med antatt høyest (strandberg) og lavest (granskog) stedsfaktor ble valgt ut for å undersøke hvorvidt ulike nivå av UV-B stråling ville gi varig skade i PSII. F_v/F_m verdier som ble målt i UV-B eksponerte thalli fra granskog og strandberg etter 48 timer ved svakt lys, viste en signifikant nedgang i PSII effektivitet med økende UV-B stråling (<u>Figur 24, 26</u>) (<u>Tabell 5</u>). Det var også en signifikant nedgang i F_v/F_m når thalli var acetonekstraherte (<u>Figur 23, 26 og Tabell 5</u>). For koplete parametere var det en sammenheng mellom HABITAT og økende UV-B eksponering. Det vil si at for thalli som ikke ble eksponert for UV-B, hadde thalli fra strandberg lavere F_v/F_m verdier, sammenliknet med thalli fra granskog

(<u>Figur 25</u>). Ved økende nivåer av UV-B eksponering lå F_v/F_m verdiene for thalli fra strandberg på samme nivå eller litt over thalli fra granskog (<u>Figur 25</u>).

Selv med UV-B stråledoser som var opptil tre ganger maksimale verdier som normalt måles gjennom klare sommerdager (Gauslaa & Ustvedt, 2003) var det relativt lite fotoinhibering i laven. Den totale dose UV-B og PAR (150µmol fotoner m⁻² s⁻¹) *H. physodes* mottok i løpet av 120 timer kontinuerlig eksponering i fuktede thalli er sammenlignbart med det som mottas i eksponerte naturlige habitat gjennom en stor del av vekstsesongen på flere måneder. Solhaug *et al.*(2003), viste at eksponering i laboratorieforsøk med mer realistiske doser (0.75 Wm⁻²) i 3 uker ikke viste noen skader på PSII relatert til UV-B stråling selv i parietinfrie *Xanthoria parietina* thalli.

H. physodes thalli som ble eksponert for UV-B stråling ble i tillegg eksponert for PAR (150µmol fotoner m⁻² s⁻¹) kontinuerlig i perioden. Det er mulig at en slik kontinuerlig PAR eksponering kombinert med UV-B eksponering og fukting kan ha gitt stresseffekter som vises som nedsatt effekt av PSII. F_v/F_m verdier målt her viser at økt UV-B stråling kan øke fotoinhiberingen både i lys-sensitive og lys-tolerante thalli. Det er derfor mye som tyder på at andre faktorer slik som temperatur, PAR og fukting kan være like viktige for stressinduserte reaksjoner i lav som økt UV-B stråling.

4.9 UV-B toleranse i PSII for *Hypogymnia physodes* thalli fra granskog og strandberg (10 døgn)

Det var usikkert om stråledosene og tidsintervallet var tilstrekkelig for å gi skade i PSII. Thalli ble UV-B eksponert i 10 døgn ved strålenivåer mellom 3.3-3.8 Wm⁻². Klorofyll-fluorescensmålingene for viste at det er flere faktorer som samvirker for de effekter man ser i F_v/F_m verdier for thalli fra granskog og strandberg (Figur 24-27)(Tabell 6). Det er signifikante effekter av UV-B eksponering, fukting og habitat når man ser på disse faktorer separat (Tabell 6). Men man ser at nedgangen i F_v/F_m verdi for UV-B eksponerte thalli først opptrer når laven blir fuktet. I tørr tilstand får man ingen effekt av UV-B eksponering (Figur 27 og Tabell 6). Tørkede thalli har en reduksjon i mengde lys som slipper gjennom overbarken (Büdel *et al.*, 1996) og en sterkere lysrefleksjon (Gauslaa, 1984). Fukting av thalli vil gi et mer transparent thalli som slipper mer lys gjennom thallus. Med økt lys gjennomtrengning vil faren for skade av PSII øke. Gjennom stabile tørre perioder vil absorpsjon gjennom øvre del av cortex være redusert mye av strukturelle endringer slik at beskyttelse med sekundære UV-B absorberende fenoler antakelig vil være mindre påkrevd, enn i perioder med høy fuktighet og strålingsfluktuasjoner.

Videre ser man et samspill mellom UV-B eksponering, fukting og habitat. Når thalli fra strandberg var tørre hadde UV-B eksponerte thalli litt høyere F_v/F_m verdier sammenliknet med de som ikke ble eksponert for UV-B (<u>Figur 28</u>). Det er vist at effekten av UV-B eksponeringen generelt er avhengig fukting (<u>Figur 27</u>), men det er kun thalli fra strandberg som får en nedgang i Fv/Fm verdier når de blir fuktet og eksponert for UV-B (<u>Figur 28</u>) (<u>Tabell 4</u>). Thalli fra granskog hadde generelt lavere F_v/F_m verdier sammenliknet med strandberg og for disse har thalli som var eksponert for UV-B, lavere F_v/F_m verdier sammenliknet med thalli som ikke ble eksponert (<u>Figur 28</u>). Ved fukting av thalli fra granskog får man ingen signifikant effekt verken for UV-B eksponerte eller for thalli som ikke er UV-B

eksponerte, kun en generell nedgang i F_v/F_m verdier (<u>Figur 28</u>). Dette betyr at thalli fra granskog får en nedgang i F_v/F_m verdier kun som følge av fukting, og ikke som følge av UV-B stråling. Det er derfor mulig at det er den kontinuerlige eksponeringen med PAR som gir slike effekter. For thalli fra strandberg er det sannsynlig at nedgangen i F_v/F_m verdier er en følge av UV-B stråling. Selv om disse eksponeres for både PAR og UV-B, så er det ingen effekt med PAR alene.

Det er et signifikant samspill mellom UV-B eksponering, fukting og acetonekstrahering. Tørre thalli som ikke var acetonekstraherte hadde høyere F_v/F_m verdier når de ble eksponert for UV-B, enn når de ikke ble eksponert for UV-B (Figur 29). Når thalli som ikke var acetonekstraherte ble fuktet, fikk man en effekt av UV-B i form av lavere F_v/F_m verdier (Figur 29). Tørre thalli som var acetonekstraherte hadde lavere F_v/F_m verdier når de ble eksponert for UV-B enn når de ikke ble eksponert, men her fikk man ingen signifikant effekt av UV-B når laven ble fuktet, selv om man fikk en generell nedgang i F_v/F_m verdier (Figur 29).

Alle thalli hadde F_v/F_m verdier rundt 0.6 eller lavere. Dette betyr at uansett hvilke kombinasjoner av behandling de ulike thalli hadde gjennomgått, så kan de sies å ha vært fotoinhibert i større eller mindre grad. Thalli fra granskog var generelt mer fotoinhibert sammenliknet med thalli fra strandberg, og thalli som var fuktet var mer fotoinhibert sammenliknet med thalli som var tørre. Det er derfor ingen ting som tyder på en klar UV-B skjermende funksjon for lavsyrene i *H. physodes*.

Klorofyll-fluorescens målinger har klare begrensinger for hva de kan vise av skadelige effekter i en organisme. UV-B stråling gir DNA skade men kan også skade PSII. En DNA skade vil ikke kunne måles direkte ved F_v/F_m målinger. Da F_v/F_m måles etter to døgn i fuktig tilstand er det sannsynlig at en DNA skade vil kunne gi en sekundær skade i form av reduserte F_v/F_m verdier.

4.10 Induksjon av lavsyresyntese i *Hypogymnia physodes* thalli fra granskog og strandberg

Kunstig eksponering med UV-B stråling skulle vise om den spesifikke strålingen kunne indusere syntese av lavsyrer. En slik UV-B indusert syntese bør i følge Cockell og Knowland (1999) oppfylles for å vite om de aktuelle forbindelsene har en UV-skjermende effekt. Fuktede thalli fra granskog som var eksponert for PAR + UV-B stråling gjennom 10 døgn, resyntetiserte 4.4 % av sitt opprinnelige lavsyreinnhold. Thalli fra strandberg som hadde fått tilsvarende behandling resyntetiserte 3.7 %. Fuktede thalli fra granskog som kun var eksponert for PAR, resyntetiserte 5.8 % av sitt opprinnelige lavsyreinnhold, mens thalli fra strandberg som kun var eksponert for PAR, resyntetiserte 3.1 %. ANOVA test viste at det ikke var signifikante forskjeller i resyntesen mellom de ulike behandlingene (P = 0.916). Man kan derfor ikke avgjøre om det var PAR alene eller en kombinasjon av PAR+UV-B, eventuelt UV-B alene som induserte syntesen av lavsyrer.

Xanthoria parietina thalli uten parietin, resyntetiserte 15 - 25% av det opprinnelige parietin innholdet i løpet av 3 uker i naturlig sollys i felten. Resyntesen var høyest i thalli fra strandberg, sammenliknet med thalli på trestammer. Skjerming av UV-stråling under 360 nm

ga en resyntese av parietin på under 5% for fuktede thalli (Solhaug *et al.*, 2003). *X. parietina* thalli fra strandberg resyntetiserte 14% av det opprinnelige innholdet av parietin når de ble eksponert for UV-B i vekstkammer. Ekskludering av UV-B, reduserte mengden til 5.5% og eksklusjon av både UV-B og UV-A resulterte i kun 3.5% av det opprinnelige innholdet (Solhaug *et al.*, 2003). Solhaug *et al.*, (2003) viste at resyntese av parietin i parietinfrie *X. parietina* thalli var klart avhengig av UV-B stråling. PAR induserte ikke parietinsyntese, og UV-A induserte kun en veldig liten syntese. Forskjellen i farge hos *X. parietina* fra trestammer i skygge til åpent strandberg (Gauslaa & Ustvedt, 2003), er antakelig forårsaket av naturlig sollys. Men studier på sammenhengen mellom stråling og konsentrasjon av ulike forbindelser i andre lav er tvetydige; Rundel (1969); Legaz *et al.*, (1986); Buffoni Hall *et al.*, (2002); Bjerke *et al.*, (2002) fant en positiv korrelasjon, mens Stephenson & Rundel (1979); Golojuch & Lawrey (1988); Swanson *et al.*, (1996) ikke gjorde det. I *Ophioparma ventosa* økte ikke resyntesen av usninsyre med sterk PAR, når man i tillegg gav UV (Bjerke *et al.*, 2002).

Swanson & Fahselt (1997) fant ut at UV-A økte og UV-B minsket innholdet av sekundære forbindelser i *Umbilicaria americana*. Denne art har gyrophoric syre som hovedforbindelse og lecanoric syre som en biforbindelse. Noen sekundære forbindelser er fotolabile. Usninsyre ser ut til å bli degradert av UV-B eksponering (BeGora & Fahselt, 2001a). Derfor er det endelige innholdet av sekundære forbindelser etter UV eksponering avhengig av balansen mellom en UV indusert syntese og UV indusert degradering. Innholdet av usninsyre i *Cladonia unicialis* som er eksponert for PAR og UV-A, var høyere enn enn i thalli som kun var eksponert for PAR, eller for PAR + UV-B (BeGora & Fahselt, 2001b). En liknende UV-A stimulerende effekt ble funnet for atranorin i *Cladina rangiferina* (BeGora & Fahselt, 2001b).

For *H. physodes* var det ingen signifikant forskjell på behandlingene, og det er derfor ikke mulig å avgjøre hvilken/hvilke faktorer som induserte resyntesen av lavsyrer. Uansett var det en beskjeden resyntese av lavsyrer på omtrent 3 – 6% av det opprinnelige innholdet, uavhengig av behandling. Resyntesen var høyest i thalli fra granskog, sammenliknet med de fra strandberg. Nivået for resyntesen av lavsyrer i H. physodes thalli var omtrent som for de X. parietina thalli som kun var eksponert for PAR i feltforsøket, eller som i vekstkammerforsøket med eksponering til UV-A+PAR eller PAR alene. At det ikke var en liknende effekt for UV-B på H. physodes som det ble vist for X. parietina, kan kanskje forklares i sterk degradering når *H. physodes* thalli eksponeres for UV-B stråling kombinert med PAR. H. physodes thalli ble eksponert for 3.3-3.8 Wm⁻² kontinuerlig i 10 døgn, mens X. parietina thalli ble eksponert for naturlig sollys i feltforsøket i 3 uker og 0.5 W m⁻² i 6 timer per døgn i 20 døgn i vekstkammer forsøket. For *H. physodes* thalli kan et så høyt nivå av UV-B stråling ha bidratt til en kontinuerlig degradering av lavsyrer etter hvert som de ble syntetisert. Et liknende forsøk med moderate doser UV-B kan muligens gi et svar på dette. Ut fra resultatene her å dømme kan kriteriet om induksjon av lavsyresyntese ved hjelp av UV-B ikke sees å ha blitt oppfylt.

5 KONKLUSJON

Fra tidligere forsøk med *Xanthoria parietina* var det vist at det var en klar sammenheng mellom innholdet av sekundære forbindelser og lysforholdene langs en naturlig lysskyggegradient. Det var derfor interessant å undersøke andre arter lav for å se om man kunne gjøre liknende funn for disse. Det var to hovedpunkter som skulle besvares i forsøket utført med *Hypogymnia physodes*.

1. Blir produksjon av lavsyrene i *H. physodes* indusert av UV-B stråling?

Da det ikke var signifikant forskjell i behandlingene i induksjonsforsøket var det ikke mulig å avgjøre hvilken behandling som ga den beskjedne syntesen av lavsyrer. Det er derfor ingen ting som tyder på at produksjon av lavsyrer i *H. physodes* thalli blir indusert av UV-B stråling. Langvarig og sterk UV-B eksponering kan ha bidratt til degradering av lavsyrer etter hvert som disse ble syntetisert. Det er derfor viktig å teste ut teorien om degradering av lavsyrer ved å eksponere *H. physodes* thalli for mer realistiske nivåer med UV-B stråling for å se om dette gir et høyere innhold etter resyntesen.

2. Gir lavsyrene i *H. physodes* beskyttelse mot UV-B stråling?

Det var ikke mulig å finne en bestemt årsak til den generelle nedgangen i effektivitet ved PSII i *H. physodes* thalli. Man kan derfor ikke konkludere med en beskyttelse mot UV-B skade for de involverte lavsyrer. Da dette åpner for andre mulige funksjoner for lavsyrene i *H. physodes* vil det være viktig å utføre forsøk med tanke på en antibeitefunksjon.

6 REFERANSER

Anderson MC (1964) Studies of woodland light climate. I. The photographic computation of light conditions, *J. Ecol.* **52**: 27-41.

Bachereau F, Asta J (1997) Effects of ultraviolet radiation at high altitude on the physiology and the biochemistry of a terricolous lichen (*Cetraria islandica* (L) Ach.) *Symbiosis* **23**: 197-217.

Ballarè CL, Rousseaux MC, Searles PS, Zaller JG, Giordano CV, Robson TM, Caldwell MM, Sala OE & Scopel AL (2001) Impacts of solar ultraviolet-B radiation on terresterial ecosystems of Tierra del Fuego (southern Argentina) – an overview of recent progress, *J. Photochem. Photobiol.*, B. **62**: 67-77.

Beggs CJ, Wellmann E (1994) Photocontrol of flavenoid biosynthesis, in: R.E. Kendrick, G.H.M Kronenberg (Eds.), Photomorphogenesis in Plants, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp 733-751.

BeGora MD, Fahselt D (2001a) Photolability of secondary compounds in some lichen species. *Symbiosis* **31**: 3-22.

BeGora MD, Fahselt D (2001b) Usnic acid and atranorin consentrations in lichens in relation to bands of UV irridiance. – Bryologist **104**: 134-140.

Bjerke JW, Lerfall K, Elvebakk A (2002) Effects of ultraviolet radiation and PAR on the content of usnic and divarcatic acids in two arctic-alpine lichens. *photochemical & Photobiological Sciences* 1: 678-685.

Bjerke JW (2003) Arctic-alpine lichens and global change: how do ultraviolet-B radiation and warming affects secondary metabolism, morphological characters and physiological prosesses. Doctoral Dissertation in Plant Physiology. University of Tromsø, Norway

Björn LO (1999) Ultraviolet-B radiation, the ozone layer and ozone depletion. *In*: Rozema J (ed): *Stratospheric ozone depletion*. *The effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems*. 21-37. Backhuys Publishers, Leiden, The Nederlands.

Björn LO, Callaghan TV, Gehrke C, Gwynn-Jones D, Lee JA, Johanson U, Sonesson M & Buck ND (1999) Effects of ozone depletion and increased ultraviolet-B radiation on nothern vegetation, *Polar res.* **18**: 331-337.

Britt AB (1996) DNA damage and repair in plants. *Annu. Rev.* Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. **47**: 75-100.

Büdel A, Lange OL. (1996) The role of cortical and epineeral layers in the lichen genus *Peltula*. Cryptogamic Bot. **4**: 262-269.

Buffoni Hall RS (2002) Efects of increased UV-B radiation on the lichen *Cladonia arbuscula* ssp. *mitis*. UV-absorbing pigments and DNA damage. Doctoral Dissertation in Plant Physiology. Lund University

Buffoni Hall RS, Paulsson M, Duncan K, Tobin AK, Widell S, Bornman JF (2001) Water and temperature-dependence of DNA damage and repair in the fruticose lichen *Cladonia arbuscula* ssp. *Mitis* exposed to UV-B radiation.

Caldwell MM (1979) Plant life and ultraviolet radiation: some pespective in the history of earth's UV climate. BioScience, **29**: 520-525

Caldwell MM, Robberecht R & Billings WD (1980) A steep latitudinal gradient of solar ultraviolet-B radiation in the arctic-alpine life zone. *Ecology* **61**: 600-611

Caldwell MM, Termura AH, Tevini M, Bornman JF, Björn LO, Kulandaivelu G (1995) Effects of increased solar radiation on terrestrial plants. Ambio **24**: 166-173.

Canuto VM. *et al.* (1982) UV radiation from the young sun and oxygen and ozone level in the prebiological paleoatmosphere, Nature **296**: 816-820

Cockell CS, Knowland J (1999) Ultraviolet radiation screening compounds. Biol. Rev. Cam. Phil. Soc. **74**: 311-345.

Demmig-Adams A, Maguas C, Adams WW III, Meyer A, Kilian E, Lange OL (1990) Effects of high light on the effiency of photochemical energy conversion in a variety of lichen species with green and blue-green phycobionts. Planta **180**: 400-409.

Dring MJ, Wagner A, Luning K (2001) Contribution of the UV component of natural sunlight to photoinhibition of photosynthesis in six species of subtidal brown and red seaweeds, *Plant Cell Environ.*, **24**: 1153-1164.

Eker APM, Yajima H, Yasui A (1994) DNA photolyase from the fungus *Neurospora crassa*. Purification charaterisation and compairison with other photolyases. Photochem. Photobiol. **60**: 125-133.

Elix JA (1996) Biochemistry and secondary metabolites. *Lichen Biology*. Cambridge University Press. 154-180

El-Jaoual T &. Cox DA (1998) Manganese toxicity in plants. J. Plant Nutr. 21: 353-386.

Fahselt D (1994) Secondary biochemistry of lichens. Symbiosis 16: 117-165.

Fahselt D, Alstrup V (1997) Visulalisation of extracellular deposits in recent and subfossil *Umbbilicaria hyperborea*. *Lichenologist* **29**: 547-557.

Farrar JF (1976) Ecological physiology of the lichen hypogymnia physodes. II. Effects of wetting and drying cycles and the concept of 'physiological buffering'. - New Phytol. 77: 105-113. [RLL# 96]HYPOGYMNIA/ WATER RELATIONS/ PHYSIOLOGY/ ECOLOGY/ PHYSIOLOGICAL BUFFERING

Farrar JF (1976a) The lichen as an ecosystem: observation and experiment. In *Lichenolgy: Progress and Problems*, ed. D. H. Brown, D. L. Hawksworth & R. H. Baily, pp. 385-406. London: Academic Press.

Feige GB & Jensen M (1987) Photosynthetic properties of lichens stored at -25 °C for several years, *Bibl. Lichenol.*, **25**: 319-323.

Fernàndez E, Quilhot W, Gonzàlez I, Hidalgo ME, Molina X, Meneses I (1996) Lichen metabolites as UVB filters, *Cosmet. Toiletries*, **111**: 69-74.

Garcia-Pichel F (1998) Solar ultraviolet and the evolutionary history of cyanobacteria, Orig. Life Evol. Biosph. **28**: 321-347.

Gauslaa Y, (1984) Heat resistance and energy budget in different Scandinavian plants. Holarct. Ecol. 7; 1-78.

Gauslaa Y, Kopperud C, Solhaug KA (1996) Optimal quantum yield of photosystem II and chlorophyll degradation of *Lobaria pulmonaria* in relation to pH. *The Lichenologist*, **28**: 267-278.

Gauslaa Y & Solhaug KA (1996) Differences in the susceptibility to light stress between epifytic lichens of ancient and young boreal forest, *Funct. Ecol.*, **10**: 344-354.

Gauslaa Y & Solhaug KA (1999) High-light damage in air-gry thalli of the old forest lichen *Lobaria pulmonaria* – interactions of irridiance, exposure duration and high temperature, *J. Exp. Bot.*, **50**: 697-705.

Gauslaa Y & Solhaug KA (2001) Fungal melanins as a sun screen for symbiotic green algae in the lichen *Lobaria pulmonaria*, *Oecologica*, **126**: 462-471.

Gauslaa Y & Ustvedt EM (2003) Is parietin a UV-B or blue-light screening pigment in the lichen *Xanthoria parietina? Photochemical and Photobiological Sciences* **2**: 424-432.

Gauslaa Y, Ohlson M, Solhaug KA, Bilger W, Nybakken L (2001) Aspect-dependent highirradiance damage in two transplanted foliose forest lichens *Lobaria pulmoneria* and *Parmelia sulcata, Can. J. Forest Res.*, **31**: 1639-1649.

Golojuch ST, Lawrey JD (1988) Quantitative variation in vulpinic and pinastric acids produced by *Tuckermannopsis pinastri* (lichen-forming Ascomycotina, Parmeliaceae). *American Journal of Botany* **75**: 1871-1875.

Gorbach NV, Kobzar NN (1981) Determination of the age of epiphyte lichen hypogymnia physodes (L.) Nyl. - Doklady Akademii Nauk BSSR [Minsk] **25**: 848-851. [RLL# 123-39] HYPOGYMNIA/ AGE/ GROWTH/ OWN/ USSR

Hanelt D, Wiencke C & Nultsch W (1997) Influence of UV radiation on the photosynthesis of Arctic macro-algae in the field. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. **38**: 40-47.

Hauck M, Paula A, Grossa S & Raubuch M (2003) Manganese toxicity in epiphytic lichens: chlorophyll degradation and interaction with iron and phosphorus. *Environmental and Experimental Botany*, **49**: 181-191.

Hawksworth DL (1994) The recent evolution of lichenology: a science for our times. Cryp. Bot., **4**: 117-129

Hill DJ (1971) Experimental study on the effect of sulphite on lichens with reference to atmospheric pollution. *New Phytologist*, **70**: 831–836.

Hill DJ, Woolhouse H. W (1966) Aspects of the autecology of *Xanthoria parietina* agg. *Lichenologist* **3**: 207-214.

Horst WJ (1988) The physiology of manganese toxicity. In: R.D. Graham, R.J. Hannam and N.C. Uren, Editors, Manganese in Soils and Plants, Kluwer, Dordrecht, pp. 175–188.

Huneck S (1999) The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften* **86**: 559-570.

Huneck S, Yoshimura I (1996) *Identification of lichen substances*. Berlin, Germany: Springer Verlag.

Huner NAP, Øquist G, Hurry VM, Krol M, Falk S, Griffith M (1993) Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation in cold temperant plants. Photosythesis Research **37**: 19-39.

Huskies A, Lud D, Moerdijk-Poortvliet T & Rozema J (1999) Impact of UV-B radiation on antarctic terrestial vegetation, in *Stratospheric ozone depletion; the effects of enhanced UV-B radiation on terrestial ecosysytems*, ed. J. Rozema, Backhuys Publishers, Leiden, pp. 313-337.

Hyvärinen M, Koopmann R, Hormi O, Tuomi J (2000) Phenols in reproductive and somatic structures of lichens: a case of optimal defence? - Oikos **91**: 371-375.

Jansen MAK, Gaba V, Greenberg BM (1998) Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. Trends Plants Sci. **3**: 131-135.

Jokela K, Leszcynski K, Visuri R, Ylianttila L (1995) Increased UV exposure in Finland in 1993. *Photochemistry and Photobiology* **62**: 101-107.

Jordan BR (1996) The effects of ultraviolet-B radiation on plants: A molecular perspective. In: Advaces in Botanical research, Vol **22**: 22nd edn., pp. 97-162 callow, J. A., ed. Academic Press Ltd, London.

Kerr JB, McElroy CT (1993) Evidence for large upwards trends of ultraviolet-B radiation linked to ozone depletion. *Science* **262**: 1032-1034.

Klisch M, Sinha RP, Richter PR, Häder DP (2002) Mycosporine-like amino acids (MMAs) protect against UV-B induced damage in *Gyrodinium dorsum* KOFOID, *J. Plant Physiol.*

Krog H, Østhagen H og Tønsberg T (1994) Lavflora; Norske busk og bladlav. Universitetsforlaget Oslo.

Lange OL (1953) Hitze- und Trockenresistez der Flechten in Beziehung zu ihrer Verbreitung. Flora **140**: 39-97.

Lange OL, Bilger W, Rinmke S, Schreiber U (1989) Chlorophyll fluorescence of lichens containing green and blue-green algae during hydration by water vapour uptake and by addition of liquid water. Bot. Acta **102**: 306-313.

Lange OL, Green TGA, Reichenberger H, Hesbacher S, Proksch P (1997) Do secondary substances in the thallus of a lichen promote CO_2 diffusjon and prevent depression of net photosyntesis at high water content? *Oecologia* **112**: 1-3

LeBlanc F & Rao DN (1973) Effects of sulphur dioxide on lichen and moss transplants. *Ecology* **54:** 612–617

Legaz ME, Vicente C, Ascaso C, Pereira EC, Filho LX (1986) Pigment analysis of sun and shade poulations of *Cladonia verticillaris*. – Biochem. Syst. Ecol. **14**: 575-582.

Lowry B, Lee D, Hebaut C (1980) The origin of land plants: a new look at an old problem. Taxon, **29**: 183-197

MacFarlane JD, Kershaw KA (1980) Physiological environmental interactions in lichens. IX. Thermal stress and lichen ecology. New Phytol. **84**; 669-685.

Madronich S, McKenzie RL, Caldwell MM, Bjørn LO (1995) Changes in ultraviolet radiation reaching the earth's surface. *Ambio* **24**: 143-152.

Madronich S, RL McKenzie, Bjørn LO, Caldwell MM (1998) Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *J. Photochem. Photobiol.*, B, **46**: 5-19.

Manrique E, Redondo FL, Serin[~] a E & Izco J (1989) Estimation of chlorophyll degradation into phaeophytin in *Anaptychia ciliaris* as a method to detect air pollution. *Lazaroa* **11**: 141–148.

Markham R, Franke A, Given DR, & Brownsey P (1990) Antarctic ozone level trends from herbarium specimens flavenoids. Bull. Liason Gr. Polyphenols **15**: 230-235.

Molina M, Rowland F (1974) Stratospheric sink for chloro-fluoromethanes: chlorine atom catalysed destruction of ozone. Nature **249**: 810-812

Nybakken L (2003) UV-screening in Arctic and alpine vascular plants and lichens. Doctoral Dissertation in Plant Physiology. Agricultural University of Norway. Department of Biology and Nature Conservation.

Nybakken L, Gauslaa Y, Solhaug KA (2000) Light intensity and heat susceptibility of melanic and pale populations of the foliose lichen *lobaria pulmonaria*, (in Norwegian), *Blyttia*, **58**: 185-191.

Pearson L & Skye E (1965) Air pollution affects pattern of photosynthesis in *Parmelia* sulcata, a corticolous lichen. Science 148: 1600–1602

Petersen JL, Lang DW, Small GD (1999) Cloning and characterisation of class II DNA photolyases from *Chalmydomonas*. Plant. Mol. Biol. **40**: 1063-1071. Rao DN & LeBlanc F (1966) Influence of an iron-sintering plant on corticolous epiphytes in Wawa, Ontario. *Bryologist* **70**: 141–157

Phoenix GK, Gwynn-Jones D, Lee JA, Callaghan TV (2002) Ecological importance of ambient solar ultraviolet radiation to sub-arctic heath community. *Plant Ecology* **165**: 263-273.

Porra RJ, Thompson WA., Kriedmann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorbtion pectroscopy. *Biochemica et Biophysica Acta*. **975**: 384-394. Elsevier.

Puckett KJ, Nieboer E, Flora W & Richardson DHS (1973) Sulphur dioxide: Its effect on photosynthetic 14 C fixation in lichens and suggested mechanisms of phytotoxicity. *New Phytologist* 72: 141–154.

Rancan F, Rosan S, Boehm K, Fernàdez E, Hildago ME, Quilhot W, Rubico C, Boehm F, Piazena H, Oltmanns U (2002) Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **68**: 133-139.

Rao DN & LeBlanc F (1966) Influence of an iron-sintering plant on corticolous epiphytes in Wawa, Ontario. *Bryologist* **70:** 141–157.

Rex M, Harris NRP, der Gathen P, Lehmann R, Braaten GO, Reimer E, Beck A, Chippenfield MP, Alfier R, Allaart M, O'Connor F, Dier H, Dorokhov V, Fast H, Gil M, Kyro E, Litynska Z, Mikkelsen IS, Molyneux MG, Nakane H, Nothollt J, Rummukainen M, Viatte P, Wenger J (1997) Prolonged stratospheric ozone loss in the 1995-96 Artic winter. *Nature* **389**: 835-838.

Rikkinen J (1995) What's behind the pretty colours? A study on the photobiology of lichens, *Bryobrothera*, **4**: 1-239.

Rozema J, Van de Staaij JWM, Bjørn LO & Caldwell MM (1997a) UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. Trends Ecol. Evol. **12**: 22-28.

Rozema J *et al.* (2001) The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems-an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **1** 000-000

Roxburgh JR & Kelly D (1995) Uses and limitations of hemispherical photography for estimating forest light environments, *New Zeal. J. Ecol.*, **19**: 213-217.

Rundel PW (1969) Clinal variation in the production of usnic acid in *Cladonia subtenuis* along light gradients. – Bryologist **72**: 40-44.

Sancar A (1994) Structure and function of DNA photolyase. Biochemistry 33: 2-9.

Sancar GB, Smith FW, Lorence MC, Rupert CS, Sancar A (1984) Sequence of the *Escherichia coli* photolyase gene and protein. J. Biol. Chem. **259**: 6033-6038.

Smith DC & Douglas A (1987) The Biology of Symbiosis. London: Edward Arnold

Solhaug KA & Gauslaa Y (1996) Parietin, a photoprotective secondary product of the lichen *Xanthoria parietina. Oecologia* **108**: 412-418

Solhaug KA & Gauslaa Y (2001) Acetone rincing-A mehtode for testing ecological and physiological roles of secondary compounds in living lichens, *Symbiosis*, **30**: 301-315.

Solhaug KA, Gauslaa Y, Nybakken L, Bilger W (2003) UV-induction of sun-screening pigments in lichens. *New Phytologist* **158**: 91-100.

Stephenson NL, Rundel PW (1979) Quantitative variation and the ecological role of vulpinic acid and atranorin in the thallus of *Letharia vulpina*. – Biochem. Syst. Ecol. **7**: 263-287.

Swanson A, Fahselt D, Smith D (1996) Phenolic levels in *Umbilicaria americaria* in relation to enzyme polymorphism, altitude and sampling date. *Lichenologist* **28**: 331-339.S.

Swanson A, Fahselt D (1997) Effects of ultraviolet radiation on polyphenolics of *Umbilicaria Americana*. Can. J. Bot. **75**: 284-289.

Tobler F (1925) Zur Physiologie der Farbunterschiede bei *Xanthoria, Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **43**: 301-305.

White FJ & James PW (1985) A new guide to microchemical techniques for the identification of lichens substances. British Lichen Society Bulletin 57: 1-41 + 6 Tabs.

Wright VP (1990) Terrestrialization. Soils. IN: Briggs DEG, Crowther PR (eds.), Paleobiology, a synthesis. Blackwell Scientific Publications, Oxford pp. 57-59

Zahner H, Anke H, Anke T (1983) Evolution and secondary pathways. IN: Bennet JW, Ciegler A (eds.) Secondary metabolism and differention in fungi. Marcel Deccer, Inc. New York pp. 153-171

Ögren E (1994) The significance of photoinhibation for photosynthetic productivity, in *Photoinhibation of photosynthesis from molecular mechanisms to the field*, ed. N. R. Baker, Bios Scientific Publishers, Oxfrod, pp. 433-447.
7 APPENDIKS

1. ANOVA resultater for UV-B toleranse forsøk, 5 døgn.

Forklaring til koder: Habitat 3 = granskog Habitat 5 = strandberg + Acetonekstrahering = 1 -Acetonekstrahering = 0 -UV (PAR) = 0 +UV (1.4 Wm²) = 1 +UV (2.3 Wm⁻²) = 2 +UV (3.3 Wm⁻²) = 3

SYSTAT Rectangular file H:\dokument\Marius.SYD, created Thu Jun 26, 2003 at 11:23:48, contains variables:

HABITAT	ACETON	UV	FVFM
Effects coding used	l for categori	Ical varia	oles in model.
Categorical values HABITAT (2 levels)	encountered o	during prod	cessing are:
3,	5		
ACETON (2 levels)			
Ο,	1		
UV (4 levels)			
Ο,	1.2,	2,	3

Dep Var: FVFM N: 160 Multiple R: 0.630 Squared multiple R: 0.397

Analysis of Variance

Source	Sum-of- Squares	df	Mean-Square	F-ratio	Р
HABITAT	0.000	1	0.000	0.053	0.818
ACETON	0.064	1	0.064	16.818	0.000
UV	0.242	3	0.081	21.195	0.000
HABITAT*ACETON	0.000	1	0.000	0.071	0.790
HABITAT*UV	0.034	3	0.011	2.995	0.033
ACETON*UV	0.011	3	0.004	0.938	0.424
HABITAT ACETON A	0.009	3	0.003	0.771	0.512
Error	0.549	144	0.004		

Least Squares Means



Habitat* Aceton



Least Squares Means



Least Squares Means



Least Squares Means

Habitat*UV



Aceton*UV





Habitat*Aceton*UV



*** WARNING ***									
Case	44	is	an	outlier	(Stud	dentized	Residual	= -	-
4.428)									
Case	89	is	an	outlier	(Stud	dentized	Residual		-
7.577)									
Durbin-Watson D S	Stat	ist	ic	2.08	36				
First Order Autoc	corr	ela	tio	n -0.04	13				

Effects coding used for categorical variables in model. Categorical values encountered during processing are: HABITAT (2 levels) 3, 5 ACETON (2 levels) 0, 1 UV (4 levels) 0, 1.2, 2, 3

Dep Var: FVFM N: 160 Multiple R: 0.581 Squared multiple R: 0.337 Analysis of Variance

Source	Sum-of- Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
HABITAT	0.000	1	0.000	0.052	0.820
ACETON	0.064	1	0.064	16.374	0.000
VU	0.242	3	0.081	20.635	0.000
Error	0.603	154	0.004		





*** WARNING *** Case 44 is an outlier 4.173) Case 89 is an outlier 7.265) Durbin-Watson D Statistic 1

Durbir	n-Watso	on D	Statistic	1.	931
First	Order	Auto	ocorrelation	0.	034

(Studentized	Residual	=	-
(Studentized	Residual	=	-

2. ANOVA resultater for UV-B toleranse forsøk, 10 døgn

Forklaringer til koder: +UV = 1, -UV = 0+ACETON=1 -ACETON=0 TØRR=0 VÅT=1 HABITAT 1=STRANDBERG HABITAT 2=GRANSKOG Effects coding used for categorical variables in model. Categorical values encountered during processing are: UV (2 levels) 1 Ο, TV (2 levels) Ο, 1 HABITAT (2 levels) 2 1, ACETON (2 levels) 1 Ο, Dep Var: YIELD N: 80 Multiple R: 0.893 Squared multiple R: 0.798

Analysis of Variance

Source	Sum-of- Squares	df	Mean-Square	F-ratio	Р
UV	0.050	1	0.050	8.587	0.005
TV	0.335	1	0.335	57.088	0.000
HABITAT	0.948	1	0.948	161.371	0.000
ACETON	0.003	1	0.003	0.515	0.476
UV*TV	0.027	1	0.027	4.641	0.035
UV*HABITAT	0.002	1	0.002	0.258	0.613
UV*ACETON	0.012	1	0.012	2.048	0.157
TV*HABITAT	0.012	1	0.012	2.064	0.156
TV*ACETON	0.002	1	0.002	0.301	0.585
HABITAT*ACETON	0.004	1	0.004	0.743	0.392
UV*TV*HABITAT	0.026	1	0.026	4.424	0.039
UV*TV*ACETON	0.034	1	0.034	5.842	0.019
UV*HABITAT*ACETON	0.010	1	0.010	1.723	0.194
TV*HABITAT*ACETON	0.007	1	0.007	1.200	0.277
UV*TV*HABITAT*ACETON	0.008	1	0.008	1.335	0.252
Error	0.376	64	0.006		



4.Aceton

Least Squares Means



Least Squares Means



Least Squares Means



3.Habitat

Least Squares Means













7.UV*Aceton









0.0

1 ABITAT 2

0,2

8.TV*Habitat

Least Squares Means



9.TV*Aceton

Least Squares Means



11.UV*TV*Habitat

1 2 HABITAT

0.0

0.4

0.2

0.0

0

UV

10.Habitat*Aceton

Least Squares Means





0

UV

1,2

12.UV*TV*Aceton



Least Squares Means

14.TV*Habitat*Aceton

Least Squares Means



13.UV*Habitat*Aceton



3. REGRESJONSANALYSE FOR SITE FACTORS Friday, june 27, 2003 09:55:10 Linear Regression abs 310/areal = 3.28 + (4.12 * isf) N = 75.0 R= 0.525 Rsgr= 0.276 Adj Rsgr= 0.266 Standard Error of Estimate = 2.0224 Coefficient Std. Error t Constant 3.28 0.410 8.01 4.12 0.781 5.28 isf Ρ Constant < 0.0001 < 0.0001 isf Analysis of Variance: SS DF MS Regression 1 113.9 113.89 73 Residual 298.6 4.09 Total 74 412.5 5.57 F Ρ 27.8 < 0.0001 Regression Residual Total Normality Test: Failed (P = 0.0247) Homoscedasticity Test: Passed (P = 0.8463) Power of performed test with alpha = 0.0500: 0.9986 Friday, June 27, 2003, 10:08:33 Linear Regression abs 310/areal = 3.94 + (2.61 * dsf) N = 75.0 R= 0.421 Rsqr= 0.178 Adj Rsqr= 0.166 Standard Error of Estimate = 2.1556 Coefficient Std. Error t Constant 3.94 0.376 10.50 dsf 2.61 0.657 3.97 Ρ Constant < 0.0001 0.0002 dsf Analysis of Variance:

SS MS DF Regression 1 73.3 73.27 73 339.2 4.65 Residual 412.5 5.57 Total 74 F Р Regression 15.8 0.0002 Residual Total Normality Test: Failed (P = 0.0013) Homoscedasticity Test: Failed (P = 0.0076) Power of performed test with alpha = 0.0500: 0.9681 Friday, June 27, 2003, 10:10:08 Linear Regression abs 310/vekt = 308.5 - (7.78 * isf) N = 75.0R= 0.0167 Rsqr= 0.000278 Adj Rsqr= -0.0134 Standard Error of Estimate = 141.4464 Coefficient Std. Error t Constant 308.47 28.7 10.760 isf -7.78 54.6 -0.142 Ρ Constant <0.0001 isf 0.8872 Analysis of Variance: DF SS MS Regression 1 405.4 405.4 Residual 73 1460517.9 20007.1 Total 74 1460923.3 19742.2 F Ρ Regression 0.0203 0.8872 Residual Total Normality Test: Failed (P = <0.0001) Homoscedasticity Test: Failed (P = 0.0027) Power of performed test with alpha = 0.0500: 0.0345The power of the performed test (0.0345) is below the desired power of 0.8000. You should interpret the negative findings cautiously.

Friday, June 27, 2003, 10:10:57 Linear Regression abs 310/vekt = 323.5 - (43.0 * dsf)N = 75.0R= 0.117 Rsqr= 0.0136 Adj Rsqr= 0.000129 Standard Error of Estimate = 140.4979 Coefficient Std. Error t Constant 323.5 24.5 13.22 42.8 -1.00 dsf -43.0 Ρ Constant <0.0001 dsf 0.3183 Analysis of Variance: DF SS MS Regression119928.619928.6Residual731440994.719739.7Total741460923.319742.2 Ρ F Regression 1.01 0.3183 Residual Total Normality Test: Failed (P = <0.0001) Homoscedasticity Test: Failed (P = <0.0001) Power of performed test with alpha = 0.0500: 0.1674The power of the performed test (0.1674) is below the desired power of 0.8000. You should interpret the negative findings cautiously. Friday, June 27, 2003, 10:12:29 Linear Regression stw = 102.0 + (152.3 * isf)N = 75.0R= 0.836 Rsqr= 0.699 Adj Rsqr= 0.695 Standard Error of Estimate = 30.2699 Coefficient Std. Error t Constant 102.0 6.14 16.6 isf 152.3 11.69 13.0

Ρ Constant <0.0001 isf <0.0001 Analysis of Variance: DF SS MS Regression1155551.2155551.2Residual7366887.4916.3Total74222438.63005.9 F Ρ Regression 169.8 <0.0001 Residual Total Normality Test: Passed (P = 0.4182) Homoscedasticity Test: Failed (P = 0.0039)Power of performed test with alpha = 0.0500: 1.0000Friday, June 27, 2003, 10:12:52 Linear Regression stw = 117.3 + (117.7 * dsf)N = 75.0R= 0.819 Rsqr= 0.670 Adj Rsqr= 0.666 Standard Error of Estimate = 31.7010 Coefficient Std. Error t Constant 117.3 5.52 21.2 dsf 117.7 9.66 12.2 Ρ Constant <0.0001 dsf <0.0001 Analysis of Variance: DF SS MS Regression1149077.2149077.2Residual7373361.41005.0Total74222438.63005.9 F Ρ Regression 148.3 <0.0001 Residual Total Normality Test: Passed (P = 0.5187) Homoscedasticity Test: Failed (P = 0.0051) Power of performed test with alpha = 0.0500: 1.0000