

Orchideenmykorrhiza: Symbiotische Anzucht einiger Dactylorhiza-Arten

H. BEYRLE, F. PENNINGSFELD, B. HOCK*

Lehrstuhl für Botanik der Technischen Universität München,
Fachbereich Landwirtschaft und Gartenbau
(H. B. und B. H.)

und
Fachhochschule Weihenstephan, Fachbereich Gartenbau (F. P.)
D-8050 Freising

Eingegangen am 23.5.1985

Beyrle, H., Penningsfeld, F. & B. Hock (1985) – Orchid mycorrhiza: Symbiotic propagation of some Dactylorhizas. *Z. Mykol.* 51 (2): 185–198.

Key Words: *Dactylorhiza*, Mykorrhiza, Orchids, *Rhizoctonia Stahlia*.

Abstract: Mykorrhiza formation under in-vitro conditions is described for some *Dactylorhizas* Necker ex Nerski. Seeds were germinated and infected in the presence of *Rhizoctonia Stahlia* isolated from orchid roots. The development of protocorms took place within thirteen weeks. Further development required a cold treatment of twelve weeks.

Zusammenfassung: Am Beispiel verschiedener Knabenkräuter der Gattung *Dactylorhiza* Necker ex Nerski wird die Mykorrhizierung unter in-vitro Bedingungen beschrieben. Samen wurden in Gegenwart von *Rhizoctonia Stahlia*, die aus Orchideenwurzeln isoliert worden waren, gekeimt und mykorrhiziert. Die Protokorm-Entwicklung erfolgte innerhalb von dreizehn Wochen. Die Weiterentwicklung erforderte eine Kältebehandlung von zwölf Wochen.

Einleitung

Die Orchideenmykorrhiza ist eine Symbiose zwischen Orchideen und Pilzen. Ihre Erforschung begann mit einem Beitrag von *Wahlisch* (1886), der die Beziehung zwischen Orchideenwurzel und Pilzpartner klärte. *Bernard* (1899, 1903) erkannte als erster die Bedeutung des Mykorrhizapilzes für die Samenkeimung. Durch Beiträge von *Burgef* (1909, 1932, 1936) wurden wesentliche Fragen auf dem Gebiet der Mykorrhiza-physiologie geklärt. Trotz intensiver Forschungsaktivität auch in jüngster Zeit, insbesondere in australischen und englischen Arbeitsgruppen, sind noch entscheidende Fragen ungelöst, z. B. die Bedeutung der Symbiose für den Pilzpartner.

Die erfolgreiche Verbreitung der Orchideen und die Anpassung an die verschiedensten Klimazonen der Erde beruht nicht zuletzt auf dem Zusammenleben mit geeigneten Pilzpartnern. Bei grünen Orchideen spielen Vertreter der Formgattung *Rhizoctonia* die wichtigste Rolle. Eine Reihe dieser imperfekten Pilze konnte inzwischen dem natürlichen System zugeordnet und als Basidiomyceten aus dem Verwandtschaftskreis der *Tulasnellales*,

* Sonderdruckerfordernungen an B. Hock

Tremellales und *Aphylophorales* identifiziert werden. Bei den nicht-grünen Orchideen kommen dagegen andere Pilze vor, die aber ebenfalls überwiegend aus dem Verwandtschaftskreis der Basidiomyceten stammen, unter anderem aus so bekannten Gattungen wie *Armillaria* und *Fomes*.

Pilzpartner spielen bei der Entwicklung der Orchideen eine entscheidende Rolle. Die Samen sind wenig differenziert, meist kleiner als 1 mm und wiegen ca. 1 µg. Das Endosperm ist unterentwickelt oder fehlt ganz. Zu Keimungsbeginn quillt der Embryo auf. Die in wenigen Zellen gespeicherten Fette und Öle werden in Stärke umgewandelt. Nach Sprengung der Testa, die häufig durch Ausscheidung bzw. hineinwachsende Hyphen von Mykorrhizapilzen erleichtert wird, entwickelt sich ein sog. Protokorm, ein wenig differenzierter, spindelförmiger Körper aus verhältnismäßig wenigen Zellen, von dem absorbierende Epidermishaare nach außen wachsen. Dieses Protokorm läßt sich als spätes, erst außerhalb der Samenschale erreichtes Embryonalstadium interpretieren. Das Protokorm ist oftmals, insbesondere bei terrestrischen Orchideen, chlorophylllos. Blätter und Wurzeln werden erst nach einem mehrere Wochen bis Monate dauernden heterotrophen Wachstum gebildet.

Spätestens im Stadium des Protokorms ist der Keimling auf Nahrungshilfe durch den Mykorrhizapartner angewiesen (Mycotrophie). Sofern der Pilz nicht bereits im Samen vorhanden ist, erfolgt die Infektion über die Epidermishaare, und die Pilzhyphen verbreiten sich von Zelle zu Zelle. Eine sichtbare Folge der Infektion einer Zelle ist das Verschwinden der Stärkekörner. Kurze Zeit später setzt das Protokormwachstum ein. Abbildung 1 zeigt ein mykorrhiziertes Protokorm von *Dactylorhiza maculata* im Längsschnitt.

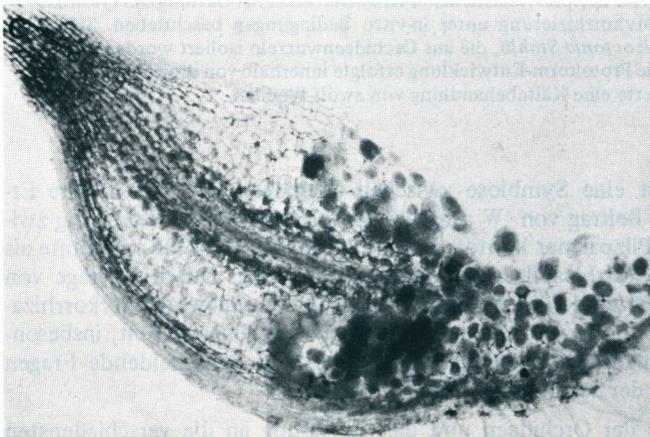


Abb. 1: Längsschnitt durch ein 8 Wochen altes Protokorm von *D. maculata*. Die Zellen im basalen Bereich enthalten zahlreiche Hyphenknäuel, die bereits teilweise verdaut sind.

Fig. 1: Length section through an eight week old protocorm of *D. maculata*. The cells in the basal part contain numerous hyphal balls which are already partly digested.

Symbiosepilze versorgen den Keimling mit Kohlenhydraten. Neben einfachen Zuckern können diese Pilze auch komplexe Kohlenhydrate wie Zellulose, von einigen sogar auch Verbindungen wie Lignin und Tannin verwertet werden (Burgess, 1936). Die Verwertung der C-Quelle ist jedoch von der Stickstoffquelle und von der Vitaminzufuhr stark abhängig. Organische N-Quellen werden sehr gut, Ammoniumsalze im allgemeinen besser als Nitrate verstoffwechselt (Burgess, 1936).

Die Kohlenhydrat-Translokation durch den Pilz wurde von S m i t h (1967) in einem einfachen und eleganten Ansatz nachgewiesen. Eine Petrischale wurde im Zentrum mit Zelloseagar und an der Peripherie mit Mineralagar beschickt. Die Beimpfung mit dem Mykorrhizapilz erfolgte im Zentrum, die Aussaat der Orchideen an der Peripherie. Die Mykorrhizabildung ermöglichte die Entwicklung der Orchideen, die ohne den Pilz und seine Fähigkeit zum Zelluloseabbau und zur Kohlenhydrat-Translokation nicht hätte stattfinden können. Der Orchideenkeimling erhält somit sämtliche Nährstoffe (einschließlich der Vitamine) vom Pilzpartner.

In der Regel bleibt auch nach dem Übergang zum photo-autotrophen Stadium die Mykorrhiza erhalten.

In späteren Stadien erstreckt sich die Verpilzung auf die Rindenbereiche der Wurzel. Inwieweit grüne Orchideen von dem Mykorrhizapartner mit Kohlenhydraten versorgt werden, ist noch nicht restlos geklärt. Eine entsprechende Vermutung liegt jedoch nahe, da sich die Verpilzung der Wurzeln von der Verpilzung der Protokorme nicht prinzipiell unterscheidet und da oftmals gerade wenig Blattmasse bildende Pflanzen stark mykorrhiziert sind.

Auch über die sonstige Nährstoffaufnahme erwachsener Orchideen gibt es nur wenige Hinweise. Neuere Arbeiten von A l e x a n d e r und Mitarb. (1984) zeigten, daß die Phosphataufnahme erwachsener Pflanzen von *Goodyera repens* in Gegenwart des Mykorrhizapartners *Rhizoctonia goodyerae-repentis* 100mal größer sein kann als nicht-mykorrhizierte Pflanzen. Die Mykorrhiza erwachsener Orchideen zeigte damit eine auffällige Ähnlichkeit zur Ektomykorrhiza, z. B. hinsichtlich der Fähigkeit erhöhter Nahrungsaufnahme und größerer Wachstumsraten, insbesondere unter suboptimalen Ernährungsbedingungen (vgl. H o c k und B a r t u n e k , 1984).

Bis heute ist noch kein eindeutiger Nachweis eines von der Pflanze zum Symbiosepilz gerichteten Stofftransports gelungen. Neuere Experimente von H a r l e y und S m i t h (1983) konnten keine Radioaktivität in Mykorrhizapilzen nachweisen, wenn mykorrhizierte, grüne Protokorme von *Dactylorhiza purpurella* im Licht mit $^{14}\text{CO}_2$ inkubiert wurden.

Dennoch wäre es zu einfach, Orchideen pauschal als nekrotrophe Parasiten an Pilzen (L e w i s , 1973) zu betrachten. H i j n e r und A r d i t t i (1973) zeigten, daß Orchideenkeimlinge p-Aminobenzoesäure in den Agar abgeben und das Vitaminbedürfnis von *Rhizoctonia* befriedigen. Der Pilz selbst produziert Pyrimidin, ein Bestandteil von Thiamin, der das Wachstum von Orchideenkeimlingen fördert. Er zeigte sich jedoch von Thiazol, einem weiteren Bestandteil des Pyrimidins, abhängig. Vermutlich wird diese Verbindung vom Keimling geliefert, so daß sich beide Partner in ihren Vitaminansprüchen ergänzen.

Eine Bewertung der Symbiose und ihrer Bedeutung für den Mykorrhizapilz wird durch die Tatsache erschwert, daß sich der Lebensraum des Pilzpartners auf drei Räume aufteilt. Ein externes Hyphensystem, das sich von der Trägerpflanze in den Boden erstreckt, dient zur Aufnahme von Wasser, Mineralstoffen und organischen Verbindungen. In der Wirtspflanze befindet sich ein internes System aktiver Hyphen (Pilzwirtszone) sowie ein weiterer Typ integrierter Zellen, in denen die Hyphen verdaut werden (Pilzverdauungszone). Vermutlich ist der Ort des Austauschs zwischen den Symbionten die Pilzwirtszelle, während in den Pilzverdauungszellen der Nutzen allein auf Seiten der Wirtspflanze liegt. Die Verpilzung beschränkt sich auf Parenchymzellen im Rindenbereich der Wurzel bzw. des Protokorms. Durch Bildung der intrazellulären Hyphenknäuel entstehen bei den autotro-

phen Orchideen große Kontaktflächen. Die Wand dieser Hyphen besteht aus zwei Schichten, aus einer inneren, elektronendichten Schicht gegen das eigene Plasmalemma und einer äußeren, weniger dichten und granulären Schicht (H a d l e y und Mitarb., 1971, S t r u l l u und G o u r r e t , 1974). Da freilebende Hyphen in Agarkulturen nur die innere Schicht aufweisen, wird angenommen, daß die äußere Schicht ganz oder teilweise vom Wirt produziert wird (H a d l e y , 1975).

Die Wirtszellen sind physiologisch außerordentlich aktiv. Die Infektion durch den Mykorrhizapilz wird durch eine Hypertrophie des Zellkerns (B u r g e f f , 1936), Endopolyloidie (W i l l i a m s o n , 1970) und erhöhte Proteinsynthese beantwortet. Ein Materialaustausch zwischen Hyphen und Wirtszelle wird über sog. Pinocytose-Vesikel (N i e u w d o r p , 1972) oder Protuberanzen (H a d l e y und Mitarb., 1971) vermutet. Die Hyphenknäuel der Pilzwirtzone haben nur eine begrenzte Lebensdauer. Nach kurzer Zeit werden sie von der Wirtszelle verdaut. Das Hyphencytoplasma wird resorbiert, das Zellwandmaterial dagegen bleibt als Klumpen erhalten. Es ist noch unklar, wie der Kollaps der Hyphen eingeleitet wird. Möglicherweise spielen hierbei Phytoalexine eine Rolle – Antibiotica der Höheren Pflanze, die unter anderem gegen Pilze gerichtet sind und auch aus Orchideen isoliert werden konnten (G ä u m a n n und K e r n , 1959, S t o e s s l und A r d i t t i , 1984). Während des Vorgangs der Verdauung kann bereits von der Nachbarzelle her eine neue Infektion erfolgen (B u r g e f f , 1936, B u r g e s , 1939). Eine Zelle vermag demnach gleichzeitig eine Verdauungs- und eine Wirtszelle zu sein (H a r l e y und S m i t h , 1983).

Trotz der Bedeutung des Mykorrhizapartners für die Entwicklung der Orchideen gelingt es, unter Berücksichtigung geeigneter Kulturmaßnahmen, auch mykorrhizafreie Orchideen anzuziehen. In den Jahren 1922 bis 1930 wies K n u d s o n die erfolgreiche Kultur von Orchideensamen auf Zuckernährböden bis zur blühfähigen Pflanze nach. Seitdem wird dieses Verfahren der asymbiotischen Kultur im großen Maßstab bei tropischen Orchideen angewendet. Es bildet heute die wichtigste Grundlage der gärtnerischen Orchideenproduktion. Versuche zur Aussaat terrestrischer europäischer Orchideen zeigten jedoch unterschiedliche Ergebnisse. Mediterrane Arten erwiesen sich als relativ einfach, andere Gattungen brachten jedoch größere Schwierigkeiten. Trotz jüngster Erfolge auf diesem Gebiet (z. B. F r o s c h , 1983) erscheint es besonders im Hinblick auf die praktische Anwendung (Gewinnung robuster Pflanzen, die ins Freiland überführt werden) wünschenswert, die symbiotische Anzucht voranzutreiben. B u r g e f f (1954) sowie S e i t z (1976) erzielten beachtliche Erfolge mit der symbiotischen Anzucht, bei welcher Farnwurzeln (*Polypodium*, *Osmunda*) vom Mykorrhizapilz durchwachsen waren. Prinzipiell erwies sich jedoch die asymbiotische Kultur als einfacher (B o r r i s , 1969, H a d l e y , 1983), nachdem Probleme der Saatgutbehandlung, der Nährböden und der Überwindung der Knospenruhe durch Kälteeinfluß gelöst waren. Die Schwierigkeiten der asymbiotischen in-vitro-Kultur steigen in dem Maße, wie die Orchideen von ihrem Symbionten abhängig sind. Dies erklärt auch die unterschiedlichen Ergebnisse bei einheimischen Orchideenarten.

Ziel unserer Arbeit war die Etablierung einer stabilen Mykorrhiza innerhalb der Gattung *Dactylorhiza* unter in-vitro-Bedingungen. Hierfür mußten Verfahren zur Isolierung und Reinkultur des Mykorrhizapilzes ausgearbeitet werden. Schließlich waren die Voraussetzungen für eine symbiotische Anzucht der Orchideen zu klären. Die vorliegende Arbeit zeigt, daß dieses Ziel prinzipiell erreichbar ist, daß jedoch die Bedingungen für einen Erfolg bei den einzelnen Arten außerordentlich unterschiedlich sein können.

Material und Methoden

Nährmedien

Kultur der Mykorrhiza-Pilze: Tabelle 1 zeigt die Zusammensetzung des Nähragars zur Kultur der Mykorrhizapilze. Die Vitamine Biotin, Thiamin und p-Aminobenzoesäure und das Antibiotikum Streptomycin wurden sterilfiltriert und mit dem autoklavierten und auf 49°C abgekühlten Kulturmedium vereinigt.

Tab. 1: Nähragar zur Isolation der Mykorrhizapilze

Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	80 mg
KH ₂ PO ₄	80 mg
KCl	160 mg
NaFe · EDTA	25 mg
Asparagin	380 mg
Biotin	5 µg
Thiamin	100 µg
p-Aminobenzoesäure	200 µg
lösliche Stärke	6 g
Streptomycin	80 µg
Agar-Agar	15 g
Aqua dest.	1000 ml

Die Vitamine und Streptomycin wurden sterilfiltriert. Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit 0,1 N HCl auf 5,6 eingestellt.

Anzucht der Orchideen in Gegenwart von Mykorrhizapilzen: Vier verschiedene Nährmedien auf Zellulose-, Stärke-, Hafer- und Hafer/Hefeextrakt-Basis wurden getestet (vgl. Tab. 2). Für die ersten beiden Varianten kam ein gemeinsames Grundmedium zum Einsatz, das in Teilen mit dem Nährmedium zur Kultur der Mykorrhizapilze identisch ist.

Wurzelproben

Für die Entnahme der Wurzelproben von *Dactylorhiza* und anderen wild vorkommenden, einheimischen Orchideenarten lag Ende Mai 1984 eine Genehmigung der Regierung von Oberbayern als höherer Naturschutzbehörde vor. Zur Isolierung der Mykorrhizapilze genügte jeweils ein kleines Wurzelstück. Das Ausgraben der ganzen Pflanze war daher nicht erforderlich, und die Beschädigung der Exemplare blieb auf ein Minimum beschränkt.

Oberflächensterilisation

Mykorrhizierte Wurzelstücke von ca. 1 cm Länge wurden unter einem Leitungswasser-Strahl gründlich von anhaftenden Bodenpartikeln befreit. Darauf folgte die Oberflächensterilisation nach Freccero und Fanelli (1975) durch Inkubation in 30%igem H₂O₂ (5 s), gefolgt von 20%igem H₂O₂ (20 s). Daran schlossen sich sechs Waschwgänge in sterilem Wasser (jeweils 10 s) an. Anschließend wurden die Wurzelstücke unter sterilen Bedingungen in Scheiben von ca. 3 mm zerteilt, die zu dritt in Petrischalen mit jeweils 20 ml Nähragar zur Kultur von Mykorrhizapilzen (Tab. 1) ausgelegt wurden.

Entnahme von Hyphenknäueln

Als weitere Methode zur Kultur von Mykorrhizapilzen wurden aus der Pilzwirtzone von Wurzeln Hyphenknäuel entnommen und auf Nährmedium für Mykorrhizapilze bebrütet. Als Ausgangsmaterial dienten wiederum unter Leitungswasser gereinigte, mykorrhizierte Wurzelstücke, die unter sterilen Bedingungen durch einen Längsschnitt mit der abgeflamten Rasierklinge halbiert und mit Hilfe von zwei feinen Nadeln auf einem Objektträger unter einem Tropfen Leitungswasser zerzupft wurden. Die austretenden Hyphenknäuel wurden auf mehrere Wassertropfen in einer Petrischale verteilt und mit 20 ml flüssigem, auf 42°C abgekühlten Nähragar zur Kultur von Mykorrhizapilzen überschichtet.

Anzucht der Mykorrhizapilze

Die Bebrütung erfolgte bei 18°C im Dunkeln. Zur Gewinnung von Stammkulturen wurden Stücke aus

Tab. 2: Nähragar zur Anzucht von Orchideen in Gegenwart der Mykorrhizapilze

a) Grundmedium*	Endkonzentration mg/l
Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	83,3
KH ₂ PO ₄	83,3
KCl	166,7
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	83,3
Asparagin	380,0
Na · Fe · EDTA	25,0
	(µg/l)
H ₃ BO ₃	1000
Zn SO ₄ · H ₂ O	1000
Mn SO ₄ · H ₂ O	75
Ni Cl ₂ · 6 H ₂ O	30
Cu SO ₄ · 5 H ₂ O	30
Al Cl ₃	30
K J	10
Biotin	5
Thiamin	100
p-Aminobenzoesäure	200
b) Hauptmedien:	
Zellulosemedium:	15 g Zellulose/l Grundmedium (gepulvert, Merck)
Stärkemedium:	10 g Stärke/l Grundmedium (löslich, Merck)
Hafermedium (nach Clements und Ellyard, 1979):	25 g Hafer/l dest. H ₂ O (Köln Instant Flocken)
Hafer/Hefeextraktmedium (nach Clements, 1983):	3,5 g Hafer 0,1 g Hefeextrakt } pro 1 dest. H ₂ O (Merck)
c) Nähragar:	
Die vier Hauptmedien wurden mit 10 g Agar (Merck) /l versetzt. Nach der pH-Einstellung auf 5,9 mit 0,1 N HCl erfolgte das Autoklavieren für 20 min bei 119°C (1 bar).	

* Das Grundmedium wurde aus den 20fach konzentrierten Stammlösungen (jeweils durch geschwungene Klammer gekennzeichnet) zusammengesetzt.

der Myzelfront auf Stärkeagar (Tab. 2) überimpft. Die Übertragung auf neues Medium erfolgte im Abstand von jeweils zwei Monaten.

Symbiotische Anzucht der Orchideen

Kulturgefäße: Für die Anzucht wurden sterile Plastik-Petrischalen mit einem Durchmesser von 90 mm verwendet, die durch eine Trennwand in zwei Hälften geteilt waren. Die eine Seite wurde bis zur Höhe der Trennwand mit einem Nähragar zur Anzucht von Orchideen gefüllt (23 ml), die andere Seite mit entsprechender Menge Wasseragar (10 g Agar pro 1 l dest. H₂O).

Beimpfen mit dem Mykorrhizapilz: Die geteilten Kulturgefäße wurden in jeweils 15 Ansätzen im Zentrum mit dem gewünschten Mykorrhizapilz beimpft. Spätestens nach zehn Tagen bei 18°C waren beide Seiten der Petrischale vollständig mit Myzel bewachsen.

Oberflächensterilisation und Aussaat der Orchideensamen: Samenmaterial von *Dactylorhiza maculata*, *D. ericetorum*, *D. majalis*, *D. maj. x purpurella*, *D. praetermissa* wurde freundlicherweise von der Deutschen Orchideengesellschaft (Saattauschzentrale), von Frau von Ramin (Frankfurt, Palmengarten) und von Prof. Dr. Webster (University of Exeter, England) zur Verfügung gestellt. Das Saatgut wurde bis zur Aussaat trocken bei 4°C gelagert.

Zur Oberflächensterilisation wurden die Samen in kleineren Portionen 5 min lang in 5% (w/v) Natriumhypochlorit mit 1% (w/v) Tween 80 zur Benetzung auf einer Glasfritte (M. Meyer, 6368 Vilbel-Heilsberg) inkubiert und nach Absaugen der Lösung dreimal mit sterilem dest. H₂O nachgewaschen. Zur Aussaat verteilte man die Samen mit einer Impföse gleichmäßig auf beide Agarhälften der vom Pilz bewachsenen Petrischalen. Die Anzucht erfolgte bei 18°C im Dunkeln.

Die Knospenruhe der Protokorme wurde durch eine Kältebehandlung (5°C) für zwölf Wochen im Dunkeln gebrochen.

Ergebnisse

Zur Isolierung von Mykorrhizapilzen wurden Wurzeln von *Dactylorhiza maculata* herangezogen. Bei stärkerer Vergrößerung von Wurzelquerschnitten waren im verpilzten Gewebe intrazellulär knäuelartig aufgewickelte Pilzhyphen zu erkennen (Abb. 2a). In derselben Gewebezone fanden sich jedoch auch degenerierende und sogar völlig verdaute Hyphenknäuel (Abb. 2b). Eine klare Trennung in eine Pilzwirtszone und eine Pilzverdauungszone konnte nicht beobachtet werden.

Für die Isolierung der Mykorrhizapilze wurden zwei Verfahren getestet: 1. Auswachsen der Pilze aus dünnen Scheiben oberflächensterilisierter Wurzeln in das Kulturmedium (vgl. Tab. 1). 2. Entnahme von unverdauten Hyphenknäueln aus zerzupften Wurzelhälften und Übertragung in das Medium. In beiden Fällen ergab sich ein raschwüchsiges Myzel mit breiten, an den Septen eingeschnürten Hyphen (Abb. 2c), das nach dem Bestimmungsschlüssel von Arx (1981) der Formgattung *Rhizoctonia* zugeordnet werden konnte. Entsprechend der Nomenklatur von Burgelff (1936) handelte es sich um die Formart *Rhizoctonia Stahlii*.

Im Gegensatz zu den Isolat aus *Dactylorhiza* erbrachten die beiden Verfahren bei anderen Orchideenarten (z. B. *Gymnadenia conopsea*, *Orchis morio*) sehr unterschiedliche Resultate. Nach der Oberflächensterilisation wuchsen neben *Rhizoctonia*-Arten verschiedene Bodensaprophyten aus, die u. a. den Gattungen *Mucor* und *Trichoderma* zugeordnet werden konnten.

Zur Samenkeimung und Weiterentwicklung von *Dactylorhiza maculata* in Gegenwart des Mykorrhizapilzes wurden geteilte Petrischalen verwendet, die auf der einen Hälfte mit einem Nähragar und auf der anderen Hälfte mit Wasseragar beschickt waren. Als Nähragar-Varianten wurden Medien auf Zellulose-, Stärke-, Hafer- sowie Hafer/Hefeextrakt-Basis getestet. Nach der Beimpfung mit *Rhizoctonia Stahlii* im Zentrum und Bebrütung bei 18°C für 10 Tage erfolgte die Aussaat der oberflächensterilisierten Samen auf der Nähr- sowie auf der Wasseragar-Seite.

Hinsichtlich der Samenkeimung ergaben sich bei den verschiedenen Medien nur geringfügige Unterschiede. Anders dagegen verlief die Protokorm-Entwicklung (Abb. 3), wobei die Differenzen zwischen der Nähr- und Wasseragar-Seite einer Platte mit einer Ausnahme wesentlich geringer waren als zwischen den Kulturgefäßen mit verschiedenen Nährmedien. Auf der Schale mit Zellulose-Agar (Abb. 3A) entwickelten sich nur wenige Protokorme, die auch nur eine geringe Größe erreichten. Auch auf Hafermedium (Abb. 3B) blieb die Protokormzahl klein; auf der Nähragar-Seite entstanden jedoch große Protokorme. Auf dem Hafer-Hefeextraktmedium (Abb. 3C) wurden die Protokorme bald nach der Keimung

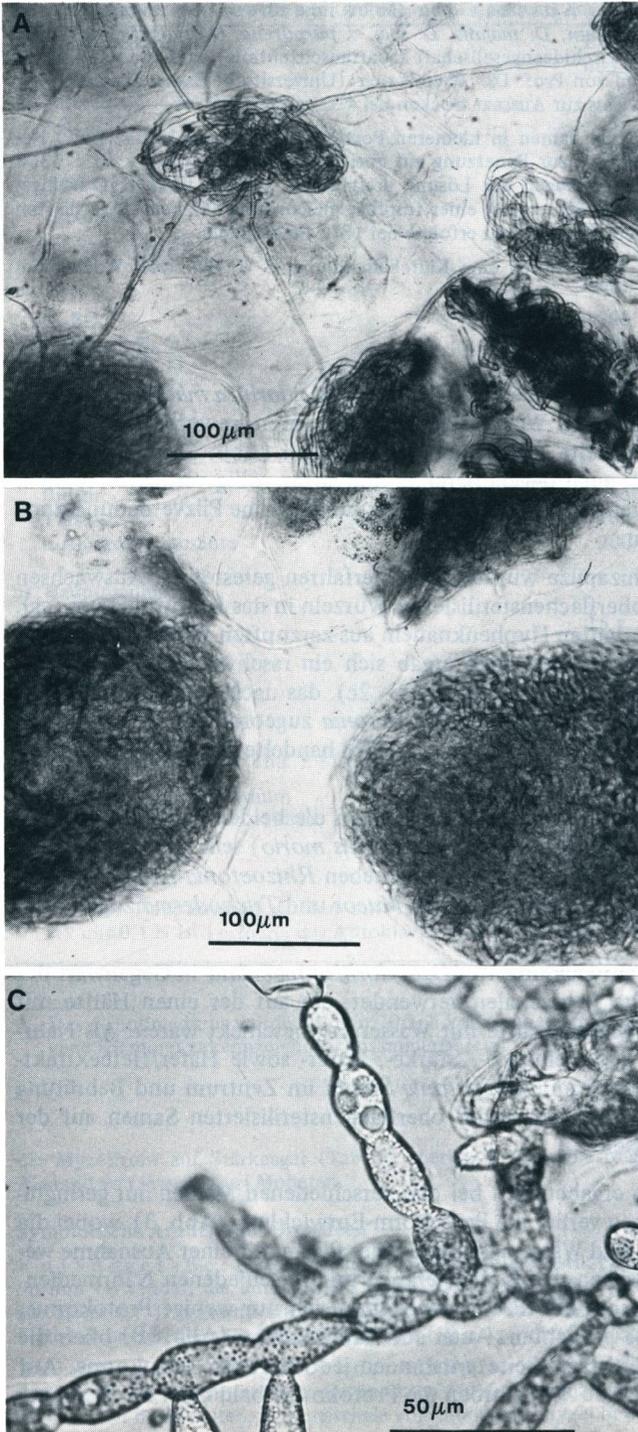


Abb. 2: Mykorrhiza von *D. maculata*.

A) Hyphenknäuel aus Pilzwirtszellen. Die Pilzknäuel stehen mit den Knäueln der Nachbarzellen durch Hyphenbrücken in Verbindung. Anfärbung mit Anilinblau (0,05% in Lactophenol).

B) Degenerierende Hyphenknäuel. An der schwächeren Anilinfärbung der Hyphenknäuel läßt sich die von innen nach außen fortschreitende Degeneration erkennen.

C) *Rhizoctonia Stahlīi* in Agarkultur: Monilioides Myzel.

Fig. 2: Mycorrhiza of *D. maculata*.

A) Hyphal balls from host cells. There are hyphal connections between hyphal balls of neighbouring cells. The specimens were stained with anilin blue (0.05% in lactophenol).

B) Degenerating hyphal balls. The degeneration proceeds outwards. It can be recognized by the weakening of the anilin blue staining.

C) *Rhizoctonia Stahlīi* in an agar culture. Moniloid mycelium.

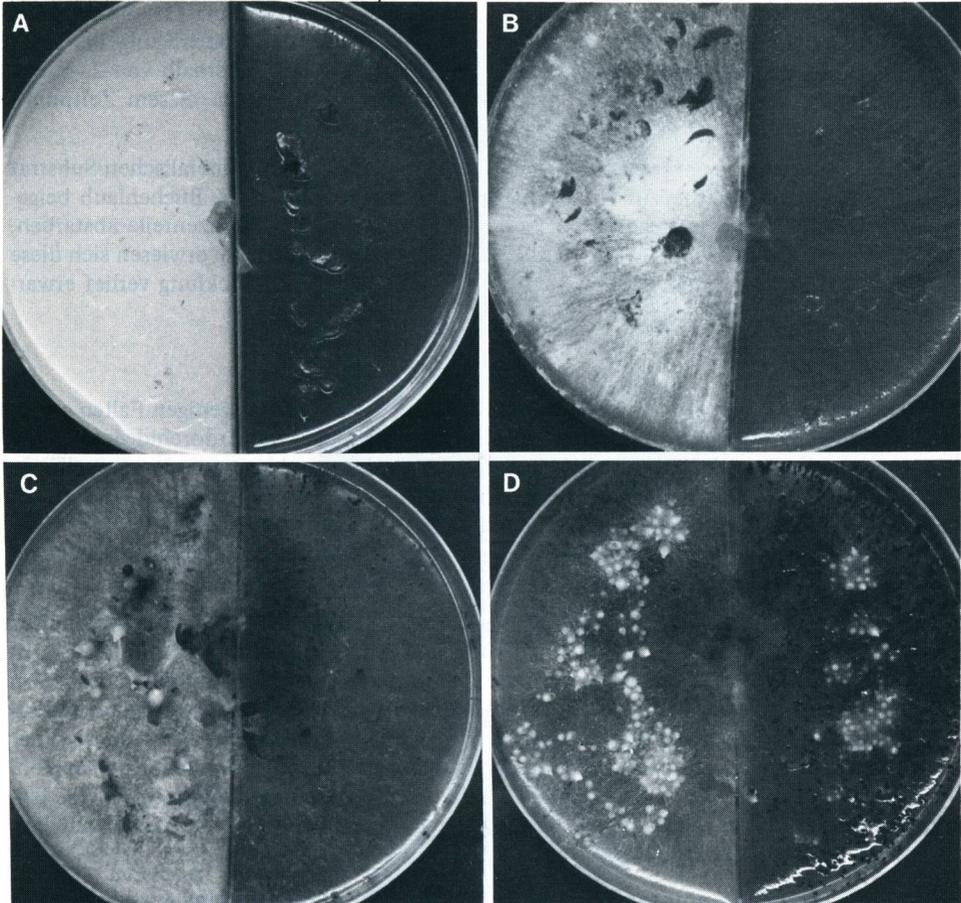


Abb. 3: Protokormentwicklung auf verschiedenen Medien.

Linke Hälfte: Nähragar,
Rechte Hälfte: Wasseragar.

- A) Zelluloseagar,
- B) Hafer- Hefeextraktagar,
- C) Haferagar,
- D) Stärkeagar.

Fig. 3: Development of protocorms on different media.

Left part: Nutrient agar. Right part: Water agar.

- A) cellulose agar;
- B) Oatmeal-yeast extract agar;
- C) Oatmeal-agar;
- D) Starch agar.

vom Pilz parasitiert und starben ab. Eine optimale Protokorbildung erfolgte auf der Schale mit Stärkemedium (Abb. 3D), bei der sich aus den Samen innerhalb von dreizehn Wochen allgemein große Protokorme bildeten (Abb. 4A). *Dactylorhiza maculata*, *D. ericetorum*, *D. majalis*, *D. maj. x purpurella* und *D. praetermissa* entwickelten sich vergleichsweise ähnlich und zeigten nur geringfügige Unterschiede.

Für die Weiterentwicklung der Protokorme war eine Kältebehandlung (12 Wochen bei 5°C) erforderlich, um die Knospenruhe zu brechen. Nach der Übertragung ins Licht (Osram-Fluora, ca. $15 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bei 18°C entwickelte sich innerhalb von 2–3 Wochen das erste Blättchen. Die nicht gekühlten Kontrollen waren zu diesem Zeitpunkt schon längst abgestorben.

Die jungen Pflänzchen konnten anschließend getopft werden. Dem mineralischen Substrat (Blähton, 0–2 mm) wurde zur Ernährung des Mykorrhizapilzes 15% Buchenlaub beige-mischt. Als am Ende der Vegetationsperiode die oberirdischen Pflanzenteile abstarben, wurden einige Pflänzchen ausgetopft (Abb. 4B) und untersucht. Dabei erwiesen sich diese Orchideen-Jungpflanzen als stark mykorrhiziert. Die weitere Entwicklung verlief erwartungsgemäß.

Diskussion

Die symbiotische Kultur einheimischer Orchideen ist bisher nur in wenigen Fällen gelungen. S e i t z (1976) zeigte am Beispiel verschiedener europäischer Erdorchideen, daß die Anwesenheit des Symbionten das Wachstum beschleunigt und zu gesunden Keimlingen führt. Trotz beeindruckender Erfolge bei der asymbiotischen Aufzucht in-vitro (z. B. F r o s c h , 1983) erfordert das erfolgreiche Überleben unter natürlichen Bedingungen, d. h. in Konkurrenz mit anderen Organismen und weiteren Stresssituationen, anscheinend die Anwesenheit des Mykorrhizapilzes.

Die gezielte Mykorrhizierung verlangt folgende Techniken: 1. Isolierung und Reinkultur geeigneter Mykorrhizapilze, 2. Mykorrhizierung und Aufzucht der Orchideen. Diese Aufgabe wurde zum ersten Mal von B e r n a r d (1903) am Beispiel tropischer Orchideen gelöst. Er legte Wurzelsegmente auf einen passenden Nährboden. Die auswachsenden Wurzelpilze wurden anschließend mit den Orchideensamen kombiniert. Die Identifikation der tatsächlichen Endophyten erfolgte über diejenigen Samen, die zur Entwicklung gelangten. B u r g e f f (1909, 1936) führte die Oberflächensterilisation ein und verbesserte die Isolationsmethode. Er konnte damit die Beteiligung von Fusarien und anderen Schimmelpilzen an der Mykorrhizierung ausschließen.

Die Oberflächensterilisation garantiert jedoch noch nicht die Gewinnung des eigentlichen Mykorrhizapartners. Aus entsprechend behandelten Wurzelstücken, die auf Nährböden verteilt werden, wachsen häufig eine Reihe von Nicht-Mykorrhizapilzen aus. Entsprechende Beobachtungen machten H a r v a i s und H a d l e y (1967 b), bei *Orchis purpurella*, S e i t z (1976) bei verschiedenen europäischen Orchideen, V i j und S h a r m a (1983) bei indischen Orchideen. Dies überrascht nicht, da eine Reihe saprophytischer Pilze bei Orchideenwurzeln nicht nur oberflächlich, sondern auch inter- und sogar intrazellulär vorkommen (W a r c u p und T a l b o t , 1967).

Unsere eigenen Isolationsversuche, die in Anlehnung an B u r g e f f (1936) vorgenommen wurden, deckten sich mit diesen Beobachtungen: Neben *Rhizoctonia*-Formarten wurden insbesondere bei *Gymnadenia conopsea* und *Orchis morio* weit verbreitete Bodensaprophyten wie *Trichoderma* und *Mucor* erhalten. Da auch viele *Rhizoctonia*-Species unter diese Rubrik fallen, gewährleistet ein *Rhizoctonia*-Isolat mit dieser Methode nicht den tatsächlichen Symbionten.

Durch eine gezielte Entnahme von Hyphenknäueln aus der Wurzel kann diese Gefahr jedoch weitgehend umgangen werden. So konnten unsere sämtlichen Hyphenisolate aus *D. maculata* der Formart *Rhizoctonia StahlII* H. Burgeff (1936) und Isolate aus *Gymnadenia conopsea* und aus *Orchis morio* der Formart *Rhizoctonia repens* N. Bernard (1909)

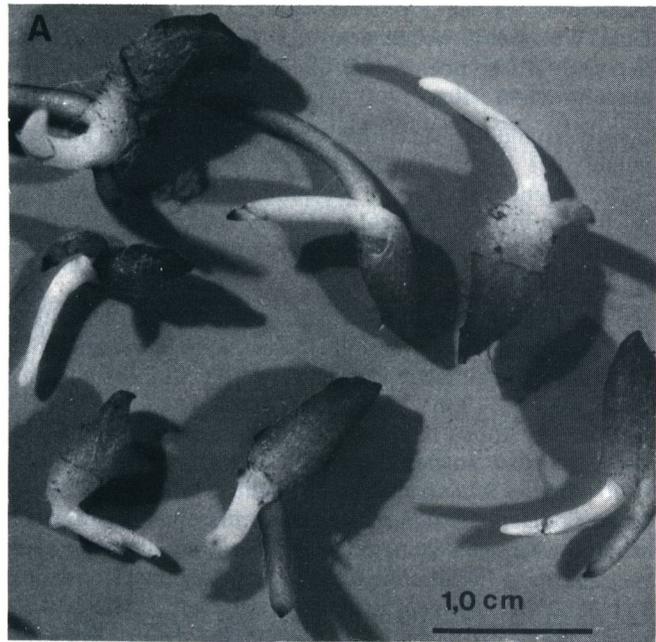


Abb. 4: Entwicklungsstadien von *D. maculata*.

A) Drei Monate nach der Aussaat. – Ein großer Teil der Protokorme zeigt neben dem Sproß die erste Wurzel. Die Pflänzchen wurden in der 9. Woche pikiert.

B) Zwölf Monate alte Jungpflanze mit neu gebildeter Winterknospe und sproßbürtigen Wurzeln. Diese zeigen die für *Dactylorhiza* charakteristische fingerförmige Anordnung.

Fig. 4: Developmental stages of *D. maculata*.

A) Three months after sowing. Most protocorms have developed in addition to the shoot the first root. The plants were transplanted after nine weeks.

B) Twelve months old plants with newly formed winter bud and roots. They exhibit the characteristic finger-like arrangement.

zugeordnet werden. Probleme ergeben sich höchstens bei Doppelinfectionen, bei denen in einer Wurzelzelle neben dem eigentlichen Symbionten ein Nicht-Symbiont vorkommt, der ebenfalls Hyphenknäuel bildet (vgl. W a r c u p , 1971). Solche Fälle sind jedoch ausgesprochen selten.

Selbstverständlich setzt die direkte Hyphenentnahme eine kräftige Mykorrhizierung voraus, wie sie bei den meisten europäischen Orchideen bereits kurz hinter der Wurzelspitze gegeben ist (F u c h s und Z i e g e n s p e c k , 1925). Ausnahmen machen jedoch *Cypripedium calceolus*, *Listera ovata*, *Cephalanthera alba* sowie einige *Epipactis*-Arten, die als erwachsene Pflanzen völlig autotroph sind und nur selten einen Mykorrhizapilz beherbergen.

Bei der Zusammenstellung des Nähragars müssen in erster Linie die speziellen Nährstoffansprüche der Mykorrhizapilze berücksichtigt werden. Als C-Quelle werden Polysaccharide ebenso wie einfache Zucker verwertet. Stärke, die von Pilzen gut abgebaut wird (vgl. B u r g e f f , 1936), bietet den Vorteil, eine Reihe von Fremdorganismen auszuschalten, welche den Abbau nicht vollziehen können. Nach unserer Erfahrung hat sich die Zugabe von Streptomycin bewährt, das durch Angriff auf 70 S-Ribosomen das Bakterienwachstum hemmt. Als organische N-Quelle wurde die Aminosäure Asparagin eingesetzt, die einen üppigen, buschigen Wuchs verursacht. Dieses Wachstumsverhalten wäre nur bei schwachwüchsigen Symbionten ein Nachteil, die unter diesen Bedingungen nicht rasch genug aus dem Gefahrenbereich einer möglichen Kontamination herauswachsen könnten.

Die Spezifität der Mykorrhizapilze von europäischen Orchideen ist anscheinend relativ gering (H a d l e y , 1970; W a r c u p , 1975; H a r v a i s und H a d l e y , 1967 a). Die wenigen bisher vorliegenden Ergebnisse beziehen sich jedoch lediglich auf die Samenkeimung und Protokorm-Bildung einer beschränkten Anzahl europäischer Orchideenarten. Insbesondere *Orchis morio* und *Dactylorhiza purpurella* zeigten in Gegenwart von *Rhizoctonia*-Isolaten verschiedener Herkunft eine nur geringe Spezifität.

Beim Aufbau einer stabilen Symbiose spielt das Nährmedium eine entscheidende Rolle. Dieser Tatsache wurde in der Literatur bisher wenig Beachtung geschenkt. Durch geeignete Wahl der Einzelkomponenten müssen die unerwünschten Extremfälle – Ausbleiben der Symbiose oder Parasitismus des Mykorrhizapilzes – vermieden werden. Modifikationen der ursprünglich mineralischen Symbioseböden durch Zugabe von Hefe- oder Kartoffelextrakt brachten nur in Ausnahmefällen ein besseres Wachstum der Orchideenkeimlinge. Wirksamer zeigte sich dagegen eine Variation der C- und N-Quelle.

Als C-Quelle bewährte sich bisher vor allem Zellulose und ermöglichte ein ausgewogenes Wachstum (H a d l e y , 1969). Einfache Zucker führten dagegen oftmals zu einer zu starken Virulenz des Pilzes. Lösliche Stärke, wie sie von B u r g e f f (1936) benutzt wurde, zeigte diese negativen Eigenschaften nicht. Brauchbare Ergebnisse erhielten W a r c u p (1981), C l e m e n t s und E l l y a r d (1979) bei Verwendung eines einfachen Haferagars, der später durch C l e m e n t s (1983) mit Hefeextrakt ergänzt wurde.

Unsere Untersuchungen mit den genannten Medien ergaben für das Wachstum von *Dactylorhiza*-Protokormen sehr unterschiedliche Resultate. Als zusätzliche Variante wurde die Teilung der Agarplatten in eine Nähr- und eine Wasseragarhälfte eingeführt, wobei jedoch die gesamte Fläche mit Myzel bewachsen war. Über den Ferntransport wurde hierdurch eine indirekte Versorgung der Wasseragarhyphen mit Nährstoffen gewährleistet. Dieser Ansatz ermöglicht bei *Dactylorhiza ericetorum* Keimung und Wachstum auf der Wasseragarseite in Anwesenheit von *Rhizoctonia Stahlii* (persönliche Mitteilung von Herrn Prof. Dr. W e b s t e r , University of Exeter).

Das Wachstum des Mykorrhizapilzes auf der Wasseragarseite war gleich gut wie auf der Nähragarseite. Dasselbe galt u. a. für die Keimung und Protokormentwicklung von *Dactylorhiza*. Das langsame Wachstum der Protokorme auf dem Zelluloseboden spiegelte die geringe Verfügbarkeit dieser C-Quelle für *Rhizoctonia StahlII* unter den gegebenen Versuchsbedingungen wider. Als besser verwertbar erwies sich der Haferagar. Allerdings kamen hier nur wenige Protokorme zur Entwicklung. Auf dem Hafer- Hefeextraktagar zeigte sich *Rhizoctonia StahlII* als äußerst virulent, was sich im parasitären Verhalten äußerte. Das schnelle Wachstum der Protokorme von *Dactylorhiza* auf dem Stärkeagar in Symbiose mit *Rhizoctonia StahlII* bezeugte das ausgeglichene Kräfteverhältnis der Partner bei geringer Virulenz des Mykorrhizapilzes.

Die Virulenz von *Rhizoctonia StahlII* war jedoch auf der Wasseragarseite offensichtlich geringer. Dies zeigte sich jedenfalls im Zusammenhang mit anderen Orchideenarten (unveröffentlichte Resultate). Während die Samen von *Orchis morio* und *Anacamptis pyramidalis* auf der Stärkeagarseite lediglich aufquollen, erfolgte auf der Wasseragarseite des Stärkemediums die Samenkeimung und eine allerdings nur geringe Entwicklung der Protokorme.

W e i n h o l d und Mitarb. (1969, 1972) untersuchten den Einfluß der Ernährung auf die Virulenz von *Rhizoctonia solani*. Hier standen Virulenz und Pathogenität in enger Beziehung zum verfügbaren Nahrungsangebot. Dabei kam der Stickstoffquelle die größte Bedeutung zu. Für unsere Experimente wurde als N-Quelle Asparagin gewählt, da sie von den Symbionten gut verwertet wird – zumal von B u r g e f f (1936) Hinweise vorlagen, daß organischer Stickstoff das Zustandekommen der Symbiose erheblich fördert. Im Hinblick auf die Virulenz der Pilze sollte jedoch bei anderen Orchideenarten die Stickstoffquelle variiert werden.

Die symbiotische Kultur einheimischer Orchideen, wie *Dactylorhiza* ist insbesondere im Hinblick auf bessere Überlebenschancen beim Anpflanzen auf natürlichem Substrat aussichtsreich. Sie dürfte nicht nur als Möglichkeit für den Erwerbsgartenbau in Zukunft an Bedeutung gewinnen, sondern auch im Rahmen des Naturschutzes bei der Erhaltung bedrohter Orchideenarten praktische Anwendung finden.

Danksagung

Wir danken der Regierung von Oberbayern für die Genehmigung zur Entnahme von Wurzelproben sowie der Deutschen Orchideengesellschaft, Frau von Ramin und Herrn Prof. Dr. J. Webster für die Überlassung von Orchideensamen. Besonderen Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. M. Seitz, Bonn, Universitätsklinik, für die wertvolle Korrespondenz.

Literatur

- ALEXANDER, C., I. J. ALEXANDER & G. HADLEY (1984) – Phosphate uptake by *Goodyera repens* in relation to mycorrhizal infection. New Phytol. 97: 401–411.
- ARX, v. J. A. (1981) – The genera of fungi sporulating in pure culture. J. Cramer, Vaduz.
- BERNARD, N. (1899) – Sur la germination du *Neottia nidus-avis*. 128: 1253–1255.
- (1903) – La germination des Orchides. Comp. Rend. Acad. Sci, Paris 137: 483–485.
 - (1909) – L'évolution dans la symbiose. Les Orchidees et leur champignons commensaux. Ann. Sci. Nat. Bot. 9: 1–196.
- BORRIS, H. (1969) – Samenvermehrung und Anzucht europäischer Erdorchideen. Berichte des 2. Europäischen Orchideenkongress.
- BURGEFF, H. (1909) – Die Wurzelpilze der Orchideen, ihre Kultur und ihr Leben in der Pflanze. G. Fischer, Jena.
- (1932) – „Saprophytismus und Symbiose“. G. Fischer, Jena.
 - (1936) – Die Samenkeimung der Orchideen. G. Fischer, Jena.
 - (1954) – Samenkeimung und Kultur europäischer Erdorchideen. G. Fischer, Stuttgart.

- BURGES, A. (1939) – The defensive mechanism in orchid mycorrhiza. *New Phytol.* 38: 273–283.
- CLEMENTS, M. A. (1983) – Propagation of orchids using symbiotic fungi. Combined Proceedings International Plant Propagators Society, publ. 1983.
- & R. K. ELLYARD (1979) – The symbiotic germination of Australian terrestrial orchids. *Am. Orchid. Soc. Bull.* 48: 810–816.
- FRECCERO, V. & C. FANELLI (1975) – Isolamento dei funghi micorrizogeni del *Pinus radiata*. *Pubblicazioni del Centro di Sperimentazione agricole et forestale* 13: 29–34.
- FROSCH, W. (1983) – Asymbiotische Vermehrung von *Orchis morio* mit der ersten Blüte nach 23 Monaten. In: „Probleme der Taxonomie, Verbreitung und Vermehrung europäischer und mediterraner Orchideen“. Sonderheft: Die Orchidee, 101–104.
- FUCHS, A. & H. ZIEGENSPECK (1925) – Bau und Form der Wurzeln der einheimischen Orchideen im Hinblick auf ihre Aufgaben. *Bot. Arch.* 12: 290–379.
- GÄUMANN, E. & H. KERN (1959) – Über die Isolierung und den chemischen Nachweis des Orchinols. *Phytopath. Z.* 35: 347–356.
- HADLEY, G. (1969) – Cellulose as a carbon source for orchid mycorrhiza. *New Phytol.* 68: 933–939.
- (1970) – Nonspecificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. *New Phytol.* 69: 1015–1033.
- (1975) – Fine structure of orchid mycorrhiza. In: *Endomycorrhizas* (Sanders, F. E., B. Mosse & P. B. Tinker, eds.) 335–351 Academic Press, London, New York.
- (1983) – Symbiotic germination of orchid seed. *The Orchid Review*, 91: 44–47.
- , R. P. C. JOHNSON & D. A. JOHN (1971) – Fine structure of the host fungus interface in orchid mycorrhiza. *Planta* 100: 191–199.
- HARLEY, J. L. & S. E. SMITH (1983) – Mycorrhizal symbiosis. Academic Press Inc. (London) Ltd.
- HARVAIS, G. & G. HADLEY (1967 a) – The relationship between host and endophyte in orchid mycorrhiza. *New Phytol.* 66: 205–216.
- (1967 b) – The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures. *New Phytol.* 66: 217–230.
- HIJNER, J. A. & J. ARDITTI (1973) – Orchid mycorrhiza, vitamin production and requirements by the symbiont. *Am. J. Bot.* 60: 829–835.
- HOCK, B. & A. BARTUNEK (1984) – Ektomykorrhiza. *Naturwiss. Rundschau* 11: 437–444.
- KNUDSON, L. (1922) – Non-symbiotic germination of orchid seeds. *Bot. Gaz.* 75: 1–25.
- (1930) – Flower production by orchid grown non-symbiotically. *Bot. Gaz.* 89: 192–199.
- LEWIS, D. H. (1973) – Concepts in fungal nutrition and the origin of biotrophy. *Biol. Rev.* 48: 261–278.
- NIEUWDORP, P. J. (1972) – Some observations with light and electron microscope on the endotrophic mycorrhiza of orchids. *Acta bot. neerl.* 21: 128–144.
- SEITZ, H. M. (1976) – Symbiotische Samenkeimung bei europäischen Orchideen. *Tagungsber. 8. Welt-Orch. Konf.* 343–350.
- SMITH, S. E. (1967) – Carbohydrate translocation in orchid mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 66: 371–378.
- STOESSL, A. & J. ARDITTI (1984) – Orchid Phytoalexins. In: *Orchid Biology: Reviews and Perspectives III*. Ed. by Arditti, J., Cornell University Press, Ithaca, USA.
- STRULLU, D. G. & J. P. GOURRET (1974) – Ultrastructure et evolution du champignon symbiotique des racines de *Dactylorhiza maculata*. *J. Microscop. Paris*, 20: 285–294.
- VII, S. P. & M. SHARMA (1983) – Mycorrhizal associations in North Indian Orchidaceae – A morphological study – *Bibliotheca Mycologica* 91: 467–503.
- WAHRLICH, W. (1886) – Beiträge zur Kenntnis der Orchideenwurzelpilze. *Bot. Zeit.* 44: 480–487.
- WARCUP, J. H. (1971) – Specificity of mycorrhizal association in some Australian terrestrial orchids. *New Phytol.* 70: 41–46.
- (1975) – Factors affecting symbiotic germination of orchid seeds. In: „Endomycorrhizas“ (Sanders, F. E., B. Mosse & P. B. Tinker, Edts.) 87–104, Acad. Press, London, New York.
- (1981) – The mycorrhizal relationship of Australian orchids. *New Phytol.* 87: 371–387.
- & P. H. B. TALBOT (1967) – Perfect states of *Rhizoctonias* associated with orchids. *New Phytol.* 66: 631–641.
- WEINHOLD, A., T. BOWMAN & R. DODMAN (1969) – Virulence of *Rhizoctonia solani* as affected by nutrition of the pathogen. *Phytopathol.* 59: 1601–1605.
- (1972) – Influence of exogenous nutrition on virulence of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol.* 62: 278–281.
- WILLIAMSON, B. (1970) – Induced DNA synthesis in orchid mycorrhiza. *Planta* 92: 347–354.



Deutsche Gesellschaft für Mykologie e.V.
German Mycological Society

Dieses Werk stammt aus einer Publikation der DGfM.

www.dgfm-ev.de

Über [Zobodat](#) werden Artikel aus den Heften der pilzkundlichen Fachgesellschaft kostenfrei als PDF-Dateien zugänglich gemacht:

- **Zeitschrift für Mykologie**
Mykologische Fachartikel (2× jährlich)
- **Zeitschrift für Pilzkunde**
(Name der Hefreihe bis 1977)
- **DGfM-Mitteilungen**
Neues aus dem Vereinsleben (2× jährlich)
- **Beihefte der Zeitschrift für Mykologie**
Artikel zu Themenschwerpunkten (unregelmäßig)

Dieses Werk steht unter der [Creative Commons Namensnennung - Keine Bearbeitungen 4.0 International Lizenz](#) (CC BY-ND 4.0).



- **Teilen:** Sie dürfen das Werk bzw. den Inhalt vervielfältigen, verbreiten und öffentlich zugänglich machen, sogar kommerziell.
- **Namensnennung:** Sie müssen die Namen der Autor/innen bzw. Rechteinhaber/innen in der von ihnen festgelegten Weise nennen.
- **Keine Bearbeitungen:** Das Werk bzw. dieser Inhalt darf nicht bearbeitet, abgewandelt oder in anderer Weise verändert werden.

Es gelten die [vollständigen Lizenzbedingungen](#), wovon eine [offizielle deutsche Übersetzung](#) existiert. Freigebiger lizenzierte Teile eines Werks (z.B. CC BY-SA) bleiben hiervon unberührt.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Zeitschrift für Mykologie - Journal of the German Mycological Society](#)

Jahr/Year: 1985

Band/Volume: [51_1985](#)

Autor(en)/Author(s): Beyrle H., Penningsfeld F., Hock B.

Artikel/Article: [Orchideenmykorrhiza: Symbiotische Anzucht einiger Dactylorhiza-Arten 185-198](#)