

Identifizierung der Wurzel assoziierten Pilze von *Gentianella bohemica*



Fabienne Flessa und Kristina Schröter bei der *Gentianella*-Probennahme im Bayerischen Wald.
© M. Lauerer

November 2010

Auftraggeber: Bayerisches Landesamt für Umwelt
Bürgermeister-Ulrich-Str. 160
86179 Augsburg
<http://www.lfu-bayern.de>

Auftragnehmer: Dr. Marianne Lauerer
Ökologisch-Botanischer Garten
Universität Bayreuth
Tel 0921 552972
Email: marianne.lauerer@uni-bayreuth.de

Bearbeitung: Dr. Marianne Lauerer, Kristina Schröter, Fabienne Flessa
und Dr. Alexandra Kehl

Inhalt

A	Zusammenfassung.....	3
B	Einleitung	4
C	Bearbeitungsmethode	4
	Nurse-Plant-Experiment	4
	Analyse der Pilzvergesellschaftung.....	4
D	Ergebnisse	5
	Makro- und Mikroskopischer Nachweis der Mykorrhizierung.....	5
	Molekulare Analysen der Wurzel assoziierten Pilze.....	6
	Nurse-Plant-Experiment	8
E	Diskussion und Bedeutung der Ergebnisse für den Naturschutz	9
F	Literatur.....	10

A Zusammenfassung

Gentianella bohemica wird seit 2004 zur Arterhaltung und für Wiederansiedelungsprojekte im Ökologisch-Botanischen-Garten der Universität Bayreuth (ÖBG) kultiviert. Wie frühere Studien zeigten sind Pflanzen in Kultur im Gegensatz zu denjenigen am Naturstandort nicht mykorrhiziert. Es wird angenommen, dass der Böhmisches Fransenenzian wie die ganze Familie der Gentianaceae in Form einer speziellen arbuskulären Mycorrhiza mit Pilzen der Gattung *Glomus* vergesellschaftet ist. Im Rahmen der studentischen Abschlussarbeit von Kristina Schröter wurde deshalb die Wurzel assoziierte Pilzgesellschaft von *Gentianella bohemica* aus der Erhaltungskultur sowie von zwei Naturstandorten (Teufelsbach BY, Chvalšiny CZ) molekularbiologisch untersucht. Zudem wurde ein sog. Nurse-Plant-Experiment mit *Trifolium medium* und *Nardus stricta* als Begleitpflanzen durchgeführt. Aufgrund von Kulturführungsproblemen war hier eine Auswertung nicht möglich.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Pilzvergesellschaftung von *Gentianella bohemica* komplexer ist als erwartet. Insgesamt wurden an den *Gentianella*-Wurzeln 475 Pilzgenotypen (RFLP-Typen) isoliert. Die Pilzvergesellschaftung variierte von Standort zu Standort sehr stark, nur drei Genotypen kamen an allen drei Standorten vor, die anderen waren Standort oder Individuen spezifisch. Von den 35 häufigsten RFLP-Typen wurde die DNA sequenziert, um die Pilze zu identifizieren. Danach sind etwa 80 % der gefundenen Pilze Basidiomyceten, 7 % Ascomyceten und 8 % über den Datenbankvergleich gar nicht identifizierbar. Der für die Gentianaceae-Mycorrhiza verantwortliche *Glomus* nur in vier Pflanzen und nur am Standort Chvalšiny im Böhmisches Wald nachgewiesen, nicht aber am Standort Teufelsbachwiese, wo er erwartet worden wäre. Neben *Glomus* konnten nur zwei weitere Pilze genauer identifiziert werden, die restlichen Pilzgenotypen waren nicht genauer zuzuordnen.

Für die Anwendung sowohl im Naturschutz vor Ort wie auch in der Erhaltungskultur im ÖBG wären vor allem zwei Aspekte interessant zu verfolgen:

(1) Wenn die höhere Vitalität der *Gentianella* Bestände in Tschechien nicht zuletzt auf die Mykorrhizierung durch *Glomus*, der einen höheren pH-Wert bevorzugt, zurückzuführen ist, wären Untersuchungen und Maßnahmen zum Boden-pH-Wert im Bayerischen Wald und in der Erhaltungskultur anzustreben, um um bessere Bedingungen für *Glomus*-Arten zu schaffen.

(2) In weiteren Forschungsprojekten sollte zudem die Rolle der Begleitpflanzen (Nurse-Plants) für eine Mykorrhiza-Infektion untersucht werden. Es zeichnet sich anhand der vorliegenden Ergebnisse ab, dass *Trifolium* durch seine Mykorrhizierung als Nurse Plant fungieren könnte. Vor allem unter Kulturbedingungen aber auch am Naturstandort könnte damit möglicherweise eine erfolgreiche Infektion von *Gentianella* durch *Glomus* herbeigeführt werden.

Zitiervorschlag:

LAUERER M, SCHRÖTER K, FLESSA F & KEHL A (2010): Identifizierung der Wurzel assoziierten Pilze von *Gentianella bohemica*. - Abschließender Bericht im Auftrag des Bayerischen Landesamtes für Umwelt (LfU), 10 S., Augsburg

B Einleitung

Gentianella bohemica ist eine vom Aussterben bedrohte (RL 1), zweijährige Art, deren einziges Vorkommen in Deutschland an wenigen Standorten im Bayerischen Wald liegt (1, 8). Zur Arterhaltung wird dieser zweijährige Fransenenzian seit 2004 im Ökologisch-Botanischen-Garten der Universität Bayreuth (ÖBG) kultiviert. Wie Zillig 2010 bereits nachwies, sind Pflanzen am Naturstandort mykorrhiziert, *Gentianella bohemica* im ÖBG hingegen nicht (10). Gentianaceae sind in Form einer speziellen arbuskulären Mykorrhiza (AM) mit Pilzen der Gattung *Glomus* vergesellschaftet (2, 7). Zudem ist lange bekannt, dass eine Symbiose mit Mykorrhizapilzen bei vielen Pflanzenarten zu einer erhöhten Vitalität führt (3).

Bisherige Studien zeigen, dass die Inokulation von *Gentiana* mit Mykorrhizapilzsporen schwierig ist (9). Möglicherweise ist diese dauerhaft nur über bestimmte Begleitpflanzen möglich, die permanent Sporen und Hyphen für Neuinfektionen in den Boden abgeben (Nurse-Plant-effect (9)). Vom Böhmischem Enzian weiß man bislang nicht, mit welchen Pilzpartnern er vergesellschaftet ist, wie stark er in seiner Vitalität von einer Mykorrhizierung abhängt und in wie weit er für eine dauerhafte Mykorrhizierung auf stete Neuinfektion z.B. durch *Glomus*-Sporen angewiesen ist. Erkenntnisse hierzu könnten nicht nur einer Verbesserung der ex-situ-Kultur, sondern auch dem Schutz der Art am Wildstandort dienen. Im Rahmen der studentischen Abschlussarbeit von Frau Kristina Schröter wurde deshalb ein Nurse-Plant Experiment durchgeführt, sowie die Pilzgesellschaft mit Hilfe der Restrikt-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)- Methode in und an der Wurzel untersucht.

C Bearbeitungsmethode

Nurse-Plant-Experiment

Im Mai 2010 wurden vom Standort „Teufelsbachwiese“ im Bayerischen Wald von *Trifolium medium* und *Nardus stricta* jeweils zehn Pflanzen ausgegraben und im ÖBG zusammen mit je einer einjährigen *Gentianella bohemica* –Rosette aus der Kultur des ÖBG in einen Topf gepflanzt. Zehn zusätzliche allein getopfte *Gentianella*-Pflanzen dienten als Kontrolle. Nach Reife der ersten Kapsel der jeweiligen Pflanze wurden die Enziane mikroskopisch (Lactophenol-Blau-Färbung) auf Mykorrhizierung untersucht.

Analyse der Pilzvergesellschaftung

Am 14. Juli 2010 wurden je sechs *Gentianella*-Pflanzen (zwei räumlich getrennte Plots mit je drei $\pm$ nah beieinander liegenden Pflanzen) von den Standorten „Teufelsbachwiese“ bei Mauth (Bayerischer Wald, D) und Chvalšiny (Böhmischer Wald, CZ) mit den Wurzeln ausgegraben. Für die Entnahme am Teufelsbach wurde zuvor eine Genehmigung bei der Regierung von Niederbayern (Dr. W. Zahlheimer) eingeholt, für die Entnahme in Tschechien erfolgte die entsprechende Abstimmung mit den tschechischen Kollegen. Im Labor wurde das Wurzelsystem von *Gentianella* in sterilem Leitungswasser ausgewaschen. Die Wurzeln wurden zum einen mikroskopisch auf Mykorrhizierung untersucht (s.o.) und zum anderen für die molekularbiologische Identifizierung der Wurzel assoziierten Pilze verwendet. Nach der Isolation der DNA wurde mit Pilz-spezifischen Primern die Pilz-DNA (nukleare ribosomale DNA, ITS-Region und mtLSU) herausgefiltert und die einzelnen Genotypen über Klonierung voneinander getrennt. Die vereinzelter cDNA Stücke wurden mit Restriktions-Enzymen geschnitten und die so erhaltenen charakteristischen Bandenmuster der anschließenden Aga-

rosegel-Elektrophorese wurden über Ähnlichkeitsmatrixberechnungen analysiert. Von den 30 danach am häufigsten vorkommenden RFLP-Typen, die im Prinzip verschiedenen Pilzgenotypen entsprechen, wurden die DNA-Sequenzen ermittelt und mit den hinterlegten Sequenzen einer Gen-Datenbank (Genbank von NCBI) verglichen, um die Pilze zu identifizieren oder taxonomischen Gruppen zuzuordnen.

D Ergebnisse

Makro- und Mikroskopischer Nachweis der Mykorrhizierung

Die Wurzeln von *Gentianella bohemica* aus der Kultur im ÖBG und diejenigen von den Naturstandorten Teufelsbachwiese und Chvalšiny unterscheiden sich makroskopisch sehr stark (Abb. 1). Erstere haben ein Wurzelsystem mit hohem Feinwurzelanteil, diejenigen vom Naturstandort sind extrem wenig verzweigt und weisen mit bloßem Auge erkennbare Verdickungen der Wurzel auf, die Abschnitte starker Mykorrhizierung sind. Die mikroskopischen Präparate zeigten, dass die *Gentianella*-Wurzeln aus der Kultur des ÖBG inklusive derjenigen aus dem Nurse-Plant-Experiment alle nicht mykorrhiziert waren (Abb. 2 a). Hingegen sind jene vom Standort bei Chvalšiny mykorrhiziert und weisen den typischen *Paris*-Typ auf (Abb. 2 b), der von der Pilzgattung *Glomus* gebildet wird. In den Proben vom Standort Teufelsbachwiese konnte bislang keine *Glomus*-Mykorrhizierung nachgewiesen werden. In noch vorhandenen Proben, soll dieser Befund nochmals geprüft werden. Die Wurzeln von *Trifolium* aus dem Nurse-Plant-Experiment waren gut mykorrhiziert, diejenigen von *Nardus* hingegen nur gering.



Abb.1: Fotos der Wurzelsysteme von *Gentianella bohemica* aus der Kultur des ÖBG (links) und vom Standort Teufelsbachwiese (rechts) – beide maßstabsgetreu abgebildet.

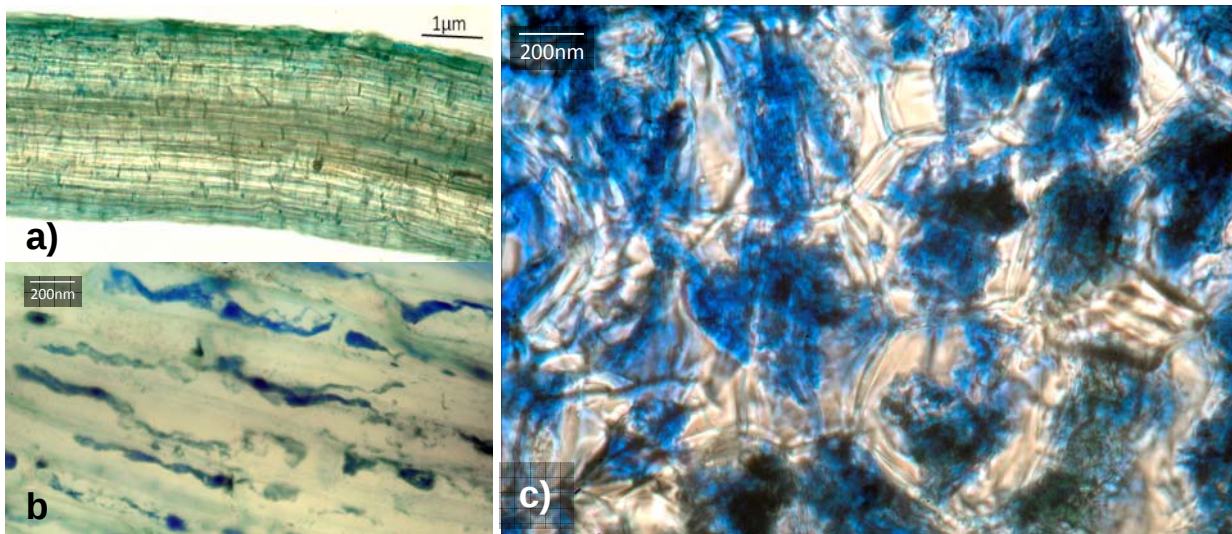


Abb. 2: Fotos der mikroskopischen Wurzel aufnahmen. a) Wurzeln von *Gentianella bohemica* aus der Kultur des ÖBG. Eine Mykorrhizierung, die durch Blaufärbung zu erkennen wäre, ist nicht vorhanden. b) Wurzeloberfläche von *Gentianella*-Wurzeln, die am Standort Teufelsbachwiese gesammelt wurden: Eine schwache Infektion mit Pilzen ist erkennbar. c) Schnitt durch eine Wurzel vom Standort Chvalšiny: Die Mycorrhiza (blau) bildet deutliche Arbuskeln in den Zellen und weist interzelluläre Verbindungen auf, so dass hier ein typischer *Glomus*-Pilz-induzierter Mykorrhizotyp vorliegt (sog. *Paris*-Typ).

Molekulare Analysen der Wurzel assoziierten Pilze

Die RFLP-Analyse (Restriktions- Fragment-Längen Polymorphismus-Analyse) und die anschließende Ähnlichkeitsberechnung liefern so genannte RFLP-Typen, die verschiedenen Pilzgenotypen entsprechen, ohne dass diese taxonomisch zugeordnet oder identifiziert werden. Es zeigte sich, dass (1) an allen drei untersuchten Standorten (ÖBG, Teufelsbachwiese und Chvalšiny) eine hohe Zahl Wurzel assoziierter RFLP-Typen isoliert werden konnten, deren Zusammensetzung aber von Standort zu Standort unterschiedlich war (Abb. 3). Insgesamt wurden an den *Gentianella*-Wurzeln 475 RFLP-Typen isoliert: an den Pflanzenwurzeln der ÖBG-Kultur waren es 119, an denen aus Chvalšiny bzw. von der Teufelsbachwiese 172 bzw. 224 verschiedene RFLP-Typen. Nur drei der isolierten RFLP-Typen kamen an allen drei beprobten Standorten vor, 2 % der RFLP-Typen gleichzeitig auf der Teufelsbachwiese und bei Chvalšiny, 1 % auf der Teufelsbachwiese sowie im ÖBG und 4 % am Standort Chvalšiny und gleichzeitig im ÖBG vor.

Zu den Unterschieden in der Pilzvergesellschaftung zwischen den Standorten ergaben sich große individuelle Unterschiede (Tab. 1). So kamen pro Standort 80 (in Chvalšiny) bis 90 % (Teufelsbachwiese) der RFLP-Typen jeweils nur in einer Pflanze vor (Tab. 1). Es deutete sich an, dass die individuellen Unterschiede am Standort Teufelsbachwiese etwas größer sind, als am Standort bei Chvalšiny. Bei letzterem kamen 9 Pilztypen in wenigstens 3 Pflanzen vor (4,4% der Pilztypen des Standortes), am Standort Teufelsbachwiese hingegen entsprechend nur 3 (1,3 % der Pilztypen des Standortes). Darüber hinaus waren zum Zeitpunkt der Ernte (Mittel Juli) die Pflanzen an Teufelsbach signifikant kleiner als Pflanzen in Chvalšiny ($p=0,035$).

Aufgrund der individuellen Pilzgesellschaft an den einzelnen *Gentianella*-Pflanzen lassen sich signifikante Unterschiede zwischen den Standorten statistisch ermitteln (Abb. 4). Dabei zeigte sich, dass sich die Pilzgesellschaft an den Standorten Teufelsbachwiese und

Chvalšiny hoch signifikant unterscheiden ($R=0,52$; $p=0,006$) und diejenige vom Standort Teufelsbachwiese und ÖBG ebenfalls signifikant verschieden sind ($R=0,51$; $p=0,024$). Die Pilzflora von den Standorten Chvalšiny und ÖBG ist nicht signifikant verschieden ($R=0,27$; $p=0,272$), da zwei Pflanzen von Chvalšiny eine hohe Ähnlichkeit zu den Proben des ÖBG aufweisen. Der Grund hierfür könnte das Vorkommen bzw. Fehlen von Pilzen der Gattung *Glomus* sein (vgl. Abb. 4, Tab. 2).

Von den 35 häufigsten RFLP-Typen wurde die DNA sequenziert, um die Pilze zu identifizieren. Danach sind etwa 80 % der gefundenen Pilze Basidiomyceten, 7 % Ascomyceten und 8 % über den Datenbankvergleich nicht identifizierbar (Tab. 2). Eine genauere taxonomische Zuordnung war nur in wenigen Fällen möglich, nur zwei Pilzgenotypen konnten einer bisher bekannten Art zugeordnet werden (*Debaryomyces hansenii* und *Hypoxylon fuscum*, Tab. 2). Vertreter der Gattung *Glomus* konnten nur in vier Proben nachgewiesen werden, die vom Standort Chvalšiny stammten. Alle Pilze, außer dem gefundenen *Glomus* sp., sind frei lebend im Boden oder können z.T. Ektomykorrhiza ausbilden.

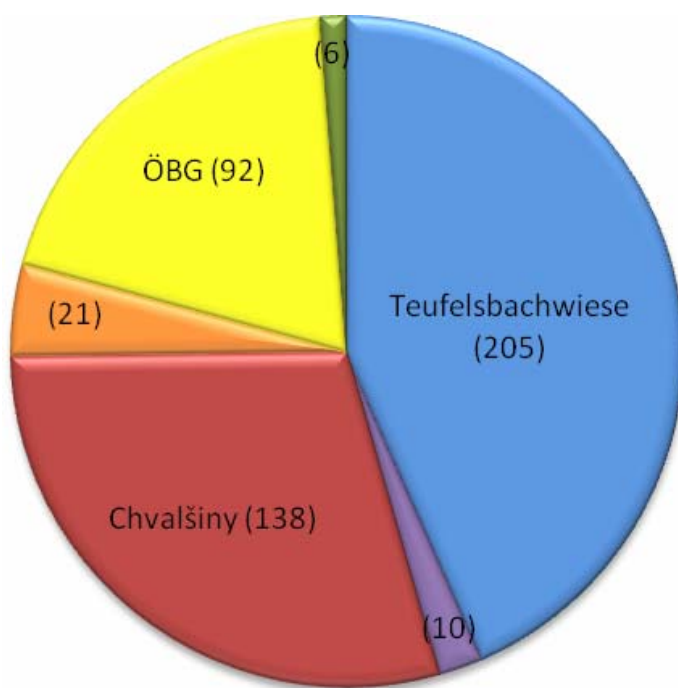


Abb. 4: Verteilung der RFLP-Typen auf die drei Standorte (ÖBG-Kultur, Teufelsbachwiese und Chvalšiny). Die Zahl in Klammern gibt die absolute Zahl der gefundenen RFLP-Typen an. In den Überlappungsbereichen ist die Anzahl der gleichzeitig an beiden Standorten vorkommenden Typen angegeben. Drei RFLP-Typen kamen an allen drei Standorten vor (in der Graphik nicht eingetragen).

Tab. 1: Anzahl der einzelnen RFLP-Typen die an *Gentianella bohemica* Wurzeln identifiziert wurden. In Abhängigkeit vom Standort ist in der Tabelle angegeben, in wie vielen Pflanzen gemeinsame Typen vorkamen.

	Teufelsbachwiese	Chvalšiny	ÖBG	Gesamt
In 1 Pflanze	203	140	113	406
In 2 Pflanzen	18	23	5	52
In 3 Pflanzen	3	4	1	13
In 4 Pflanzen	-	5	-	6
In 5 Pflanzen	-	-	-	2
In 6 Pflanzen	-	-	-	-
In 7 Pflanzen	-	-	-	1

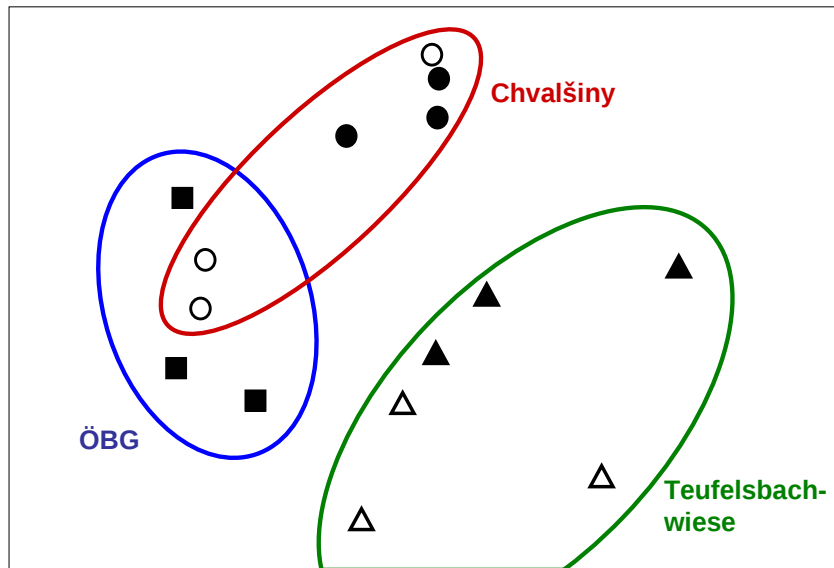


Abb. 4: NMS (Non-metric Multi-Dimensional Scaling) der RFLP-Analyse der Pilzvergesellschaftung an der Wurzel aller untersuchten *Gentianella bohemica* Pflanzen (je zwei Plots (offene und geschlossene Symbole) mit je drei Pflanzen von den Standorten Chvalšiny und Teufelsbachwiese, sowie drei Pflanzen aus der Kultur des ÖBG. Die Proben aus dem Bayerischen Wald sind deutlich von den anderen Gruppen unterscheiden. Zwei Proben von Chvalšiny sind denen aus der Erhaltungskultur ähnlich.

Tab. 2: Ergebnisse der taxonomischen Zuordnung der sequenzierten Pilz-DNA (NCBI Genbank). Für jeden beprobten Standort ist die Anzahl der Pflanzen angegeben, in der der entsprechenden Pilz nachgewiesen wurde. „Nicht identifizierbar“ sind Sequenzen, die in der Datenbank entweder keine Übereinstimmung hatten oder nur als unkultivierter Pilz/unkultivierte Ektomycorrhiza gelistet waren.

Pilz-Taxon		Teufelsbachwiese	Chvalšiny	ÖBG-Kultur
Basidiomycota	<i>Erythrobasidium</i>	3	3	3
	Agaricomycetes (zwei versch. Gruppen)	3	2	1
	<i>Ceratobasidium</i> (zu weiterer Agaricomycetes Gruppe)	3	5	2
Ascomycota	Sordariomycetes	1	1	
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	1	1	1
	<i>Hypoxyton fuscum</i>	1		
Glomeromycota	<i>Glomus</i> sp.		4	
	nicht identifizierbarer Pilz	3	3	1

Nurse-Plant-Experiment

Auf Grund von Problemen bei der Kulturführung (u.a. starker Befall durch Weiße Fliege) wurde der Versuch am 2.8.2010 nach 76 Tagen abgebrochen. Zu diesem Zeitpunkt lebten noch 20% der *Gentianella*-Pflanzen, zwei von zehn aus der Kontrollgruppe, eine von zehn, die mit *Nardus stricta* zusammen gepflanzt waren und drei von zehn, mit *Trifolium medium* in einem Topf. Es konnte beobachtet werden, dass die Rosetten von *Gentianella* nach dem Umtopfen nur wenige bis keine neuen Wurzeln ausbildeten. Keine der *Gentianella bohemica* Wurzeln aus diesem Experiment wies eine Mykorrhizierung auf. Es ist geplant dieses Experiment in den nächsten Jahren zu wiederholen.

E Diskussion und Bedeutung der Ergebnisse für den Naturschutz

Die Ergebnisse zeigen, dass eine hohe Anzahl an Pilzgenotypen (RFLP-Typen) nachgewiesen werden konnte, was den Erfahrungen und Erwartungen entspricht. Aufgrund der angewandten Methode wurden auch Wurzeloberflächen assoziierte Pilze mit analysiert, von denen eine hohe Anzahl in jedem Boden vorhanden ist. Auf der Teufelsbachwiese im Bayerischen Wald wurde fast die Hälfte aller nachgewiesenen RFLP-Typen gefunden, was auf eine hohe Diversität der Bodenpilze an diesem Standort schließen lässt. Die Ergebnisse zeigen aber auch sehr deutlich, dass sich die Standorte in ihrer Pilzvergesellschaftung unterscheiden, auch wenn es einmal Überlappungen zwischen zwei Standorten gibt. Zudem variiert die Pilzvergesellschaftung individuell ausgesprochen stark, jede *Gentianella*-Pflanzen eines jeden Standortes hat nahezu ihre eigene Pilzausstattung. Dies bedeutet nicht, dass jedes Individuum ihre eigene funktionelle Pilzausstattung hat. Bei der hohen Vielfalt an im Boden und in Wurzelnähe lebenden Pilzen, unterliegt es sicherlich auch dem Zufall, welche Pilze und Pilzsporen sich gerade in Wurzelnähe befanden und beprobt wurden.

Der für die Gentianaceae-Mykorrhiza verantwortliche *Glomus* konnte nur in vier Pflanzen am Standort Chvalšiny im Böhmischem Wald nachgewiesen werden, nicht am Standort Teufelsbachwiese, wo er allerdings erwartet worden wäre. Möglicherweise tritt *Glomus* hier tatsächlich nicht auf – worauf auch die mikroskopischen Beobachtungen hindeuten – oder es liegt ein *Glomus*-RFLP-Typ vor, der bislang noch nicht sequenziert wurde und das Taxon somit noch nicht bekannt ist. Die *Gentianella bohemica* Population am Standort Teufelsbachwiese besteht aus nur wenigen Individuen, die Bestandszahlen variieren von Jahr zu Jahr sehr und die Pflanzen sind im Vergleich zu den Standorten im Böhmischem Wald weniger groß und vital (Thomas Zipp und Dr. Matthias Dolek – mündliche Mitteilung). So geben die vorliegenden Ergebnisse Anlass zur Spekulation, dass die fehlende *Glomus*-Mykorrhiza auf der Teufelsbachwiese möglicherweise für die geringere Vitalität des dort vorkommenden Böhmischem Fransenenzians verantwortlich ist. Ein wichtiger Faktor für jede Pilzgesellschaft ist die Bodenchemie und von *Glomus*-Arten ist bekannt, dass sie einen höheren Boden-pH-Wert bevorzugen (5). Messungen des pH-Wertes in Bodenproben von Teufelsbachwiese und Chvalšiny ergaben deutlich höhere pH-Werte für letzteren Standort (Daten nicht gezeigt). Nach der DNA-Sequenzierung konnten neben *Glomus* nicht sehr viele weitere Pilze genauer identifiziert werden. Soweit möglich soll ihre Bedeutung hier dennoch kurz erläutert werden. Von *Ceratobasidium*-Arten weiß man, dass sie Mykorrhizapartner von Orchideen sein können (6). Vorstellbar wäre, dass die Mykorrhiza-Funktion am Standort Teufelsbachwiese statt von *Glomus*-Arten von *Ceratobasidien* übernommen wird. Die mikroskopischen Untersuchungen zeigten für die Pflanzen von der Teufelsbachwiese ja eine Pilzinfektion, die jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht durch *Glomus* induziert war. Die Gruppe der Agaricomyceten können sowohl als Parasiten, Symbionten oder Ectomycorrhiza-Partner auftreten (4). Mit welcher Assoziation hier gerechnet werden kann ist unklar. *Debaryomyces hansenii* ist ein Hefepilz und *Hypoxylon fuscum* (Rotbraune Kohlbeere) ein Holzersetzer, der rotbraune kugelige Fruchtkörper auf totem Holz bildet und wohl eher „zufällig“ in *Gentianella*-Wurzelnähe gefunden wurde. Er ist bei uns häufig mit *Alnus*, *Corylus* und anderen Betulaceae assoziiert, kommt aber auch in den Tropen vor, wo er weniger wirtsspezifisch ist.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass die Pilzvergesellschaftung von *Gentianella bohemica* sehr komplex ist und diese sicherlich nicht durch eine einfache Maßnahme optimiert werden kann. Interessant wären vor allem zwei Aspekte zu verfolgen:

(1) Wenn die höhere Vitalität der *Gentianella* Bestände in Tschechien nicht zuletzt auf die Vergesellschaftung und Mykorrhizierung durch *Glomus* zurückzuführen ist, wären Bodenanalysen der Standorte interessant. Man könnte dann ggf. Maßnahmen ergreifen, die z.B. den pH-Wert verändern, um bessere Bedingungen für *Glomus*-Arten zu schaffen.

(2) In weiteren Forschungsprojekten sollte zudem die Rolle der Begleitpflanzen (Nurse-Plants) für eine Mykorrhiza-Infektion untersucht werden. Es zeichnet sich anhand der vorliegenden Ergebnisse ab, dass *Trifolium* durch seine deutliche Mykorrhizierung als Nurse Plant fungieren könnte. Zudem wurde *Trifolium* bereits als Nurse-Plant erfolgreich bei *Gentiana verna* eingesetzt (9). Vor allem unter Kulturbedingungen aber auch am Naturstandort könnte damit möglicherweise eine erfolgreiche Infektion von *Gentianella* durch *Glomus* herbeigeführt werden.

F Literatur

1. BERG, M. (2001). Das Artenhilfsprogramm für endemische und stark bedrohte Pflanzenarten Bayerns. Schriftenreihe des Bayer. Landesamtes für Umweltschutz 156:19-88.
2. COX, G. & F. SANDERS (1974) Ultrastructure of host-fungus interface in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. New Phytologist 73:901 ff
3. FELDMANN, F. (1998) Arbuskuläre Mykorrhiza im Gartenbau. Symbiosetechnologie in der Praxis. Thalacker Medien, Braunschweig. 80 S.
4. HIBBETT, D. S., et al. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycological Research 111:509-547.
5. PENG, Y.-I., M.-N. YANG & X.-B. CAI (2010) Influence of soil factors on species diversity of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in Stipa steppe of Tibet Plateau. Yingyong Shengtai Xuebao 21:1258-1263.
6. PORRAS-ALFARO, A. & BAYMAN, P. (2007) Mycorrhizal fungi of Vanilla: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. Mycologia 99:510-525.
7. READ, D. J., H. K. KOUCEKI & HODGSON, J. (1976) Vesicular-arbuscular mycorrhiza in natural vegetation systems. 1. Occurrence of infection. New Phytologist 77:641-653.
8. RÖSLER, S. (2001).. Das Artenhilfsprojekt Böhmischer Enzian (*Gentianella bohemica* Skalklicky). Ergebnisse der Dauerbeobachtung 1991-1998. Schriftenreihe des Bayer. Landesamtes für Umweltschutz 156: 89-104.
9. SYKOROVA, Z., J. RYDLOVA & VOSATKA, M. (2003) Establishment of mycorrhizal symbiosis in *Gentiana verna*. Folia Geobotanica 38:177-189.
10. ZILLIG, P., LEBERMANN, K., MORBA, D., ARNETH, G. & LAUERER, M. (2010) Ex Situ-Preservation of the Bohemian Gentian - Experiences of the cultivation in the Botanical Gardens Bayreuth. Naturschutz und Landschaftsplanung 42:78-84.