

## Einfluß des Wassergehaltes auf die Frostresistenz von *Flammulina velutipes*

C. FADERL, M. MOSER

Institut für Mikrobiologie der Universität Innsbruck  
Technikerstraße 25, A-6020 Innsbruck, Austria

Eingegangen am 13.5.1988

C. Faderl, M. Moser (1988) – Influence of water content on the frost resistance of *Flammulina velutipes*.  
Z. Mykol. 54(2): 127–138.

**Key Words:** *Flammulina velutipes*, frost resistance, frost damage, water content

**Abstract:** Freezing damage of *Flammulina velutipes* (*Agaricaceae*) was examined on experimentally frozen cap segments by using visual characteristics, intravital fluorescein diacetate (FDA) staining and sporulation tests, and by measuring the electric conductivity. Different plectenchymae of one cap and even different hyphae within one plectenchyma show variations in resistance to freezing. Cell membranes of hyphae within cap and gill trama are irreversibly damaged during the process of freeze-thawing below  $-7^{\circ}\text{C}$ . Sporulation decreases only after an exposure below  $-12^{\circ}\text{C}$ , but the FDA degrading enzymes in the hymenial layers are still active after a period at  $-27^{\circ}\text{C}$ . The water content of the cap at the time of freezing is reciprocally correlated with its frost resistance, but this correlation is absent in caps with low water content.

**Zusammenfassung:** Künstlich gefrorene Segmente aus den Hüten von *Flammulina velutipes* (*Agaricaceae*) wurden mit Hilfe visueller Merkmale, einem elektrischen Leitfähigkeitstest, einer Lebendfärbung mit Fluoresceindiäacetat (FDA) und einem Sporulationstest auf Schädigungen infolge des Einfrierens untersucht. Zwischen verschiedenen Plektenchymen eines Fruchtkörpers und zwischen verschiedenen Hyphen eines Plektenchyms treten Resistenzunterschiede auf. Die Zellmembran von Hyphen der Hut- und der Lamellentrama wird während des Gefrier-Auftau-Prozesses irreversibel bei einer Temperatur unter  $-7^{\circ}\text{C}$  geschädigt, das Sporulationsvermögen nimmt erst nach einer Exposition unter  $-12^{\circ}\text{C}$  ab, FDA-spaltende Enzyme sind jedoch noch nach einem Einfrieren auf  $-27^{\circ}\text{C}$  im Hymenialbereich aktiv. Der Wassergehalt der Hüte, zum Zeitpunkt des Einfrierens ist reziprok mit deren Frostresistenz korreliert, diese Korrelation fehlt jedoch bei Hüten mit niedrigem Wassergehalt.

Frosttemperaturen stellen für das Überleben der Fruchtkörper vieler Basidiomyzeten einen limitierenden Faktor dar. Die Fruchtkörper einiger Pilzarten, z. B. *Camarophyllus niveus* (Scop.: Fr.) Karst., *Clitocybe dealbata* (Sow.: Fr.) Kumm. und *Lepista personata* (Fr.: Fr.) Cke. sind jedoch tolerant gegenüber Frösten (Buller 1909, Pirk 1963). Manche können auch wiederholtes Gefrieren und Auftauen überleben und danach weitersporulieren, so die ökologisch interessante Gruppe der in der alpinen und arktischen Tundra wachsenden, etwa *Entoloma alpiculum* (Favre) Noordel., *Lepista multiforme* (Romell) Gulden, *Cortinarius favrei* Henders. und *Arrhenia auriscalpium* Fr., sowie Arten, die in milden Wintern fruktifizieren, wie *Hypholoma capnoides* (Fr.: Fr.) Kumm. und verschiedene Stämme von *Pleurotus ostreatus* (Jacq.; Fr.) Kumm. und *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Karst. (Ingold 1978, 1981, 1982, Moser unveröffentl.). Sie weisen eine protoplasmatische Resistenz gegenüber einer Frostdehydratation auf (Levitt 1958). Auch die Myzelien vieler

Mykorrhizapilze sind frostresistent. An ihnen wurden inter- und intraspezifische Unterschiede in der Frostresistenz festgestellt (France & al. 1979). Diese lassen ökotypische Trends erkennen, beispielsweise eine höhere Resistenz von Hochlagenstämmen gegenüber Tieflagenstämmen; daher sollte für die künstliche Mykorrhizabeimpfung von Pflanzen für Hochlagenaufforstungen möglichst frostresistentes Inokulum herangezogen werden (Moser 1958a). Ökotypische Unterschiede bestehen auch zwischen verschiedenen Stämmen von *Flammulina velutipes* hinsichtlich des jahreszeitlichen Auftretens der Fruchtkörper. Es gibt im Winter fruktifizierende und im Sommer fruktifizierende Stämme; Winterstämme bilden auch unter Laborbedingungen nur bei tieferen Temperaturen Fruchtkörper im Gegensatz zu Sommerstämmen (Moser unveröffentl., Mori persönl. Mitteilung). Möglicherweise bestehen zwischen den Fruchtkörpern der verschiedenen Ökotypen Unterschiede in ihrer Frostresistenz: Ursache dafür könnten genetisch bedingte Unterschiede in bezug auf bestimmte Inhaltsstoffe, wie Zuckergehalt, verschiedene Proteintypen usw. sein. *Flammulina velutipes* ist somit ein gutes Versuchsobjekt für die Untersuchung der Frostresistenz von Basidiomyzeten.

Bei Pflanzen hat sich die Frostresistenz als eine komplexe Eigenschaft erwiesen (Sakai & al. 1987, Larcher 1985), die im Rahmen der durch die Erbanlagen bedingten Reaktionsnorm von mehreren Faktoren weitgehend gesteuert wird. Über den Einfluß solcher Faktoren auf die Frostresistenz der Fruchtkörper von Basidiomyzeten ist bisher nichts bekannt. Ihre Kenntnis kann allerdings wichtig für die Interpretation der Ergebnisse von Frostresistenzmessungen sein (Gusta & al. 1977) und darüber hinaus durch die Art und Weise ihrer Wirkung Informationen über die Ursache der Frostresistenz bzw. einer Schädigung durch Frost liefern.

Diese Arbeit befaßt sich mit dem Einfluß des Wassergehaltes auf die Frostresistenz der Fruchtkörper von *Flammulina velutipes*. An künstlich gefrorenen Fruchtkörpersegmenten wurde überprüft, ob zwischen dem prozentualen Eisgehalt im Plektenchym und der Frostresistenz ein Zusammenhang besteht. Geschädigte Plektenchyme bzw. Zellen wurden räumlich lokalisiert sowie der Zeitpunkt von Membranschädigungen ermittelt. Zur Erfassung der Schäden kamen verschiedene Diagnoseverfahren zur Anwendung: visueller Schädigungstest, Sporulationstest, Vitalfärbung mit FDA und Leitfähigkeitstest.

## Material und Methoden

### Züchten der Fruchtkörper

Das Züchten der Fruchtkörper von *Flammulina velutipes* erfolgte unter künstlichen Bedingungen auf supplementiertem Stroh. Polypropylensäcke (40/60 cm) wurden unter Zugabe von 0,5 l Leitungswasser prall mit Stroh gefüllt und nach dem Zubinden der Öffnungen mit Aluminiumdraht für eine Stunde bei 120°C autoklaviert. Zur Herstellung des Inokulums wurden nach der Methode von Moser (1958b) Isolate aus einem Anfang Oktober 1984 im Almtal/Oberösterreich gefundenen Fruchtkörper gewonnen, diese auf 4 % Malzagarplatten (MP) bei 18°C inkubiert, aus unkontaminierten Kulturen erneut auf MP überimpft und bei 25°C bebrütet. Hatten die Myzelspitzen bis auf wenige mm den Rand der Petrischalen erreicht, so wurde gemäß Eger (1976a) jeweils eine 2 cm breite Randzone in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit 4 % Malzextraktbouillon übertragen und mit einer an einen Magneten geklebten Rasierklinge auf dem Magnetrührer bis zum Verschwinden größerer Agarstücke zerkleinert. Das Beimpfen und Supplementieren des Strohs erfolgte unter sterilen Bedingungen jeweils mit dem Inhalt eines Erlenmeyerkolbens pro Sack. Die nur lose zugebundenen (Gasaustausch!) Strohkulturen wurden nach einer siebenwöchigen Anwachphase bei 25°C zur Fruchtkörperinduktion bei 18°C exponiert, beim Auftreten der ersten Primordien vom Sackmaterial befreit, in mit feuchtem Zellstoff ausgelegte Plastikwannen (60/40/30) gegeben, mit perforierter Plastikfolie abgedeckt und alle paar Tage mit einem Wasserzerstäuber befeuchtet. Die Gefrierversuche erfolgten nur an älteren, d. h. voll aufgeschirmten Fruchtkörpern von 2 bis 4 cm Durchmesser.

### **Einfrieren der Proben**

Vom Stiel getrennte Hüte wurden mit einer Rasierklinge sektoral in mehrere, je nach deren Größe meist in vier Stücke zerteilt, und diese mit einer Stecknadel am Probenhalter (Petrischale mit angeklebter 4 mm dicker Korkscheibe) befestigt (s. Abb. 1). Der Probenhalter mit der einzufrierenden Probe wurde mit einem Gummiband so am Meßfühlerhalter fixiert, daß das Kupfer-Konstantan-Thermoelement ins Innere der Huttrama reichte. Das Abkühlen der Probe erfolgte durch Exposition der aus Probenhalter und Meßfühlerhalter zusammengesetzten Gefrierkammer in einem Eisfach, wobei eine spontane Nukleation den Gefriervorgang einleitete. Bei Erreichen der gewünschten, simultan mit einer digitalen Datenerfassungsanlage registrierten Temperatur wurde die Gefrierkammer dem Eisfach wieder entnommen und der Probenhalter nach dem Auftauen der Probe auf einen mit feuchtem Zellstoff ausgelegten Deckel einer Petrischale gesetzt. Die Inkubationsdauer der Probe in der so entstandenen feuchten Kammer richtete sich nach dem jeweiligen Diagnoseverfahren. Die mittlere Einfriergeschwindigkeit zwischen 0°C und -20°C betrug etwa 2 K/min, das Auftauen erfolgte etwas rascher. Für die Untersuchung visueller Frostschäden wurden die Proben auf -2°C, -4°C, . . . , -20°C gefroren, für den histologischen Vitalitätstest auf -27°C, für den Leitfähigkeitstest und den Sporulationstest auf -3°C, -6°C, -9°C, -12°C, und für die Untersuchung der Wirkung des Wassergehaltes auf die Frostresistenz je nach Feuchtigkeitsgrad bei feuchten Proben im Bereich von -2°C bis -10°C, bei trockenem in einem tieferen Temperaturbereich, maximal bis -27°C.

### **Visueller Schädigungstest**

Die visuelle Schadensbeurteilung erfolgte durch vergleichende makroskopische Betrachtung von Versuchs- und Kontrollprobe. Die Kontrollprobe wurde jeweils demselben Fruchtkörper entnommen wie die Gefrierproben und wie diese am Probenhalter befestigt, jedoch ohne Auftauen sofort in der feuchten Kammer exponiert. Als Beurteilungskriterien wurden Farbe und Struktur der Hut- und Lamellentrama herangezogen. Der visuelle Schädigungstest wurde zur Untersuchung makroskopisch sichtbarer Veränderungen der Proben in Folge irreversibler Frostschäden unmittelbar nach dem Auftauen, sowie einen, zwei und drei Tage nach dem Auftauen angewendet.\*

### **Leitfähigkeitstest**

Mit dem Leitfähigkeitstest wurde die elektrische Leitfähigkeit im Plektenchym gemessen, um den Zeitpunkt von Membranschäden festzustellen. Diese äußern sich wegen vermehrt aus den Hyphen herausdiffundierender Ionen in einem Anstieg der Leitfähigkeit. Als Maß einer Schädigung diente der Versuchswert in Prozent des Kontrollwertes. Versuchs- und Kontrollwert wurden jeweils an derselben Probe vor und nach dem Einfrieren mit einer Stechelektrode gemessen. Die Elektrode setzte sich aus einem 1 cm langen Stück eines Plastiktrinkhalmes und zwei durch diesen zentral im Abstand von 7 mm gestochenen Stecknadeln mit angelöteten dünnen Kupferdrähten zusammen. Die mit dem Leitfähigkeitsmeßgerät PW9501/01 (Philips) bei einer Wechselspannung von 2000 Hz ermittelten Werte wurden jeweils temperaturkompensiert. Die Kontrollwerte wurden nach Stabilisierung der Leitfähigkeit, ca. 10 min nach dem Einstechen der Elektroden, unmittelbar vor dem Einfrieren gemessen, die Versuchswerte 12 und 24 min sowie 1, 2, 3, 4, 5 und 20 h nach dem Auftauen.

### **Histologischer Vitalitätstest mit FDA**

Mit dem histologischen Vitalitätstest wurden geschädigte Plektenchyme bzw. Zellen auf Handschnitten von schmalen sektoralen Hutteilen, jeweils bestehend aus einer Lamelle und der darüber befindlichen Huttrama räumlich eingegrenzt. Der Test beruht auf der Fähigkeit lebender Zellen, mit Hilfe verschiedener Enzyme aus Fluoresceindiacetat (FDA) das grün fluoreszierende Fluorescein abzuspalten. Die Schnitte von Versuchs- und Kontrollprobe (Kontrolle s. visueller Schädigungstest) wurden gleichzeitig unmittelbar nach dem Auftauen der Gefrierproben den Schneide- bzw. Färbeprozeduren unterworfen und vergleichend auf demselben Objektträger unter dem Durchlichtmikroskop betrachtet. Das Schneiden erfolgte in 0,45 % (v/w) phosphatgepufferter (pH 6, 0,0033M) Kochsalzlösung (KL), das Färben für 30 min in einer Färbelösung aus 10 ml KL und 100 µl FDA-(Sigma)-Stammlösung (5 mg FDA pro ml Aceton). Nach dem Waschen in KL wurden die Schnitte sofort mit einem Reichert-Biovar-Fluoreszenzmikroskop (Erregerfilter E2, Sperrfilter Sp2) untersucht.

\* Zur Untersuchung der Wirkung des Wassergehaltes auf die Frostresistenz wurde der Wert „zwei Tage nach dem Auftauen“ herangezogen.

### Sporulationstest

Die Wirkung des Einfrierens auf das Sporulationsvermögen wurde durch vergleichende Betrachtung von Deckgläsern mit Sporenabwürfen der Versuchs- und Kontrollproben (Kontrollprobe s. vis. Schädigungstest) abgeschätzt. Die Deckgläser mit 22 mm Kantenlänge wurden unmittelbar nach dem Auftauen der Proben gleichzeitig unter die Versuchs- und Kontrollproben auf den Zellstoff der feuchten Kammer (s. Abb. 1) gelegt und nach zwei Tagen wieder entnommen.

### Einfluß des Wassergehaltes auf die Frostresistenz: Testdurchführung

Vor dem Einfrieren wurde der Wassergehalt der von den Stielen getrennten Hüte bei 18°C variiert. Sie wurden entweder in einer feuchten Kammer durch mehrstündiges Liegen auf nassem Zellstoff mit Wasser gesättigt oder durch eintägiges Aufbewahren in einer Petrischale, die mit dem Deckel je nach gewünschtem Austrocknungsgrad fest oder nur lose verschlossen war, dehydriert. Anschließend wurden das Frischgewicht der Hüte bestimmt, die Hüte zerteilt und die Proben wie bereits beschrieben gefroren. Nach der visuellen Diagnose zwei Tage nach dem Auftauen wurden jeweils alle Proben desselben Fruchtkörpers (auch die Kontrollen) zusammengelegt, 24 h bei 80°C getrocknet, 10 min im Exsikkator abgekühlt und das Trockengewicht bestimmt. Aus dem Frisch- und Trockengewicht wurde der Wassergehalt der Hüte errechnet.

### Einfluß des Wassergehaltes auf die Frostresistenz: Testauswertung

Es wurden drei alternative Modelle über den Einfluß des Wassergehaltes auf die Frostresistenz formuliert und überprüft, welches davon mit den ermittelten Daten am besten übereinstimmte.

Modell A: Der Wassergehalt übt keinen Einfluß auf die Frostresistenz aus.

Modell B: Es gibt einen Einfluß des Wassergehaltes auf die Frostresistenz; er läßt sich nicht auf eine Korrelation des prozentualen Eisgehaltes mit einer Schädigung zurückführen.

Modell C: Der Einfluß des Wassergehaltes läßt sich auf eine Korrelation des prozentualen Eisgehaltes mit einer Schädigung zurückführen.

Um die Modelle B und C miteinander vergleichen zu können, wurde eine dem Prozentsatz des nicht gefrorenen Wassers proportionale Größe abgeleitet, die sowohl den Wassergehalt der Proben als auch deren maximale Gefriertemperatur beinhaltet. Den Ausgangspunkt der folgenden Überlegungen bildet Gl.(1), wonach der Prozentsatz des nicht gefrorenen Wassers ( $q$ ) in einer partiell gefrorenen idealen Lösung eines undissoziierten Stoffes dem Quotienten aus Molalität ( $m$ ) der Lösung vor dem Einfrieren durch die Gefriertemperatur  $T$  (in  $-^{\circ}\text{C}$ ) näherungsweise proportional ist (Mazur 1966).

$$q = 1.86 \cdot m / T \quad (1)$$

Da eine Zelle ein Gemisch verschiedener Lösungen enthält, muß Gl. (1) allgemeiner formuliert werden.

$$q = \sum ((m(i) \cdot \vartheta(i)) \cdot 1.86) / T \quad (2)$$

$\vartheta(i)$  ist der Dissoziationsgrad der Lösung  $i$ , die Molalität  $m(i)$  ist der Quotient aus Stoffmenge  $n(i)$  durch die Masse des Lösungsmittels  $m(w)$ , in diesem Fall des Wassers.

$$m(i) = n(i) / m(w) \quad (3)$$

Unter der Voraussetzung, daß das Verhältnis der Produkte aller  $m(i) \cdot \vartheta(i)$  sowie das Verhältnis der Masse der osmotisch wirksamen Substanzen (Zucker, Salze, . . .) zur Masse der osmotisch nicht wirksamen Substanzen (Lipide, Zellwand, . . .) bei allen Proben konstant ist, ist unter Verwendung eines Proportionalitätsfaktors  $k$

$$\sum (m(i) \cdot \vartheta(i)) = k \cdot m(t) / m(w), \quad (4)$$

wobei  $m(t)$  die Masse der gesamten Trockensubstanz angibt. Verwendet man als Maß für den Wassergehalt die Masse des Wassers pro Masse Trockensubstanz  $W_T$ , so ist

$$\sum (m(i) \cdot \vartheta(i)) = k / W_T \quad (5)$$

Eine dem Prozentsatz des nicht gefrorenen Wassers proportionale Größe  $P$  ist daher der Quotient aus reziprokem Wassergehalt  $W_T$  durch die Gefriertemperatur ( $c = \text{Proportionalitätsfaktor}$ ).

$$P = c \cdot q = 1 / (W_T \cdot T) \quad (6)$$

Werden die für die Gültigkeit der Gleichungen (1) und (4) formulierten Voraussetzungen erfüllt, so sind alle in einem Diagramm, in dem die Ordinate den reziproken Wassergehalt  $W_T$  und die Abszisse die Gefriertemperatur angeben, durch den 0-Punkt verlaufenden Geraden Isolinien für den prozentualen Eisgehalt. Lassen sich in diesem Diagramm halbgeschädigte Proben durch eine solche Gerade verbinden, dann korreliert ihr Schädigungsgrad daher mit dem prozentualen Eisgehalt.

Der Vergleich des Modells A mit den Modellen B und C erfolgte graphisch mit einem solchen Diagramm. Die Modelle B und C wurden unter Verwendung einer Probitanalyse für alternative Dosis-Wirkungs-Beziehungen (Baker & al. 1978, Fink & al. 1966) miteinander verglichen.

Die Beurteilung der Frostschäden erfolgte zwei Tage nach dem Einfrieren an Hand visueller Merkmale unter Verwendung einer dreiteiligen Schädigungsskala. Für den statistischen Vergleich der Modelle B und C mittels Probitanalyse wurde der abhängigen Variablen der Schädigungsgrad der Proben zugeordnet, wobei die beiden Klassen „keine Schädigung“ und „leichte Schädigung“ zu einer einzigen zusammengefaßt wurden. Bei Modell C wurde die unabhängige Variable mit dem P-Wert, also dem Quotienten aus reziprokem Wassergehalt  $W_T$  und Gefriertemperatur T der einzelnen Proben belegt. Bei Modell B wurde sie nur mit der Gefriertemperatur belegt, und eine Schar von Dosis-Wirkungskurven gleicher Steigung für verschiedene Wassergehalte angepaßt.

Die für die beiden Modelle als Maß für ihre Richtigkeit errechnete Deviance wurde mittels F-Test auf einen eventuell signifikanten Unterschied geprüft. Für Modell C wurde die  $LD_{50}$  errechnet; sie wurde als jener P-Wert ( $P_{50}$ ) definiert, bei welchem die Wahrscheinlichkeit für eine leichte bzw. keine Schädigung der Proben gleich groß war wie für eine schwere Schädigung.

## Ergebnisse

### Visuelle Veränderungen in Folge irreversibler Frostschäden

Makroskopisch sichtbare Veränderungen der gefrorenen Proben gegenüber den Kontrollen wurden in Abhängigkeit von der Gefriertemperatur und vom Zeitintervall zwischen Einfrieren und Schadensbewertung festgestellt. Unmittelbar nach dem Auftauen konnten Veränderungen im Aussehen schon ab einer Gefriertemperatur von etwa  $-3^{\circ}\text{C}$  beobachtet werden. Diese äußerten sich in einem glasigen Aussehen und einer weichen Konsistenz der Proben, einer leichten Schrumpfung der Huttrama und einer welligen Lamellenschneide. Mit dem Sinken der Gefriertemperatur verstärkten sich die Symptome. Eine Farbveränderung trat in keinem Fall auf.

Einen Tag nach dem Einfrieren waren die Veränderungen an den bis etwa  $-7^{\circ}\text{C}$  gefrorenen Proben meist wieder verschwunden. Waren diese jedoch auf tiefere Temperaturen gefroren worden, so blieben die Veränderungen in mehr oder weniger deutlicher Form erhalten, wobei noch eine Verfärbung hinzukommen konnte. Am zweiten Tag entsprach das Aussehen der Proben meist dem am ersten Tag festgestellten. In einigen Fällen traten Anzeichen einer Schädigung deutlicher zu Tage. Eine Diagnose am dritten Tag bestätigte immer das Ergebnis vom zweiten Tag.

Tab. 1: Klassifikation visueller Frostschäden

Tab. 1: Visual classification of freezing damage

Schadensklasse	Lamellenstruktur	Huttramastruktur	Farbe der Lamellen- oder Huttrama
keine Schädigung	wie Kontrolle	wie Kontrolle	wie Kontrolle
leichte Schädigung	gewellt bis verbogen	leicht geschrumpft	leichter Braunton
schwere Schädigung	gekippt	stark geschrumpft	braun

Eine Schädigung wurde an Hand der vier Merkmale Lamellenstruktur bzw. -farbe und Tramastruktur bzw. -farbe beurteilt. Das an jedem einzelnen Merkmal festgestellte Schädigungsmaß wurde gemäß Tab. 1 einer der drei Klassen „keine Schädigung“, „leichte Schädigung“ und „schwere Schädigung“ zugeordnet. Als Gesamtschaden einer Probe wurde jener maximale Schädigungsgrad definiert, der bei mindestens einem Merkmal auftrat.

Aus Abb. 2 geht das optimale Zeitintervall zwischen Einfrieren und Schadensbewertung zur Feststellung irreversibler Schäden hervor. Unmittelbar nach dem Auftauen ließen sich reversible und irreversible Schäden nicht voneinander unterscheiden. Nur die einen Tag nach dem Einfrieren festgestellten Schäden blieben erhalten und waren somit irreversibel, wurden aber erst am zweiten Tag vollständig manifest. Bei Verwendung visueller Merkmale gemäß Tab. 1 ließ sich die Frostresistenz daher am besten zwei Tage nach dem Einfrieren feststellen.

### Zeitpunkt einer Schädigung

Die elektrische Leitfähigkeit stieg unmittelbar nach dem Auftauen steil an, erreichte innerhalb der ersten halben Stunde einen Maximalwert, dessen Höhe von der Gefriertemperatur beeinflusst wurde und fiel dann langsam wieder ab (s. Abb. 3). Eine deutlich erhöhte Leitfähigkeit der bei  $-9^{\circ}\text{C}$  und  $-12^{\circ}\text{C}$  gefrorenen Proben war bereits unmittelbar nach dem Auftauen zu erkennen. Die mit Hilfe der Leitfähigkeitsmessung ermittelten Membranschädigungen traten somit während des Gefrier-Auftau-Prozesses auf.

### Histologischer Vitalitätstest mit FDA

In Schnitten der ungefrorenen Kontrollen wurden in allen Teilen der Trama viele Zellen mit grün fluoreszierendem Cytoplasma festgestellt. Die Schnitte der auf  $-27^{\circ}\text{C}$  gefrorenen Proben wiesen hinsichtlich der Huthaut, der Huttrama und der Lamellentrama ein unterschiedliches Färbeverhalten auf. In diesen Plektenchymen waren nur vereinzelt Zellen mit grünem Cytoplasma zu erkennen. Der Hymenialbereich war sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Gefrierproben in etwa gleichem Ausmaß gefärbt.

Zwischen den verschiedenen Plektenchymen eines Fruchtkörpers gab es somit deutliche Unterschiede in der Frostresistenz. Die Resistenz des Hymeniums war höher als die der Hut- und Lamellentrama sowie der Huthaut. Resistenzunterschiede bestanden auch zwischen Zellen desselben Plektenchyms.

### Wirkung des Einfrierens auf die Sporulation

Die bei  $-3$ ,  $-6$  und  $-9^{\circ}\text{C}$  gefrorenen Proben waren hinsichtlich der Dichte der Sporenabdrücke von den Kontrollen nicht zu unterscheiden. Erst die bei  $-12^{\circ}\text{C}$  gefrorenen ließen eine allerdings nur schwache Abnahme des Sporulationsvermögens erkennen.

### Einfluß des Wassergehaltes auf die Frostresistenz

Abb. 4 zeigt den Schädigungsgrad der Proben in Abhängigkeit von ihrem Wassergehalt und der Gefriertemperatur. Die Frostresistenz feuchter Proben mit einem Wassergehalt zwischen 8,3 und 20  $W_T$  ( $W_T$  = Gramm Wasser pro Gramm Trockensubstanz), reziprok zwischen 0,05 und 0,12  $1/W_T$ , wurde vom Wassergehalt stark beeinflusst; je höher der Wassergehalt, um so geringer die Frostresistenz. Die Frostresistenz trockener Proben zwischen 4,2 und 8,3  $W_T$  (zwischen 0,12 und 0,24  $1/W_T$ ) wurde vom Wassergehalt nicht beeinflusst und erreichte maximal  $-17^{\circ}\text{C}$ . Somit war keines der angenommenen Modelle für die vollständige Beschreibung des Resistenzverhaltens von *Flammulina velutipes* ge-

eignet. Aus Abb. 4 geht hervor, daß Modell A für einen Wassergehalt zwischen 4,2 und 8,3  $W_T$  gilt. Für einen Wassergehalt zwischen 8,3 und 20  $W_T$  gilt hingegen, wie der statistische Test zeigte, Modell C. Dies bedeutet für Proben zwischen 8,3 und 20  $W_T$ , daß sich der Wassergehalt und die Frostresistenz zueinander reziprok verhielten und daß mit großer Wahrscheinlichkeit eine Schädigung ab ein und demselben prozentualen Eisgehalt eintrat. Die Isolinien für eine 50prozentige Schädigung der Proben und einen bestimmten, allerdings nicht quantitativ erfaßten Eisgehalt waren daher identisch. Der errechnete  $p_{50}$ -Wert, die Steigung dieser Isolinie, betrug 0,72.

## Diskussion

An Hutsegmenten von im Labor bei 18°C gezüchteten Fruchtkörpern der Basidiomycetenart *Flammulina velutipes* traten bei langsamem Gefrieren irreversible Schäden ab ca. -8°C auf. Obwohl sie erst zwei Tage nach dem Auftauen mit Sicherheit visuell an einer Schrumpfung der Huttrama, einem Welligwerden der Lamellenschneide und einer Bräunung an beiden Organen feststellbar waren, traten sie während des Gefrier-Auftau-Prozesses auf. Denn ab dieser Gefriertemperatur war bereits unmittelbar nach dem Auftauen ein sprunghafter Anstieg der elektrischen Leitfähigkeit im Plektenchym nachzuweisen. Und sowohl die Leitfähigkeitserhöhung als auch die visuell erfaßten Schädigungsmerkmale lassen sich auf Permeabilitätsstörungen der Plasmamembranen zurückführen (Larcher 1977). Eine Tramaschrumpfung bzw. Lamellenwellung von bis zu etwa -7°C gefrorenen Proben erwies sich als reversibel und war nicht von einem Anstieg der elektrischen Leitfähigkeit begleitet. Der den Strukturveränderungen zu Grunde liegende Turgeszenzverlust der Zellen war daher nicht eine Folge von Membranschäden, sondern war auf den Wasserentzug durch den extrazellulären Gefrierprozeß zurückzuführen. Sowohl zwischen verschiedenen Plektenchymen als auch zwischen verschiedenen Hyphen eines Plektenchyms traten deutliche Unterschiede in der Frostresistenz auf. Die für die Abspaltung des grün fluoreszierenden Fluoresceins aus FDA verantwortlichen Enzyme, beispielsweise Lipasen, Esterasen, (Schnürer & al. 1982) wurden in Zellen der Hut- und Lamellentrama schon bei höheren Temperaturen inaktiviert als in Zellen des Hymenialbereichs. Auch blieben die Basidien, wie der Sporulationstest zeigte, auch dann noch funktionsfähig, wenn an der Hut- und Lamellentrama bereits Schädigungen auftraten.

Die Untersuchung der Wirkung des Wassergehaltes auf die Frostresistenz wurde unter Anwendung des visuellen Diagnoseverfahrens durchgeführt; sie bezog sich daher auf das Resistenzverhalten von Hyphen der Hut- und Lamellentrama. Die Frostresistenz verhielt sich bei befeuchteten Proben zwischen 8,3 und 20  $W_T$  (Gramm Wasser pro Gramm Trockensubstanz) reziprok zum Wassergehalt, bei unbefeuchteten Proben zwischen 4,2 und 8,3  $W_T$  wurde sie vom Wassergehalt nicht mehr beeinflußt und erreichte maximal -17°C. Obwohl der beim Gefrieren im Plektenchym gebildete prozentuale Eisgehalt nicht direkt gemessen wurde, ist anzunehmen, daß er ausschlaggebend für das Resistenzverhalten befeuchteter Proben war. Bei dieser Überlegung wurde davon ausgegangen, daß in einer partiell gefrorenen idealen chemischen Lösung der Prozentsatz des nicht gefrorenen Wassers dem Quotienten aus Osmolalität und Gefriertemperatur proportional ist (Mazur 1966). Verhält sich der Zellsaft ähnlich wie eine ideale chemische Lösung, und ist das Massenverhältnis der osmotisch wirksamen und der osmotisch nicht wirksamen Substanzen einer Zelle unabhängig vom Wassergehalt konstant, so ist die Osmolalität des Zellsaftes dem reziproken Wassergehalt einer Zelle proportional. Werden diese Modellannahmen erfüllt, so ist daher der Quotient aus reziprokem Wassergehalt und Gefriertemperatur dem Prozentsatz des nicht gefrorenen Wassers proportional. Alle durch den 0-Punkt gehenden

Geraden in einem Diagramm, dessen Ordinate den reziproken Wassergehalt und dessen Abszisse die Gefriertemperatur angeben, stellen dann Isolinien für den prozentuellen Eisgehalt im Gewebe dar. Eine solche Gerade ließ sich mit der Isolinie für einen mittleren Schädigungsgrad feuchter Proben gut in Übereinstimmung bringen. Es kann daher angenommen werden, daß erstens die getroffenen Modellannahmen richtig waren und zweitens die Frostresistenz feuchter Proben vom prozentualen Eisgehalt abhing. Eine durch den prozentualen Eisgehalt begrenzte Frostresistenz wurde auch bei Hefen (Mazur & al. 1981), Pilzhyphen (Bartezko 1910) und einigen Pflanzengeweben (Levitt 1956) festgestellt und dürfte daher ein häufig anzutreffendes Phänomen sein.

Aus dem Resistenzverhalten feuchter Proben zwischen 8.3 und 20  $W_T$  lassen sich Rückschlüsse auf die Ursache einer Schädigung durch Frost bei *Flammulina velutipes* ziehen. Unter den vielen bestehenden Schädigungstheorien kommen nur jene in Betracht, die eine Abhängigkeit der Frostresistenz vom Wassergehalt zulassen; vorwiegend temperaturabhängige Schädigungsmechanismen, beispielsweise der „Lösungseffekt“ (Lovelock 1953) können keine zufriedenstellende Erklärung bieten. Eine Schädigung durch den mechanischen Streß, der beim Zusammenquetschen der Zellen infolge der extrazellulären Eisbildung auftritt (Iljin 1933), wäre hingegen möglich. Dieser Schädigungsmechanismus setzt eine Abhängigkeit der Frostresistenz vom Wassergehalt voraus. Er ist wahrscheinlich auch bei Fruchtkörpern des Basidiomyzeten *Hypsizygus* (ehem. *Lyophyllum*) *ulmarius* wirksam (Fujikawa & al. 1986), die wie die Fruchtkörper von *Flammulina velutipes* eine protoplasmatische Toleranz gegen Frostdehydration aufweisen.

Das unterschiedliche Verhalten von Proben zwischen 8.3 und 20  $W_T$  einerseits und zwischen 4.2 und 8.3  $W_T$  andererseits hinsichtlich der Wirkung des Wassergehaltes auf die Frostresistenz konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erklärt werden. Zwar könnte die Ursache dafür in zwei verschiedenen Schädigungsmechanismen liegen, doch wäre es auch möglich, daß ein und derselbe Mechanismus bei unbefeuchteten Proben zwischen 4.2 und 8.3  $W_T$  vom prozentualen Eisgehalt unabhängig war oder letzterer nicht mehr mit dem Quotienten aus reziprokem Wassergehalt und Gefriertemperatur korrelierte.

Aus der Abhängigkeit der Frostresistenz der Fruchtkörper von *Flammulina velutipes* von ihrem Wassergehalt ergeben sich Konsequenzen für die Überlebenschancen dieses Pilzes im Freiland. Treten Umweltbedingungen vor strengen Frösten ein, die den Wassergehalt der Fruchtkörper ansteigen lassen, beispielsweise Regenfälle, so stellen sie eine Gefahr für das Überleben dar.

Da der festgestellte Zusammenhang zwischen dem prozentualen Eisgehalt und der Frostresistenz ein interpretierbares und offenbar weit verbreitetes Phänomen ist, könnte er eine geeignete Grundlage für die Normierung der Frostresistenz von Basidiomyzetenfruchtkörpern bieten. Mit Hilfe einer solchen Normierung ließen sich die Frostresistenzen von Fruchtkörpern verschiedener Feuchtigkeitsgrade unter Eliminierung des Wassergehaltseinflusses miteinander vergleichbar machen. Dies wäre vor allem bei im Freiland gewachsenen Fruchtkörpern zweckmäßig, da deren Wassergehalt starken und kurzzeitigen Schwankungen unterworfen ist, so daß einer Standardisierung der Versuchsbedingungen durch Selektion von Exemplaren gleicher Turgeszenz enge Grenzen gesetzt sind. Vergleichende Frostresistenzuntersuchungen wären beispielsweise zwischen verschiedenen nahe verwandten Klimaökotypen sinnvoll, da sich an ihnen gut die Ursache von eventuell genetisch bedingten Resistenzunterschieden untersuchen ließe. Biochemische und cytologische Arbeiten könnten dann vielleicht Aufschluß darüber erbringen, welche Strategien Pilze anwenden, um unter so schwierigen Umweltbedingungen wie Frösten zu fruktifizieren.

## Literatur

- BAKER, R. J. & J. A. NELDER (1978) – The GLIM System, Release 3, Generalized Linear Interactive Modelling. Numerical Algorithms Group, Oxford.
- BARTETZKO, H. (1910) – Untersuchungen über das Erfrieren von Schimmelpilzen. *Jahrb. Wiss. Botan.* 47, 57–98.
- BULLER, A. H. R. (1909) – *Researches on Fungi*, Vol. 1, 126 f. Longmans, Green, New York.
- EGER, G., G. EDEN & E. WISSING (1976) – *Pleurotus ostreatus* – Breeding Potential of a New Cultivated Mushroom. *Theoret. Appl. Genet.* 47, 155–163.
- FINK, H., G. HUND & D. MEYSING (1966) – Vergleich biologischer Wirkungen mittels programmierter Probitanalyse. *Method. Inform. Med.* Vol. 5, No. 1, 19–25.
- FRANCE, R. C., M. CLINE & C. P. REID (1979) – Recovery of Ectomycorrhizal Fungi after Exposure to Subfreezing Temperatures. *Can. J. Bot.* 57, 1845–1848.
- FUJIKAWA, S. & K. MIURA (1986) – Plasma Membrane Ultrastructural Changes Caused by Mechanical Stress in the Formation of Extracellular Ice as a Primary Cause of Slow Freezing Injury in Fruit Bodies of Basidiomycetes (*Lyophyllum ulmarium* (Fr.) Kühner). *Cryobiology* 23, 371–382.
- GUSTA, L. V. & D. B. FOWLER (1977) – Factors affecting the cold survival of winter cereals. *Can. J. Plant. Sci.* 57, 213–219.
- ILJIN, W. S. (1933) – Über das Absterben der Pflanzengewebe durch Austrocknen und über ihre Bewahrung vor dem Trockentode. *Protoplasma* 20, 105–124.
- INGOLD, C. T. (1978) – Survival of *Flammulina velutipes* in severe Frost and the Liberation of Spores under Freezing Conditions. *Bull. Br. Mycol. Soc.* 12, 87–87.
- (1981) – *Flammulina velutipes* in Relation to Drying and Freezing. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 76 (1), 150–152.
- (1982) – Resistance of certain Basidiomycetes to Freezing. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 79 (3), 554–556.
- LARCHER, W. (1977) – Kälteresistenz in: K. Kreeb: *Methoden der Pflanzenökologie*, Fischer, Jena, 51–66.
- (1985) – Frostresistenz in: P. Sorauer, *Handbuch der Pflanzenkrankheiten*, Vol. 1, Parey, Berlin, 177–259.
- LEVITT, J. (1956) – *The Hardiness of Plants*. Academic Press London New York.
- (1958) *Frost, Drought, and Heat Resistance*. Protoplasmatologia, Springer, Wien.
- LOVELOCK, J. E. (1953) – The Haemolysis of Human Red Blood Cells by Freezing and Thawing. *Biochim. Biophys. Acta* 10, 414–426.
- MAZUR, P. (1966) – Physical and Chemical Basis of Injury in Single-Celled Micro-organisms Subjected to Freezing and Thawing in: Merymann, H. T., *Cryobiology*, Academic Press London, New York, 213–315.
- , W. F. RALL & N. RIGOPOULOS (1981) – Relative Contributions of the Fraction of Unfrozen Water and of Salt Concentration to the Survival of Slowly Frozen Human Erythrocytes. *Biophysical Journal* 36, 653–675.
- MOSER, M. (1958a) – Der Einfluß tiefer Temperaturen auf das Wachstum und die Lebensfähigkeit höherer Pilze mit spezieller Berücksichtigung von Mykorrhizapilzen. *Sydowia, Annales Mycologici Ser. 2*, Vol. 12, No. 1/6, 387–399.
- (1958b) – Künstliche Mykorrhizaimpfung von Forstpflanzen 1. *Forstwissenschaftliches Zentralblatt* 77, 32–40.
- PIRK, W. (1953) – Beobachtungen an einigen kälteertragenden und frostbeständigen Pilzarten im mittleren Westertal. *Mitt. d. Florist.-soziol. Arbeitsgem. Stolzenau/Weser* 4, 11–14.
- SAKAI, A. & W. LARCHER (1987) – Frost Survival of Plants. Springer, Berlin, Heidelberg.
- SCHNÜRER, J. & T. ROSSWALL (1982) – Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a Measure of Total Microbial Activity in Soil and Litter. *Appl. and Environm. Microbiol.* 1256–1261.

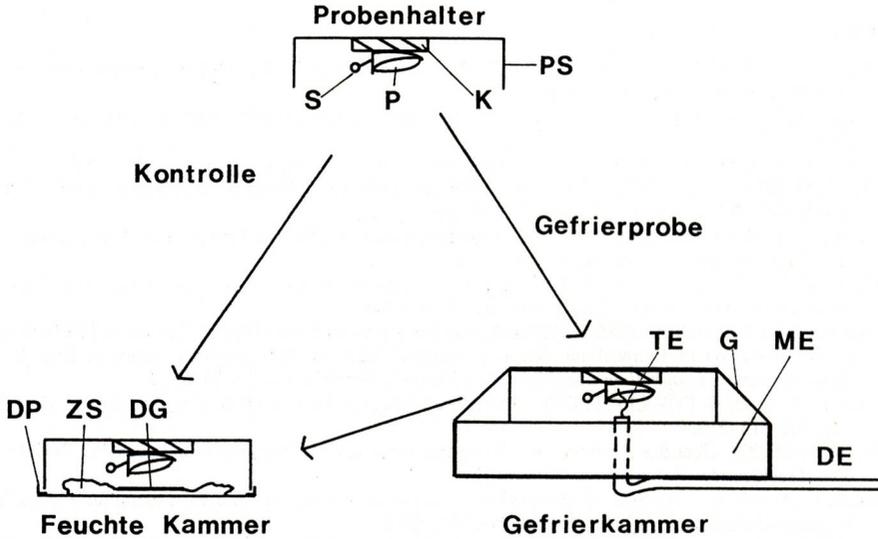


Abb. 1: Montage der Proben, feuchte Kammer, Gefrierkammer, PS Petrischale, S Stecknadel, P Probe, K Korkscheibe, DP Deckel einer Petrischale, ZS feuchter Zellstoff, DG Deckglas, TE Thermoelement, G Gummiband, ME Meßfühlerhalter, DE Meßleitung zur Datenerfassungsanlage.

Fig. 1: Mounting of sample, moist chamber, freezing chamber. PS = petri dish, S = pin, P = sample, K = kork disc, DP = cover of petri dish, ZS = moist cellulose, DG = cover slip, TE = thermocouple, G = rubber band, ME = holder for thermocouple, DE = connection with data processing equipment.

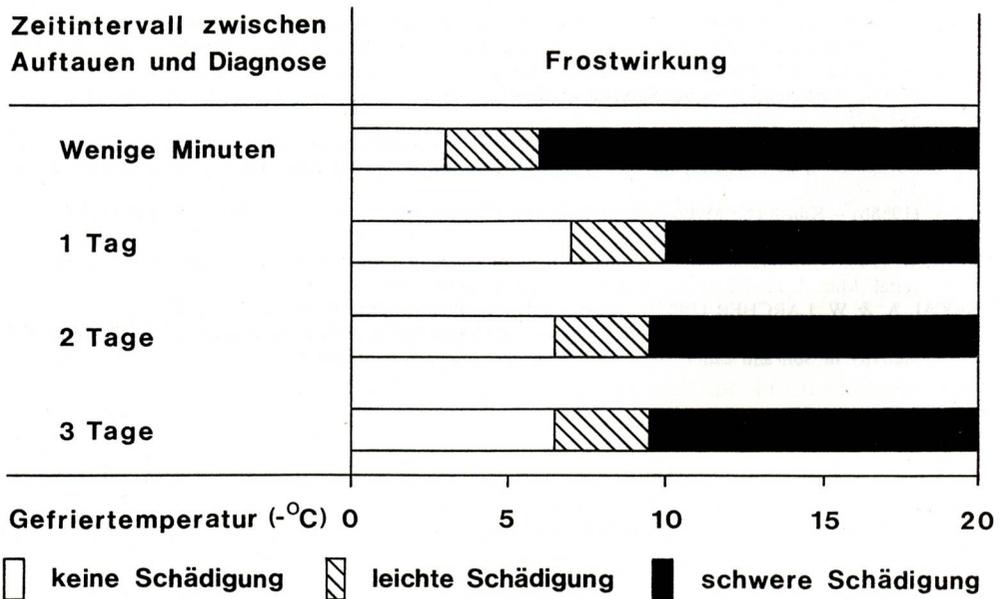


Abb. 2.: Visuelle Schäden bei *Flammulina velutipes* in Abhängigkeit von Gefriertemperatur und Beobachtungszeitraum. Irreversible Schäden wurden erst 2 Tage nach dem Frieren manifest.

Fig. 2: Visible damage of *Flammulina velutipes* as dependent on freezing temperature and observation time. Irreversible damage became evident only two days after freezing.

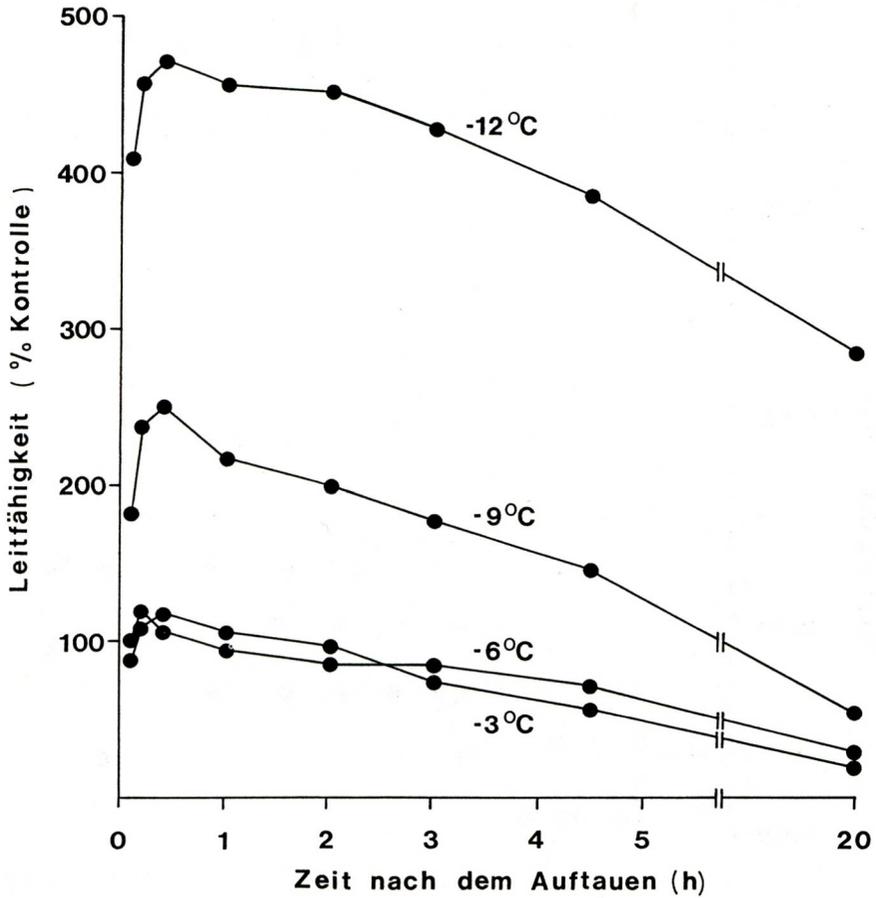


Abb. 3: Elektrische Leitfähigkeit im Hutgewebe von *Flammulina velutipes* in Abhängigkeit von Gefrier-temperatur und Zeitpunkt der Messung. Der rasche Anstieg der Leitfähigkeit in auf  $-9^{\circ}\text{C}$  und  $-12^{\circ}\text{C}$  gefrorenen Proben deutet auf eine Schädigung der Zellmembranen während des Gefrier-Auftau-Prozesses hin.

Fig. 3: Electric conductivity in cap tissue of *Flammulina velutipes* as dependent on freezing temperature and time of measuring. The rapid increase of conductivity in samples frozen down to  $-9^{\circ}\text{C}$  and  $-12^{\circ}\text{C}$  respectively indicates damage of cell membranes during the process of freeze-thawing.

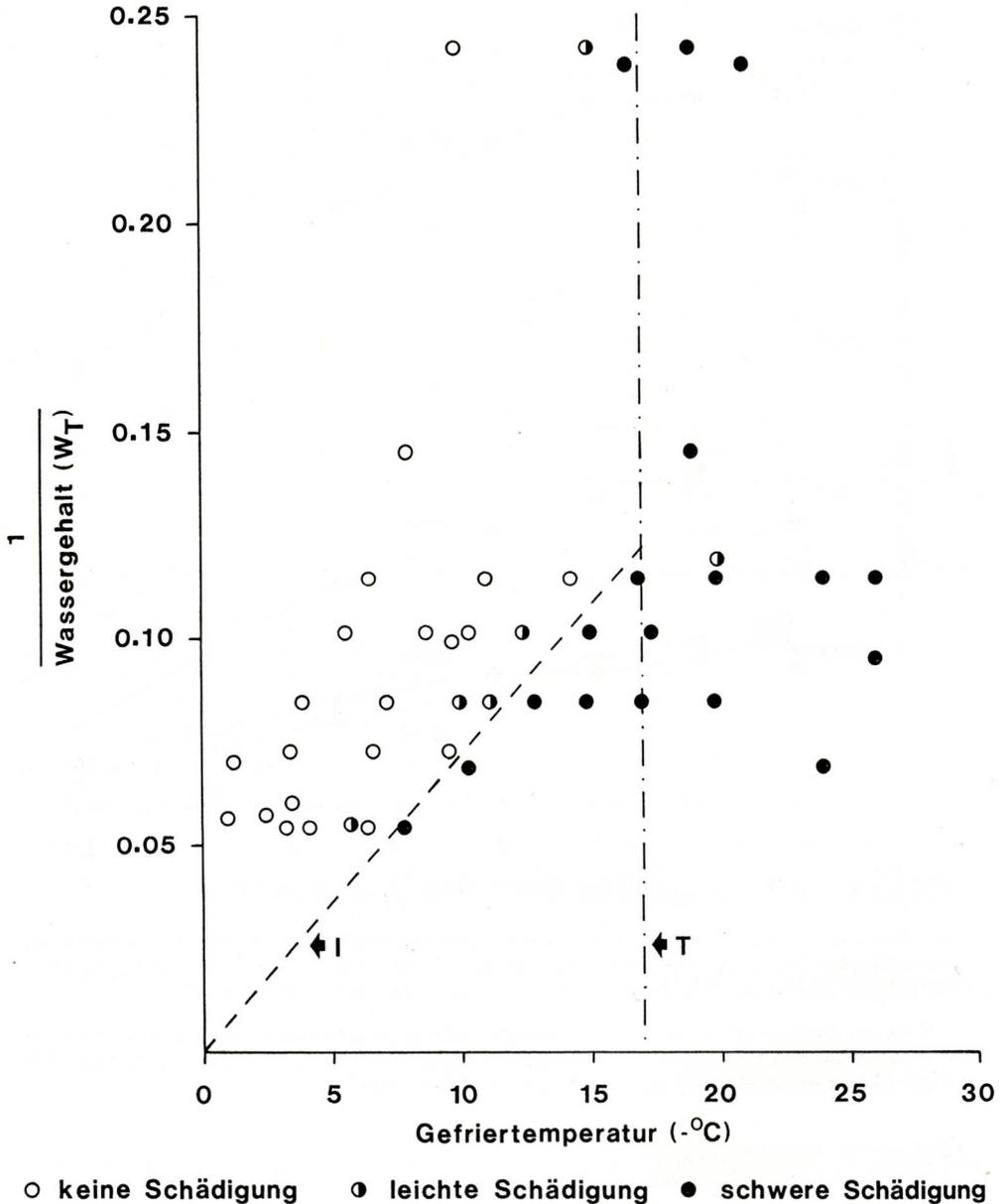


Abb. 4: Einfluß des Wassergehaltes auf die Frostresistenz von *Flammulina velutipes*. Wegen der reziproken Auftragung des Wassergehaltes in der Ordinate ( $W_T$  = Masse des Wassers pro Masse Trockensubstanz) können Proben mit gleichem prozentualen Eisgehalt entlang einer durch den 0-Punkt verlaufenden Geraden angeordnet werden. Da eine solche Gerade die Isolinie I für den 50prozentigen Schädigungsgrad der Proben zwischen 0,05 und 0,12  $l/W_T$  darstellt, hängt deren Frostresistenz mit großer Wahrscheinlichkeit vom prozentualen Eisgehalt ab. T = absolute Letaltemperatur.

Fig. 4: Effect of water content of *Flammulina velutipes* on its frost resistance. Due to the reciprocal plotting of the water content on the y-coordinate ( $W_T$  = quantity of water per quantity dry weight) samples with the same ice content can be arranged on a straight line crossing the zero point. As such a line represents the isoline for a 50 % degree of damage of samples between 0,05 and 0,12  $l/W_T$ , the frost resistance probably depends on the percentual ice content. T = absolute lethal temperature.



Deutsche Gesellschaft für Mykologie e.V.  
German Mycological Society

Dieses Werk stammt aus einer Publikation der DGfM.

[www.dgfm-ev.de](http://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. Freigibiger lizenzierte Teile eines Werks (z.B. CC BY-SA) bleiben hiervon unberührt.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://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: 1988

Band/Volume: [54\\_1988](#)

Autor(en)/Author(s): Faderl C., Moser Meinhard Michael

Artikel/Article: [Einfluß des Wassergehaltes auf die Frostresistenz von Flammulina velutipes 127-138](#)