

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

**Untersuchungen über die Bildung und Regeneration
von Fruchtkörpern bei Hutpilzen**

III. *Flammulina velutipes* Curt. ex. Fr. und *Agaricus bisporus* (Lge.) Sing.

Von
GERLIND EGER

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. Juli 1965)

Die erste Veröffentlichung dieser Reihe (EGER 1965a, kurz Teil I genannt) berichtete über eine Stimulation der Fruchtkörperbildung bei *Pleurotus Florida* durch Fruchtkörperstücke der eigenen Art bzw. von *Flammulina velutipes* und *Agaricus bisporus*, die zweite (EGER 1965b, kurz Teil II) über das Regenerationsvermögen der Fruchtkörper von *Pleurotus*. Die vorliegende Arbeit untersucht in analoger Weise Fruchtkörperbildung und Regeneration bei *F. velutipes* und *A. bisporus*.

A. Material und Methode

Material und Methoden sind in Teil I und II beschrieben. Hier seien nur zusätzliche Einzelheiten erwähnt.

a) Der *Flammulina*-Stamm „ $L_1 \times L_7$ “ (in Teil I fälschlich „ $L_1 \times L_2$ “) und der japanische Stamm „ J “ unterscheiden sich in der Fruktifikationswilligkeit. Auf Biomalz (BM)-Agar bildet „ $L_1 \times L_7$ “ 10–20, „ J “ 20–40 Tage nach Aufstellung der Mycelien unter zur Fruchtkörperbildung geeigneten Bedingungen die ersten Basidiokarprien. Bei „ $L_1 \times L_7$ “ sind 80–100% der Kulturen fertil, bei „ J “ nur 8–45%. „ J “ bildet auf BM-Agar nur einzelne, auf Stroh-Torfsubstrat sehr zahlreiche Fruchtkörper. „ $L_1 \times L_7$ “ fruktifiziert auf dem 2. Substrat nicht.

b) Auf gefrorenen (-20°C) oder 1 Std auf $+80^\circ\text{C}$ erhitzten, nicht keimfreien Fruchtkörperstücken wuchsen Bakterien. Da Fälle bekannt sind, in denen Bakterien die Fruktifikation von Basidiomyceten fördern (RAPER u. KRONGELB 1958; URAYAMA 1960 u. 1961; EGER 1961), wurden die Fruchtkörperstücke für einige Versuche 3×1 Std bei $+80^\circ\text{C}$ gehalten oder $\frac{1}{2}$ –1 Std mit 1 atü autoklaviert.

c) Um die Wirkung von Basidiokarpmaterial auf die Fruktifikation der Mycelien zu verfolgen, bestimmten wir 1. die %-Zahl fertiler Kulturen je Behandlungsreihe, 2. die je Mycel gebildete Gesamtzahl von Fruchtkörpern und Anlagen, 3. die Länge des größten Fruchtkörpers je Petrischale. Für jede Versuchsreihe wurde aus den Einzelwerten von 2. und 3. ein Mittelwert berechnet. Diese durchschnittliche „Fruchtkörperzahl“ (2) bzw. „Fruchtkörpergröße“ (3) für behandelte Mycelien und unbehandelte Kontrollen wurden miteinander verglichen und die Differenzen mit dem *t*-Test auf Signifikanz ($P < 5\%$) geprüft.

d) Zur Förderung der Fruktifikation bei *Flammulina* durch arteigenes Material wurden 2 cm lange Stielstücke des Stammes „ J “ verwendet.

B. Versuche und Ergebnisse

I. Förderung der Fruktifikation mit Hilfe von Fruchtkörperstücken

1. Flammulina velutipes

a) Behandlung mit arteigenem Material

In Versuchen von BEVAN u. KEMP (1958) begann, wenn Agarplatten mit homogenisierten Fruchtkörpern beimpft worden waren, die Fruktifikation früher als mit homogenisiertem Mycel. Man konnte daher bei Zugabe arteigener Fruchtkörperstücke zu vorkultiviertem Mycel eine Förderung wie bei *Pleurotus* (Teil I) erwarten. Bei Stamm „J“ war dies auch in allen sechs Versuchen der Fall. Die Zahl fertiler Kulturen stieg auf 80–100% an (vgl. Abschnitt A., a und Tab. 1, Ia), und die durchschnittliche Fruchtkörperzahl und Fruchtkörpergröße (A., c und Tab. 1, Ib u.c) waren etwas höher als bei den Kontrollen. Bei „L₁ × L₇“ dagegen ließen sich in der Regel keine Unterschiede feststellen. Nur in einem Versuch, in dem sich die Fruktifikation aus unbekanntem Gründen verzögert hatte, gab es mit Stielstücken früher Basidiokarprien als bei den Kontrollen.

Tabelle 1. *Beeinflussung der Fruchtkörperbildung von F. velutipes „J“ durch Stielstücke desselben Stammes (I), Stielstücke von Pleurotus Florida (II) und junge Fruchtkörper („button“) von Agaricus bisporus (III)*

Behandlung der FK-Stücke	I			II			III		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
0	—	—	—	92	6,6+	5,4+	91	8,8+	3,9+
–20° C	100	4,0	4,0	92	10,6+	4,0	100	7,0+	3,4+
1 × +80° C	100	4,2+	4,3+	100	8,3+	5,2+	100	3,7+	5,1+
3 × +80° C	83	3,1	5,1+	100	8,8+	5,1+	100	8,4+	7,3+
1 × +120° C	83	3,2	4,6+	100	7,2+	5,5+	100	7,8+	6,2+
Kontrolle, nur Mycel	42	2,1	2,9	33	1,5	3,3	8	0,7	1,3

Erläuterung. FK = Fruchtkörper; a = % fertile Kulturen nach 40 Tagen Versuchsdauer; b = durchschnittliche FK-Zahl; c = durchschnittliche FK-Größe in cm; + = gegenüber Kontrolle signifikant verschieden (vgl. Abschnitt A., c).

b) Behandlung mit artfremdem Material

Pleurotus- und *Agaricus*-Stücke verursachten immer eine Förderung. Bei „J“ zeigten die %-Zahl fertiler Kulturen und die durchschnittliche Fruchtkörperzahl und -größe (siehe A., c) gegenüber den unbehandelten Mycelien eine deutliche Zunahme (Tab. 1, II u. III). Bei „L₁ × L₇“ war die Fruchtbarkeit der Kontrollen bereits 100% und daher nicht mehr zu steigern. Die Basidiokarprien der behandelten Kulturen waren aber im Durchschnitt signifikant größer und zahlreicher. Sie entstanden oft in unmittelbarer Nähe des aufgelegten Fruchtkörperstückes.

Tab. 1 enthält das Ergebnis eines Versuches. Gleichartiges Mycel wurde am gleichen Tag behandelt und im gleichen Kulturraum aufgestellt. Es ist daher zulässig, die Zahlen innerhalb und zwischen den Blöcken I—III zu vergleichen. Berücksichtigt man die großen Schwankungen bei der Fruktifikation paralleler Kontrollserien, so ist kein Unterschied in der Wirkung erhitzten bzw. sterilisierten Materials gegenüber gefrorenem oder frischem festzustellen. Ferner kann man eine etwas stärkere Stimulation durch artfremdes Material als durch arteigenes herauslesen. Dies wird durch weitere Versuche bestätigt.

2. *Agaricus bisporus*

A. bisporus bildet unter keimfreien Bedingungen in der Regel keine Fruchtkörper (vgl. EGER 1961). Bei aseptischer Arbeitsweise konnte weder mit arteigenem noch mit artfremdem Fruchtkörpermaterial die Fruktifikation induziert werden. Das lag nicht etwa an einem ungeeigneten Nährboden. Neben BM-Agar verwendeten wir auch das für Champignonkulturen übliche Kompostsubstrat, welches bei Zusatz von unsteriler

Tabelle 2. Zahl der regenerierten Primordien und Fruchtkörper auf Stielstücken von *Flammulina* (Fruchtkörper 1—7 frisch geerntet, 8—20 bei -20°C gelagert)

Fruchtkörper	Stielstück		
	oberstes	mittleres	unterstes
1	26	12	8
2	22	15	7
3	17	10	9
4	21	10	8
5	20	9	2
6	14	3	7
7	10	26	2
8	16	12	1
9	11	16	0
10	17	7	3
11	27	19	14
12	30	22	10
13	22	9	0
14	9	13	4
15	14	0	0
16	13	17	0
17	26	12	3
18	22	14	7
19	17	8	5
20	21	10	7
	Σ : 375	244	97
	\bar{x} : 18,8	12,2	4,9
	$\bar{x}' - \bar{x}''$:	6,6 ⁺	7,3 ⁺

+ = Mittelwerte sind signifikant verschieden; vgl. A., c.

„Deckerde“ stets Basidiokarpbildung ermöglicht (vgl. „Halbschalentest“, EGER 1961). Dagegen erhielten wir in einigen Fällen bei dem leicht fruktifizierenden Stamm 310a (siehe EGER 1962) auf BM-Nährboden und auf Kompostsubstrat ohne „Deckerde“ Primordien, wenn wir die Kulturen künstlich infizierten. Das geschah mit Auszügen aus „Deckerde“ bzw. mit in Bouillon gezüchteten Bakteriengemischen. Sterile Kulturfiltrate dieser Bakterien waren dagegen wirkungslos (EGER unveröffentlicht).

II. Regenerationsversuche

1. *Flammulina velutipes*

In Anlehnung an Versuche von BEVAN u. KEMP (1958) wurden Stiele kräftiger Fruchtkörper in drei Stücke von etwa 2 cm Länge zerlegt. Wie bei *Pleurotus* (Teil II) beobachteten wir stets die einzelnen Teile eines Fruchtkörpers. So konnten wir anhand der 20 Fruchtkörper in Tab. 2 einen deutlichen Abfall der Regenerationsfähigkeit von oben nach unten feststellen und für 30 weitere statistisch ermitteln. Es ergaben sich im 2. Fall Mittelwerte von 7,1 Regeneraten für das oberste, 3,6 für das mittlere und 1,1 für das untere Stielstück. Sie sind signifikant verschieden. Die Primordien entstanden meistens in Nestern irgendwo auf der Stiel-

Tabelle 3. Regeneration aus Hüten und Hutteilen

Art des Materials	Anzahl			Ort der Regeneration
	a	b	c	
<i>frisch</i>				
ganze Hüte mit Lamellen auf Agar	20	4	1—9	Hutoberfläche und Berührungszone zwischen Huthaut und Agar
ganze Hüte mit Oberseite auf Agar	17	3	1—2	Berührungszone zwischen Huthaut und Agar
halbierte Hüte mit Schnittfläche auf Agar	17	9	1—12	Hutoberfläche, vorwiegend Berührungszone zwischen Huthaut und Agar
Huthaut mit Schnittfläche auf Agar	21	4	2—3	oben auf der Haut
Lamellen	19	0	0	— — — — —
1—1,5 mm dicke Sektoren mit Lamellen	12	0	0	— — — — —
<i>gefroren (-20°C)</i>				
ganze Hüte beliebig auf Agar	23	10	1—13	Berührungszone zwischen Huthaut und Agar bevorzugt, in 2 Fällen Lamellen

Erläuterung. a = auf Agar gelegte Stücke; b = regenerierende Stücke; c = Regenerate je Stück.

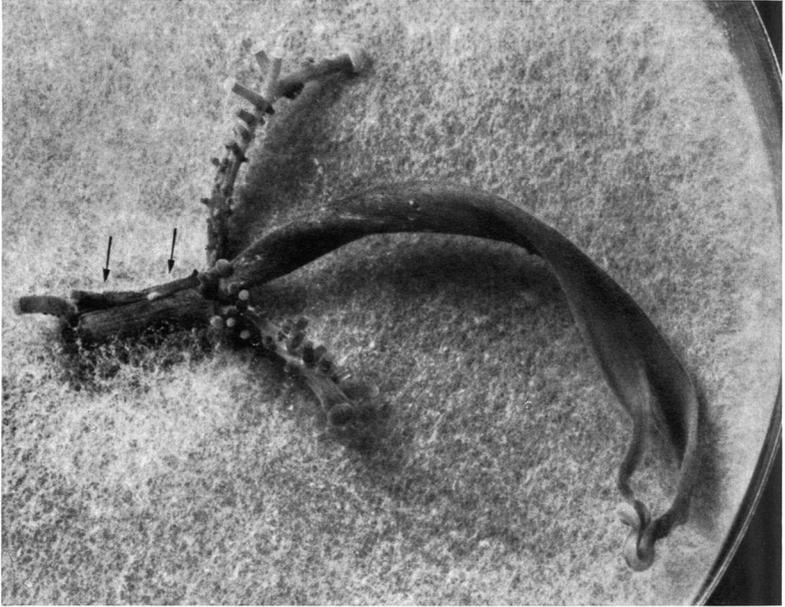


Abb. 1. Regeneration an Stielen. Aus einem Stielstück (Pfeile) haben sich an der rechten Schnittfläche drei kräftige Fruchtkörper gebildet. Auf den beiden kleineren sind wiederum zahlreiche Regenerate entstanden. Diese wurden oben am Stiel größer als unten

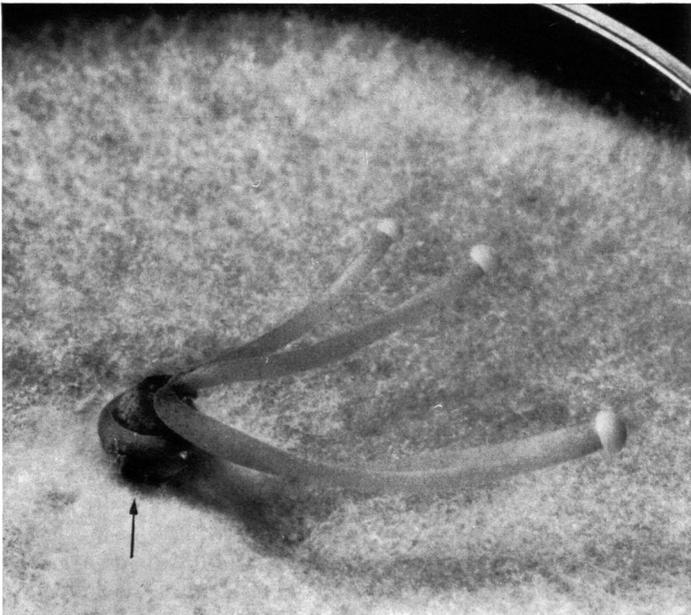


Abb. 2. Reduzierte Regeneration aus Hüten. An dem Stielstummel haben sich drei kräftige Fruchtkörper gebildet. An dem Hut sind erst 7 Tage später Primordien (Pfeil) angelegt worden

oberfläche oder an den Schnittflächen. Eine Bevorzugung dem Agar anliegender Stellen war bei den Stielen nicht zu erkennen, auch nicht bei dünnen Längsschnitten.

3 mm kurze Stücke aus der obersten Stielzone regenerierten verhältnismäßig intensiver als 2 cm lange. Bei 26 Wiederholungen wurden im Mittel 10 Anlagen gezählt. Lagen die Stückchen mit einer Schnittfläche dem Nährboden auf, so entstanden die Primordien am Rand der anderen.

Manchmal bildeten größere Regenerate an ihren Stielen zahlreiche neue Anlagen. Die Primordien höher am Stiel entwickelten sich weiter als diejenigen darunter (Abb. 1).

Hüte und Teile davon zeigten gegenüber den Stielen ein stark reduziertes Regenerationsvermögen (siehe Tab. 3). Dies war besonders deutlich, wenn Hüte mit der Stielnarbe oder einem Stielstummel nach oben auf den BM-Agar gelegt worden waren. Am Stielrest entwickelten sich innerhalb von 10 Tagen neue Fruchtkörper, während man erste Anlagen auf der Huthaut erst 7–10 Tage später erkennen konnte (Abb. 2). An Hutmaterial wurden nicht nur weniger Primordien gebildet, sie blieben auch sämtlich klein und schwach und entstanden bevorzugt in enger Berührung mit dem Nährboden.

Bei -20°C eingefrorenes Material regenerierte wie frisches (Tab. 2 und 3).

2. *Agaricus bisporus*

Versuche mit Stielstücken, Hutstücken und Lamellen verliefen negativ. Eine Regeneration konnte nur gelegentlich an kleinen, ganzen Fruchtkörpern beobachtet werden, welche bei ungünstigen Kulturbedingungen das Wachstum eingestellt hatten (EGER 1963).

C. Diskussion

Betrachtet man das Ergebnis der Untersuchungen über den Einfluß von Basidiokarpstücken auf die Fruchtkörperbildung an Mycelien, so verdienen vor allem drei Beobachtungen hervorgehoben zu werden. 1. Nicht nur Fruchtkörperstücke von *Flammulina velutipes* stimulieren *Pleurotus Florida* (Teil I), sondern auch umgekehrt: *Pleurotus* fördert *Flammulina*. Beide Arten werden außerdem durch Basidiokarpmaterial von *Agaricus bisporus* entsprechend beeinflußt. Es enthalten also die Fruchtkörper zweier holzzersetzender Pilze und einer bodenbewohnenden Art, welche zu zwei verschiedenen Familien (*Ticholomataceae*, *Agaricaceae*) gehören, einen gleichen Wirkungsfaktor. Man kann erwarten, daß diesem allgemeine Bedeutung zukommt. 2. Die kompakten Fruchtkörperstücke von *Pleurotus* und *Agaricus*, welche annähernd gleiche Volumina hatten, beeinflußten die Fruktifikation von *Flammulina* stärker als die arteigenen, mehr oder weniger hohlen Stielstücke von geringerer Masse. Die Wirkung

des Faktors scheint demnach von dem zugesetzten Quantum abzuhängen. 3. Bei *Agaricus bisporus* gelang es nicht, die Fruktifikation auf entsprechende Weise zu induzieren.

In den Regenerationsversuchen zeigten die einzelnen Arten paralleles Verhalten. Bei *Pleurotus Florida* (Teil II) und *Flammulina velutipes* können grundsätzlich aus allen Fruchtkörperteilen neue Basidiokarprien entstehen, während bei *Agaricus bisporus* eine Regeneration aus Fruchtkörperstücken nicht gelang.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Sonderstellung von *Agaricus bisporus* hinsichtlich der Fruchtkörperbildung und stützen die Hypothese, daß die Induktion von Basidiokarprien am Mycel und die Regeneration neuer Fruchtkörper aus Fruchtkörperstücken *ähnliche physiologische Voraussetzungen haben*.

Wie in früheren Versuchen gezeigt wurde, gelangt von Basidiokarpstücken, die auf Mycel gelegt werden, ein die Fruktifikation stimulierender Faktor in das Mycel (Teil I) und kann bei der Verletzung von Zellen vielleicht auch in den Nährboden diffundieren (Teil II). Derselbe Faktor muß aber auch mit der Regeneration in Zusammenhang stehen. Dies demonstrieren Versuche mit *Pleurotus Florida*, in denen nachlassende Regenerationsfähigkeit der Basidiokarpstücke mit zunehmender Fruchtkörperbildung am Mycel verbunden ist (Teil I, Tab. 1) und die Entstehung von Primordien am Mycel parallel zu den Regeneraten an verletzten Lammellenrändern (Teil II, Abb. 6).

Die Frage nach der Art dieses Faktors wurde in Teil I diskutiert. Die neuen Versuche schließen mit Sicherheit die Wirkung lebender Plasmabestandteile oder Mikroorganismen aus, da auch durch Hitze sterilisiertes Material die Fruktifikation fördert. Es muß sich um eine chemische Verbindung (oder einen Komplex solcher Verbindungen) handeln. Die bisherigen Versuche geben noch keine Auskunft, ob dies ein Wirkstoff (Wirkstoffkomplex) oder ein Nährstoff ist. Versuche mit *Pleurotus Florida* und *Flammulina*-Stamm „J“, in denen geringe Mengen Fruchtkörpersubstanz einen deutlichen Effekt erzeugten, sprechen für einen Wirkstoff. Bei *Flammulina* „L₁ × L₇“ förderten nur verhältnismäßig große Fruchtkörperstücke. Hier läßt sich ein Nährstoffeinfluß nicht ausschließen.

Zum Schluß sei noch auf Einzelheiten der Regenerationsversuche mit *Flammulina velutipes* eingegangen, da sie eine Möglichkeit zur Erklärung der negativen Ergebnisse mit *Agaricus* andeuten. Über die Feststellung eines Regenerationsvermögens hinaus, wie es BEVAN u. KEMP (1958) beschrieben, konnten wir eine Zunahme der Regenerationsintensität in den Stielen von unten nach oben feststellen und einen schroffen Abfall in den Hüten. Diese Unterschiede können nicht methodisch bedingt sein. Auf Grund der in Teil II gemachten Erfahrungen wurde für möglichst engen Kontakt der einzelnen Stücke mit dem Nährboden gesorgt. Dies erwies

sich bei Hutmaterial als förderlich, bei Stielen dagegen regenerierten sowohl dem Agar anliegende als auch abstehende Teile. Es müssen die Unterschiede im Regenerationsvermögen innere Ursachen haben. Setzen wir voraus, daß Regeneration und Fruchtkörperbildung von der Existenz eines Stoffes X abhängen und daß steigende Konzentrationen dieses Stoffes zunächst fördern, nach Überschreiten eines breiten Optimums aber hemmen, so müßten die Hüte überoptimale Konzentrationen von X enthalten. Diese Annahme ließe sich durch Versuche leicht prüfen. Man brauchte nur steigende Gewichte vergleichbaren Stielmaterials auf Mycel einwirken zu lassen und mit der Wirkung gleicher Quanten Hutmaterials zu vergleichen.

Wirkt X entsprechend einer Optimumskurve, dann kann die Fruktifikation eines Mycels, welches diese Substanz verhältnismäßig schnell synthetisiert, durch kleine Fruchtkörperstücke nur wenig gefördert werden. So könnte es etwa bei *Flammulina* „ $L_1 \times L_7$ “ sein. Bei *Agaricus bisporus* enthalten vielleicht die Hyphen des Mycels für die Fruktifikation zu hohe Konzentrationen von X. Dann wäre Basidiokarpbildung nur möglich, wo diese Konzentration lokal verringert würde. Das könnte durch Adsorption an Aktivkohle (EGER 1961) oder durch die Tätigkeit lebender Bakterien (S. 285) geschehen. Da eine Regeneration aus Fruchtkörperstücken bei diesem Pilz nicht gelang, müßte X in den Fruchtkörperzellen ebenfalls überoptimal vorhanden sein. Die Optimum-Konzentrationen für Fruchtkörperinduktion und Regeneration brauchen nicht identisch zu sein.

Zusammenfassung

Bei *Flammulina velutipes* läßt sich Fruchtkörperbildung am Mycel durch Zugabe arteigener und artfremder Fruchtkörperstücke stimulieren, wie das für *Pleurotus Florida* bereits berichtet wurde. Da auch durch Hitze sterilisiertes Material wirkt, kann mit der Existenz einer artunspezifischen, die Fruchtkörperbildung induzierenden Substanz gerechnet werden.

Bei *F. velutipes* nimmt das Regenerationsvermögen der Fruchtkörper am Stiel von unten nach oben zu und fällt im Hut steil ab.

Mycel von *Agaricus bisporus* dagegen reagiert auf Zugabe von Fruchtkörpermaterial nicht. Auch eine Regeneration an Basidiokarbstücken war nicht zu beobachten. Dies unterstreicht die Sonderstellung dieses Pilzes, der lebende Bakterien zur Fruchtkörperinduktion zu benötigen scheint.

Summary

In *Flammulina velutipes* fruit-body formation on the mycelium may be stimulated by the addition of basidiocarp pieces of the own or of different species as has been reported for *Pleurotus Florida*. Heat-sterilized material

retains the stimulating character. Thus the existence of a fruit-body inducing chemical compound is likely.

In *F. velutipes* regeneration intensity of fruit-bodies is increasing from the bottom to the top of the stipe and decreasing strongly in the pileus.

Mycelium of *Agaricus bisporus* in contrast does not react on the addition of fruit-body material. Regeneration could not be observed on basidiocarp pieces. This emphasizes the isolated position of this fungus, that seems to require living bacteria for basidiocarp induction.

Frl. WALTRAUD KIRCHNER, Frl. LOTTE BAETGE und Frau MARIANNE SCHNEIDERERIT 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 Funktion der Deckschicht bei der Fruchtkörperbildung des Kulturchampignons, *Psalliota bispora* Lge. *Arch. Mikrobiol.* **39**, 313—334 (1961).
- Untersuchungen zur Fruchtkörperbildung des Kulturchampignons. *Mushroom Sci.* V (Philadelphia) **1962**, 314—329.
- Über die Regeneration von Fruchtkörperanlagen aus Fruchtkörpern von Hutpilzen. *Z. Pilzk.* **29**, 24—26 (1963).
- Untersuchungen über die Bildung und Regeneration von Fruchtkörpern bei Hutpilzen. I. *Pleurotus Florida*. *Arch. Mikrobiol.* **50**, 343—356 (1965a).
- Untersuchungen über Bildung und Regeneration von Fruchtkörpern bei Hutpilzen. II. Weitere Regenerationsversuche mit *Pleurotus Florida*. *Arch. Mikrobiol.* **51**, 85—93 (1965b).
- RAPER, J. R., and G. S. KRONGELB: Genetic and environmental aspects of fruiting in *Schizophyllum commune* Fr. *Mycologia* (N. Y.) **50**, 707—740 (1958).
- URAYAMA, T.: Studies on fruit body formation of *Psilocybe paneoliiformis* Murrill in pure culture. *Memoirs Faculty Arts a. Education, Miyazaki University* **9**, 393—462 (1960).
- Stimulative effect of certain specific bacteria upon mycelial growth and fruit body formation of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. *Bot. Mag. Tokyo* **74**, 56—59 (1961).

Dr. G. EGER,

Institut für Allgemeine Botanik, 463 Bochum-Querenburg, Im Lottental