

Aus dem Max Planck-Institut für Kulturpflanzenzüchtung, Hamburg-Volksdorf

Untersuchungen über die Bildung und Regeneration von Fruchtkörpern bei Hutpilzen

II. Weitere Regenerationsversuche mit *Pleurotus Florida*

Von
GERLIND EGER

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. Februar 1965)

In dieser Zeitschrift wurde vor kurzem über Regenerationsversuche mit *Pleurotus Florida* berichtet (EGER 1965). Es regenerierten einzelne Fruchtkörper oder Stielstücke keine neuen Fruchtkörper, sondern bedeckten sich mit Mycel, wie das auch BEVAN u. KEMP 1958 von *Flammulina (Collybia) velutipes* berichtet haben. Die vorliegende Arbeit sucht nach den Ursachen dieser Unregelmäßigkeit.

A. Material und Methode

Die *Pleurotus*-Fruchtkörper wurden auf einem sterilisierten Strohs substrat (vgl. EGER 1965) in offenen Einmachgläsern herangezogen. Unter Wattehauben und anderen Verschlüssen zur Keimfreiheit gibt es nur stark deformierte Fruchtkörper mit langen Stielen und kümmerlichen Hüten. Fruchtkörper von normaler Form, die sich bis zum Sporenwerfen entwickeln konnten, waren aber für die folgenden Untersuchungen nötig.

Stücke der unsteril geernteten Fruchtkörper wurden auf Biomalzagar gelegt (vgl. EGER 1965). Den Fruchtkörpern anhaftende Bakterien vermehrten sich nicht, und Schimmelpilze wuchsen nicht, wenn frisch geerntetes Material verwendet wurde. Selbst auf dünnen Schnitten oder auf Lamellen wurde nach mehrtägiger Kulturdauer bei mikroskopischer Kontrolle keine Entwicklung von Fremdorganismen beobachtet. Wurden die Fruchtkörper aber für mehrere Tage bei -20°C eingefroren, so war die antibiotische Wirksamkeit sichtbar zerstört. Die Stücke bedeckten sich mit einem dichten Überzug von Bakterien oder Schimmelfäden und nur selten konnte *Pleurotus*-Mycel oder gar eine Regeneration beobachtet werden. Während also bei aseptisch gewonnenem Fruchtkörpermaterial auf Agarnährboden kein großer Vitalitätsverlust nach dem Tiefgefrieren festzustellen war (EGER 1965), ist er bei Verwendung unsterilen Materials ganz offensichtlich. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden nur frisch geerntete Fruchtkörper verwendet.

Alle Versuche wurden wenigstens dreimal wiederholt. Bei der Bewertung der Regenerationsfähigkeit (-Intensität) einzelner Fruchtkörperstücke wurde die Zahl der regenerierten Fruchtkörperanlagen je Einheit der den Agar überragenden Oberfläche nach 7 Tagen Versuchsdauer zugrunde gelegt, gleichgültig, ob und wie stark sich diese Anlagen später weiterentwickelten. (Das Wachstum der Anlagen ist auch sehr stark von äußeren Faktoren abhängig. In dieser Arbeit interessierten in erster Linie die den Hyphenzellen innewohnenden Fähigkeiten.)

B. Versuche und Ergebnisse

1. Gibt es Unterschiede im Regenerationsvermögen verschiedener Fruchtkörperteile?

a) Versuche mit Stielen

Stiele noch nicht ausgewachsener Fruchtkörper wurden durch Schnitte senkrecht zur Längsachse in Stücke von 2 cm Länge bis zu Scheiben von 1 mm Dicke zerlegt und ihre Abfolge im Stiel von unten nach oben vermerkt. Die Stücke wurden erstens so auf den Nährboden gegeben, daß sie mit der Stieloberfläche auflagen, während die Schnittflächen senkrecht zur Nährbodenoberfläche standen. Die Regeneration fand vorwiegend auf der Stieloberfläche statt, während aus den Schnittstellen Mycel herauswuchs (vgl. EGER 1965, Abb. 1 b). Zweitens wurden 1–5 mm dicke Scheiben mit einer Schnittfläche auf den Nährboden aufgesetzt. Die nach oben weisende Schnittfläche regenerierte nun oft sehr intensiv (Abb. 1). Schließlich wurde aus 1–2 cm langen Stielstücken mit passenden Korkbohrern das Stielinnere herausgestanzt, so daß nur ein Rohr von etwa 1–2 mm Wanddicke stehen blieb. Das Stielinnere und die Rinde wurden getrennt auf Nährboden gelegt. Beide erwiesen sich als regenerationsfähig.



Abb. 1. Regeneration auf einer dünnen Stielscheibe, welche mit einer Schnittfläche Biomalzagär aufliegt. Die ganze über den Agar ragende Oberfläche ist mit Regeneraten bedeckt. Auf dem Agar hat sich um das Stielstück ein Kranz von Mycel gebildet. Maßstab 1,2: 1

In allen Versuchsreihen gab es einzelne Stücke, die nicht regenerierten und solche, die vollkommen mit Anlagen bedeckt waren. Eine Korrelation zwischen Regenerationsintensität und bestimmten Stielzonen war nicht erkennbar.

b) Versuche mit Hüten

Hüte kleiner Fruchtkörper von 0,5–1,5 cm wurden mit der Hutoberseite oder mit den Lamellen flach auf den Nährboden gelegt. Alle Hüte regenerierten, doch mit unterschiedlicher Intensität. Größere Hüte wurden in Teile zerlegt. Erstens wurden die Lamellen abgeschnitten und zu mehreren auf einem Haufen auf den Nährboden gegeben. Sie bedeckten sich mit Mycel und nur am Rand des Haufens wurden einzelne Fruchtkörper regeneriert (Abb. 2). Zweitens wurden aus dem Inneren der Hüte Scheiben herausgeschnitten und mit breiter Fläche auf den Agar gedrückt. Sie regenerierten mehr oder weniger viel Fruchtkörperanlagen. Drittens wurde mit einer Pinzette nur die Huthaut abgezogen und einmal mit der Oberseite, das andere Mal mit der Unterseite auf den Nährboden gegeben. Alle Hautstücke regenerierten, aber wieder unter-

schiedlich gut. Bei wenig regenerierenden hatten sich die Ränder vom Nähragar gelöst und hochgerollt. Regeneration gab es nur auf den Stellen, die dem Nährboden noch ganz dicht angeschmiegt waren. — In einem weiteren Versuch wurden die Ränder der Huthaut nach dem Anlegen an den Nährboden mit Agarblöckchen beschwert, so daß sie sich nicht mehr vom Agar lösen konnten. Bei allen Hautstückchen war diesmal die gesamte Oberfläche dicht mit Fruchtkörperanlagen bedeckt!

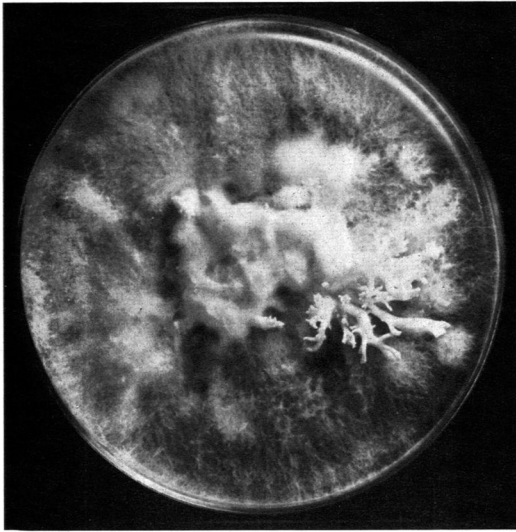


Abb. 2. Mehrere Lamellen im Haufen auf Biomalagar. Es werden nur am Rand einzelne Fruchtkörper regeneriert

Die Versuche mit Hutmaterial offenbarten Regenerationsvermögen in allen Hutteilen. Die letzten Versuche mit Huthaut gaben einen wichtigen Hinweis auf die Ursachen der unregelmäßigen Regeneration gleichartiger Fruchtkörperstücke in allen bisherigen Versuchen.

2. Die Ursachen unregelmäßiger Regeneration

Nachdem klar war, daß nur diejenigen Stellen einer Huthaut regenerieren, welche den Nährboden direkt berühren, wurde in allen folgenden Versuchen auf einen möglichst engen Kontakt des Fruchtkörpermaterials mit dem Nährboden geachtet.

Wegen ihrer planen Oberfläche wurden zunächst Lamellen einzeln vom Hutfleisch abgetrennt und möglichst faltenlos und ohne Luftblasen einzuschließen, flach auf den Nährboden gegeben. Der dünnste Teil der Lamellen hinter der Schneide schmiegte sich dem Nährboden leicht an. Der dickere Teil vor dem Rand, der am Hutfleisch angewachsen war, bereitete Schwierigkeiten. Alle Lamellen regenerierten auf der Oberfläche Anlage

neben Anlage, wo sie dem Agar dicht auflagen. An abstehenden Stellen blieb, wie bei Huthaut, die Regeneration aus (Abb.3). Die Regeneration begann bevorzugt an den dünnsten Stellen, den Schneiden (vgl. Abb.4).



Abb.3. Zwei Lamellen auf Biomalzagar. Die lange Lamelle steht an drei Stellen vom Agar ab, und die Regeneration unterblieb dort. Auf allen dem Nährboden anliegenden Flächen haben sich dagegen Anlagen und junge Fruchtkörper gebildet (Maßstab etwa 1,5:1)

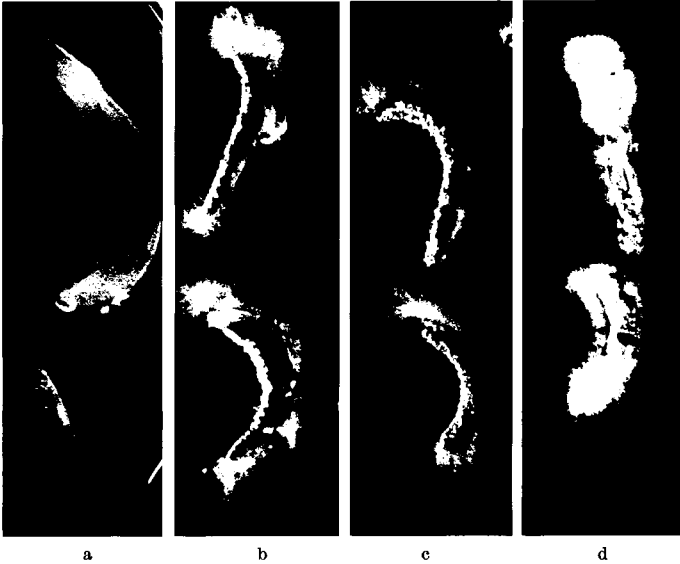


Abb.4 a—d. Regeneration auf Agar mit steigender Biomalzkonzentration 7 Tage nach Versuchsbeginn. a 0‰; b 0,5‰; c 1,5‰; d 2,5‰. Die Regeneration beginnt bei den Lamellen an der Schneide. — Bei 2,5‰ Biomalz hat sich die Oberfläche der Lamellen bis auf die Stellen, die vom Agar abstehen, mit Anlagen bedeckt (vgl. auch Abb.3). Bei d ist die obere Lamelle beim Auflegen auf den Nährboden zerbrochen. (Maßstab 1:1)

Auch kleine Lamellenstückchen, z.B. 1—2 mm breite Querstreifen, bedeckten sich mit Anlagen. Dünne Längs- und Querscheiben aus Fruchtkörperstielen und aus dem Hutfleisch, die mit planer Fläche dem Nährboden ganz auflagen, regenerierten in weiteren Versuchen ebenso 100‰ig und intensiv wie die Lamellen.

Die Notwendigkeit einer innigen Berührung der Hyphenzellen eines Fruchtkörpers mit dem Nährboden für das Zustandekommen einer intensiven Regeneration läßt zwei Hypothesen zu: 1. Die Hyphen behalten einen für die Regeneration nötigen und in Fruchtkörpern gegebenen Zustand der Zellen nur bei, wenn sie hinreichend mit Nährstoffen versorgt sind. Tritt „Hunger“ ein, so können sie nur noch als Mycel weiterwachsen. 2. Die Zellen enthalten einen Stoff, welcher in höherer Konzentration die Regeneration verhindert. Wird ein Teil dieses Stoffes durch Diffusion an den Agar abgegeben, so kann die Regeneration beginnen. Beide Hypothesen wurden geprüft.

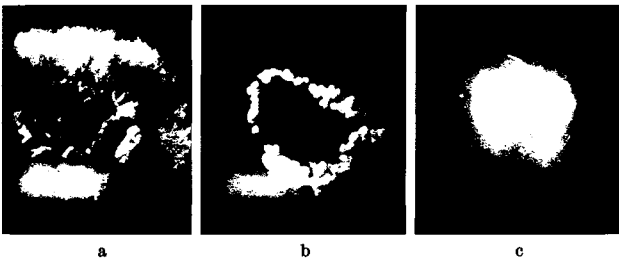


Abb. 5a—c. Regeneration auf dünnen Stückchen Huthaut, welche auf 1%igem Agar liegen. Der Agar enthält bei a 2% Biomalz, b 2% Glucose, c 2%iger Glucoselösung isosmotische Konzentration NaCl.— Mit Glucose werden nur wenige, aber kräftige Anlagen am Rand gebildet. (Maßstab 1,1:1)

Jeweils aus einem Hut wurden die Lamellen einzeln abgenommen und zu 5—6 flach auf die folgenden Nährböden gelegt: Wasseragar mit 0,75%, 1%, 1,5% und 2,0% Agar. Ferner 2,0%iges Agar mit 0%, 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0% und 2,5% Biomalz. Mit Wasseragar gab es keine Regeneration. Die Verdünnung eines Hemmstoffes findet offenbar nicht statt. Mit steigender Biomalzkonzentration nahm dagegen die Regeneration an Intensität zu (Abb. 4a—d). Dies spricht für die 1. Hypothese. — Mit zunehmender Biomalzkonzentration steigt auch der osmotische Wert des Nährbodens an und die Wasserverhältnisse verschlechtern sich für den Pilz. Es könnte somit nicht nur die Nährstoffkonzentration, sondern auch der Wasserfaktor einen Einfluß auf die Regeneration haben. Es wurde daher noch die Regeneration auf 1%igem Wasseragar verglichen mit der Regeneration auf gleichprozentigem Agar mit 1% und 2% Biomalz, 1% und 2% Glucose und mit der Glucose isosmotischen Konzentrationen NaCl (p. a. Merck). Mit Wasseragar und mit NaCl-Agar regenerierten die Lamellen nicht. Mit Biomalz war die Zahl der regenerierenden Lamellen 100%. Mit Glucose gab es im Vergleich zu Biomalz nur wenige, aber besonders kräftige Anlagen, vorwiegend an den Rändern der Lamellen. In Versuchen mit dünnen Stückchen Huthaut, Hutfleisch und Stielfleisch gab es dasselbe Resultat (Abb. 5a—c) wie mit Lamellen.

Für die Regeneration aus Fruchtkörpern ist demnach eine rasche Versorgung der Zellen mit geeigneten Nährstoffen maßgebend. In Versuchen mit größeren Fruchtkörperstücken, welche nur mit einem verhältnismäßig geringen Teil ihrer Oberfläche den Nährboden berühren, ist dies nur begrenzt möglich. Durch Diffusion können Nährstoffe nur über sehr geringe Strecken schnell herangeführt werden. Für größere Entfernungen sind andere, aktive Mechanismen erforderlich (vgl. Lehrbücher der Botanik). Es ist zu bezweifeln, daß Transportmechanismen solcher Art, die in wachsenden Fruchtkörpern wirken, in den abgeschnittenen Stücken voll funktionsfähig bleiben und einen wirksamen Nährstoffstrom vom Agar über die zerstörten Zellen in den Schnittflächen ermöglichen. Die einzelnen Fruchtkörper einer Kultur werden außerdem unterschiedlich mit Nährstoffen versorgt, wie man wohl aus den stets beobachtbaren Unterschieden in der Größe und der Entwicklungsgeschwindigkeit der Fruchtkörper schließen darf. Nimmt man noch an, daß die im Augenblick des Zerschneidens enthaltenen unterschiedlichen Nährstoffreserven nicht beliebig verschiebbar sind, so ist gut zu verstehen, daß die Regeneration größerer Fruchtkörperstücke mit sehr unterschiedlicher Intensität erfolgt oder auch ganz unterbleiben kann.

3. *Verändert sich das Regenerationsvermögen während der Entwicklung der Fruchtkörper mit zunehmendem Alter?*

In allen bisherigen Versuchen wurden noch nicht ausgewachsene Fruchtkörper verwendet. Es blieb zu untersuchen, ob ein gleich gutes



Abb. 6. Anlagenbildung auf und um dicke Lamellen ausgewachsener Fruchtkörper. Die winzigen weißen Knötchen zeigen bei mikroskopischer Betrachtung die für Fruchtkörperanlagen typische Beschaffenheit. (Maßstab 1,25: 1)

Regenerationsvermögen auch bei älteren Entwicklungsstadien vorhanden ist. Nun wurden Fruchtkörper genommen, die bereits Sporen geworfen hatten. Sie regenerierten wie junge Exemplare. In einem Versuch wurde das Regenerationsvermögen eines Fruchtkörpers während seiner Entwicklung verfolgt. Als der Hut einen \varnothing von 2 cm erreicht hatte, wurde ein Sektor herausgeschnitten. Alle vom Hutrand bis zum Stiel durchlaufenden Lamellen wurden herausgetrennt und einzeln auf Wasseragar und Biomalzagar der oben angegebenen Konzentrationen gegeben. 2 Tage später wurde wieder ein Sektor herausgenommen und in gleicher Weise getestet. Nach abermals 2 Tagen wurde der Rest des nunmehr reifen Hutes untersucht. Auf Biomalz war kein Unterschied in der Regenerationsintensität

der Lamellen verschiedenen Alters zu erkennen. Auf Wasseragar gab es auf den jungen und noch kleinen Lamellen des ersten Sektors

keine Anlagen. Bei den großen Lamellen der 2. und 3. Entnahme dagegen bildeten sich am Lamellenrand und in einigen Fällen sogar auf dem Agar neben den Lamellen in einer Entfernung bis zu 1 und 2 mm winzige Fruchtkörperanlagen, und zwar um so mehr, je größer und dicker die Lamellen waren. Diese Anlagen entstanden bevorzugt an dem dickeren Rand, der vom Hut abgetrennt worden war, nicht an der Lamellenschneide (Abb. 6). Dieses Ergebnis darf wohl so gedeutet werden, daß in den dicken Lamellen stellenweise genügend Nährstoffe gespeichert waren, welche die Regeneration von Anlagen erlaubten. Dort, wo die Lamellen vom Hut losgetrennt worden waren, gab es verletzte und zerstörte Zellen. Es konnten daraus Nährstoffe und andere Substanzen in den Agar diffundieren (vgl. Diskussion).

Eine wesentliche Veränderung der Regenerationsfähigkeit während der Fruchtkörperentwicklung wurde somit nicht beobachtet.

4. Weitere Beobachtungen an regenerierendem Fruchtkörpermaterial

In den meisten Versuchen wurden die Beobachtungen über 7 Tage hinaus fortgesetzt und die Weiterentwicklung der Regenerate beobachtet. Regenerierte ein größeres Fruchtkörperstück auf der Oberfläche nur einzelne bis wenige Anlagen, so wuchsen diese gewöhnlich bis auf mehrere Zentimeter Länge heran. Die Gestalt dieser Fruchtkörper war stark abgewandelt. Es kamen neben den bereits geschilderten horn- bis geweihartigen Gebilden (vgl. EGGER 1965) auch korallen- bis bäumchenförmige vor. Letztere sind wohl so aufzufassen, daß sich aus hornartigen Fruchtkörpern neue regenerierten und aus diesen wiederum welche. Gab es sehr viele Regenerate dicht nebeneinander, blieben die meisten im Anlagestadium stecken. Nur am Rande entwickelten sich einzelne weiter. Auf Biomalzagar erfuhr diese Weiterentwicklung mit zunehmender Nährstoffkonzentration eine Steigerung. In vielen Fällen entwickelten Anlagen und Fruchtkörper, welche nicht weiterwuchsen, an den Spitzen Mycelbüschel.

C. Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, daß alle Teile eines Fruchtkörpers von *Pleurotus Florida* regenerationsfähig sind. Auch kleine, dünne Fruchtkörperstückchen von nur wenigen Quadratmillimetern können auf der ganzen Oberfläche Anlagen bilden, wenn sie auf einem Biomalz-Nährboden hinreichender Konzentration dicht aufliegen. Die Regenerationsfähigkeit der Lamellen erscheint mir besonders bemerkenswert, weil dort die Spezialisierung der Zellen am weitesten fortgeschritten ist. Allerdings wissen wir nicht, ob die Regeneration aus spezialisierten Zellen des Hymeniums erfolgt, z. B. auch aus Basidien, oder aus weniger differenzierten im Trama. Bisher wurden nur fertige Anlagen mikroskopisch betrachtet, die als winzige Hyphenknäule auf Lamellen aufsitzen. Ihr

Ursprung ließe sich wahrscheinlich durch Schnittserien zurückverfolgen. Die Möglichkeit, 1–2 mm breite Querstreifen von Lamellen regenerieren zu lassen, ermutigt zu Versuchen, Objektträgerkulturen herzustellen und den Regenerationsvorgang mikroskopisch direkt zu beobachten.

Die Versuche mit verschiedenen Konzentrationen Agar, Biomalz, Glucose und NaCl ergaben, daß die Regenerationsintensität von der Art der Nährstoffe und ihrer Konzentration beeinflußt wird (vgl. Anlagen auf Biomalz und auf Glucose!). Mit Wasseragar und mit NaCl-Agar ist eine Regeneration nur auf dicken Fruchtkörperstücken zu beobachten, bei großen Lamellen zuweilen am dicksten, vom Hut abgetrennten Rand. Vor allem diese letzte Beobachtung zeigt, daß von den beiden, auf S. 89 aufgestellten Hypothesen, der ersten der Vorzug zu geben ist. Wäre die Verdünnung eines Hemmstoffes in den Zellen Voraussetzung für die Regeneration, so würde diese auch mit Wasser- und NaCl-Agar zuerst an der dünnsten Stelle der Lamellen einsetzen. Daß gerade das Gegenteil zutrifft, außerdem die Regeneration auf dünnen Stücken auf Biomalz-agar mit steigender Konzentration zunimmt und auch mit Glucoseagar erfolgt, spricht für die Notwendigkeit einer raschen und ausreichenden Nährstoffversorgung.

Diese Versuche lieferten neben der Erklärung für die ungleichmäßige Regeneration auf größeren Fruchtkörperstücken (vgl. S. 86) auch noch eine Methode zum Studium der für die Regeneration (und darum wohl auch für die Entwicklung von Fruchtkörpern) notwendigen Nährstoffe. Sie sollte schneller zum Ziel führen als die bisher üblichen Versuche mit Mycelkulturen. Darüber hinaus eröffnet sich die Möglichkeit, durch Studium der Wirkung zellphysiologisch wirksamer Substanzen auf Regeneration und Mycelwachstum etwas über die physiologischen Grundlagen der Fruchtkörperbildung zu erfahren.

Die Beobachtung einer schwachen Anlagenbildung mit Wasser- und NaCl-Agar (in einem Fall auch mit Glucoseagar) auch am Mycel 2 mm außerhalb des Fruchtkörpermaterials (vgl. S. 91) lehrt allerdings, daß auch ein die Anlagenbildung fördernder Faktor in den Agar geraten oder wenigstens in den darin wachsenden Hyphen vorhanden sein kann. Aus anderen Untersuchungen (EGER 1965) ging hervor, daß zerriebenes oder gefrorenes Fruchtkörpermaterial von *Pleurotus Florida*, *Flammulina velutipes* und *Agaricus bisporus* Fruchtkörper an Mycel von *Pleurotus* induzieren kann, auch über mehrere Zentimeter Entfernung hin. — In vorliegenden Regenerationsversuchen enthielt das Fruchtkörpermaterial in den Schnittflächen zerstörte und beschädigte Zellen. Es besteht somit zwischen beiden Untersuchungen kein Widerspruch.

HAGIMOTO (1963) und GRUEN (1963) zeigten, daß bei *Agaricus bisporus* in Lamellen ein Stoff gebildet wird, welcher in den Stiel gelangt und das Streckungswachstum reguliert. Bei *Pleurotus* konnte für die Regene-

ration in Fruchtkörpern weder unterschiedliche Intensität noch ein Zentrum festgestellt werden. Auch sehr kleine Stücke verschiedener Herkunft können regenerieren. Ob jeder Fruchtkörperzelle diese Fähigkeit zukommt, müssen weitere Untersuchungen lehren.

Zusammenfassung

Es wurden Regenerationsversuche mit verschiedenen Teilen frisch geernteter *Pleurotus*-Fruchtkörper durchgeführt. Nicht nur die äußeren Fruchtkörperpartien wie Stielrinde und Huthaut sind regenerationsfähig, sondern auch Hutfleisch, Stielfleisch und Lamellen.

Die Intensität der Regeneration (Anlagenzahl je Oberflächeneinheit) zeigt keine Korrelation zum Alter oder zu bestimmten Zonen der Fruchtkörper. Vielmehr hängt sie davon ab, wie gut der Kontakt eines Fruchtkörperstückes mit einem geeigneten Nährboden gelingt. Eine schnelle und hinreichende Versorgung der Hyphenzellen mit Nährstoffen scheint dabei maßgebend zu sein.

Summary

Regeneration experiments with different parts of freshly harvested fruit bodies of *Pleurotus* were performed. Not only the outer parts as the rind of the stipe and the skin of the pileus do regenerate, but also stipe tissue, pileus tissue and lamellae.

The intensity of the regeneration (number of primordia/surface unit) do not show a correlation to the age or special zones of the fruit bodies. It depends rather on a good contact of a piece of a sporophore with a suitable nutrition medium. A rapid and sufficient provision of the hyphal cells with nutritives seems to be responsible for it.

Fräulein LOTTE BAETGE danke ich für zuverlässige Assistenz, Herrn KONRAD ENGELHARDT für die Herstellung der Fotos.

Literatur

- BEVAN, E. A., and R. F. O. KEMP: Stipe regeneration and fruit-body production in *Collybia velutipes* (Curt.) Fr. Nature (Lond.) 181, 1145—1146 (1958).
EGER, G.: Untersuchungen über die Bildung und Regeneration von Fruchtkörpern bei Hutpilzen — I. *Pleurotus Florida*. Arch. Mikrobiol. 50, 343—356 (1965).
HAGIMOTO, H.: Studies on the growth of fruit body of fungi. IV. The growth of the fruit body of *Agaricus bisporus* and the economy of the mushroom growth hormone. Bot. Mag. 76, 256—263 (1963).
GRUEN, H. E.: Endogenous growth regulation in carpophores of *Agaricus bisporus*. Plant Physiol. 38, 652—666 (1963).

Dr. GERLIND EGER,
Institut für Allgemeine Botanik der Ruhr-Universität,
Bochum-Querenburg, Im Lottental