

Phyton (Horn, Austria)	Vol. 41	Fasc. 1	111–128	29. 6. 2001
------------------------	---------	---------	---------	-------------

In vitro-Anzucht von *Nigritella* (*Orchidaceae-Orchideae*) aus Samen, mit Hilfe von symbiotischen Pilzen

Von

Gerfried DEUTSCH*

Mit 5 Abbildungen

Eingelangt am 15. Juni 2000

Key words: *Nigritella*, *Orchidaceae*, *Rhizoctonia*, *Hyphomycetes*. – Protocorm, mycorrhiza, symbiotic germination.

Summary

DEUTSCH G. 2001. In vitro-propagation of *Nigritella* (*Orchidaceae-Orchideae*) from seeds with the help of mycorrhizal fungi – *Phyton* (Horn, Austria) 41(1): 111–128, 5 figures. – German with English summary.

Two strains of the form genus *Rhizoctonia*, isolated from *Nigritella rhellicani* roots stimulated germination and further development not only of *Nigritella*, but also that of *Gymnadenia* and *Dactylorhiza*. Seeds were sterilised briefly in an adapted sterilization apparatus and put on media, which were inoculated with *Rhizoctonia* before. Typical fungal coils (peloton) were visible only after swelling of the seeds, after the fungus had entered the protocorm through the rhizoids. Approximately one year after germination, the protocorms, which had developed shoots and roots, were established successfully in mineral soil.

The investigation of roots of *Nigritella* from nature has shown that they were infected more or less heavily throughout the year.

Zusammenfassung

DEUTSCH G. 2001. In vitro-Anzucht von *Nigritella* (*Orchidaceae-Orchideae*) aus Samen, mit Hilfe von symbiotischen Pilzen. – *Phyton* (Horn, Austria) 41(1): 111–128. 5 Abbildungen. – Deutsch mit englischer Zusammenfassung.

*) Mag. Gerfried DEUTSCH, Institut für Botanik der Universität Graz, Holteigasse 6, A-8010 Graz, Österreich (Austria, Europe. – e-mail: gerfried.deutsch@kfunigraz.ac.at

Zwei aus den Wurzeln von *Nigritella rhellicani* isolierte Mykorrhizapilze der Formgattung *Rhizoctonia* bewirkten die Keimung und Weiterentwicklung sowohl von *Nigritella*, als auch von *Gymnadenia* und *Dactylorhiza*. Die Samen wurden mittels der hier vorgestellten Sterilisationsapparatur kurz sterilisiert und auf zuvor mit *Rhizoctonia* inokulierte Nährböden übertragen. Der Pilz drang erst nach erfolgter Quellung der Samen über Rhizoide ein und bildete die charakteristische Hyphenknäuel-Struktur (Peloton) aus. Etwa ein Jahr nach erfolgter Keimung konnten jene Protokorme, welche Sproß und Wurzel ausgebildet hatten, erfolgreich in Erdkultur überführt werden.

Weiters konnte bei der Untersuchung der Wurzeln von *Nigritella* aus dem Freiland eine ganzjährige Verpilzung der Wurzelrinde festgestellt werden.

Einleitung

Durch Kreuzungsexperimente und anschließende Anbauversuche in vitro wurde versucht, neue Zugangsmöglichkeiten zur weiteren Erforschung des Fortpflanzungsmodus von *Nigritella* L.C.M. RICHARD zu eröffnen. Während die Ergebnisse der in vitro Anzucht schon hier veröffentlicht werden, sollen die Ergebnisse der Versuche über den Fortpflanzungsmodus erst nach Abschluß der noch andauernden Untersuchungen publiziert werden.

Die Entwicklung der Orchideensamen in der Natur ist meist nur möglich, wenn bestimmte Bodenpilze (meist Formgattung *Rhizoctonia*, *Hyphomycetes*) die Sämlinge infizieren und in ihnen eine endotrophe Mykorrhiza ausgebildet wird. Die Pilze versorgen die Sämlinge mit Wasser, Nährsalzen und Kohlenhydraten (BURGEFF 1936: 30).

Aufgrund dieser Tatsache ist die gärtnerische Anzucht von Nigritellen, wie auch von anderen Orchideen, aus Samen (von Zufallskeimungen abgesehen) nur unter kontrollierten Bedingungen in vitro möglich.

Der Begriff „Mycorhiza“, Pilzwurzel, wurde von FRANK 1885: 129 erstmals für ein Zusammenleben von im Boden befindlichen Pilzen mit den Wurzeln höherer Pflanzen geprägt. Aber erst BERNARD erkannte 1903 die Bedeutung der Orchideenmykorrhiza für die Keimung und das Wachstum der Orchideen. Bis zum Jahre 1909 gelang BERNARD erstmals die Isolierung und Reinkultur zahlreicher Orchideenpilze (BERNARD 1909: 25ff). Nur kurze Zeit später gewann auch BURGEFF zahlreiche Orchideenpilzreinkulturen (BURGEFF 1936: 125). Mit diesen Pilzen glückten beiden Forschern erstmals in vitro-Samenkeimungen von Orchideen.

Die Entdeckung von KNUDSON im Jahre 1919 (KNUDSON 1922), daß der Symbiont durch eine definierte Nährlösung ersetzt werden kann, war der Durchbruch in der Orchideenkultur. Von nun an konnten vor allem tropische Orchideen in fast beliebiger Stückzahl herangezogen werden. Die bis dahin gebräuchliche symbiotische Methode wurde zumindest bei tropischen Orchideen immer mehr von asymbiotischen Methoden verdrängt.

Heute wird die symbiotische Technik nur noch vereinzelt bei der Kultur schwer keimender terrestrischer Orchideen verwendet und verliert wegen der zeitraubenden Isolierung der Symbionten und wegen der oft unsicheren Ergebnisse immer mehr an Bedeutung und wurde von der asymbiotischen Anzucht fast völlig abgelöst.

Während viele epiphytische Orchideen auf simplen Nährböden nach einfacher Sterilisation der Samen gut keimen, gelingt dies bei vielen terrestrischen Orchideen nicht. Erst BURGEFF 1936: 50–51 erkannte den Zusammenhang zwischen Struktur der Testa und der Benetzbarkeit der Samen. Er empfahl vor der Keimung eine zweimonatige sterile Wässerung für die schwer keimenden europäischen Erdorchideen.

Erst von VEYRET 1969 wurde eine meist braune, den Embryo umgebene Hülle als wesentliche Struktur erkannt, die sie „la carapace“ nannte. Dieser Terminus wurde von LUCKE 1981: 182, 1983 als „die Carapace“ übernommen. TEPPNER 1999: 292 schlägt, dem Gebrauche in der Zoologie entsprechend (HENTSCHEL & WAGNER 1986: 166, 459), „der Carapax“ als deutschsprachige Form vor. HENTSCHEL & WAGNER 1986: 166, 459 leiten Carapax folgendermaßen ab: griech. ho und he charax – die Befestigung, Palisade; griech. pagios – fest. Die Mächtigkeit des, aus dem inneren Integument, allenfalls zusätzlich aus dem Nucellus, entstehenden Carapax steht in direktem Zusammenhang mit dem Keimverhalten in vitro. Er stellt eine Barriere gegen Wasser dar, und verwehrt damit den Zutritt von Nährstoffen zum Embryo. Die Stärke des Carapax ist abhängig von Jahr, Reifegrad, Standort und Orchideenart. Erst eine Samenbehandlung mit Natriumhypochlorid (NaOCl), die über die notwendige Zeitdauer zur Sterilisation der Samen hinausgeht, brachte erste nennenswerte Keimerfolge (LUCKE 1981: 184). Die wesentliche Wirkung der Natriumhypochloridlösung besteht dabei in der Penetration des Carapax, die durch Alkalyse und Oxidation destabilisiert und damit wasserdurchlässig wird (LUCKE 1982: 108).

Die erste asymbiotische Keimung von *Nigritella* Arten gelang HAAS in den siebziger Jahren bei *Nigritella rhellicani* [als *N. nigra*] und *Nigritella miniata* (HAAS 1977: 69–73). Er macht jedoch keinerlei Angaben über die Weiterentwicklung der Protokorme. Erst MALMGREN 1992a: 60, 1992b: 286 berichtet wieder über die asymbiotische Keimung und Kultur der skandinavischen Sippe *Nigritella nigra* subsp. *nigra*.

Über symbiotische Keimungen bei *Nigritella* liegen keinerlei Berichte vor.

Material und Methode

Isolierung und Kultur der Mykorrhizapilze

Wurzeln von *Nigritella rhellicani* Jungpflanzen vom natürlichen Standort wurden im Labor in fließendem Leitungswasser von anhaftendem Schmutz befreit und

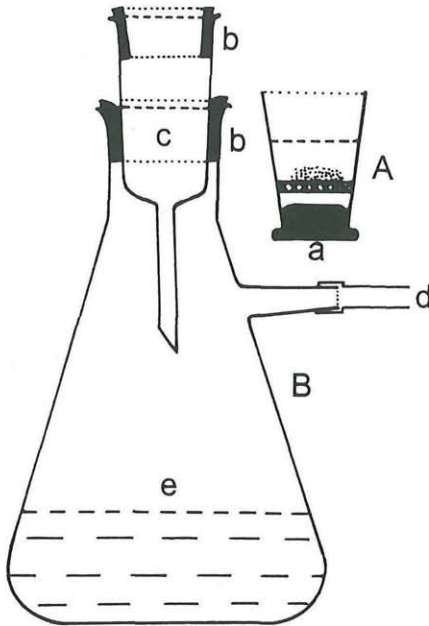


Abb. 1. Desinfektionsapparat. A: Glasfritte mit Desinfektionslösung und Samen, mit Gummistoppel (a) verschlossen. B: Erlenmeyerkolben, mit Auffangraum (e) für die abgesaugte Desinfektionslösung. b. Gummidichtung, c. Trichteraufsatz, d. Anschluß zur Wasserstrahlpumpe.

anschließend in 0,5%igem Natriumhypochlorid im Desinfektionsapparat (Abb. 1) für eine Minute grob oberflächlich sterilisiert. Die weiteren Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Reinluftbank. Unter einer Stereolupe wurden Stücke des verpilzten Rindengewebes herausgeschnitten und auf F.I.M. Medium (CLEMMENTS & al. 1986: 438) in Petrischalen ausgelegt. Außerdem wurden auch einzelne Hyphenknäuel aus den Zellen mittels einer dünnen Glaskapillare entnommen und ebenfalls auf F.I.M. Medium ausgelegt. Dabei wurde darauf geachtet, die Gewebestücke bzw. Pelotons in das Medium einzudrücken, um aerobe Bakterien an zu starkem Wachstum zu hindern.

Die Petrischalen wurden bei ca. 25 °C inkubiert und alle 24 Stunden unter der Stereolupe kontrolliert. Nach etwa 48 Stunden wuchsen die ersten Hyphen in das umliegende Medium ein. Die Pilze wurden rein morphologisch nach Verzweigungsart und Wachstumsgeschwindigkeit unterschieden und es wurden davon Reinkulturen angelegt.

Etwaige bakterielle Verunreinigungen konnten durch Durchwachsen

von mediumfreien Lücken vermieden werden. Dabei wurden aus dem erkalteten Agar rund um das aufgebraute Rindengewebe bzw. Hyphenknäuel eine etwa 5 mm breite Lücke ausgestochen, die von den Hyphen leicht durchwachsen, von den Bakterien aber nicht überwunden werden konnte.

Die solchermaßen isolierten und von Bakterien gereinigten Pilzkulturen wurden nun im Anschluß auf ihre symbiotischen Eigenschaften getestet.

Ansatz für den Keimkompatibilitätstest

Durch einen Aussaattest können aus der Vielzahl der isolierten Pilze diejenigen, die Keimung und Weiterentwicklung am Besten fördern, gefunden werden.

Die Pilze wurden durch Ausstechen von etwa 5 mm² großen Agarwürfeln aus den Reinkulturen und Übertragen auf den Haferflockennährboden nach CLEMMENTS & ELLYARD 1979: 815 übertragen. Den Kulturen wurde etwa 14 Tage Zeit gelassen, die Agar-Platten vollständig zu bewachsen. Pilze, die auf dem oben genannten Nährboden ausschließlich Lufthyphen ausbildeten, wurden aus Erfahrung als unbrauchbar angesehen und verworfen.

Danach wurden auf die Kulturen Samen von *Nigritella rhellicani* aufgebracht und bei ca. 20 °C dunkel inkubiert.

Samenmaterial

Samenmaterial folgender Arten und Herkünfte wurden verwendet:

Nigritella lithopolitana RAVNIK: Österreich, Kärnten, Hochobir, 46°30'30"N/14°29'15"O, ca. 2000 m, 13.07.1997, leg. G. DEUTSCH.

Nigritella rhellicani TEPPNER & KLEIN:

Österreich, Steiermark, Gaberl, Wölkerkogel, 1. Kehre nach Altem Almhaus, Richtung Maria Lankowitz. 47°5'N/14°55'O, ca. 1550 m 16.06.1997, leg. G. DEUTSCH
Italien, Lombardia, Alpi Orobie, Pizzo Camino, Ind. 3, 07.1997, leg. R. KARL.

Nigritella miniata (CRANTZ) JANCHEN: Österreich, Steiermark, Aflenz, Bürgeralm, Zlacken, 47°36'N/15°14'O, ca. 1740 m. 1.07.1997, leg. G. DEUTSCH.

Nigritella nigra (L.) RCHB. fil. subsp. *austriaca* TEPPNER & KLEIN: Österreich, Steiermark, Mürtztal, Hohe Veitsch, Schaller Rinne, ~300 m östlich des Graf Meran Hauses, 47°38'40"N/15°24'10"O, ca. 1800 m. 26.06.1997, leg. G. DEUTSCH.

Nigritella widderi TEPPNER & KLEIN: Österreich, Steiermark, Mürtztal, Hohe Veitsch, Schaller Rinne, ~300 m östlich des Graf Meran Hauses, 47°38'40"N/15°24'10"O, ca. 1800 m. 26.06.1997, leg. G. DEUTSCH.

Samenmaterial wurde teilweise reif in der Natur entnommen, meist stammte es aber aus kontrollierten Kreuzungen zwischen in Kultur befindlichen *Nigritella*-Individuen oben genannter Standorte. Die Samen wurden jeweils reif gerettet, von anderen Pflanzenresten gereinigt und meist sofort ausgesät. Teilweise wurde auch mehrere Monate altes, bei 4 °C bzw. -18 °C gelagertes Samenmaterial verwendet.

Aussaat und Kultur

Vorbereitung des Kultursubstrates

Als Aussaatgefäße wurden Glaspetrischalen und zur weiteren Kultur 250 ml Glasflaschen verwendet. Zu Beginn wurde Pilzmyzel aus der Stammkultur mittels Ausstechen eines etwa 5 mm² großen Agarwürfels und Übertragen auf den Haferflockennährboden nach CLEMENTS & ELLYARD 1979: 815 überimpft. Nach einer Kulturdauer von 14 Tagen bei Zimmertemperatur ergab der so vorbereitete Mykorrhizapilz-Agar die Grundlage zur symbiotischen Kultur.

Desinfektionsapparat für Orchideensamen

Angeregt durch die Vorstellung einer Desinfektionsfritte und einer Vakuumfritte durch LUCKE 1975, 1983, wurde eine ähnliche Glasfritte adaptiert (Abb. 1), jedoch wird nur der untere Teil der Fritte mittels Gummistoppel (a) verschlossen. Nach Einfüllen der zu sterilisierenden Samen und der Sterilisationsflüssigkeit wird die Mischung, die zur Bleichung notwendige Zeit mit einem Spatel umgerührt. Zum Absaugen der Desinfektionslösung wird der Stoppel entfernt und die Fritte (A) in den passenden Aufsatz (c) auf den Erlenmeyerkolben aufgesetzt. Die Flüssigkeit fließt nun durch den mittels Wasserstrahlpumpe erzeugten Unterdruck (d) rasch in das Kolbeninnere (e) ab. Die feinen Samen verbleiben am Grund der Fritte und können leicht mittels eines Spatels entnommen werden. Durch das rasche Absaugen der Desinfektionsflüssigkeit können exakte Desinfektionszeiten eingehalten werden.

Die gesamte Apparatur ist dauernd in der Querstrombank aufgebaut. Das bedeutet, daß der gesamte Sterilisationsvorgang unter sterilen Bedingungen abläuft,

und die Fritte im Gegensatz zu LUCKE daher nicht verschlossen zu werden braucht. Dadurch sind Manipulationen auch während des Sterilisationsvorganges möglich.

Die Fritte wird nach Gebrauch unter fließendem Leitungswasser kräftig ausgespült und ebenfalls in der Werkbank aufbewahrt.

Die vorgestellte Desinfektionsfritte hat sich mittlerweile auch für die Desinfektion anderer Samen und Explantate für die *in vitro* Kultur bewährt und sich als überaus praktisch erwiesen.

Sterilisationszeit und Aussaat

Die Samen wurden mit 0,5% Natriumhypochlorid (NaOCl) 5 Minuten sterilisiert, und nach dem Absaugen der Sterilisationslösung mit sterilem, destilliertem Wasser gespült. Die Samen wurden mittels eines abgeflamnten Spatels auf teils mit den Isolaten P. 16, teils mit P. 18 infizierten Nährböden übertragen und im Klimaschrank dunkel bei ca. 18 °C aufgestellt.

Beim Vorgang der Sterilisation bleiben unweigerlich Samen in der Glasfritte hängen und sind für eine weitere Verwendung nicht mehr zugänglich. Daher wurde, besonders wenn nur wenig Samenmaterial vorhanden war, völlig auf die Sterilisation verzichtet und die Samen direkt aus dem Vorratssäckchen mittels eines abgeflamnten Spatels in der Sterilbank auf die vorbereiteten Schalen übertragen. Dabei wurden sie leicht ins Medium eingedrückt um eine stärkere Benetzung der trockenen Samen zu erreichen.

Die Protokorme wurden etwa alle zwei Wochen auf frisches Haferflocken-Medium übertragen. Der Pilz hatte dabei jeweils eine Vorlaufzeit von etwa 10 Tagen.

Gewöhnung der Pflanzen an Erdkultur

Die Pflanzen wurden erst nachdem sie Sproßspitze und erste Wurzeln angelegt hatten, etwa in einem Alter von 8 Monaten, in ein mineralisches Erds substrat pikiert. Um dabei Verluste zu minimieren und das Anwachsen zu fördern, wurden die Pflanzen zuvor einer mindestens 8 wöchigen Kühlperiode (3–5 °C) unterworfen. Erst dann wurden sie aus der Flasche genommen und das Nährmedium durch vorsichtiges Abwaschen mit lauwarmem Wasser entfernt.

Die Pflanzen wurden in sterilisiertes, aufgekalktes Substrat (Rindensubstrat : Sand : Seramis im Verhältnis 1 : 2 : 1), das etwa 2 Wochen zuvor mittels Inokulum mit dem Pilz P.16 beimpft wurde, gesetzt.

Ergebnisse

Infektionsgrad der Wurzeln im Freiland

Da zur Isolierung neuer Mykorrhizapilze immer wieder Wurzeln von *Nigritella*-Pflanzen von den entsprechenden Naturstandorten untersucht wurden, konnten Erkenntnisse über Infektionsgrad, Anzahl der vorhandenen Pilze sowie etwaige saisonale Schwankungen der Infektion gewonnen werden. Sämtliche untersuchten Wurzeln (mit Ausnahme von frisch gebildeten Wurzelspitzen) zeigten weitgehend unabhängig von der Jahreszeit eine starke Infektion der Wurzelrinde. In dieser Schicht waren die von Pilzknäueln (Pelotons) ausgefüllten Zellen leicht unter der Stereolupe zu erkennen. Auch von außen waren infizierte Stellen un-

schwer durch die gelb-braune Färbung der Rhizodermis zu erkennen. Die Verpilzung war jedoch nicht gleichmäßig über die ganze Wurzel verteilt, sondern es gab immer wieder einzelne, verschieden große Gruppen von Zellen mit unterschiedlich alten Infektionen. An verpilzten Wurzelabschnitten konnten keine Stärkekörner beobachtet werden, wohl aber an nichtinfizierten Stellen, bei denen die Stärkekörner sofort beim Verletzen der Zellen herausrieselten.

Anhand der unterschiedlichen Morphologie und Wuchsgeschwindigkeit der Hyphen am Nährboden konnten oft mehrere Pilze aus einer Wurzel unterschieden werden. Bis zu vier verschiedene Pilze pro Wurzelfragment von *Nigritella* wurden beobachtet. Die Untersuchungen an den Wurzeln wurden von Juni bis Anfang November durchgeführt. Dabei wurden Wurzeln aller Altersstufen untersucht: Wurzeln die an der vorjährigen Knolle entsprangen, aber auch Wurzeln die sich im Laufe des Sommers an der jungen Knolle entwickelten. In all diesen Experimenten wurden Symbionten in den Wurzeln beobachtet und isoliert. Allerdings zeigte sich in den, im Jahr der Untersuchung an der neuen Knolle gebildeten Wurzeln ein etwas schwächerer Infektionsgrad. Da in den vorjährigen Wurzeln der höchste Symbiontengehalt zu finden ist und Mykorrhiza-Strukturen die ganze Vegetationszeit über gefunden wurden, ist anzunehmen, daß es in der ganzen Vegetationszeit über zu Neuinfektionen kommt, bzw. Mykorrhizapilze in den Wurzeln den Winter überdauern.

In den Knollen selbst fanden sich keinerlei Anzeichen von Symbionten.

Isolierung und Kultur der Mykorrhizapilze

Etwa zwei Tage nach dem Auslegen der oberflächlich sterilisierten Wurzelstücke bzw. der Pelotons wurden die ersten auswachsenden Hyphen sichtbar. Sie wuchsen meist sternförmig auseinander und bildeten an den Langhyphen die für die Gattung *Rhizoctonia* charakteristischen Kurzhypen aus (Abb. 2).

Insgesamt wurden in den zwei Versuchsjahren etwa 80 in Morphologie und Wuchsgeschwindigkeit unterschiedliche Pilze isoliert. Die Hyphen wuchsen hauptsächlich an der Agaroberfläche, und es bildeten sich sowohl auf dem nährstoffarmen Isolierungsmedium (F.I.M) als auch auf dem etwas nährstoffreicheren Oat-Medium kaum Lufthyphen aus. Wurden die Pilze in etwa zu $\frac{3}{4}$ befüllten Eproutetten übertragen, so wuchsen die

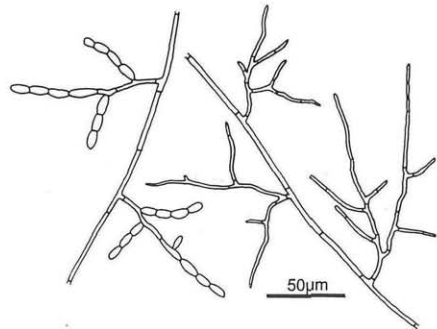


Abb. 2. Hyphen und Konidien von *Rhizoctonia* sp. Isolat P. 16 aus *Nigritella rhellicani*.

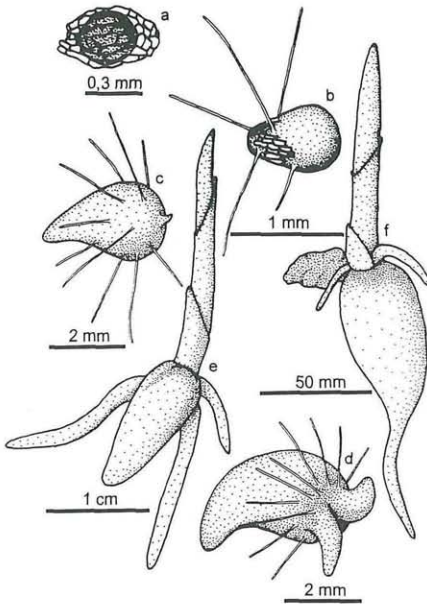


Abb. 3. Entwicklung von *Nigritella* vom Samen bis zur Jungpflanze. – a. reifer Samen mit Embryo und umgebender Testa. – b. gekeimter Embryo mit ersten Rhizoiden, sog. Protokorm. – c. Protokorm mit Sproßspitze. – d. Protokorm mit beginnender Wurzelbildung und Streckung des Sprosses. – e. Jungpflanze mit ersten Wurzeln und ergrünem Sproß zur Zeit des Auspflanzens in Erds substrat. – f. Jungpflanze mit erster, deutlich vergrößerter Knolle, kurz vor Entfaltung der Blätter, 1 Jahr nach der Etablierung in Erde.

mung ab einer Größe von ca. 3 mm, während *Nigritella* erste Sproßspitzen erst etwa nach 4 Monaten ausbildete.

Einige der isolierten Pilze brachten die Samen zwar zum Keimen, konnten aber deren weitere Entwicklung nicht fördern. Die Protokorme begannen meist im Stadium der ersten Rhizoiden, nach etwa 3 Monaten, abzusterben. Die meisten Isolate schienen jedoch keinerlei Wirkung auf die aufgebrauchten Samen zu haben, selbst bereits gekeimte Samen die nachträglich aufgebracht wurden, wurden nicht infiziert.

Auf der Kontrollplatte ohne Pilz war trotz vereinzelter Keimung keinerlei Weiterentwicklung zu beobachten.

Hyphen in allen Fällen in das Medium ein und konnten auch Tiefen von etwa 10 cm erreichen.

Keimkompatibilität

Alle isolierten Pilze wurden durch Keimversuche mit Samen von *Nigritella rhellicani* auf ihre Keimkompatibilität getestet. Von den etwa 80 isolierten Pilzen zeigten sich nur zwei Isolate (P. 16 und P. 18) aus *Nigritella rhellicani* als förderlich für die Keimung der Samen und Weiterentwicklung der Sämlinge von *Nigritella*. Sie bildeten nach einsetzendem Wachstum der Protokorme die charakteristischen Hyphenknäuel (Pelotons) aus (Abb. 4).

Außer der Gattung *Nigritella* keimten mit diesen Pilzen auch verschiedene *Dactylorhiza*-Arten wie *D. fuchsii*, *D. praetermissa*, *D. majalis* und *D. incarnata* sowie *Gymnadenia conopsea* und *G. odoratissima*.

Die Entwicklung der Protokorme verlief bei *Dactylorhiza* und *Gymnadenia* wesentlich rascher als bei *Nigritella*. Die ersten Sproßspitzen zeigten sich bei *Dactylorhiza* beispielsweise schon 2–3 Wochen nach der Keimung

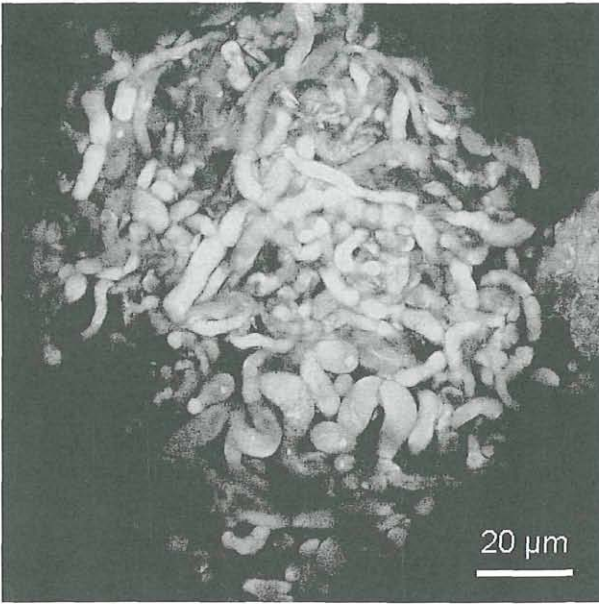


Abb. 4. Hyphenknäuel (Peloton) aus einem in Kultur gezogenen Protokorm von *Nigritella rhellicani*. phot. 4. 12. 1996.

Charakterisierung der verwendeten Pilze

Beide Isolate P. 16 und P. 18 können aufgrund morphologischer und cytologischer Befunde sowie nach der Art ihres Verzweigungsmusters eindeutig der Formgattung *Rhizoctonia* (*Hyphomycetes*) zugeordnet werden:

Die hyalinen und gleichmäßig septierten schnallenlosen Hyphen des Pilzisolates P. 16 aus *Nigritella rhellicani* verzweigen sich nur wenig und zeigen ein unbegrenztes Wachstum in einer Richtung. Diesen Langhyphen entspringen in ziemlich regelmäßigen Abständen Kurzhhyphen, die stärker verzweigt sind und etwa den gleichen Durchmesser aufweisen. Der Durchmesser, sowohl der Lang- als auch der Kurzhyphen beträgt ca. 4–6 µm. Je nach Alter der Kultur können statt dieser Kurzhhyphen auch Monilienketten gebildet werden. Die Monilienketten sind meist verzweigt, selten unverzweigt, und hyalin. Die Chlamydo-sporen haben eine Länge von etwa 22–24 µm und sind zwischen 8 und 12 µm breit (Abb. 2). Alle Hyphen, aber auch Monilienketten, fusionieren an den Berührungspunkten. Nach längerer Kulturzeit werden auch hyaline bis leicht beige Sklerotien von unterschiedlicher Größe gebildet. Diese zwischen 0,3 und 10 mm großen rundlichen Sklerotien bestehen aus größeren Ansammlungen von Monilien und können sowohl am Medium als auch am Deckel der Kulturschalen auftreten.

Der Pilz vermag auch das Nährmedium zu verlassen und die Glaswände der Kulturgefäße mit seinem Hyphengeflecht zu überziehen. Andererseits dringt der Pilz auch sehr tief ins Nährmedium ein und kann in Eprouvetten etwa 10 Zentimeter tief ins Medium einwachsen.

Durch Anfärben mit Acridinorange lassen sich zwei Zellkerne pro Segment nachweisen.

Das Isolat P. 18 gleicht P. 16 sowohl in Gestalt als auch in der Größe der Organe. Beide konnten aber jüngst durch molekularbiologische Methoden eindeutig voneinander unterschieden werden.

Keimung und Entwicklung von *Nigritella*

Die Aussaaten wurden, um etwaige Verunreinigungen durch Schimmelpilze oder Bakterien rechtzeitig bekämpfen zu können und die Keimung und Weiterentwicklung der Pflanzen zu verfolgen, in regelmäßigen Abständen, etwa jede Woche, unter der Stereolupe kontrolliert. Dabei wurde der Begriff „Keimung“ als das Sprengen der Testa und gleichzeitiges Austreten von Rhizoiden aufgefaßt.

Wenige Tage nach dem Aufbringen der Samen auf das verpilzte Medium quollen die meisten Samen deutlich auf. Die Keimung der Samen erfolgte etwa 3–4 Wochen nach der Aussaat einigermaßen gleichmäßig, mit sehr hoher Keimrate von ca. 90% der Samen mit gut ausgebildeten Embryonen.

War die Keimung noch relativ einheitlich und gleichmäßig, zeigten sich in der Weiterentwicklung der Pflanzen große Unterschiede, nicht nur zwischen den Schalen, sondern auch innerhalb einer Petrischale. Besonders auffällig war, daß eine schnellere Entwicklung meist am Rand der Schale bzw. an leicht erhöhten Stellen stattfand, also meist vom Medium leicht exponierte Stellen betraf.

Einige Protokorme lagen in ihrer Entwicklung aber weit zurück, und kamen aus dem Stadium der Keimung, mit den ersten Rhizoiden, nicht heraus. Sie wurden, nachdem sie ihre Reservestoffe verbraucht hatten, vom Pilz aufgelöst.

Bei den meisten Protokormen war jedoch ein langsames, aber deutliches Wachstum zu erkennen. Die Körper wuchsen zu tropfenförmigen Gebilden mit einigen Rhizoiden und ohne erkennbaren Sproßpol heran (Abb. 3 b) und erreichten nach 2 Monaten Kultur eine Größe von etwa 2 mm. Durch das laufende Umbetten in einem Intervall von etwa 2–3 Wochen wurde das Wachstum nie unterbrochen, und die größten Protokorme erreichten 4 Monate nach der Keimung bereits eine Länge von über 1 Zentimeter und einen Durchmesser von etwa 3–4 mm an der Spitze.

Das Wachstum der Protokorme fand immer am chalazalen Ende statt, während am Suspensor-Ende niemals Zellteilungen beobachtbar waren. Wohl aber fanden sich in diesem Teil der Protokorme die vom symbio-

tischen Pilz infizierten Zellen, die bereits rein äußerlich an der gelbbraunen Färbung zu erkennen sind.

Um die Handhabung zu erleichtern und den Kulturen mehr Nährmedium zu Verfügung zu stellen, wurden die größeren Protokorme einzeln, die kleineren in Dreiergruppen in 250 ml Flaschen gelegt. Die größten Pflanzen bildeten bereits 4 Monate nach der Keimung vereinzelt schon grüne Sproßspitzen und Wurzeln aus (Abb. 3 d) und wurden daher im Klimaschrank bei Wechsellicht (12h) und einer Temperatur von ca. 20 °C weiterkultiviert.

Relativ oft wurden Protokorme mit zwei oder auch mehr Sproßpolen beobachtet. Die Meristeme teilten sich kurz nach der Keimung und wuchsen zunächst zu noch am hinteren Ende zusammenhängenden Protokormen, schließlich jedoch zu selbständigen, dadurch vegetativ vermehrten Pflanzen heran.

Erdkultur

Die vom Kulturmedium befreiten Protokorme mit ergrüntem Sproß und mehreren Wurzeln (Abb. 3 e) wurden vorsichtig, ohne die brüchigen Wurzeln zu beschädigen, in das vorbereitete Substrat übertragen. Die Pflanzen wurden mit den Sproßspitzen bis knapp unter die Substratoberfläche gesetzt. Je nach Größe bildeten die Pflanzen im ersten Jahr ein bis zwei Blätter aus, die nach etwa 2–3 Monaten, sicherlich auch bedingt durch zu warme Sommertemperaturen, vergilbten und einzogen.

Trotz der kurzen Vegetationsperiode bildeten viele Pflanzen deutlich vergrößerte, konische, Protokorm-ähnliche Knollen aus (Abb. 3, f). Die größte Knolle hatte dabei eine Länge von 16 mm und eine Breite von 4 mm.

Die Sterblichkeit der Protokorme war zunächst gering. Ca. 90% der Pflanzen trieben nach dem Pikieren aus und nur sehr kleine Pflanzen bildeten keine Blätter. Durch die sommerlich warm-feuchten Temperaturen wurden die Blätter schwacher Individuen jedoch bald von pathogenen Pilzen befallen. Insbesondere kleine Pflanzen mit schwachem Wurzelsystem starben relativ schnell ab.

Am Beginn der zweiten Vegetationsperiode erschienen aber trotzdem mehrheitlich Triebspitzen, die deutlich stärker waren, als die des Vorjahres (Abb. 5). Wahrscheinlich bedingt durch die ungünstigen Klimabedingungen trieben jedoch nur etwa 60% der ursprünglich pikierten Pflanzen aus.

Diskussion

Mykorrhiza-Pilze

Bei der Isolierung von symbiotischen Pilzen aus Wurzeln von *Nigritella* wurde oft eine Vielzahl von morphologisch unterschiedlichen Pilzen gewonnen, obwohl die Wurzeln oberflächlich sterilisiert wurden



Abb. 5. Etablierte Jungpflanze von *Nigritella nigra* subsp. *austriaca*, Austrieb im zweiten Jahr. phot. 30. 3. 2000.

bzw. die Pilze direkt aus den Pelotons gewonnen wurden. Eine Isolation von außen anhaftenden Pilzen ist daher weitgehend ausgeschlossen. Obwohl darauf geachtet wurde, pro Wurzelstück nur morphologisch unterschiedliche Mycelien zu isolieren, sind Mehrfachisolierungen aufgrund der schwierigen Unterscheidung der Pilze aus verschiedenen *Nigritella* Individuen möglich.

Auch WARCUP & TALBOT 1967: 632–640 fanden mehrere Symbionten in und an den Orchideenwurzeln. Sie unterschieden zwischen außen anhaftendem, externem Mycelium, sowie interzellularen Hyphen und Hyphenknäuel. Dabei führten sie keinerlei Keimexperimente mit den isolierten Pilzen durch, sehen allerdings nur Pilze aus Hyphenknäueln als echte Mykorrhizapilze an.

CURRAH & al. 1987: 2473; 1988: 739–742 konnten vier verschiedene Pilze aus einer Wurzel von *Calypso bulbosa* isolieren, jedoch nichts über deren Rolle als Mykorrhizapartner aussagen.

Bei eigenen Untersuchungen konnten trotz der Vielzahl der gewonnenen Pilze, nur zwei für die Keimung und Weiterentwicklung geeignete Mycelien gefunden werden. Auch Pilze, die offensichtlich in der Natur Mykorrhizapilze von *Nigritella*-Arten sind und in den untersuchten Wurzeln im Freiland Hyphenknäuel bildeten, konnten bis auf zwei Ausnahmen die Samen nicht zur Keimung bringen und zeigten sich auch nicht für die Weiterentwicklung der Protokorme verantwortlich. Schon BURGEFF 1936: 226 spricht von mehreren Pilzen, die in Wurzeln erwachsener, gesunder Pflanzen vorkommen, nicht immer normale Keimung auslösen und meist für die Weiterentwicklung der Protokorme völlig untauglich sind.

Nigritella und sicherlich auch andere Erdorchideen beherbergen demnach mehrere Pilze, mit denen sie symbiotische Verbindungen eingehen können, während sich für die Keimung und Weiterentwicklung, zumindest unter künstlichen Bedingungen, nur sehr wenige Pilze eignen. Ob dies durch die besonderen Bedingungen *in vitro* bedingt ist, oder ob diese isolierten Wurzelpilze auch in der Natur keinerlei Entwicklung bei Samen und Protokormen auslösen vermögen, konnte nicht festgestellt werden.

Am Anfang des 20. Jahrhunderts wurde oft angenommen, daß die Symbiose zwischen Orchidee und Wurzelpilz sehr spezifisch sei und jede Orchideenart auch ihren eigenen Pilz hätte (BURGEFF 1936: 226). Das ist aber, wie Isolierungs- und Keimexperimente zeigen, sehr häufig nicht der Fall. Die für die Keimung geeigneten Pilze sind mit von der Ursprungspflanze verschiedenen Orchideen-Arten kompatibel und eignen sich oft sehr gut zur Aufzucht *in vitro*.

So haben Versuche mit Isolat 16 und Isolat 18 aus *Nigritella rhellicani* positive Keimergebnisse mit *Gymnadenia* Arten sowie allen untersuchten *Dactylorhiza* Arten ergeben. Dagegen waren Ergebnisse bei *Nigritella* mit aus *Dactylorhiza* isolierten Pilzen wenig erfolgreich.

Zu ähnlichen Ergebnissen kommt auch BURGEFF 1936: 226–230, dessen Pilze mehrere Orchideenarten zum Keimen brachten. Er meint sogar, daß die geographische Herkunft und die Abstammung von terrestrischen oder epiphytischen Orchideen bei der Pilzwahl der Pflanze keinerlei Rolle spielen.

WARCUP 1975: 98–102 fand Orchideengattungen wie beispielsweise *Dactylorhiza*, die mit mehreren Pilzen stabile Mykorrhiza zu bilden vermochten, während manche Gattungen immer nur mit dem selben Pilz gefunden wurden. Er nimmt deswegen ein unterschiedliches Maß von Spezifität an. Beispielsweise sind anscheinend viele *Caladenia* Arten meist mit *Sebacina vermifera* (*Tremellales*) vergesellschaftet (WARCUP 1971: 42–43).

Im Vergleich dazu fanden CLEMENTS & al. 1986: 442–443 Hinweise für die enge Spezifität bei europäischen Orchideen. Es wurden 5 Gruppen europäischer Orchideen unterschieden, die verschiedene Pilzstämme bevorzugen. Auch BORRIS & VOIGT 1986 fanden Hinweise für die ausgeprägte Spezifität der Symbiose bei *Orchis mascula*. Hier keimten die Samen nur mit einem aus *Orchis mascula* isolierten Pilz.

Diese Beobachtung paßt gut zu den Verhältnissen bei *Nigritella*. Auch hier keimen und wachsen diese Arten in Kultur nur mit aus *Nigritella*-Wurzeln isolierten Pilzen.

Keimung und Protokormentwicklung

Zunächst quillt der Embryo unter Wasseraufnahme auf, sprengt die Testa und bildet einzelne Rhizoiden aus. Der keimende Embryo entwickelt sich zunächst zum Protokorm, einem Keimkörper, der, anders als bei anderen Angiospermen, keinerlei Wurzel ausbildet. Das Suspensorende des Embryos besitzt kein Meristem und spezialisiert sich erst später zu mycotrophem Gewebe. Das Wachstum findet am chalazalen Ende statt. Es allein ist für das Längen- und Dickenwachstum des Protokorms verantwortlich und bildet schließlich Sproß und Adventivwurzel aus.

Die Protokorme von *Nigritella* sind ähnlich denen von *Gymnadenia* und *Dactylorhiza* länglich-konisch und mit vielen Rhizoiden bedeckt. Die Form der in Kultur gezogenen Protokorme gleicht den in der Natur gefundenen.

FUCHS & ZIEGENSPECK 1927: 341–342 konnten die Entwicklungsgeschichte von *Nigritella* in der Natur nicht erforschen, sie fanden nur Jungpflanzen, vermuteten aber eine weitgehend ähnliche Entwicklung wie bei *Gymnadenia*.

Es ist seit den Untersuchungen von BERNARD 1903 eine allgemein bekannte Tatsache, daß die Samen der Orchideen in der Natur nur mit Hilfe von symbiotischen Pilzen keimen und sich weiterentwickeln. Nun keimten symbiotisch ausgesäte Samen von *Nigritella* zwar ohne Probleme, jedoch verlief die Weiterentwicklung zunächst langsam. Die Embryonen waren gequollen und hatten einige Rhizoiden ausgebildet, jedoch zeigten sich zunächst bei der Untersuchung keinerlei Spuren der Hyphen des symbiotischen Pilzes.

Erst nach einsetzendem Wachstum wurden sowohl Pilzknäuel (Abb.4) in den Zellen der Protokorme, als auch über Rhizoiden ein bzw. austretende Hyphen gefunden. Der Pilz ermöglicht, wahrscheinlich durch Penetrieren des Carapax, zunächst die Quellung und dringt also erst später, wahrscheinlich über die Rhizoiden in den bereits gekeimten Embryo ein und kann erst darauf dessen Entwicklung fördern.

Auch in den Untersuchungen von HADLEY 1970: 1018–1022 erfolgte die Infektion durch den Pilz sowohl bei den europäischen Orchideen *Dac-*

tylorhiza purpurella, *Goodyera repens* und *Coeloglossum viride*, als auch bei den tropischen Orchideen *Cymbidium canaliculatum* und verschiedenen *Epidendrum*-Arten erst nach erfolgter Keimung über die Rhizoiden.

RASMUSSEN 1990: 145–146 beobachtete bei *Dactylorhiza majalis* zwar das Eindringen der Hyphen über den Suspensor, diese wurden aber beim Durchwachsen von Zellen mit Tannin ähnlichem Inhalt in ihrem Wachstum gehemmt und waren nicht in der Lage, Hyphenknäuel auszubilden. Die Pelotons wurden allein durch die etwas später über Rhizoiden einwachsenden Hyphen gebildet.

Zu einem ganz anderen Schluß kommen BORRIS & VOIGT 1986. Sie konnten bei *Orchis mascula* eindeutig nachweisen, daß bereits vor der Keimung der Samen und vor einer sichtbaren Vergrößerung des Embryos charakteristische Mykorrhizastrukturen in einzelnen Zellen des Embryos vorhanden sind. Dabei wachsen die Hyphen vor allem über die Suspensorzellen in den Embryo ein.

Auch BURGEFF 1959: 372–373 und RICHARDSON & al 1992: 292–294 beschreiben das Einwachsen der Hyphen über die Suspensorzellen. BURGEFF ist sogar der Meinung, daß eine unbekannte, fein granuläre Substanz, die direkt über den Suspensorzellen gelegen ist, die Hyphen anzieht.

Da *Nigritella* Samen auf pilzfreiem Oat-Medium nur vereinzelt quellen und zur Keimung kommen, muß der Pilz trotz allem auch für die Samenkeimung verantwortlich sein. Er scheint zunächst jedoch nur die Wasseraufnahme des Embryos zu beschleunigen und damit die Keimung auszulösen. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung, daß auch andere Pilze die Keimung auszulösen vermögen, jedoch keine Mykorrhizastrukturen bilden und keinerlei Weiterentwicklung fördern, unterstützt. Es hängt demnach offenbar vom Pilz oder dessen Spezifität ab, auf welche Weise er das Protokorm besiedeln kann. Erst danach setzt das Wachstum der Protokorme ein.

Die Samen von *Nigritella* keimten in symbiotischer Kultur etwa drei bis vier Wochen nach der Aussaat, also oft rascher als in asymbiotischer Kultur. Aus der Literatur ist bisher nur die asymbiotische Kultur bekannt.

Bei HAAS 1977: 71 quollen die ersten Samen nach 20 Tagen, bis zur Keimung dauerte es ca. zwei bis drei Monate, während bei MALMGREN 1992b: 286 die Keimung von *Nigritella nigra* subsp. *nigra* schon nach zwei bis drei Wochen einsetzte. Die verschiedenen Zeitangaben könnten durch unterschiedliche Vorbehandlungsmethoden bedingt sein, oder mit unterschiedlichen Ansichten darüber, was die einzelnen Autoren unter dem Beginn der Keimung verstehen, erklärt werden.

Kultur von *Nigritella*

Über die in vitro-Kultur von *Nigritella* ist nur wenig Literatur vorhanden. Einzig HAAS 1977 und MALMGREN 1992b: 286; 1996: 69 berichten über Keimung bzw. Kultur von *Nigritella rhellicani*, *Nigritella miniata* und *Nigritella nigra* subsp. *nigra*. Inwieweit die Weiterkultur der angezogenen *Nigritella* Pflanzen bei HAAS erfolgreich war, ist nicht bekannt. Nur MALMGREN berichtet über Kultur-Erfolge bei *Nigritella nigra* subsp. *nigra*, *Gymnigritella runei* und anderen Erdorchideen (MALMGREN 1996: 69; persönliche Mitteilung).

Durch die Verwendung der symbiotischen Kulturmethode konnten in den letzten Versuchsjahren mehrere hundert *Nigritella* Protokorme herangezogen werden. Die meisten Pflanzen sind bereits erfolgreich in Erdkultur überführt worden. Einige wenige Pflanzen sind schon die zweite Vegetationsperiode in Kultur und haben erste Knollen gebildet. (Abb. 3 f)

Während manche europäischen Orchideen, besonders wintergrüne Arten wie *Orchis purpurea* und *Orchis militaris*, eine Kühlperiode im Protokormstadium zur Weiterentwicklung unbedingt benötigen (MITCHELL 1989: 164–165; MALMGREN 1996: 69), ist diese bei *Nigritella* weder zur Keimung noch zur Ausbildung von Sproß und Wurzel unbedingt notwendig, sondern unterstützt und synchronisiert nur deren Ausbildung. Erst danach wird eine Kühlbehandlung (= Ruheperiode) notwendig, um die Pflanzen zu weiteren Wachstum anzuregen. Nach dieser Ruhephase entfalten sich die Blätter und gleichzeitig erhöht sie die Überlebensrate der Pflanzen beim Transfer in Erd-Substrat.

Zusätzliche Bedeutung haben die Symbionten durch einen gewissen Schutzeffekt gegen pflanzenpathogene Pilze und Bakterien, der den Protokormen nicht nur am Kulturmedium, sondern auch nach dem Auspflanzen im Substrat zugute kommt. Auch WEINERT 1992 betont diesen Schutzeffekt der Pilze im Zusammenleben mit der adulten Pflanze.

Insgesamt kann bei symbiotischer Kultur oft auf ein gewisses Maß an Sterilität verzichtet werden, ohne den Kulturen zu schaden; im Gegenteil, oft wurden gerade bei unsteril ausgesäten Samen stärkere Keimraten erzielt. Gleichzeitig war es auch möglich, sehr geringe Mengen von Samenmaterial, das bei der Sterilisation unweigerlich zu einem großen Teil in der Desinfektionsfritte geblieben wäre, zur Aussaat zu bringen. Die manchmal dabei auftretenden Infektionen wurden meist schon am Beginn vom Pilzpartner unterdrückt, und konnten sich nicht weiter ausbreiten. Nur in einzelnen Fällen war eine Übertragung der Protokorme als Rettungsmaßnahme auf frisches Medium notwendig.

Dank

Mein Dank gilt allen Personen bzw. Institutionen, die zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere gilt mein Dank Herrn Univ. Prof. Dr.

H. TEPPNER für die Bereitstellung des Themas, sein Interesse an der Arbeit und für fachliche Diskussionen, sowie Herrn Dr. E. KLEIN für sein Interesse und für gemeinsame Exkursionen.

Schrifttum

- BERNARD N. 1909. L'Evolution dans la symbiose – Ann. Sci. natur. (Paris), 9. sér., 9: 1–196.
- BORRIS H. & VOIGT TH. 1986. Symbiotische und asymbiotische Samenkeimung von *Orchis mascula* – Ein Beitrag zum Problem der Spezifität der Mykorrhizapilze. – Orchidee 37(5): 222–225.
- BURGEFF H. 1936. Samenkeimung der Orchideen und Entwicklung ihrer Keimpflanzen. – Gustav Fischer, Jena.
- 1959. Mycorrhiza of orchids. – In: WITHNER C. L. (Ed.), The orchids. A scientific survey, p. 361–395. – J. Wiley and Sons, New York.
- CLEMENTS M. A. & ELLYARD R. K. 1979. The symbiotic germination of Australian terrestrial orchids. – Amer. Orchid Soc. Bull. 48(8): 810–816.
- , MUIR H. & CRIBB P. J. 1986. A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial orchids. – Kew Bull. 41(2): 437–445.
- CURRAH R. S., HAMBLETON S. & SMRECIU E. A. 1988. Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of *Calypso bulbosa*. – Am. J. Bot. 75: 739–752.
- , SIGLER L. & HAMBLETON S. 1987. New records and new taxa of fungi from the mycorrhizae of terrestrial orchids of Alberta. – Can. J. Bot. 65: 2473–2482.
- FAST G. 1980. Vermehrung und Anzucht. – In: FAST G. (Ed.), Orchideenkultur; Botanische Grundlagen, Kulturverfahren, Pflanzenbeschreibungen, p. 207–223. – Eugen Ulmer, Stuttgart.
- FRANK B. 1885. Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. – Ber. deutsch. bot. Ges. 3(4): 128–145.
- FUCHS A. & ZIEGENSPECK H. 1927. Entwicklung, Axen und Blätter einheimischer Orchideen. IV Teil. – Bot. Arch. 20: 275–422.
- HAAS N. F. 1977. Asymbiotische Vermehrung europäischer Erdorchideen. – II. *Nigritella nigra* (L.) RCHB. f. und *Nigritella miniata* (CR.) JANCHEN. – Orchidee 28(2): 69–73.
- HADLEY G. 1970. Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. – New Phytologist. 69: 1015–1023.
- HENTSCHEL E. & WAGNER G. 1986. Zoologisches Wörterbuch. 3. Aufl. – Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- KNUDSON L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. – Bot. Gaz. 73: 1–25.
- LUCKE E. 1975. Die Desinfektionsfritte für Orchideensamen. – Orchidee 26(6): 280–282.
- 1981. Samenstruktur und Samenkeimung europäischer Orchideen nach VEYRET sowie weitere Untersuchungen. (Teil 1). – Orchidee 32(5): 182–188.
- 1982. Samenstruktur und Samenkeimung europäischer Orchideen nach VEYRET sowie weitere Untersuchungen. (Teil 2). – Orchidee 33(1): 8–16.
- 1982. Samenstruktur und Samenkeimung europäischer Orchideen nach VEYRET sowie weitere Untersuchungen. (Teil 3). – Orchidee 33(3): 108–115.
- 1983. Eine Vakuumfritte für Orchideensamen. – Orchidee 34(2): 72–74.
- 1986. Orchideenkultur für alle, 6. Aufl. – Albrecht Philler, Minden.

- MALMGREN S. 1992a. Large scale asymbiotic propagation of *Cypripedium calceolus* – Plant physiology from a surgeon's point of view. – Botanic Gardens Micro-propagation News 1(5): 59–63. – Royal Botanic Gardens Kew, Surrey, UK.
- 1992b. Ein neues Samenbehandlungsprinzip. – Orchidee 43(6): 284–287.
- 1996. Orchid propagation: Theory and practice. – In: ALLEN C. (Ed.), North American native terrestrial orchids propagation and production, Conference Proceedings. pp. 63–72. – National Arboretum, Washington D.C.
- MITCHELL R. B. 1989. Growing hardy orchids from seeds at Kew. – The Plantsman 2(3): 152–169.
- RASMUSSEN H. N. 1990. Cell differentiation and mycorrhizal infection in *Dactylorhiza majalis* (RCHB. f.) HUNT. & SUMMERH. (*Orchidaceae*) during germination in vitro. – New Phytologist 116: 137–147.
- RICHARDSON K. A., PETERSON R. L. & CURRAH R. S. 1992. Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hyperborea* (*Orchidaceae*) – Can. J. Bot. 70: 291–300.
- TEPPNER H. 1999. Rezension über WAGENITZ G. 1996. Wörterbuch der Botanik. – Phytion (Horn, Austria) 39(2): 216, 238, 249–250, 264, 276, 292, 302 (mit 8 Abb.).
- VEYRET Y. 1969. La structure des semences des *Orchidaceae* et leur aptitude à la germination in vitro en cultures pures. – Mus. nation. Hist. natur. Paris, Trav. Lab. „La Jaysiana“ 3: 89–98.
- WARCUP J. H. 1971. Specificity of mycorrhizal association in some Australian terrestrial orchids. – New Phytologist 70: 41–46.
- 1975. Factors affecting symbiotic germination of orchid seed. – In: SANDERS F. E. T., MOSSE B. & TINKER P. B. (Eds.), Endomycorrhizas. p. 87–104. – Academic Press, London.
- & TALBOT P. H. B. 1967. Perfect states of Rhizoctonias associated with orchids. – New Phytologist 66: 631–641.
- WEINERT M. 1992. Konkurrenzverhalten einiger Orchideen – bzw. Bodenpilze – Schutzeffekt bei Anzucht und Kultur terrestrischer Orchideen. – Orchidee 43(2): 92–95.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn](#)

Jahr/Year: 2001

Band/Volume: [41_1](#)

Autor(en)/Author(s): Deutsch Gerfried

Artikel/Article: [In vitro-Anzucht von Nigritella \(Orchidaceae-Orchideae\) aus Samen mit Hilfe von symbiontischen Pilzen. 111-128](#)