

Projektbericht des Heisenberg-Gymnasiums 2012/13

Im letzten Jahr konnten sich die Schüler des Heisenberg Gymnasiums mit Hilfe des Ameisenfonds der Stadt Dortmund intensiver mit den einheimischen Orchidee *Epipactis helleborine* beschäftigen. Sehr erfolgreich haben einige Schüler die Wechselwirkung von Orchidee, Pilzpartner und den umstehenden Bäumen untersucht. Eine Schülerin nahm mit den Ergebnissen an dem Wettbewerb Jugend forscht teil und gewann dort den Regionalwettbewerb. Im Landeswettbewerb belegte sie den dritten Platz. Die Schülerin konnte mit Hilfe molekularbiologischer Methoden den Pilzpartner der Orchidee bestimmen, der zur Gruppe der Erdtrüffel gehört.

Dazu wurde die DNA des Pilzpartner isoliert und anschließend die DNA mit Hilfe der PCR vermehrt. Dazu bestellten wir spezielle Primer, die zur gezielten Vermehrung von Pilz-DNA verwendet werden kann (Bild 1). Anschließend erfolgte eine Bestimmung der Sequenz bei der Firma Eberhard und Partner in Dortmund. Die Datenbankabfrage ergab dann den Pilzpartner *Tuber rufum*, ein Trüffel der in NRW auf der Roten Liste steht.

Des weiteren versuchten wir die Orchidee mit Hilfe der invitro-Vermehrung zu vermehren, was bisher allerdings noch nicht zufriedenstellend gelingt. Dazu wurden im Wahlpflichtbereich sterile Nährmedien hergestellt und an an der schuleigenen Reinluftbank Anzuchtbecher hergestellt. Durch die Anschaffung eines neuen Schnellkochtopfs als Autoklavenersatz konnten wir die Anzuchtbecher selber sterilisieren und die entsprechenden Nährmedien kochen. Die oberflächensterilisierten Samen wurden anschließend ausgesät und im Lichtschrank in Kultur genommen. Die Kulturen sind bis heute keimfrei, allerdings ist bei der Gattung *Epipactis* noch keine Keimung zu beobachten. Bisher konnte der Grund dazu nicht gefunden, vor allem weil gleichzeitige Aussaaten andere einheimischer Orchideen unproblematisch verliefen. Zur Zeit arbeiten Schüler noch an weiteren Methoden dazu.

Nicht desto trotz hatten wir in diesem Jahr zahlreiche Wildpflanze der Art im Schulgarten. Schülerinnen und Schüler der Jahrgangsstufe 8 aus dem Wirklichkeitsbereich führen zur Zeit ein Orchideen-Monitoring durch (Bild 2), um zu erkennen unter welchen Umständen die natürliche Aussaat der Art funktioniert, um so so Rückschlüsse auf die stark schwankende Verbreitung der Art ziehen zu können. Insgesamt zählten die Schüler über 30 *Epipactis* Pflanzen, davon zahlreiche erstmalige Vorkommen.

Die Schüler haben außerdem angefangen einige *Epipactis*-Pflanzen in Töpfen zu kultivieren. Dabei wurden diese mit in Frage kommenden Begleitbäumen eingepflanzt, um so überprüfen zu können inwieweit der Begleitbaum Einfluss auf den entsprechenden Partnerpilz und auf die Wuchsstärke der Pflanze hat (Bild 3). Durch die Topfkultur von Orchidee und Baum können so gezielt weitere Untersuchungen und vergleichende Messungen durchgeführt werden. Einige Schülerinnen und Schüler der Oberstufe arbeiten zur zeit an der Entwicklung solcher Versuche. Die Topfkulturen der Orchideen werden durch den Wahlpflichtbereich Biologie/Chemie gepflegt und versorgt. Da die Bestimmung der Pilzpartner wie oben bereits erwähnt durch molekularen Methoden möglich ist, können wir so besser den Zusammenhang zwischen Orchidee, Pilz und Begleitbaum untersuchen.

Insgesamt konnten wir im letzten Jahr mit Hilfe des Ameisenfonds die einheimischen Orchideen noch stärker als zentrale Leitpflanze für unsere naturwissenschaftliche Förderung darstellen. Insbesondere konnten wir Themen zur Ökologie mit Hilfe dieses Projektes stärker in den Mittelpunkt rücken. Die Lebensgemeinschaft zwischen Orchidee, Pilz und Baum sind für die Schüler spannende Beispiele für biotische Faktoren eines Ökosystem. Durch Anschauung mit Hilfe einheimischer Pflanzen kann gezeigt werden, das komplexe Ökosysteme auch vor der eigenen Haustür existieren, so dass diese Themen daher für die Schüler greifbarer werden.



Orchidee:
Epipactis
helleborine

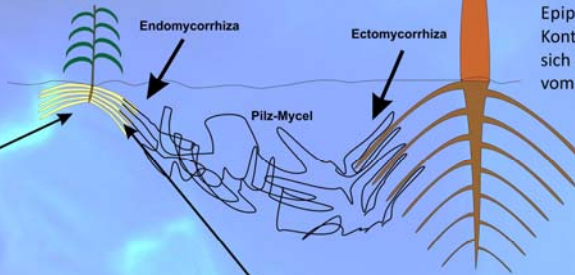
Partnerbaum





Epipactis helleborine (L.) CRANTZ

Die einheimische Orchidee *Epipactis helleborine* wird unter anderem breitblättrige Sumpfwurze oder breitblättrige Sitter genannt. Außerdem gehört sie zur Familie der Orchideen (Orchidaceae). Der Bestand der *Epipactis helleborine* ist bis heute noch ungefährdet, jedoch sinkt seit 1970 das Vorkommen stark. Aus diesem Grund wurde diese Pflanze 2006 zur Orchidee des Jahres gekürt.



Mycorrhiza:

Epipactis helleborine lebt wie fast alle Orchideen in einer Lebensgemeinschaft mit Pilzen zusammen, die als Endomycorrhiza bezeichnet wird.

Als ausgewachsene Pflanze betreibt *Epipactis helleborine* Fotosynthese, allerdings bekommt die Pflanze weiterhin organische Verbindungen vom Mycorrhiza-Partner. Es ist unklar welchen Vorteil der Pilz von der Mycorrhiza hat, daher sprechen einige Autoren nicht von einer Symbiose, sondern vom Parasitismus. Der Pilz selber steht beim Epiparasitismus über eine Ectomycorrhiza in Kontakt mit einem Laubbaum. Hierbei handelt es sich allerdings um eine Symbiose. Der Pilz bezieht vom Laubbaum Kohlenhydrate.

Pflanzenmaterial:

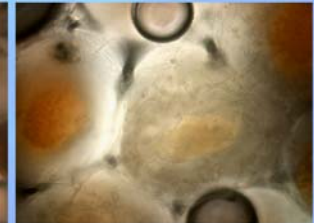
Für die Untersuchung benutzten wir zwei Orchideen, von zwei verschiedenen Standorten, die aus dem schulinternen Garten des Heisenberg-Gymnasiums stammen, wo seit einigen Jahren winterharte Orchideen kultiviert werden.

Ergebnisse zur Anatomie der Adventivwurzeln:

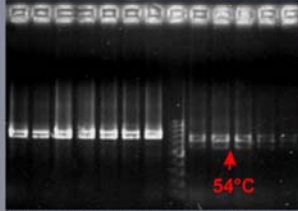
Die Orchidee zeigt die typische Schichtung einer Adventivwurzel (Abb.: 6). Nach der einschichtigen Rhizodermis (Rh) kommt die mehrschichtige Rindenschicht, die Innen an die Endodermis grenzt. Die Zellen der äußeren Rindenschicht weisen zahlreiche Phagocyten (Ph, Abb.: 6) auf, welche an dem dunklen Zellinneren zu erkennen sind. Die Phagocyten weisen zahlreiche Pilzfäden (Hyphen, Hy) auf, in den Phagocyten erfolgt der Vordau der Pilzhypfen.



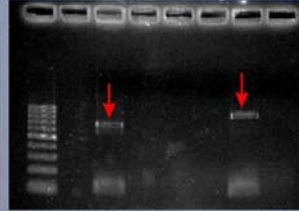
Anatomie der Adventiv-Wurzel



Phagocyte mit Pilzhypfen



Gradienten-PCR: Kontrolle links, Wurzel rechts



PCR Standort Hainbuche (links) und Linde (rechts)

Ergebnisse der molekularen Untersuchung:

Die Versuche zur optimierten PCR ergaben, dass sich die Pilz-DNA am besten mit der Zugabe von DMSO und in einem Temperaturbereich von 54-54,5 C° vermehren lässt, obwohl auch niedrigere Temperaturen Banden ergaben

Ausgehend von den optimierten PCR-Bedingungen konnten von beiden Standorten Pilz-DNA isoliert werden. Auffallend ist, dass die Banden nicht auf gleicher Höhe liegen, sondern unterschiedlich lang sind.

Nach der Sequenzierung ergab die Suche in der NCBI-Datenbank, dass der Pilzpartner unter der Hainbuche mit 97% Übereinstimmung zur Art *Tuber rufum* gehört, dem roten Trüffel aus der Gruppe der Ascomyceten (Schlauchpilze).

Der Pilz-Partner unter der Linde ist ein nicht klassifizierter Pilz aus der Gruppe der Pezizales. Er weist eine 98% Übereinstimmung mit einem nicht genauer bestimmten Pilz aus der Familie der Pyronemataceae in der Datenbank auf.

Diskussion und Fazit:

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Bestimmung der Pilze mit Hilfe von PCR und Sequenzierung recht schnell und sicher möglich ist. Voraussetzung ist eine optimierte PCR, damit die PCR direkt sequenziert werden kann. Die Primer ITS1F und ITS4 scheinen zumindest für diese Gruppe von Ascomyceten geeignet zu sein.

Dadurch, dass *Epipactis helleborine*, welche unter einer Linde stand, nicht denselben Mycorrhizapilz besitzt, wie *Epipactis helleborine*, welche unter einer Hainbuche stand, scheint der Mykorrhizapartner der Orchidee nicht festgelegt zu sein, sondern scheint abhängig zu sein von dem jeweiligen im Boden vorkommenden Ectomycorrhiza-Pilz.

Von besonderem Interesse ist das Auftreten der Gattung *Tuber*.

Eine *Epipactis helleborine* im Garten „macht“ zwar noch keinen Trüffel, aber die Gattung *Tuber* kommt auch in NRW als Mycorrhiza-Partner bei *Epipactis* in Frage, so dass *Epipactis helleborine* eventuell als eine Art „Zeigerpflanze“ für mögliche Trüffelvorkommen genutzt werden könnte, um dann gezielt die Ectomycorrhizen der in Frage kommenden Bäume mit Hilfe der PCR zu bestimmen.



Ergebnis der NCBI-Suche und Sequenzier-File Standort „Hainbuche“



Ergebnis der NCBI-Suche und Sequenzier-File Standort „Linde“