

Phyton (Horn, Austria)	Vol. 33	Fasc. 2	305-319	16. 2. 1994
------------------------	---------	---------	---------	-------------

## Die Kultivierung des Mycobionten von *Xanthoria parietina* (L.) TH. FR. auf unterschiedlichen Kulturmedien

Von

Gundula HUBER\*), Elfie STOCKER-WÖRGÖTTER\*) und Roman TÜRK\*)

Mit 10 Abbildungen

Eingelangt am 27. April 1993

Key words: *Xanthoria parietina* – mycobiont – cultivation – growth media.

### Summary

HUBER G., STOCKER-WÖRGÖTTER E. & TÜRK R. 1994. The cultivation of the mycobiont of *Xanthoria parietina* (L.) TH. FR. on different media. – *Phyton* (Horn, Austria) 33 (2) : 305-319, 10 figures. – German with English summary.

The growth and the development of the mycobiont of *Xanthoria parietina* was investigated on different media. Solid and fluid media absent of carbon sources or sources with different levels of carbon were used. With respect to different types of carbon sources the mycobiont showed no variations. But the growth rate depended on the concentration of the respective carbohydrates: The higher the concentration of the sugars or polyols the earlier the mycobiont showed a vertical growth of the hyphae. Fluid media were best suited for long term investigations. The mycelia showed no differentiation into different thallus-like layers even after a cultivation time of 6 to 12 month. After a 6 to 12 month growing period only the central hyphae of the mycelia were characterized by a higher density.

### Zusammenfassung

HUBER G., STOCKER-WÖRGÖTTER E. & TÜRK R. 1994. Die Kultivierung des Mycobionten von *Xanthoria parietina* (L.) TH. FR. auf unterschiedlichen Kulturmedien. – *Phyton* (Horn, Austria) 33 (2): 305-319, 10 Abbildungen. – Deutsch mit englischer Zusammenfassung.

Das Wachstum des Mycobionten von *Xanthoria parietina* auf verschiedenen Nährmedien wurde untersucht. Es fanden feste und flüssige Medien – mit und ohne

---

\*) Mag. G. HUBER, Dr. E. STOCKER-WÖRGÖTTER, Univ.-Prof. Dr. R. TÜRK, Institut für Pflanzenphysiologie, Universität Salzburg, Hellbrunnerstr. 34, 5020 Salzburg, (Austria).

Kohlenstoffquelle – Verwendung. Gegenüber den verschiedenen C-Quellen verhielt sich der Pilz indifferent. Die Wachstumsrate war von der Konzentration des Kohlenhydrats abhängig: Je höher die Konzentration der Zucker oder Zuckeralkohole im Medium war, desto früher und ausgeprägter zeigte der Mycobiont ein vertikales Wachstum. Am besten geeignet für langfristige Untersuchungen erwiesen sich flüssige Medien. Auch bei 6–12 Monate alten Mycobionten trat keine Differenzierung des Mycel in flechtenlagerartige Schichten auf. Lediglich die zentralen Hyphen der Mycelien wiesen eine etwas dichtere Anordnung auf.

## 1. Einleitung

Die Flechte *Xanthoria parietina* bzw. ihre Komponenten waren bereits Gegenstand vieler Untersuchungen. Erste Versuche wurden von REESS 1873 durchgeführt: „Ich selbst habe mich 1871/72 längere Zeit und gelegentlich wieder neuerdings mit Kulturversuchen an heteromeren Flechten gleichfalls beschäftigt, ... welche durch Schimmelwucherung, mangelhafte Ernährung, Durchfeuchtung und Durchlüftung - wohl auch durch meine Ungeduld zu Grunde gingen, ....“. Seit diesen mißglückten Anstrengungen wurden viele Versuche unternommen, das Wachstum des Pilzes von *Xanthoria parietina* durch Zugabe verschiedener Kohlenhydrate zu beeinflussen, um den Nährstoffbedarf und die optimalen Kulturbedingungen für den isolierten Pilz zu ermitteln (MOELLER 1887, WERNER 1927, BARTUSCH 1932, LANGE DE LA CAMP 1933, THOMAS 1939, TOBLER 1939, 1944, QUISPÉL 1943–45, AM ENDE 1950, LILLY & BARNETT 1951, HALE 1961, HENRIKSSON 1964, NICOLI & al. 1964, STEINER 1965, HILL & WOOLHOUSE 1966 u. a.). Da diese Kulturversuche zu stark von einander abweichenden Ergebnissen führten, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluß verschiedener Medien auf das Wachstum des Mycobionten von *Xanthoria parietina* untersucht. Zudem sollte die Frage geklärt werden, ob am isoliert kultivierten Mycobiont mit zunehmender Alterung die in vielen Arbeiten beschriebene Schichtung auftritt.

## 2. Material und Methoden

An folgenden Standorten wurde *Xanthoria parietina* gesammelt:

\* Österreich, Salzburg, Salzburg-Stadt, Hellbrunnerallee, 430 msm, von *Tilia platyphyllos*, 10. 2. 1990

\* Österreich, Oberösterreich, Ottensheim, Donaualtarm, 267 msm, von Apfelbäumen, 3. 4. 1990

\* Österreich, Oberösterreich, Wolfsegg am Hausruck, 650 msm, von Steinschindeln, 18. 5. 1990

Die frisch gesammelten Thalli wurden sorgfältig von Verunreinigungen wie etwa Moosen und Detritus befreit und innerhalb von drei Tagen für die Sporengewinnung herangezogen oder für spätere Kulturversuche tiefgefroren ( $-23^{\circ}\text{C}$ ). Nach dieser Grobreinigung wurden intakte Apothecien mit Hilfe eines Stereomikroskops ausgewählt und zweimal gewaschen. Die erste Reinigung erfolgte in „phosphat-buffered-saline“ – PBS (BUBBRICK & GALUN 1986):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  3,0 mM, KCl 2,7 mM,

MgSO<sub>4</sub> 0,4 mM, NaCl 137,9 mM, Tween 80 (0,01 %) v/v. Die Flechtenproben wurden mit Hilfe eines Magnetrührers 1/2 h in dieser Lösung gereinigt, anschließend 30 Min unter Fließwasser gewaschen und mit Aqua bidest. abgespült. Nach dem Waschvorgang wurden die Flechtenproben in Petrischalen auf befeuchtetes Filterpapier gelegt, um ein vorzeitiges Austrocknen während der Entnahme von Thallusfragmenten oder einzelner Fruchtkörper unter dem Stereomikroskop zu verhindern.

Der Mycobiont wurde wie bei früheren Versuchen (BONNIER 1887, WERNER 1927, BARTUSCH 1932, LANGE DE LA CAMP 1933, TOBLER 1909, 1939, 1944, THOMAS 1939, AM ENDE 1950, KOFLER 1970, CHRISTMAS 1980, LALLEMANT 1984, HONEGGER 1990) aus Ascosporen der Flechte gewonnen. Die Isolierung des Flechtenpilzes für die Agarkulturen erfolgte in Anlehnung an STOCKER-WÖRGÖTTER & TÜRK 1988 mit der umgekehrten Auffangmethode (vgl. BERTSCH & BUTIN 1967) in Petrischalen.

Da trotz der umgekehrten Sporenauffangmethode nahezu alle Kulturen mit Bakterien und unerwünschten Fremdpilzen kontaminiert waren, wurden für die Versuche mit den Medien C bis F nur mehr einzelne Apothecien zur Sporengewinnung verwendet. Zur Sporengewinnung für Flüssigkulturen (Medium G) wurden die Apothecien über dem flüssigen Medium befestigt. Um die Kontamination gering zu halten, wurden die mit einzelnen Apothecien beklebten Petrischalendeckel bereits nach 1–1,5 Tagen gewechselt.

#### Nährmedien

A - BOLD's BASAL MEDIUM – BBM (BISCHOFF & BOLD 1963) mit Erdextrakt (ESSER 1976) – Medium A

---

Stammlösungen:	I NaNO <sub>3</sub>	2,5 g
	II CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,25 g
	II MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,75 g
	IV K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,75 g
	V KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,75 g
	VI NaCl	0,25 g

I bis VI in je 100 ml Aqua bidest. lösen.

Spurenelementstammlösungen: 1. 5,0 g EDTA + 3,1 g KOH in 100 ml Aqua bidest.

2. 0,498 g FeSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O in 100 ml angesäuertem Aqua bidest. (anges. Aqua bidest.: 1 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 999 ml Aqua bidest. lösen)

3. 1,142 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> in 100 ml Aqua bidest.

4. 0,82 g ZnSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O + 0,144 g MnCl<sub>2</sub> × 4 H<sub>2</sub>O + 0,071 g MoO<sub>3</sub> + 0,157 g CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O + 0,049 g Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O in 100 ml Aqua bidest.

940 ml Aqua bidest. + 10 ml der Stammlösung I - VI + je 1 ml der Spurenelementstammlösungen 1 bis 4 + 40 ml Erdextrakt + 20 g Agar-Agar.

Erdextrakt nach ESSER 1976: 500 g sandiger Lehm oder Gartenerde mit mittelmäßigem Humusgehalt wird in 1 l Aqua bidest. suspendiert und in einem mit Watte verschlossenen Erlenmeyerkolben bei 100°C im Wasserbad oder im Autoklaven 1 h gekocht. Der Überstand wird dekantiert, filtriert und auf 1 l mit Aqua bidest. aufgefüllt. Der pH-Wert der Bolddlösung mit Erdextrakt ist auf den Bereich zw. 5 – 7 einzustellen, da dieser den optimalen Wert für die Keimung von *Xanthoria*-Sporen darstellt (CHRISTMAS 1980).

B - BOLD'S BASAL MEDIUM ohne Erdextrakt - Medium B

---

Herstellung siehe Medium A

C - modifiziertes LILLY & BARNETT-Medium (LALLEMANT 1985) - Medium C I + C II

---

Ein Liter Nährlösung enthält: 2 g L-Asparagine, 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 40 g D(+)Glucose, 0,2 mg  $\text{Fe}(\text{SO}_4) \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,2 mg  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,1 mg  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 100  $\mu\text{g}$  Tiamin, 5  $\mu\text{g}$  Biotin, 15 g Agar-Agar. Glucose wurde durch 10 g Ribose (Medium C I) bzw. durch 10 g Ribitol (Medium C II) ersetzt.

D - kombiniertes Medium aus LILLY & BARNETT (LALLEMANT 1985) + Membranfilter A7885 - Medium D

---

Einem Liter LILLY & BARNETT-Medium (ursprüngliche Version mit 40 g D(+)Glucose wurden 30 g A7885 (Merck) in Pulverform beigegeben.

E - Medium mit Membranfilter (Merck A7885) - Medium E

---

1 l fertiges Medium enthält: 8 g Pepton aus Fleisch, 8 g Pepton aus Casein, 3 g Hefeextrakt, 5 g Natriumchlorid, 1 g D(+)Glucose, Agar-Agar.

F - CZAPEK-DOX-AGAR (Merck 5460) - Medium F

---

1 l fertiges Medium enthält: 30 g Saccharose, 3 g Natriumnitrat, 0,5 g Magnesiumsulfat, 0,5 g Kaliumchlorid, 0,01 g Eisen (I-) Sulfat, 1,0 g di-Kaliumhydrogenphosphat, 13 g Agar-Agar.

G - modifiziertes LILLY & BARNETT-Medium (LALLEMANT 1985) - Medium G

---

siehe Medium C. Für dieses Medium wurde kein Agar-Agar verwendet.

Die fertigen Medien wurden unter Berücksichtigung des Zuckergehaltes vorsichtig autoklaviert und in sterile Petrischalen gegossen.

Um die Kulturen über einen längeren Zeitraum zu beobachten, wurden Subkulturen angelegt. Dazu wurden kleine Mycelien bzw. Hyphenfragmente in dreimonatigem Abstand mit einer Nadel unter sterilen Bedingungen in frische Nährmedien übertragen.

Für die Kulturen wurden Petrischalen aus Glas oder Kunststoff mit einem Durchmesser von 6 und 9 cm verwendet. Die Kulturen wurden bei einer Raumtemperatur von ca. 20°C in Kulturschränken ohne Beleuchtung inkubiert.

### Mikroskopische Methoden

Die verschiedenen Entwicklungsstadien des Mycobionten wurden im Hellfeld oder teilweise im Interferenzkontrast untersucht. Dafür stand ein Leitz MPS 46/52 Laborlux S zur Verfügung. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung: Flechtenproben und kultivierte Mycobionten wurden in 2%iger Glutaraldehydlösung fixiert (1 h), in 0,05 molarem Cacodylatpuffer gewaschen ( $4 \times$ , jeweils 15 min), und in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert (jeweils 10 min). Der Alkohol wurde durch Isopropylalkohol substituiert (über Nacht); dieser wurde in einer Kritisch-Punkt-Trocknungsanlage nach ANDERSON 1951 absublimiert. Nach dem Aufkleben auf Pro-

benhalter erfolgte die Bedampfung mit Kohle und Gold ( $3 \times$  bei 100 mA und 0,00001 Torr) und die Bespütterung ( $2 \times 4$  min bei 2,5 mA). Für die Beobachtung stand ein Stereoskan 250 mit angeschlossener Kamera zur Verfügung.

### 3. Ergebnisse

Kulturen auf Agarnährböden (Medium A, B, C I, C II, D, E und F)

Die Keimschlauchbildung wurde auf den Medien C I und C II verfolgt. Nach einem Tag haben die Sporen auf Medium C I bis zu  $11 \mu\text{m}$  lange Keimschläuche ausgebildet, auf Medium C II erreichten sie eine Länge von bis zu  $16 \mu\text{m}$ . Nach neun oder zehn Tagen haben sich auf Medium A, B, C I, C II und F kleine Mycelien mit ersten Verzweigungen ausgebildet (Abb. 1). Die Hyphenzellen der Mycelien auf Medium A, B, C I und F sind zylindrisch, schmal und enthalten wenige, kleine Lipidkörper. Im Gegensatz dazu sind die Zellen der Hyphen auf Medium C II im zentralen Bereich breit, ellipsoid und enthalten viele kleine Lipidtröpfchen; im Randbereich sind sie schmal und lang.

Tabelle 1

Größenvergleich der Hyphenzellen (Länge  $\times$  Breite) nach einer Inkubationszeit von 9 oder 10 Tagen auf verschiedenen Medien

Medium A:	2,5 $\times$ 9 $\mu\text{m}$
Medium C I:	3 $\times$ 12 $\mu\text{m}$
Medium F:	4 $\times$ 12 $\mu\text{m}$
Medium C II:	3 (5,5) $\times$ 16 (8) $\mu\text{m}$

Die Sporen auf Medium D haben nach neun Tagen kurze, lediglich  $45 \mu\text{m}$  lange Hyphen ausgebildet. Einige Sporen sind stark gequollen (Abb. 2) und etwa  $13 \mu\text{m}$  breit. Auf Medium E zeigen nur einige Sporen Keimschläuche. Die Größe der Sporen ( $100 \times 20 \mu\text{m}$ ) auf diesem Medium weist auf starke Quellungsvorgänge hin (bei der Ausschleuderung beträgt die Sporenlänge 10 bis  $16 \mu\text{m}$ , ihre Breite 7 bis  $10 \mu\text{m}$ ). Für das Wachstum junger Hyphen sind die Medien C I und C II am besten geeignet.

Die Mycelien auf Medium C I (Abb. 3) und C II (Abb. 4) zeigen nach 17 Kulturtagen keine Unterschiede. Mycelien beider Medien weisen einen Durchmesser von höchstens  $200 \mu\text{m}$  auf und zeigen bereits vertikales Wachstum. Nach einer Kulturdauer von 20 oder 22 Tagen zeigen die Mycelien der verschiedenen Medien bereits große Unterschiede. Die Sporen auf Medium E sind über das Stadium der Keimschlauchbildung nicht hinausgekommen. Sie sind stark gequollen, wobei einige eine runde Gestalt mit einem Durchmesser von  $14 \mu\text{m}$  angenommen haben. Auf Medium D sind die Sporen noch stärker gequollen – Zunahme um ca. 100 % des Ausgangswertes – haben jedoch schmale, lange Hyphen gebildet.

Neben einem starken Horizontalwachstum wiesen die Mycelien auf Medium F nach 20 Kulturtagen auch vertikales Wachstum auf. Dieses ist an Mycelien auf Medium A, B und D nicht zu beobachten.

Beim Vergleich der Kulturen auf Medium C I, D und F nach 30 Tagen kann man das deutlich bessere Wachstum des Mycobionten auf Medium F erkennen. Auf Medium C I weisen die Mycelien zwar einen geringeren Durchmesser auf als auf Medium D, zeigen jedoch einen beträchtlichen vertikalen Zuwachs.

Bei Untersuchungen der Mycelien auf Medium C I nach 35 Kulturtagen zeigen die Hyphen keine Veränderungen. Auf Medium C II erreichen die Mycelien ebenfalls einen Durchmesser von bis zu 300  $\mu\text{m}$ . Die Form der Zellen variiert jedoch sehr stark. Einige sind groß und beinhalten viele Lipidtropfen, andere wiederum – vor allem im Randbereich – sind schmal und langgestreckt.

Das beste Wachstum zeigt der Mycobiont von *Xanthoria parietina* auf Medium F. Die Kulturen zeigen neben der starken radialen Ausbreitung (Abb. 5) ein enormes vertikales Wachstum (Abb. 6). Alle Zellen sind vollständig mit Lipidkörpern aufgefüllt. Bei Mycobionten auf Medium A und B tritt auch nach langer Inkubationszeit kein vertikales Wachstum auf (Abb. 7).

Bei den Agar-Medien stagniert das Wachstum spätestens nach Eintrocknen der Kulturmedien. Ein Überimpfen der ganzen Mycelien in frische Medien ist wegen der Verankerung der Hyphen im festen Substrat (Abb. 7) nicht möglich.

#### Kulturen im Flüssigmedium (LBM) – Medium G

Nach 45 Tagen Kulturdauer erreichen einzelne Mycelien einen Durchmesser von 270  $\mu\text{m}$ . Ein Geflecht aus mehreren ineinandergreifenden Mycelien (Abb. 8) erreicht einen Durchmesser von 670  $\mu\text{m}$ . Viele Zellen, vor allem in Zentrum der Mycelien, weisen eine auffallend kugelige Gestalt auf (Abb. 9).

Nach 80 Tagen beträgt der Durchmesser der leicht rosa gefärbten Mycelien 1,6 mm.

Einige Mycelien werden weiter subkultiviert und erreichen nach 250 Tagen einen Durchmesser von bis zu 3,8 mm, nach 370 Tagen 4,4 mm. Die Zellbreite variiert zwischen 1,8 und 6,2  $\mu\text{m}$ . Auf der Oberfläche eines Mycels hat sich nach Eintrocknen des Nährmediums eine kuppelartige Struktur mit einem Durchmesser von 260  $\mu\text{m}$  gebildet (Abb. 10).

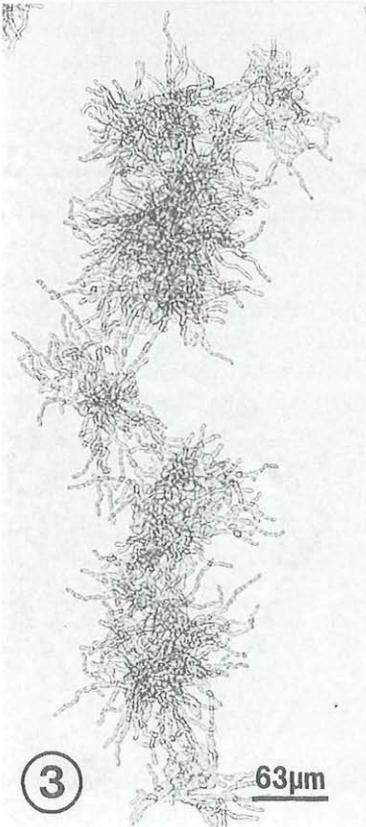
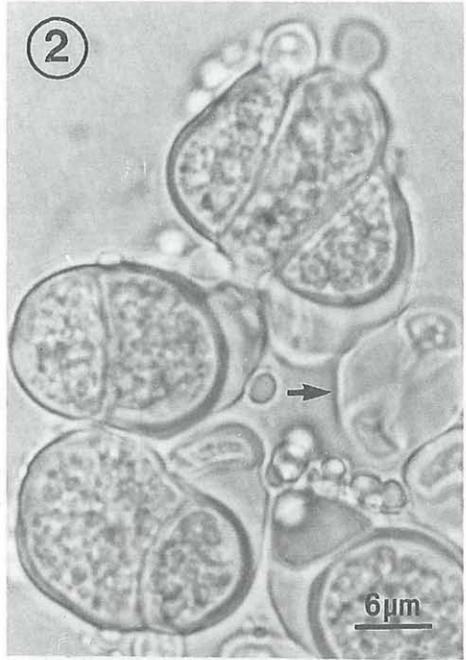
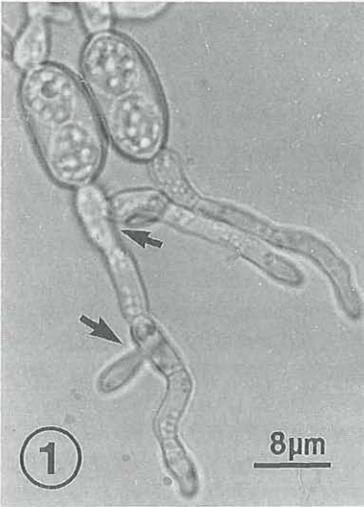
---

Abb. 1: Gekeimte Sporen mit ersten Hyphenverzweigungen (Pfeile) auf Medium A nach 9tägiger Inkubationsdauer.

Abb. 2: Stark gequollene Sporen neben einer mit ursprünglicher Ausgangsgröße (Pfeil) auf Medium D nach 20tägiger Inkubationsdauer.

Abb. 3: Mycelien mit ineinandergreifenden Hyphen auf Medium C I nach einer Inkubationszeit von 17 Tagen.

Abb. 4: Mycobiont auf Medium C II nach einer Kulturdauer von 17 Tagen.



Für langfristige Versuche haben sich flüssige Medien als am besten geeignet erwiesen. Die Mycelien können bei Bedarf in frische Medien bzw. Medien anderer Zusammensetzung überimpft werden. Reste vom „alten“ Kulturmedium lassen sich leicht durch wiederholtes „Schwemmen“ in sterilem Aqua bidest. entfernen.

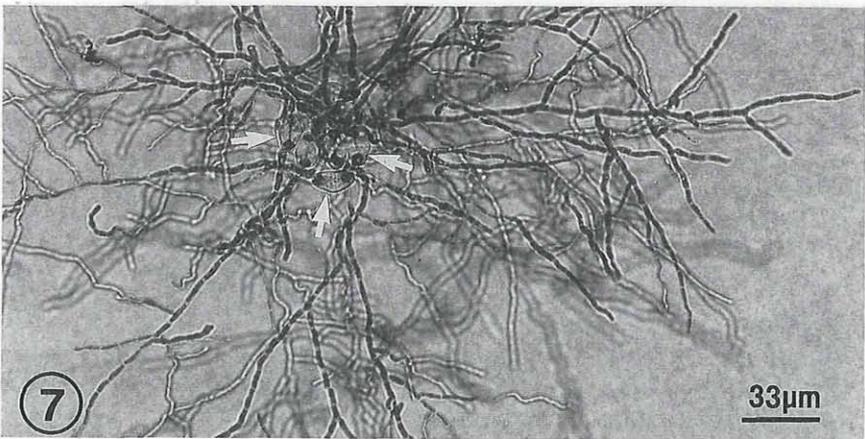
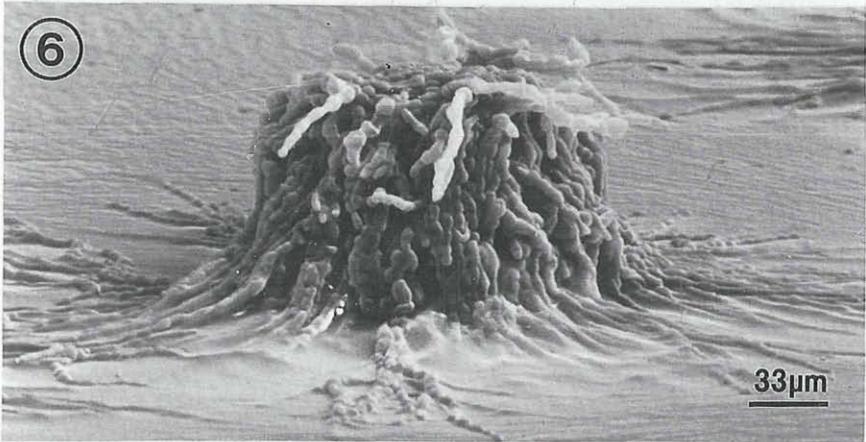
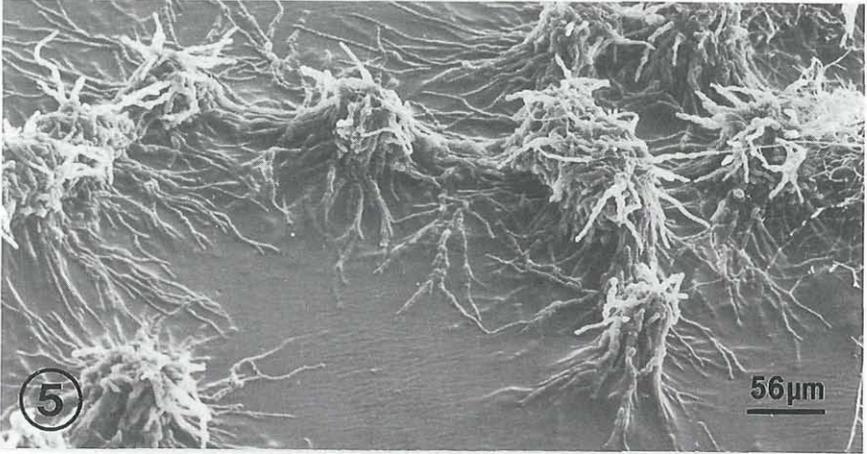
#### 4. Diskussion

In vorliegenden Untersuchungen wird die Wirkung verschiedener Medien auf das Wachstum des Mycobionten von *Xanthoria parietina* dargestellt. Der Mycobiont weist, wie auch schon THOMAS 1939 feststellte, ein auffällig langsames Wachstum auf. Während THOMAS 1939 darauf hinweist, daß der Mycobiont trotz unterschiedlich zusammengesetzter Medien gleichförmig langsame Zuwachsraten zeigte, verhielt er sich bei den vorliegenden Untersuchungen unterschiedlich gegenüber den untersuchten Nährmedien. Zudem weist der Mycobiont unterschiedliche Wuchsformen in Abhängigkeit der Nährstoffversorgung auf (siehe Abb. 6 und 7). Dieser „formative Einfluß“ der Kulturbedingungen vor allem auf die Gestalt der Hyphen wurde auch schon von BARTUSCH 1932 beobachtet. Schlanke, kaum verzweigte Hyphen zeigten unsere Mycobionten auf nährstoffarmen Medien (Mineralmedium – Medium A), während Hyphen mit kugeligen, lipidreichen Zellen wie bei BARTUSCH 1932 zumeist auf nährstoffreichen Medien auftraten (Medium D, F und G). Zudem beobachteten wir ein verstärktes Wachstum der Hyphen in den mit „Fremdpilzen“ kontaminierten Kulturen. REMMER & al. 1986 stellten eine wachstumssteigernde Wirkung niederer Hormonkonzentrationen auf den Mycobionten von *Cladonia cristatella* fest. Daher nehmen wir an, daß dieses verstärkte Wachstum in unseren verseuchten Schalen mit Medium D auf vom Fremdpilz abgegebene Phytohormone zurückzuführen ist. Auch in Flechtenthalli wurden bereits Hormone wie z.B. phenolische Verbindungen nachgewiesen (CULBERSON & AHMADJIAN 1980), deren Ursprung und Rolle im Flechtenlager noch unklar sind. Es ist jedoch anzunehmen, daß diese Phytohormone eine wichtige Funktion für die Etablierung und Aufrechterhaltung der

---

Abb. 5 und 6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Mycobionten auf Medium F nach einer Inkubationszeit von 65 Tagen. Auf Abb. 5 ist die Verankerung der Hyphen im Agar Medium und ihre vertikale Ausbreitung gut ersichtlich. Abb. 6 zeigt das enorme vertikale Wachstum auf Medium F.

Abb. 7: Mycobiont auf Medium B nach einer Kulturdauer von 95 Tagen. Durch Färbung mit Lactophenolblau treten die schmalen, zylindrischen, auf dem Medium liegenden Hyphenzellen deutlich hervor. Der Großteil der Hyphen ist jedoch im Medium verankert. Im Zentrum sind die Sporenwände noch sichtbar (Pfeile). Sie wurden im Gegensatz zu denen auf Medium C I, C II, D und F, trotz langer Kulturdauer, nicht durch vertikal wachsende Hyphen überlagert.



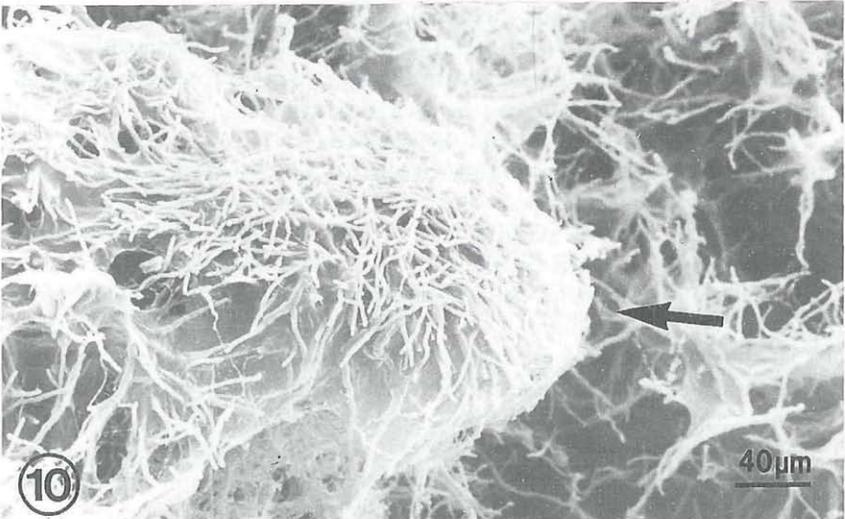
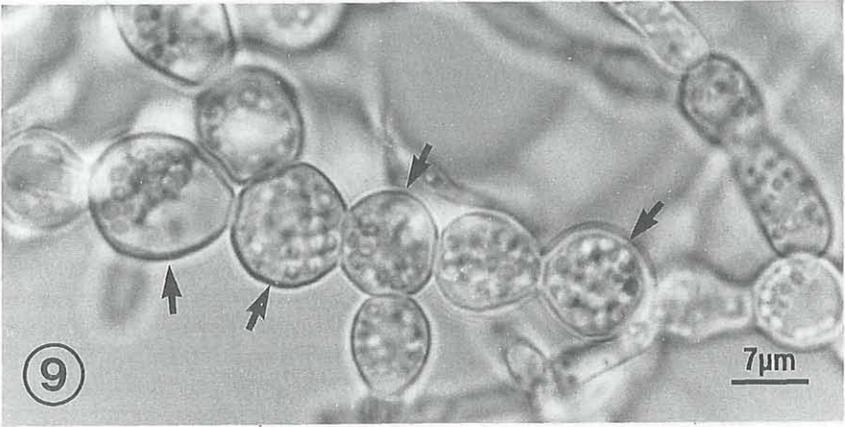
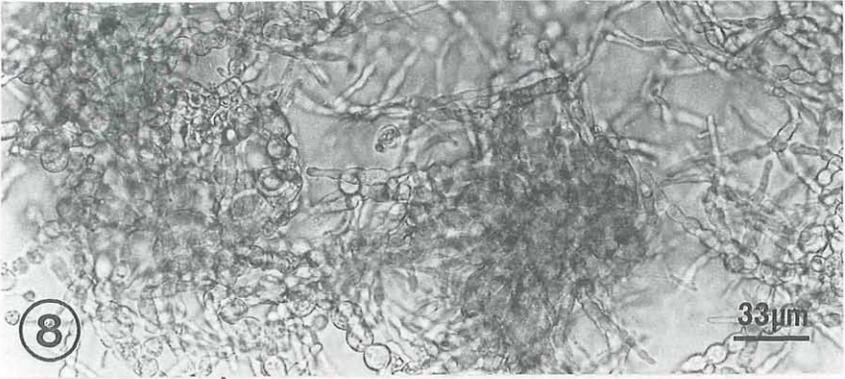
Symbiose haben. In stark bakterienverseuchten Kulturen hingegen keimten Sporen nicht aus. Die Frage, ob und wie diese Bakterien die Sporenkeimung verhindern, kann derzeit nicht beantwortet werden.

Die von uns beobachteten, in der Gestalt stark voneinander abweichenden Zellen bzw. Hyphen beschrieb schon AM ENDE 1950. Sie unterschied zwischen einem gedrungenen, durch tonnenartige Zellen gekennzeichneten „Saccharosetyp“, und einem schlankhyphigen „Pektintyp“. Ähnliche Ausbildungen wurden auch in unseren Kulturen beobachtet. In „armen“ Medien (Medium A & B) traten nur schlanke Hyphen auf (Abb. 7), während in nährstoffreichen Medien (Medium CI, CII, D, F & G) sehr schmale Hyphen und solche mit großen, kugelförmigen Zellen zu finden waren (vgl. Abb. 9). Die Lumina letzterer waren vor allem auf Medium D & G mit Lipidtröpfchen gefüllt. Dabei handelt es sich bei Pilzen nach WEETE 1981 hauptsächlich um Triglyceride und Phospholipide, welche von Estern und Fettsäuren begleitet werden. Daneben kommen noch Glycogen und Mannitol vor (OZENDA 1963). Wir nehmen an, daß die große Menge an Lipiden in den Pilzhyphen durch die ausreichende Nährstoffversorgung bedingt ist. Die Lipidproduktion wird durch das C/N-Verhältnis beeinflusst. Nach WEETE 1981 produzieren Mycobionten in Medien mit hohem C/N-Verhältnis mehr Lipide als jene in Medien mit niedrigem, da in Medien mit einem hohen C/N-Verhältnis mehr Kohlenstoff für die Lipidproduktion verfügbar ist.

In vorliegender Arbeit wurde zusätzlich untersucht, ob der isoliert kultivierte Mycobiont von *Xanthoria parietina* in einem Medium mit Ribitol – dem im Flechtenthallus von der Alge bereitgestellten (RICHARDSON & SMITH 1968, RICHARDSON 1985, RICHARDSON & al. 1968, GALUN 1988) und im Thallus über intraparietale Hyphen aufgenommenen Zuckeralkohol (HONEGGER 1986) – besser wächst als in einem Medium mit Ribose. In unseren Versuchen wurde jedoch kein Unterschied im Wachstum festgestellt. Die unterschiedlichen Zuwachsraten auf den verschiedenen Medien wurden allein durch die Konzentration, nicht aber durch die Art der Kohlenhydratquelle bedingt. Dieses Ergebnis stimmt mit jenem von RICHARDSON & SMITH 1968 überein. Sie stellten bei der verwandten Flechte *Xanthoria aureola* nach Beigabe von verschiedenen Zuckern und Zuckeralkoholen (z. B. Mannitol, Ribitol, Glucose, Saccarose) ein verstärktes Wachstum fest. Auch nach BOOTH 1971 fördert jede reiche Kohlenhy-

Abb. 8: Mycobiont in Medium G nach einer Inkubationszeit von 45 Tagen. Die Hyphen bilden am Boden der Petrischalen ein dichtes Geflecht.

Abb. 9: Mycobiont in Medium G nach einer Kulturdauer von 45 Tagen. Auffallend ist die kugelige Gestalt der mit vielen Lipidtröpfchen gefüllten Zellen aus dem Zentrum der Mycelien. Abb. 10: Mycobiont aus Medium G nach einer Kulturdauer von 370 Tagen.



dratquelle das Pilzwachstum. Daraus schließen wir, daß das Mycobiontenwachstum nicht durch die Art der Kohlenhydratquelle, sehr wohl aber durch die Menge des angebotenen Zuckers oder Zuckeralkohols beeinflußt werden kann.

Die Frage, ob der isoliert kultivierte Mycobiont die in vielen Arbeiten beobachtete Schichtung aufweist, bildete einen weiteren Schwerpunkt bei unseren Untersuchungen. Eine Differenzierung in Rhizoide, Medulla, Cortex und Lufthyphen beobachtete erstmals MOELLER 1887. In weiterer Folge wurde in vielen Arbeiten auf eine Differenzierung des kultivierten Mycobionten in Schichten hingewiesen (TOBLER 1909, WERNER 1925, 1927, BARTUSCH 1932, LANGE DE LA CAMP 1933, THOMAS 1939, QUISPÉL 1943–45). Wie jedoch schon AHMADJIAN 1980 und 1967, weisen auch STOCKER-WÖRGÖTTER & TÜRK 1989 bei ihren Kulturversuchen auf anorganischen Medien mit dem Mycobionten von *Xanthoria parietina* auf das Fehlen einer Differenzierung des Pilzmycels hin. STOCKER-WÖRGÖTTER & TÜRK 1989 vermuten, daß die Schichtung nur bei Kultivierung des Pilzes auf organischen Medien (etwa Bierwürzgelatine bei LANGE DE LA CAMP 1933, Malzextrakt bei THOMAS 1939, LALLEMANT 1985) auftritt. Bei vorliegenden Untersuchungen zeigten die im organischen LILLY & BARNETT-Medium (Medium G) kultivierten Mycobionten jedoch – wie auch auf allen anderen Medien – keine Schichtung. Da unsere klumpigen Mycelien lediglich die auch von AHMADJIAN 1987 beobachteten, harten Zentren zeigen, teilen wir die Ansicht AHMADJIAN's 1987, nach der eine thallusähnliche Struktur nur in Anwesenheit eines Photobionten gebildet werden kann. Nach AHMADJIAN 1980 entstehen diese kompakten Strukturen, weil sich der Pilz selber parasitiert. In den vorliegenden Untersuchungen wurde nie das Parasitieren eigener Hyphen durch den Pilz beobachtet. Es wurde jedoch festgestellt, daß die Hyphen mehrerer Mycelien ineinandergreifen, sobald diese in Kontakt geraten (siehe Abb. 3, 4, 5 + 8). Diese „Verflechtung“ der Hyphen spielt sicherlich eine zentrale Rolle beim Aufbau der Flechten-thalli.

STOCKER-WÖRGÖTTER & TÜRK 1989 weisen weiters darauf hin, daß das am Anfang beobachtete Vertikalwachstum des Mycobionten durch eine Integration der Sporenwände, welche bei *Xanthoria parietina* besonders lange erhalten bleiben, gefördert wird. Vorliegende rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen die Hauptursache für das spätere vertikale Wachstum im hohen Nährstoffangebot. Je höher das Angebot, desto früher zeigen die Mycobionten ein vertikales Wachstum und desto auffälliger ist dieses (vgl. Abb. 6). Diesen „hohen Wuchs“ auf nährstoffreichen Substraten beobachtete bereits ZEHNDER 1949 nach Kultivierung des Mycobionten von *Xanthoria parietina* auf verschiedenen Medien. Aus dieser Tatsache schloß er wie THOMAS 1939, daß Flechtenresyntheseversuche auf nährstoffarmen Substraten durchgeführt werden müssen, da sich die Symbionten bei Vorfinden aller benötigten Nährstoffe nicht zur Flechte verei-

nigen. Auf besonders nährstoffarmen Medien (z. B. Medium A & B) bleibt das vertikale Wachstum ganz aus (vgl. Abb. 7). Der Pilz beschränkte sich unter diesen Bedingungen auf flächenhaftes Wachstum, um möglichst viele der gering konzentrierten Nährstoffe zu erreichen. Dieses auffallend horizontale Wachstum des Mycobionten hängt nach OTT 1987a & 1987b auch mit der komplexen Fortpflanzungsstrategie von *Xanthoria parietina* zusammen. Da die Reproduktion der Flechte nur sexuell über Ascosporen erfolgt, muß sich das Mycel weit über das Substrat ausbreiten, um auf den spezifischen Photobionten (*Trebouxia*-Algen) zu stoßen, der den Thal-lus dann mit Kohlenhydraten versorgt.

## 6. Literaturverzeichnis

- AHMADJIAN V. 1967. The lichen symbioses. – Waltham, Mass., Blaisdell Publishing Co., 152 pp.
- 1980. Separation and artificial synthesis of lichens. – In: COOK C. B., PAPPAS P. W. & RUDOLPH E. D. (Eds.), Cellular interactions in symbiosis and parasitism, p. 3–29. – Ohio State Univ. Press.
- 1987. Laboratory culture of lichens and lichen symbionts. – In: NIPPON PAINT CO. (Ed.), Proceedings of symposium on tissue culture of lichen and bryophyte, Kyoto 1987, p. 1–13.
- ANDERSON T. 1951. Techniques for the preservation of three-dimensional structure on preparing specimens for the electron microscope. – Trans. New York Acad. Sci., Ser. 11: 130.
- BARTUSCH H. 1932. Beiträge zur Kenntnis der Lebensgeschichte des *Xanthoria* Pilzes. – Arch. f. Mikrobiol. 3: 122–157.
- BERTSCH A. & BUTIN H. 1967. Die Kultur der Erdflechte *Endocarpon pusillum* im Labor. – Planta (Berl.) 72: 29–42.
- BISCHOFF H. W. & BOLD H. C. 1963. Phycological studies IV. Some soil algae from encalced rock and related algal species. – Univ. Texas Public. 6318: 1–95.
- BONNIER M. G. 1887. La constitution des lichens. – Journal de botanique 1: 1–5.
- BOOTH C. 1971. Introduction to general methods. – In: Methods in Microbiology, Vol. 4: 1–111. – Academic Press, London & New York.
- BUBRICK P. & GALUN M. 1986. Spore to spore resynthesis of *Xanthoria parietina*. – Lichenologist 18: 47–49.
- CHRISTMAS M. 1980. Ascospore discharge and germination in *Xanthoria parietina*. – Lichenologist 12: 403–406.
- CULBERSON CH. F. & AHMADJIAN V. 1980. Artificial reestablishment of lichens. II. Secondary products of resynthesized *Cladonia cristatella* and *Lecanora chrysoleuca*. – Mycologia LXXII: 99–109.
- AM ENDE I. 1950. Zur Ernährungsphysiologie des Pilzes der *Xanthoria parietina*. – Arch. f. Mikrobiol. 15: 185–202.
- ESSER K. 1976. Kryptogamen: Blaualgen, Algen, Pilze, Flechten. – Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- GALUN M. 1988. Carbon metabolism. – In: GALUN M. (Ed.), Handbook of Lichenology I: 197–200. – CRC Press, Florida.

- HALE M. E. 1961. Lichen Handbook. – Smithsonian Institution Washington, D. C., 1–142.
- HENRIKSSON E. 1964. Studies in the physiology of the lichen *Collema*. – Svensk Botanisk Tidskrift 58: 361–370.
- HILL D. J. & WOOLHOUSE H. W. 1966. Aspects of the autecology of *Xanthoria parietina* agg. – Lichenologist 3: 207–214.
- HONEGGER R. 1986. Ultrastructural studies in lichens. I Haustorial types and their frequencies in a range of lichens with trebouxioid phycobionts. – New Phytol. 103: 785–795.
- 1990. Mycobiont-photobiont interactions in adult thalli and in axenically re-synthesized pre-thallus stages of *Xanthoria parietina*. – Bibl. Lichenol. 38: 191–208.
- KOFLER L. 1970. A method to use lichen spores in qualitative studies on germination. – The Bryologist 73: 603–606.
- LALLEMANT R. 1984. Etude de la formation du thalle de quelques lichen. I. L'ontogénèse du thalle du discolichen *Xanthoria parietina* (L.) Beltr. – Beitr. Biol. Pflanzen 59: 95–103.
- 1985. Le développement en cultures pures in vitro des mycosymbiontes des lichens. – Can. J. Bot. 63: 681–703.
- LANGÉ DE LA CAMP M. 1933. Kulturversuche mit Flechtenpilzen (*Xanthoria parietina*). – Arch. f. Mikrobiol. 4: 379–393.
- LILLY V. G. & BARNETT H. L. 1951. Physiology of the fungi, 464 p. – Mc Graw-Hill book company, inc., New York, Toronto, London.
- MOELLER A. 1887. Über die Cultur flechtenbildender Ascomyceten ohne Algen. – Diss., Münster.
- NICOLI R. M., LATOURELLE PH. & Y. RONDON 1964. Culture pure in vitro de quelques discolichens. – Bull. Soc. Bot. Fr. 111: 109–111.
- OTT S. 1987a. Sexual reproduction and developmental adaptations in *Xanthoria parietina*. – Nord. J. Bot. 7: 219–228.
- 1987b. Reproductive strategies in lichens. – In: PEVELING E. (Ed.), Progress and problems in lichenology in the eighties. – Bibl. Lichenol. 25: 81–93.
- OZENDA P. 1963. Lichens. In: ZIMMERMANN W. & OZENDA P. (Eds.), Traité d'anatomie végétale VI (9): 1–198. – Berlin – Nikolassee.
- QUISPEL A. 1943. The mutual relations between algae and fungi in lichens. – Rec. trav. bot. néerland. 40: 413–541.
- REESS M. 1873. Mitteilung über die Flechtenfrage. – In: Sitzungsber. d. Physical-Med. Soc. Erlangen, 64–66.
- REMMER S. B., AHMADJIAN V. & T. P. LIVDAHL 1986. Effects of IAA (indole-3-acetic acid) and kinetin (6-furfurylamino-purine) on the synthetic lichen *Cladonia cristatella* and its isolated symbionts. – Lich. Physiol. Biochem. 1: 1–25.
- RICHARDSON D. H. S. 1985. The surface physiology of lichens with particular reference to carbohydrate transfer between the symbionts. – In: VINCENTE C., BROWN D. M. & LEGAZ M. E. (Eds.), Surface physiology of lichens, p. 25–55. – Univ. Comp. de Madrid, Madrid.
- , HILL D. J. & SMITH D. C. 1968. Lichen physiology XI. The role of the alga in determining the pattern of carbohydrate movement between lichen symbionts. – New Phytol. 67: 469–486.

- & SMITH D. C. 1968. Lichen physiology X. The isolated algal and fungal symbionts of *Xanthoria aureola*. – *New Phytol.* 67: 69–77.
- STEINER M. 1965. Wachstums- und Entwicklungsphysiologie der Flechten. – In: Ruhland W. (Ed.), *Handbuch der Pflanzenphysiologie* 15 (1): 758–801. – Springer-Verlag Berlin–Heidelberg–New York.
- STOCKER-WÖRGÖTTER E. & TÜRK R. 1988. Culture of the cyanobacterial lichen *Peltigera didactyla* from soredia under laboratory conditions. – *Lichenologist* 20: 369–375.
- & — 1989. Laborversuche zur Kultivierung von Blatt- und Strauchflechten und deren Komponenten. – *Nova Hedwigia* 48: 207–228.
- THOMAS E. A. 1939. Über die Biologie von Flechtenbildnern. – *Beitr. zur Kryptogamenflora d. Schweiz* 9: 201–267.
- TOBLER F. 1909. Das physiologische Gleichgewicht von Pilz und Alge in den Flechten. – *Ber. d. Dtsch. Bot. Ges.* 27: 421–427.
- 1939. Die Kultur von Flechten. – In: ABDERHALDEN E. (Ed.), *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, Abt. 12 (2): 1491–1511. – Verlag von Urban & Schwarzenberg, Berlin, Wien.
- 1944. Die Flechtensymbiose als Wirkstofffrage. – *Planta (Berlin)* 34: 34–40.
- WEETE J. D. 1981. Lipids in fungal growth and reproduction. – In: TURIAN G. & HOHL H. R. (Eds.), *The fungal spore: Morphogenetic controls* 413: 463–485. – Acad. Press London.
- WERNER R. G. 1925. *Xanthoria parietina*, lichen, son champignon en culture pure. – *Bull. trimestr. Soc. Mycol. France* 41: 385–387.
- 1927. *Recherches biologiques et expérimentales sur les ascomycètes de lichens*. – Thèses (Faculté des Sciences, Paris), Braum & Cie, Mulhouse.
- ZEHNDER A. 1949. Über den Einfluß von Wuchsstoffen auf Flechtenbildner. – *Ber. d. Schweiz. Bot. Ges.* 59: 202–265.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn](#)

Jahr/Year: 1994

Band/Volume: [33\\_2](#)

Autor(en)/Author(s): Huber Gundula, Stocker-Wörgötter Elfie, Türk Roman

Artikel/Article: [Die Kultivierung des Mycobionten von Xanthoria parietina \(L.\) TH. FR. auf unterschiedlichen Kulturmedien. 305-319](#)