

Versuche zur künstlichen Mykorrhizabildung bei *Vitis riparia*

von

R. BLAICH

Studies on artificial mycorrhiza in *Vitis riparia*

S u m m a r y . — Under sterile conditions a mycorrhiza is formed between *Aureobasidium pullulans* and *Vitis riparia*. The mycelium forms a dense plectenchymatic layer on the roots and a more or less complete HARTIG net between the cells of the cortex. The fungus produces a growth substance inducing internodal elongation of the plantlet even before a hyphal contact is achieved.

Einleitung

Über Mykorrhizabildung bei *Vitis*-Arten liegen bisher nur wenige Angaben vor, obwohl sie recht verbreitet scheint (Literatur bei POSSINGHAM und GROOT OBBINK 1971, DEAL *et al.* 1972). In allen Fällen handelt es sich um endotrophe Formen, wie sie zwischen „Phycomyceten“ und höheren Pflanzen typischerweise auftreten. Hauptsächlich wurde eine vesiculär-arbuskuläre Form beschrieben, auch solche ohne Arbuskel wurden beobachtet (SCHRADER 1958, ALLEWELDT und SCHWAB, in Vorbereitung). Über die Arten der beteiligten Pilze ist nichts Genaues bekannt; sie scheinen jedoch den Endogonaceen anzugehören. Bisher war es allerdings nicht möglich, einen endotrophen Mykorrhizapilz von Reben in Kultur zu nehmen.

Es ist uns nun gelungen, zwischen *Vitis riparia* und einem ubiquitären, normalerweise als Saprophyten auftretenden Pilz Beziehungen herzustellen, die sowohl morphologisch als auch physiologisch einer echten ektrotrophen Mykorrhiza gleichkommen.

Material und Methoden

Nicht zu stark verholzte, grüne Stecklinge (20 mm lang, ein Auge) von *Vitis riparia* werden mit 96%igem Alkohol angefeuchtet; dieser wird nach ca. 10 s mit einer 5%igen Lösung von Tween 20 abgespült. Anschließend kommen sie in 1%ige NaOCl-Lösung und werden darin, je nach Beschaffenheit, 20—40 min belassen. Danach spült man mehrfach mit sterilem Wasser und entfernt die Schnittflächen mit einer sterilen Klinge. Die Stecklinge kommen nun in Reagenzgläser (35 × 200 mm), die etwa 25 ml Substrat enthalten. Dieses besteht aus der mit 0,6% Agar verfestigten, etwas modifizierten Lösung nach LINSMEYER-SKOOG: 1900 mg KNO₃, 800 mg NH₄NO₃, 400 mg MgSO₄, 450 mg CaCl₂, 250 mg KH₂PO₄, 20 mg MnSO₄, 15 mg H₃BO₃, 5 mg ZnSO₄, 0,25 mg Na₂MoO₄, 0,025 mg CuSO₄, 1,0 mg KJ, 0,025 mg CoCl₂, 0,1 mM FeSO₄/EDTA, 100 mg meso-Inosit, 0,4 mg Thiamin, 30 g Saccharose und Wasser ad 1000 ml.

Die Pflanzen werden bei durchgehend 28 °C im 14-Stunden-Tag (Fluora-Beleuchtung) gehalten. Nach 4 Wochen können die Stecklinge weitervermehrt werden.

Die Gläser sind mit gas-, aber nicht feuchtigkeitsthroughlässigem Parafilm abgedeckt.

Für Infektionsversuche mit ubiquitären sporenbildenden Pilzen wurde dieser für einige Zeit entfernt. Die Beimpfung mit Reinkulturen von Pilzen erfolgte durch Bestäuben mit Konidien.

Zur histologischen Untersuchung wurden mykotrophe und nicht-mykotrophe Wurzeln zusammen mit reichlich anhängendem Agar (um den Hyphenmantel nicht zu beschädigen) herauspräpariert und in Alkohol-Eisessig (3 : 1) fixiert. Als beste Färbung zur Differenzierung der Pilzhypfen erwies sich in unserem Falle die PAS-Reaktion (GERLACH 1969). Ein Teil der Präparate wurde ohne Färbung im Phasenkontrast untersucht.

Ergebnisse

Werden sterile Rebenpflänzchen im Reagenzglas mit Sporen saprophytischer Pilze infiziert, so erfolgt in der Regel auf der Agaroberfläche ein reges Wachstum, da sich das Nährmedium auch für Pilze gut eignet. Unabhängig vom Zeitpunkt der

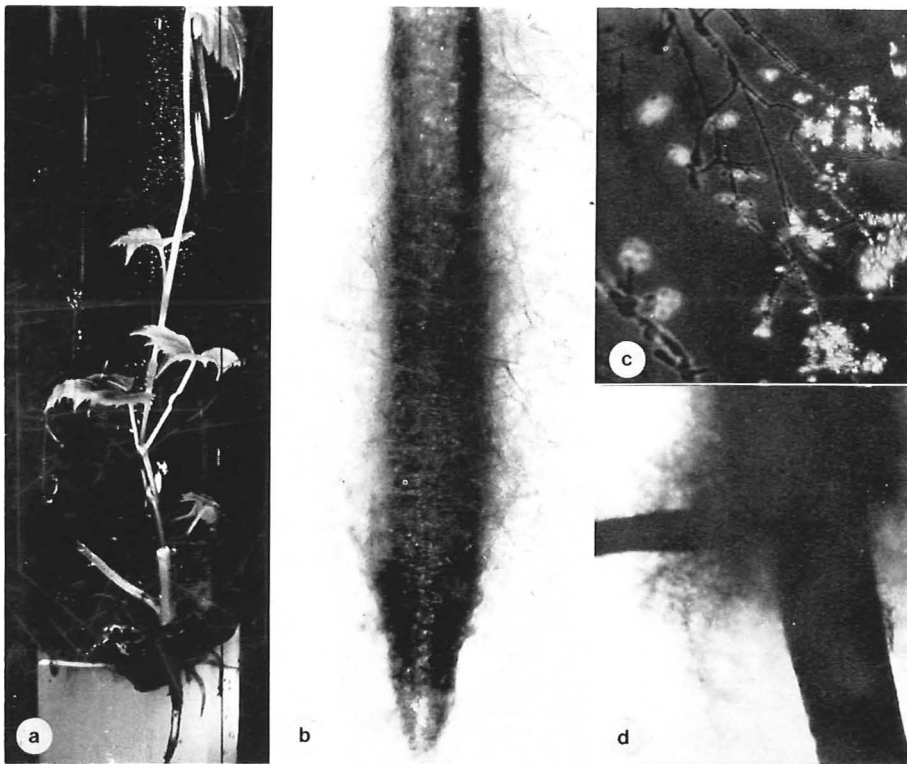


Abb. 1: a) Steriler Steckling von *Vitis riparia* auf Agarnährboden im Reagenzglas. Das Substrat ist von *Aureobasidium pullulans* besiedelt. Der Pilz beginnt die Wurzeln zu überziehen. b) Wurzel mit plektenchymatischem Überzug und ausstrahlenden Substrathypfen. c) Lufthyphen des Pilzes auf dem Substrat. d) Fortschreiten des Hyphenmantels in Richtung auf die Wurzelspitze.

a) Sterile cutting of *Vitis riparia* on nutrient agar colonized by *Aureobasidium pullulans*. The fungus is beginning to cover the roots. b) Root with plectenchymatic fungal sheath and substrate hyphae. c) Aerial hyphae of the fungus on substrate. d) Proceeding of the hyphal mantle to the root tip.

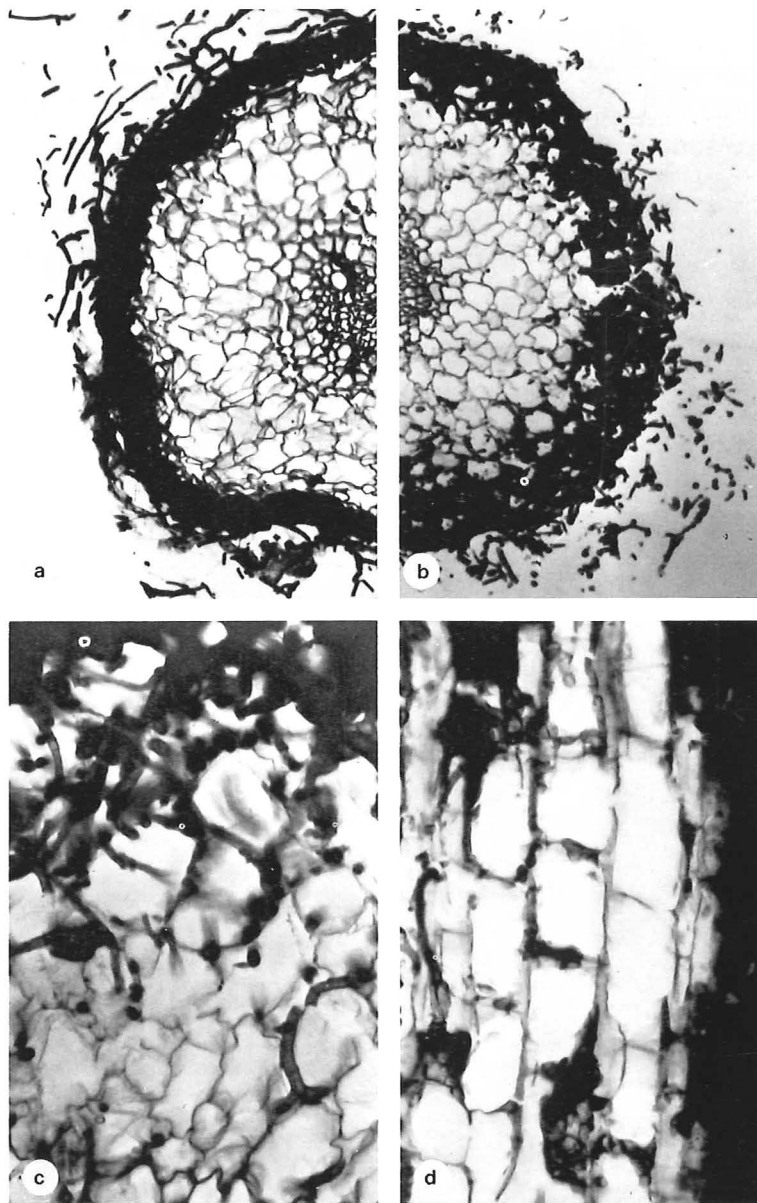


Abb. 2: a) Querschnitt durch eine Wurzel von *Vitis riparia* mit plectenchymatischem Hyphenmantel. Das Pilzmyzel ist schwarz. b) Ältere Wurzel mit einer Art HARTIGSchem Netz. c) Ausschnitt aus b). d) Längsschnitt zur Demonstration des HARTIGSchen Netzes.

a) Transversal section through a root of *Vitis riparia* with plectenchymatic hyphal mantle, the mycelium is black. b) Root with a kind of HARTIG net. c) Section of b), enlarged. d) Longitudinal section to demonstrate the HARTIG net.

Infektion, bzw. von der Größe des Pflänzchens, wird dieses aber meist nach einer gewissen Zeit von dem Pilz besiedelt, stellt sein Wachstum ein und geht unter Braunfärbung der Blätter ein. Die Symptome sind unterschiedlich und sollen hier nicht näher besprochen werden.

Unter den in der hiesigen Laborluft (Weinbergsnähe) enthaltenen Pilzen wurde jedoch eine Art gefunden, die wir als *Aureobasidium (Pullularia) pullulans* (Abb. 1 c) bestimmten und welche andere Symptome hervorruft.

Dabei wurden folgende morphologische Beobachtungen gemacht: Wird ein frischer Steckling mit diesem Pilz infiziert, so hemmt die Besiedelung des Substrats mit dem auffälligen schwarzen Myzel (Abb. 1 c) das Pflänzchen, ohne es jedoch sichtbar zu schädigen; nach einigen Wochen wird die Hemmung überwunden, und der Steckling verhält sich normal, obwohl der Pilz nunmehr auf den Rebenwurzeln einen deutlichen schwarzen Überzug bildet (Abb. 1 a, b). Infiziert man mehrwöchige Stecklinge, die schon einige Internodien gebildet haben, so tritt bei diesen, nachdem der Pilz auf dem Substratagar eine kräftige Kolonie gebildet hat, eine deutliche Internodienstreckung um etwa 30% ein.

Zu diesem Zeitpunkt steht das Myzel noch nicht mit der Pflanze in unmittelbarem Kontakt, es scheint also zunächst einen Gibberellin-ähnlichen Wuchsstoff auszuscheiden. Dies war auch der Grund für eine genauere Untersuchung des Zusammenwirkens von *A. pullulans* und *V. riparia*; Näheres wird an anderer Stelle berichtet werden.

Nach einigen Wochen bildet sich auch unter diesen Infektionsbedingungen ein schwarzer Überzug von Myzel auf den Wurzeln der Rebe. Dieser schreitet von der Agaroberfläche zu den Wurzelspitzen hin fort (Abb. 1 d), letztere meist frei lassend. Unter geeigneten Beleuchtungsbedingungen ist zu erkennen, daß von dem Myzelmantel Hyphen ins Substrat ausstrahlen (Abb. 1 b). Ist kein Pflänzchen vorhanden, so kann der Pilz, vermutlich wegen Sauerstoffmangels, nicht in die Tiefe wachsen.

Die histologische Untersuchung, in welche Längs- und Querschnitte verschiedener Regionen von mykotrophen und nicht-mykotrophen Wurzeln einbezogen wurden, zeigte Folgendes: Die Umhüllung der Wurzel durch den Pilzmantel ist nicht locker, sondern stellt ein sehr dichtes Plektenchym dar (Abb. 2 a, b).

Sie schreitet von oben beginnend zu den Wurzelspitzen fort. Bei relativ frisch besiedelten Wurzeln dringt das Myzel überhaupt nicht ein, oder nur zwischen die Zellen der Rhizodermis (Abb. 2 a). Eine Ausnahme bildet das lockere Gewebe der Kalyptra, das meist von Hyphen durchdrungen ist. Bei älteren Wurzeln wird eine Art HARTIGSches Netz gebildet, dessen Ausläufer bis zur Endodermis vorstoßen können (Abb. 2 b). Meist wachsen die Hyphen interzellulär, selten kann jedoch auch ein Eindringen in Zellen beobachtet werden (Abb. 2 c, d). Wurzelhaare sind keine vorhanden.

Die befallenen Pflanzen sind nicht in Mitleidenschaft gezogen. Ihre Wurzeln sind meist sogar kräftiger entwickelt als die der Kontrollen. Auch die Blätter wirken etwas chlorophyllreicher.

Diskussion

Aureobasidium pullulans ist ein ubiquitärer Saprophyt und für seine große Variabilität bekannt. Die Beobachtung, daß er Wuchsstoffe ausscheidet, machte schon JUMP (1938) im Zusammenhang mit dem abnormen Wachstum von *Pinus*-Sämlingen.

Die von LAUBERT (1932) aufgeführten *Aureobasidium*-Arten (u. a. *A. vitis*) haben allerdings nichts mit *Aureobasidium pullulans* (früher *Pullularia*) gemein; sie werden heute den Exobasidiales zugerechnet.

Auch im Zusammenhang mit Wurzeln wurde *A. pullulans* schon mehrfach beschrieben, jedoch nicht als Mykorrhizabildner. So kommt die Art als Endophyt in Sämlingswurzeln von *Acer pseudoplatanus* vor (PUGH und BUCKLEY 1971), und FROIDEVEAUX (1975) fand, daß sie in 50% aller Fälle mit einer Mykorrhiza zwischen *Alnus rubra* und *Lactarius obscuratus* assoziiert war.

Die Gemeinschaft zwischen *A. pullulans* und *V. riparia* geht jedoch unter unseren Bedingungen weit über eine Assoziation hinaus. Die Wurzeln sind im Endstadium vollständig von dem sehr dichten, plektenchymatischen Hyphenmantel überzogen, so daß zwangsläufig der Stofftransport vom Pilz kontrolliert werden muß. Die Pflanze gedeiht eher besser als schlechter, und auch die histologischen Strukturen entsprechen denen einer ektotrophen Mykorrhiza, wie sie bei vielen Waldbäumen auftritt und von LOBANOW (1960) wegen des Auftretens intrazellulärer Hyphen als ektendotroph bezeichnet wird. Eine gewisse Verwandtschaft besteht noch zu den von manchen Autoren als Pseudomykorrhiza bezeichneten Assoziationen an Wurzeln gewisser Waldbäume, die allerdings einen wesentlich dünneren Hyphenmantel aufweisen (MEYER 1973). Der umstrittene und etwas veraltete Begriff sollte jedoch heute besser vermieden werden.

Unter natürlichen Bedingungen wurde die hier beschriebene Verbindung nie beobachtet, obwohl *A. pullulans* praktisch überall verbreitet ist und auch die *Vitis*-Art *riparia* schon auf Mykorrhizen untersucht worden ist (ALLEWELDT und SCHWAB, in Vorbereitung). Es mag hier z. B. eine Rolle spielen, daß die Art gegen Fungistatica sehr empfindlich ist (WARREN 1974); auch ist bekannt, daß in stark gedüngten Böden, wie sie zweifellos in den meisten Weinbergen vorliegen, Mykorrhizen stark zurückgedrängt werden. Auf alle Fälle war von den übrigen, bisher von uns beobachteten Pilzen keiner in der Lage, eine ähnliche Assoziation zu bilden. Über die angesprochenen Punkte sollen unsere weiteren Untersuchungen Auskunft geben.

Zusammenfassung

Unter sterilen Bedingungen bildet *Aureobasidium pullulans* mit *Vitis riparia* eine Mykorrhiza, die als dichter plektenchymatischer Überzug auf den Wurzeln in Erscheinung tritt. Zwischen den Rindenzellen bildet sich ein mehr oder weniger ausgeprägtes HARTIGSches Netz. Der Pilz scheidet einen Wuchsstoff aus, der schon vor dem Hyphenkontakt bei sterilen Stecklingen ein Streckungswachstum auslöst.

Für die technische Ausführung der Versuche danke ich meinen Mitarbeitern, insbesondere Herrn R. WIND.

Literatur

- DEAL, D. R., BOOTHROYD, C. W. and MAI, W. F., 1972: Replanting of vineyards and its relationship to vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Phytopathology* 62, 172—175.
- FROIDEVEAUX, L., 1975: *Aureobasidium pullulans* (DE BARY) ARNAUD: An associate of *Alnus rubra* and *Lactarius obscuratus* mycorrhiza. *Europ. J. Forest Pathol.* 5, 124—127.
- GERLACH, D., 1969: *Botanische Mikrotechnik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- JUMP, Y. A., 1938: A study of forking in red pine. *Phytopathology* 28, 798—811.
- LAUBERT, R., 1932: Aureobasidiales. In: SORAUER, P. (Hrsg.): *Handbuch der Pflanzenkrankheiten*, 5. Aufl., III, 2. Teil, 282—296. Verlagsbuchhandlung Paul Parey, Berlin.

- LOBANOW, N. W., 1960: Mykotrophie der Holzpflanzen. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin.
- MEYER, F. H., 1973: Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests. In: MARKS, G. C., FOSTER, R. C. (Eds.): Ectomycorrhizae. Academic Press, New York, London.
- POSSINGHAM, J. V. and GROOT OBBINK, J., 1971: Endotrophic mycorrhiza and the nutrition of grape vines. *Vitis* 10, 120—130.
- PUGH, G. J. F. and BUCKLEY, N. G., 1971: *Aureobasidium pullulans*: An endophyte in sycamore and other trees. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 57, 227—231.
- SCHRADER, R., 1958: Untersuchungen zur Biologie der Erbsenmycorrhiza. *Arch. Mikrobiol.* 29, 285—303.
- WARREN, R. C., 1974: Differential effects of fungicides on phylloplane fungi isolated from oak. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 62, 215—218.

Eingegangen am 30. 12. 1976

Priv.-Doz. Dr. R. BLAICH
BFA für Rebenzüchtung
Geilweilerhof
D - 6741 Siebeldingen