



**Die Evolution von Mykoheterotrophie -
auf Spurensuche in der Mykorrhiza der Polygalaceae (Kreuzblumengewächse)**

(The evolution of mycoheterotrophy - seeking traces in the mycorrhiza of Polygalaceae)

Kumulative Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Magnus Rath,

geboren in Attendorn (Kreis Olpe, NRW)

Marburg

2019

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am _____
angenommen

Erstgutachter: Dr. Stephan Imhof

Zweitgutachter: Prof. Dr. Paul Galland

Tag der Disputation am: _____

Erklärung

Hiermit versichere ich, Magnus Rath, dass ich meine Dissertation „Die Evolution von Mykoheterotrophie – auf Spurensuche in der Mykorrhiza der Polygalaceae“ selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe, mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient und alle vollständigen oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

(Magnus Rath)

Anmerkungen zum Aufbau der Promotion und zur Nutzung von Bildmaterialien

Die vorliegende Promotion erfolgte kumulativ und umfasst zum Zeitpunkt der Disputation drei akzeptierte Publikationen, ein eingereichtes Manuskript und ein weiteres Manuskript im Stadium eines vorangeschrittenen Entwurfs. Die Kapitel I - IX dieser Arbeit dienen der Einführung aller der wissenschaftlichen Analyse und Deutung dienlichen Themenfelder der in dieser Promotion erhobenen morphologischen und molekularsystematischen Daten. Im Zuge dieser allgemeineren Ausführungen werden neben den Literaturdaten auch immer wieder Daten aus der eigenen Forschungsarbeit eingebunden und vor dem Hintergrund des entsprechenden Themenfeldes diskutiert. Hierdurch ist es möglich, auch Informationen, welche letztlich nicht in die Publikationen eingebunden werden konnten, aber zum Verständnis der bearbeiteten Fragestellung beitragen, in die Gesamtbetrachtung der Thematik einzubinden. Nach dieser Einführung in den theoretischen Unterbau der Arbeit erfolgt die Zusammenfassung der fünf im Zuge dieser Arbeit entstandenen Publikationen bzw. Manuskripte. Das Literaturverzeichnis umfasst alle in den Kapiteln I - X zitierten Referenzen. Die in den Publikationen/Manuskripten zitierte Literatur findet sich in der entsprechenden Literaturliste jedes Einzelmanuskripts.

Bildmaterial, welches in den Kapiteln I - IX der anschaulichen Vermittlung des theoretischen Unterbaus dieser Arbeit dient, wird, so es der Fachliteratur entstammt, ausdrücklich als Fremdquelle zitiert. Eigene Bilder und Schemata sind an der fehlenden Quellenangabe in der Legende als solche kenntlich gemacht. In Fig. 40 und Fig. 41 werden, neben eigenem Bildmaterial, auch Abbildungen aus dem Internet genutzt, die allerdings keiner Fachzeitschrift entstammen (siehe Legende). Anzumerken ist, dass dieses Bildmaterial nur als artistische Vorlage für eine digitale Nachzeichnung genutzt wurde und ausschließlich der visuellen Veranschaulichung bereits publizierter Sachverhalte über den oberirdischen Habitus der untersuchten Pflanzen dient. Wenn keine freie Lizenz vorlag, wurden die Eigentümer des betreffenden Bildmaterials im Vorfeld über die Nutzung ihrer Bilder als Zeichenvorlage informiert und erteilten ihre Zustimmung zur Verwendung der Abbildungen.

Inhaltsverzeichnis

Glossar:	S. 1-4
Motivation und Zielsetzung:	S. 5-6
I Polygalaceae – Hintergrundinformationen:	S. 7-19
I.1 Forschungsgeschichte - Polygalaceae und Mykorrhiza:	S. 7-8
I.2 Stammesgeschichte und Systematik:	S. 8-16
I.3 Polygalaceae - paläogeographischer und paläoklimatischer Hintergrund:	S. 16-17
I.4 Zusammenhang zwischen Phylogenie und Lebensform:	S. 18
I.5 Generative Verbreitungsmechanismen in den Polygalaceae:	S. 18-19
II Mykorrhiza - eine Einführung:	S. 20-38
II.1 Ektomykorrhiza (ECM):	S. 20-22
II.2 Endomykorrhiza:	S. 22-33
II.2.1 Ericoide Mykorrhiza (ERM):	S. 22-25
II.2.2 Orchideen-Mykorrhiza (OM):	S. 25-33
II.2.3 Arbuskuläre Mykorrhiza (AM):	S. 33
II.2.4 Endomykorrhiza-ähnliche Assoziationen:	S. 33-34
II.3 Ektendomykorrhiza:	S. 35
II.4 Cavendishioide-, arbutoide- und monotropoide Mykorrhiza:	S. 35-37
II.5 Mykorrhiza-ähnliche Assoziationen:	S. 37-38
III Arbuskuläre Mykorrhiza - ein Überblick:	S. 39-73
III.1 Einführung AM und grundsätzliche Merkmale der Symbiose:	S. 39-43
III.2 Morphologische Ausprägungen der Symbiose innerhalb der Wirtswurzel im Detail: .	S. 43-48
III.3 Evolution der arbuskulären Mykorrhiza:	S. 48-52
III.4 Arum- und Paris-Typ aus evolutiver Perspektive:	S. 52-53
III.5 Arbuskuläre Mykorrhiza oder Mucoromycotina-Endosymbiose: Wer war zuerst da?:	S. 53-55
III.6 (Öko-)Physiologie der arbuskulären Mykorrhiza:	S. 55-70
III.6.1 Anatomie der symbiotischen Schnittstelle:	S. 55-58
III.6.2 Stoffflüsse zwischen den Symbionten:	S. 58-67

Phosphat:	S. 58-60
Weitere Nährstoffe:	S. 61-62
Zucker:	S. 63-67
III.6.3 Kontrolle der Stoffflüsse an der symbiotischen Schnittstelle:	S. 67-70
III.6.4 Wasserstatus, Schwermetall- und Pathogenresistenz:.....	S. 70-71
III.7 Ist jede Pflanze-Pilzkombination mutualistisch?:	S. 71-73
IV Etablierung der arbuskulären Mykorrhiza auf molekularer Ebene:	S. 74-83
IV.1.1 Der Pflanzenwirt:	S. 74-78
IV.1.2 Verknüpfung von molekularem Signaling und cytologischer Akkomodation:	S. 79-81
IV.2 Der pilzliche Symbiont:	S. 81-83
V Glomeromycota - genetische Organisation, Artbegriff und Systematik:	S. 83-96
V.1 Genetische Organisation:	S. 83-85
V.2 Sex, ja oder nein?:	S. 85-89
V.3 Problematik der Artbestimmung in den AMF:.....	S. 89-96
VI Spezifität in der arbuskulären Mykorrhiza:	S. 96-99
VII Verbreitung und ökologische Bedeutung der arbuskulären Mykorrhiza:	S. 100-104
IIX Mykoheterotrophie - eine Einführung:	S. 105-125
IIX.1 Einleitung:	S. 105-109
IIX.2 Anatomische und physiologische Aspekte des Stofftransfers zwischen Pilz und mykoheterotropher Pflanze:	S. 109-114
IIX.3 Formen der Mykoheterotrophie:	S. 114-115
IIX.4 Verfahren zur Identifizierung mykoheterotropher Pflanzen:	S. 115-121
IIX.4.1 Das Isotopenverhältnis Sigma und der Anreicherungsfaktor Epsilon:	S. 117-121
IIX.5 Mykoheterotrophie - Vorkommen im Pflanzenreich und globale Verbreitung:	S. 121-125
IX Evolutionbiologische Aspekte mykoheterotropher Pflanzen:	S. 125-156
IX.1 Konvergenz - analoge Merkmale in Morphologie und Anatomie:	S. 125-136
IX.1.1 Allgemeine Modifikationen des Kormus:	S. 125-128

<i>IX.1.2 Modifikationen des Wurzelsystems im Detail:</i>	S. 129-135
<i>IX.1.3 Mikrospermie:</i>	S. 136
<i>IX.2 Die phylogenetische Perspektive - Identifizierung evolutiver Schritte auf dem Weg zur Mykoheterotrophie:</i>	S. 136-143
<i>IX.3 Triebfedern der Evolution von Mykoheterotrophie:</i>	S. 143-146
<i>IX.4 Spezifität in mykoheterotrophen Pflanzen:</i>	S. 146-156
X Die Problematik der Methode - Modifikation serienschnittbasierter Morphotypisierung in der Mykorrhizaforschung:	S. 157-158
XI Zusammenfassung der Promotion:	S. 159-169
XII Englischsprachige Kurzzusammenfassung der Promotion:	S. 170-172
XIII Danksagungen:	S. 173-174
XIV Literaturverzeichnis und Quellenverweis des Online-Bildmaterials:	S. 175-225
XV Publikationen:	S. 226-330
XVI Erklärung zur Vergabe des Themas und dem Betreuungsverhältnis während der Promotion:	S. 332
XVII Angabe zum Eigenanteil an den Publikationen:	S. 332-333
XIIX Curriculum Vitae:	S. 335-336
XIX Weitere Forschungstätigkeiten:	S. 337

Glossar:

(Mykorrhiza-)Wirt: In Mykorrhiza-Assoziationen der Organismus, welcher Kohlenhydrate für den heterotrophen Symbiosepartner bereitstellt. In der Regel eine photo(auto)trophe Pflanze. Genau genommen handelt es sich in mykoheterotrophen Symbiosen bei dem Wirt nicht um die chlorophylllose Pflanze, sondern um den pilzlichen Mikrosymbionten. Dennoch wird in dieser Arbeit auch in diesem Kontext der Begriff „Wirt“ genutzt und kennzeichnet, wenn nicht ausdrücklich anders angegeben, stets die pflanzliche Komponente der Symbiose.

(Mykorrhiza-)Pilz: Pilzlicher (Mikro)symbiont der Mykorrhiza-Assoziation. Stellt vornehmlich mineralische Nährstoffe (vor allem Phosphat & Stickstoff) für die Wirtspflanze bereit.

Ektomykorrhiza (ECM): Weit verbreitete Form der mutualistischen Symbiose, zumeist in Samenpflanzen (vornehmlich Gehölze der temperaten Regionen) und Pilzen (Basidio- & Ascomycota). Charakteristische Kennzeichen sind ein Hyphenmantel, welcher die Wurzel umgibt sowie das sog. Hartigsche Netz, ein Netzwerk aus interzellulären Hyphen zwischen den Zellen der Epidermis und/oder des Cortexparenchyms der charakteristisch in ihrem Längenwuchs gehemmten Wurzeln.

Endomykorrhiza: Überbegriff für alle Mykorrhizaformen deren Kennzeichen eine scheinbar* intrazelluläre Besiedlung der pflanzlichen Wirtszellen (zumeist in den Wurzeln) durch den Mykorrhizapilz ist (*scheinbar, da das Wirtsplasmalemma nie von den Hyphen des Mikrosymbionten durchstoßen wird).

Ektendomykorrhiza: Im engeren Sinn nur die Symbiose zwischen einzelne Arten in der Gattung *Pinus* und *Larix* mit Vertretern einer sehr begrenzten Gruppe von Ascomyceten (u. a. *Wilcoxia*). Merkmale sind ein vergleichsweise dünner Hyphenmatel, ein cortikales Hartigsches Netz und intrazelluläre Hyphen(knäuel) in den Cortezellen.

Ericoide Mykorrhiza (ERM): Form der Endomykorrhiza-Symbiose zwischen der Mehrzahl aller Ericaceae und Ascomyceten bzw. seltener Basidiomyceten. Merkmale sind das weitestgehende Fehlen eines Hyphenmantels und die intrazelluläre Besiedlung der Rhizodermiszellen mit dichten Hyphenknäueln.

Arbutoide Mykorrhiza: Spezielle Form der Mykorrhiza in der Gattung *Arbutus* und *Pyrola* (Ericaceae). Häufig sind die pilzlichen Träger der Symbiose ECM-ausbildende Basidiomyceten. Merkmale sind die Ausbildung eines Hyphenmantels, ein epidermales Hartigsches Netz und Hyphen(knäuel) in den Epidermiszellen.

Monotropoide Mykorrhiza: Charakteristische Mykorrhiza der mykoheterotrophen Gattungen innerhalb der Ericaceae ausser *Pyrola* [z. B. *Hypopitys monotropa*, *Pterospora* & *Sarcodes*] mit ECM ausbildenden Vertretern der Basidiomycota. Merkmale sind ein dichter Hyphenmantel, ein epidermales Hartigsches Netz und sehr charakteristische kurze Hyphen (*pegs*), die zapfenähnlich in die Epidermiszellen eindringen und über einen noch nicht gänzlich verstandenen Mechanismus ihren Inhalt in die Wirtszelle abgeben.

Orchideen-Mykorrhiza (OM): Typische Form der Mykorrhiza in Orchideen. Die Pilze aus sehr unterschiedlichen systematischen Gruppen innerhalb der Basidiomycota besiedeln Zellen der Epidermis und des Grundgewebes (Cortexparenchym) der Wirtswurzeln/-rhizome über intrazelluläre Hyphenknäuel.

Arbuskuläre Mykorrhiza (AM): Sehr weit verbreitete und phylogenetisch sehr alte Form der Endosymbiose von nahezu allen Gruppen der Landpflanzen mit Vertretern des Phylums Glomeromycota, den sog. arbuskulären Mykorrhiza-Pilzen (*arbuscular mycorrhizal fungi*, AMF). Morphologische Merkmale sind eine inter- und/oder intrazelluläre Hyphenausbreitung innerhalb der Epidermis und des Grundgewebes der Wurzeln, Rhizome und Thalli unter Ausbildung hochverzweigter, pilzlicher Stoffaustausch- und Speicherorgane, sog. Arbuskel (stets intrazellulär) und Vesikel (inter- und/oder intrazellulär). Letztere werden nicht von allen AM-Pilzen gebildet. Sehr formenreich bezüglich der pilzlichen Ausbreitungsmuster (Morphotypen) im Wirtsgewebe.

Nährstoffe: In der modernen Mykorrhizaforschung wird der Begriff „Nährstoffe“ synonym für mineralische Nährelemente, vor allem Phosphat und Stickstoff genutzt.

Mykotrophie: Die Abhängigkeit einer Pflanze bezüglich ihrer Versorgung mit Nährstoffen (vor allem Phosphat und Stickstoff) von der symbiotischen Assoziation mit Mykorrhizapilzen. Unterschiedliche Abstufungen der Mykotrophie sind möglich.

Mykoheterotrophie: Die Abhängigkeit einer chlorophylllosen Pflanze (*mycoheterotrophic plant*; *MHP*) von der Versorgung mit Kohlenstoff und vielfach auch (organisch gebundenem) Stickstoff über den assoziierten Mykorrhizapilz.

Partielle Mykoheterotrophie: Die anteilige Nutzung pilzstämmigen Kohlenstoffs (und Stickstoffs, s. o.) in einer chlorophyllhaltigen (eventuell aber bereits chlorophyllverarmten), photosynthetisch aktiven Pflanzen. Eine alternative, weniger gebräuchliche Bezeichnung ist „Mixotrophie“.

Initiale Mykoheterotrophie (Keim-Mykoheterotrophie): Beschreibt eine auf die frühe Keimlings-Ontogenese beschränkte, essentielle Abhängigkeit einer Pflanzen von der externen Versorgung mit pilzstämmigen Kohlenhydraten und Stickstoffverbindungen. Bisher stets in Kombination mit der Ausbildung von Mikropermie (Staubsamen) beschrieben.

Spezifität (in der Mykorrhiza):

> **Pilzspezifität:** Exklusive Assoziation einer Wirtspflanze mit phylogenetisch distinkten pilzlichen Symbionten, die nur einen Teil der am Standort vorhandenen potentiellen Interaktionspartner ausmachen. Bei dieser Form der taxonomischen Spezifität wird der pflanzliche Makrosymbiont als maßgeblich relevant für die Etablierung der spezifischen Assoziation betrachtet. Der Extremfall, die Assoziation mit nur einer Pilzart, wird als absolute (Pilz-)Spezifität bezeichnet.

> **Wirtsspezifität:** Exklusive Assoziation eines Pilzsymbionten mit phylogenetisch distinkten pflanzlichen Wirten, die nur einen Teil der potentiell kompatiblen Wirten am Standort ausmachen. Bei dieser Form der taxonomischen Spezifität wird der pilzliche Mikrosymbiont als maßgeblich relevant für die Etablierung der spezifischen Assoziation angesehen.

> **Ökologische Spezifität:** Die Realisierung von taxonomischer Spezifität im natürlichen Habitat, selbst wenn die Symbionten unter künstlichen Bedingungen unspezifisch sind.

> **Präferenzen:** Eine bevorzugte Assoziation zu einem oder mehreren phylogenetisch distinkten Symbiosepartnern, welche aber nicht exklusiv ist. Je nach Ausprägung nur schwer von einer engeren taxonomischen Spezifität zu unterscheiden.

> **Funktionelle Spezifität:** Spezifität im taxonomischen Sinne liegt nicht vor. Die aus sehr unterschiedlichen systematischen Gruppen stammenden pilzlichen Mikrosymbionten in den Wurzeln des Wirtes nehmen keine redundante bzw. sehr ähnliche Funktion für den Wirt wahr, sondern sind jeweils sehr spezifisch in ihrer ökophysiologischen Symbioseleistung. Ein viel diskutiertes, empirisch aber bisher wenig erforschtes Thema.

Periarbuskuläre Membran (PAM): Wirtsplasmalemma-Membran entlang der Grenzen zum physiologischen Austauschorgan des Arbuskels. Entsprechend ihrer Funktion im Stofftransfer zwischen Arbuskel und Wirtszelle unterscheidet diese sich ultracytologisch deutlich vom Rest des Plasmalemmas. In *Paris*-Typen wird der Begriff erweitert für die Grenzmembran entlang der intrazellulären Hyphen bzw. der an diesen inserierenden lateralen Arbuskel.

Interfascikulärer Zwischenraum (Matrix): Apoplastischer Raum, begrenzt durch PAM und pilzliche Zellwand. Enthält unterschiedliche, vornehmlich wirtsstämmige Zellwandvorstufen und zeichnet sich durch einen niedrigen pH-Wert sowie eine ausgeprägte extrazelluläre Enzymaktivität aus.

Operationelle Taxonomische Einheit (OTU): Eine Gruppe phylogenetisch verwandter Organismen, welche je nach Forschungsintention bezüglich ihres Verwandtschaftsgrades definiert wird. In dieser Arbeit wird die OTU bis auf wenige Ausnahmen definiert als monophyletische Gruppe (Klade) arbuskulärer Mykorrhizapilze, welche aus den Wurzeln von Vertretern der Polygalaceae isoliert wurden und i. d. R. auch eine hohe Sequenzähnlichkeit von mindestens 97 % zu einer definierten Referenzsequenz innerhalb der entsprechenden Klade aufweisen.

Kronengruppe (*crown group*): In der phylogenetischen Systematik umfasst die Kronengruppe alle rezenten Taxa einer monophyletischen Gruppe, einschließlich ihres letzten gemeinsamen Vorfahren.

Stammgruppe (*stem group*): Umfasst alle extinkten Vertreter einer Klade, die näher mit den Vertretern der Kronengruppe verwandt sind als mit jedem anderen Taxon.

Motivation und Zielsetzung

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden zahlreiche Fortschritte in der Erforschung mykoheterotropher Pflanzen erzielt. Fortschrittliche physiologische Verfahren und ständige Weiterentwicklung in der molekularen Technik gingen nicht spurlos an diesem, lange Zeit eher exotischen Forschungsfeld vorbei (Merckx 2013). Allerdings sind Arbeiten, welche die Evolution mykoheterotropher Pflanzen auf Basis vergleichender Morphologie thematisieren zumeist älter und fokussiert auf die äußeren Modifikationen des Kormus, nicht selten mit Schwerpunkt auf den Abwandlungen und Reduktionen des Sprosses und der Blätter (z. B. Johow 1885, 1889; Henderson 1919, Burgeff 1932, Fuchs & Ziegenspeck 1925, Camp 1940, Furman & Trappe 1971, Maas et al. 1986). Nur vergleichsweise wenige Studien untersuchen gezielt die strukturellen Unterschiede in den eigentlichen Schnittstellen mykoheterotropher Physiologie, d. h. die spezifischen, morphologischen und anatomischen Charakteristika der Wurzelsysteme und und hier speziell der in diesen ausgebildeten Mykorrhizastrukturen. Unter diesem Aspekt genauer behandelt wurden bisher nur die Gentianales (Weber et al. 1995, Imhof 1999), die Ericaceae (Henderson 1919, Massicotte et al. 2005a, 2008, 2010), Orchidaceae (Burgeff 1909, 1932) sowie Vertreter der Thismiaceae (*Afrothismia* spp.) und Burmanniaceae (Imhof et al. 2013). Diese Arbeiten befassen sich aber zumeist mit chlorophylllosen und daher schon stärker abgeleiteten Vertretern oder integrieren Ergebnisse aus Studien über vergleichsweise entfernt verwandte Arten. Trotz der sehr wertvollen Informationen, die diese Arbeiten vermitteln, sind die evolutionären Schritte beim Übergang von der autotrophen zur mykoheterotrophen Lebensweise nicht ohne detaillierte, morphologische Kenntnisse der Mykorrhiza, speziell in den chlorophyllhaltigen nahen Verwandten der mykoheterotrophen Pflanzen, rekonstruierbar. Darüber hinaus verspricht nur die Ausdehnung der Untersuchung auch auf phylogenetisch ursprünglichere Vertreter und Einschluss möglichst vieler unterschiedlicher Lebensformen zentrale evolutive Schritte aufzudecken, die vor dem eigentlichen Übergang von autotropher zu mykoheterotropher Physiologie stattgefunden haben und diese Form der heterotrophen Lebensweise erst ermöglichten. Die Familie der Polygalaceae erfüllt diese Kriterien in besonderer Weise, da durch eingehende phylogenetische Studien die Monophylie der Familie sicher nachgewiesen wurde (Persson 2001; Bello et al. 2009, 2012), eine in weiten Teilen gut aufgelöste intrafamiliäre sowie intragenerische Phylogenie vorliegt (Persson 2001; Forest et al. 2007; Abbott 2009, 2011; Pastore & Abbott 2012; Pastore 2012, Mennes et al. 2015) und darüber hinaus alle Grundlebensformen ausgebildet werden. So findet man neben den chlorophylllosen (mykoheterotrophen) Kräutern, phylogenetisch häufig ursprünglichere holzige Formen (Bäume, Sträucher, Lianen) und stammesgeschichtlich zumeist fortschrittlichere kleinwüchsige Sträucher,

Halbsträucher sowie ein bis mehrjährige Kräuter (Persson & Erikson 2007). Dass Vorliegen solcher Diversität bereits auf der taxonomischen Ebene der Familie, muss als weiterer Vorteil betrachtet werden, da es die Wahrscheinlichkeit eines evolutiv aussagekräftigen Datensatzes deutlich erhöht und die Gefahr der Einbeziehung analoger Merkmalszustände reduziert. Die Existenz einer Pflanzengruppe mit solch großer morphologischer und systematischer Vielfalt, welche darüber hinaus eine arbuskuläre Mykorrhiza ausbildet, eine Form der mutualistischen Pflanzen-Pilz Symbiose, die trotz ihrer sehr weiten Verbreitung und ihrer überproportional wichtigen Rolle in der Evolution mykoheterotropher Pflanzen bisher vergleichsweise wenig erforscht wurde, ist daher ein Glücksfall und bietet die einzigartige Chance, die Evolution der Mykoheterotrophie sowohl strukturell wie auch auf molekularsystematischer Ebene der beteiligten pilzlichen Symbionten nachzuvollziehen.

I Polygalaceae - Hintergrundinformationen

I.1 Forschungsgeschichte - Polygalaceae und Mykorrhiza

Die Mykorrhiza der Polygalaceae rückt mit dieser Arbeit nicht zum ersten mal in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Bereits Stahl (1900) bezeichnet die heimischen Vertreter der Gattung *Polygala* als obligate Mykorrhizapflanzen. Heinricher (1900/01) schränkt diese Charakterisierung ein und gesteht nur einer der heimischen Arten eine derart ausgeprägte ökophysiologische Abhängigkeit von ihrer Mykorrhiza zu. Penzig (1901) untersucht die chlorophylllose Gattung *Epirixanthes* und beschreibt bereits recht detailliert die spezifischen morphologischen Eigenarten des Wurzelsystems inklusive der Mykorrhizastrukturen. Ein Jahr später befasst sich Marcuse (1902) neben anderen Pflanzen auch mit den Mykorrhizen der von ihm als „hemisaprophytisch“ eingestuften Arten *Polygala amara* (Bittere Kreuzblume) und *P. vulgaris* (Gewöhnliche Kreuzblume), zwei heimischen, chlorophyllhaltigen („grünen“) Arten, die auch im Zuge dieser Arbeit untersucht wurden. Van der Pijl (1934) wendet sich wieder *Epirixanthes* zu. Er bestätigt den morphologischen Befund von Penzig und vermutet die Verbreitung des pilzlichen Symbionten als einschränkende Bedingung für das Vorkommen der chlorophylllosen „Saprophyten“ im Habitat - ein für den damaligen Wissensstand erstaunlich weitsichtiger Befund. Alle diese Autoren beschreiben bereits die charakteristische Aufteilung des Wurzelcortexparenchyms in eine innere Zelllage aus anatomisch sehr charakteristisch geformten Zellen, angefüllt mit schnell degenerierenden pilzlichen Strukturen, einer darüber liegenden Zelllage mit längerfristig vitalen Pilzhyphen sowie einer dritten Lage von Zellen, ebenfalls angefüllt mit degenerierenden Pilzstrukturen. Für die innersten beiden Parenchymlagen adaptiert Van der Pijl die bereits etablierten Begriffe „Wirtsschicht“ bzw. „Verdauungsschicht“ und interpretiert diese auch funktionell. Weitere Untersuchungen chlorophyllhaltiger Vertreter der Familie folgten, sind aber weniger detailliert in ihrer Beschreibung der unterirdischen Strukturen (Stelz 1968 zitiert in Smith & Smith 1997; McGee 1986, Muthukumar & Udaiyan 2000, Maremmani et al. 2003). Phoris (2005, Diplomarbeit) untersucht die Wurzeln von vier chlorophyllhaltigen Vertretern der Gattung *Polygala* und legt eine Progressionsreihe der intraradikalen Mykorrhizastrukturen. Imhof (2007) ist mit der bis dahin detailliertesten Analyse der Wurzeln und Mykorrhizastrukturen in der mykoheterotrophen Gattung *Epirixanthes* der vorerst letzte Autor in diesem Themenfeld. Vor allem auf seine Analysen wird in dieser Arbeit Bezug genommen, um eine morphologische Referenz für die Progression in der Mykorrhiza in der Familie Polygalaceae zu definieren und die untersuchten Strukturen in den chlorophyllhaltigen Vertretern vor einem evolutiven Hintergrund zu bewerten. All den genannten

Autoren gebührt mein Dank für ihre Forschungsarbeit in diesem Feld, die mir Anregung und Diskussionsgrundlage im Verlauf dieser Promotion waren.

I.2 Stammesgeschichte und Systematik

Polygalaceae sind eine Familie eudikotyledoner Pflanzen mit nahezu weltweiter Verbreitung (Ausnahme Neuseeland und Polynesien) und besonders ausgeprägter Radiation in den tropischen und subtropischen Regionen Amerikas, Afrikas und Asiens. Sie sind eine von vier Familien in den Fabales. Hier stellen sie mit 21 Gattungen und 800 - 1000 Arten nach den Fabaceae die artenreichste Gruppe. Die artenarmen Quillajaceae und Surianaceae sind die beiden weiteren Familien der Ordnung (APG IV, in: Stevens 2001 onwards; Eriksen & Persson 2007). Die Monophylie der Polygalaceae wird sowohl auf Basis morphologischer (Eriksen 1993b, Bello et al. 2012) wie auch molekularsystematischer Merkmale [*trnL-F* (Persson 2001); *rbcL*, *trnL* & *trnL-F* (Forest 2007); *rbcL* & *matK* (Bello et al. 2009)] gestützt. Die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Ordnung sind allerdings bisher noch nicht eindeutig aufgelöst und die in den letzten 16 Jahren vorgenommenen molekularsystematischen Studien lieferten diesbezüglich noch keine eindeutigen Antworten (z. B. Doyle et al. 2000, Persson 2001; Forest et al. 2007; Bello et al. 2009, 2012; Smith et al. 2011, Soltis et al. 2011, siehe Li et al. 2016 für eine Zusammenfassung der Problematik). Größere Übereinstimmung herrscht bisher nur bezüglich der engen systematischen Beziehung zwischen den Surianaceae und Quillajaceae (Wojciechowski et al. 2004, Bruneau et al. 2008, Bello et al. 2009, 2012, Cardoso et al. 2013; Koenen et al. 2013; Li et al. 2015, 2016). Die Stellung der Polygalaceae hingegen ist noch unklar. Eine engere Beziehung zu den Fabaceae wird zwar von einigen kladistischen Ansätzen (Wang et al. 2009, Bello et al. 2009, 2012, Li et al. 2015, 2016) vorgeschlagen, genauso wie eine Stellung als Schwestertaxon zu den Surianaceae (Forest et al. 2007, Bello 2009; Smith & Smith 2011), jedoch wird keines dieser Ergebnisse statistisch ausreichend gestützt und ist darüber hinaus stark von dem jeweils verwendeten phylogenetischen Modell, den ausgewählten Merkmalen bzw. deren Kombination und der Zahl analysierter Taxa abhängig (Bello 2009, 2012; Cardoso et al. 2013; Koenen et al. 2013; Li et al. 2015, 2016). In der bisher aufwendigsten phylogenetischen Analyse zur Aufklärung des Sachverhalts kombinieren Bello et al. (2012) molekulare (*matK* & *rbcL*) und eine Vielzahl zumeist blütenmorphologischer Daten. Allerdings brachte auch dieser Ansatz keine endgültige Antwort auf die Stellung der Polygalaceae innerhalb der Fabales. Größten Konsenz zwischen den morphologischen und molekularsystematischen Kladistiken (Parsimonie, Bayessche Statistik) findet allerdings die Topologie, in welcher die Polygalaceae als Schwestergruppe zu den restlichen Familien in den

Fabales auftreten und die Fabaceae das Schwestertaxon zur Klade [Surianaceae+Quillajaceae] sind. Vor dem Hintergrund identischer Topologien in anderen Analysen (Wojciechowski et al. 2004, Bello et al. 2009, Koenen et al. 2013, Cardoso et al. 2013) scheint diese interfamiliäre Verwandtschaftsbeziehung bis auf Weiteres am besten unterstützt.

In der ersten Monographie der Familie, die in das letzte Jahrzehnt des 19. Jahrhunderts datiert (Chodat, 1891 - 1893, 1896), werden die Polygalaceae in die drei Triben Xanthophylleae, Moutabeae und Polygaleae unterteilt. Eriksen (1993a) fügte diesen noch den Tribus Carpolobieae hinzu. Innerhalb der Familie ist es im Laufe des letzten Jahrhunderts, speziell aber im Zuge der voranschreitenden Etablierung molekularer Methoden in der Kladistik der letzten zwanzig Jahre, zu zahlreichen Umstrukturierungen in der Systematik der Familie gekommen. Für diese Arbeit relevant ist allerdings nur der aktuelle Stand der Forschung. Als erstes zu nennen ist demnach der phylogenetisch ursprünglichste, monotypische Tribus Xanthophylleae mit der indomalesisch verbreiteten, zumeist baumförmigen, seltener strauchigen Gattung *Xanthophyllum*. Diese wurde bereits in der Vergangenheit mehrheitlich den Polygalaceae zugeordnet (Hutchinson 1967, Goldberg 1986, Verkerke 1984, Thorne 1992) - eine Behandlung als eigene Familie (innerhalb einer Ordnung Polygalales) auf Basis des uniloculären Ovars und der zahlreich ausgebildeten Samenanlagen (Chronquist 1981, Takhtajan 1997) wird in der neueren, molekularbasierten Analysen nicht aufgegriffen (Persson et al. 2001, Forest et al. 2007) und wäre auch nur bei überproportionaler Bewertung der vorhandenen genetischen Unterschiede zu rechtfertigen. Gilt *Xanthophyllum* zweifelsfrei als das Schwestertaxon zu den restlichen Polygalaceae (Eriksen 1993b, Persson 2001, Forest et al. 2007, Bello 2009), so ist die intrafamiliäre Stellung des neuwelttropisch und indopazifisch verbreiteten, Bäume und Lianen umfassenden Tribus Moutabeae (Chodat 1896) mit den Gattungen *Moutabea*, *Balgoya*, *Eriandra*, *Barnhartia*, und *Diclidanthera* noch strittig. So nimmt dieser eine phylogenetisch basalere Position in der Nähe der Xanthophylleae ein, wenn ausschließlich morphologische Marker herangezogen werden (Eriksen 1993b). Molekulare Datensätze hingegen stützen eine größere Nähe zu den phylogenetisch jüngeren Triben Carpolobieae und Polygaleae (Persson 2001, Forest et al. 2007, Abbott 2009, Mennes et al. 2015). Allerdings hätten sich auch in letzterem Szenario die ursprünglichsten Vertreter des Tribus Moutabeae (*stem group*) vor den moderneren Polygaleae von der gemeinsamen Linie abgespalten. Die Xanthophylleae und Moutabeae repräsentieren somit phylogenetisch ursprüngliche Linien der Polygalaceae und sind mit zwei Arten der Gattung *Xanthophyllum* und einer Art in *Moutabea* ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit.

Die Unsicherheiten bezüglich der intrafamiliären Position treffen auch auf den ebenfalls nur holzige

Vertreter umfassenden, afrikanischen Tribus Carpolobieae mit den Gattungen *Aroxima* und *Carpolobia* zu, deren systematische Ausgliederung aus dem Tribus Polygaleae erst vergleichsweise kürzlich erfolgte (Eriksen 1993b). Molekularphylogenetische Analysen deuten trotz auffälliger morphologischer Unterschiede auf eine nahe Verwandtschaft zum Tribus Moutabeae (Schwestertaxon) hin, mit dem zusammen sie wiederum die Schwestergruppe zu den Polygaleae bilden (Abbott 2009; Mennes et al. 2015). Die morphologisch basierte Kladistik von Eriksen (1993b) wie auch die molekulare Phylogenie von Forest et al. (2007) stützen hingegen die Stellung der Carpolobieae als Schwestergruppe der Polygaleae.

Der Tribus Polygaleae (Chodat 1996) stellt die mit Abstand meisten Arten in der Familien, u. a. die Verwandtschaftsgruppe um die mykoheterotrophe Gattung *Epirixanthes*. Daher und aufgrund der Vielzahl ausgebildeter Lebensformen und Arten ist der Tribus für diese Arbeit von besonderem Interesse. Die Polygaleae umfassen sowohl holzige Lebensformen, d. h. kleine Bäume, Sträucher, Halbsträucher, Lianen wie auch zahlreiche perennierende und einjährige Kräuter (Persson & Eriksen 2007). Im Gegensatz zu den meist mehr oder minder stark radiärsymmetrischen (*actinomorph*) angelegten Blüten der anderen Gruppen, zeichnen sich Vertreter des Tribus durch ausgeprägte Monosymmetrie (*Zygomorphie*) im Blütenbau und in der Regel auch sehr auffällig gefärbte Blütenblätter aus (Chodat 1891 - 1893, 1896; Eriksen & Persson 2007, Bello et al. 2010; vgl. S. 11, Fig. 1 & S. 12 Fig. 2). Das durch ontogenetische Reduktion bzw. Arrestierung der beiden seitlichen Petalen dreizählige Perianth ähnelt der gekielten (*keel flowers*; Howell, Slater & Knox 1993) bzw. schmetterlingsförmigen (*papilionaten*) Blüte der Faboideae und der Gattung *Cercis* (*Cercideae*) in den Fabaceae, da es ein dem *Schiffchen* bzw. *Kiel* der Schmetterlingsblütler ähnelndes, kahn- bis löffelähnlich ausgeformtes abaxiales Kronblatt (hier ebenfalls als *Carina* bezeichnet) besitzt, welches die typischerweise 6 bis 8, an ihrer Basis röhrig (*monadelphisch*) verwachsenen Staubblätter und den bilocularen Fruchtknoten umschließt (Eriksen 1993a, Persson 2001). Darüber hinaus werden zwei zumeist auffällig vergrößerte, seitlich inserierende Blütenblätter ausgebildet (nur die Gattungen *Salomonina* und *Epirixanthes* zeigen diese Ausbildung nicht; Chodat 1891 - 1993, 1896; Bello et al. 2010, Eriksen 1993a). Diese erinnern durch ihre zumeist auffällige Farbgebung und Form stark an die *Fahne* bzw. *Flagge* (*Vexillum*) der Faboideen und bilden einzeln oder in Kombination mit den beiden häufig kleinen, weniger auffälligen medialen Kronblättern den bestäuberanlockenden Schauapparat der Blüte (Westerkamp & Weber 1999). Zusammen mit den sehr unterschiedlich ausgeprägten (z. T. auch gänzlich fehlenden) finger- bis geweihförmigen Anhängseln (*Crista*) des Blütenkiels sowie den von diesem eingehüllten generativen Strukturen ergibt sich eine spezialisierte, in ihrer blütenökologischen Funktion den Faboideen-Blüten

vergleichbare Bestäubungseinheit, die ebenfalls eine Anpassung an kräftige, flugfähige Insekten und zwar ursprünglich wohl speziell Bienen (Apidae, *Melittophilie*) zu sein scheint (Westerkamp 1997; Castro et al. 2009). Trotz dieser großen äußerlichen und funktionellen Nähe zur Kielblüte der Fabaceae und der nahen Verwandtschaft beider Familien handelt es sich bei den betreffenden Blütenorganen dennoch nicht um homologe Strukturen (Westerkamp & Weber 1999; Bello et al. 2010, 2012). Die zumeist auffälligen, seitlich inserierenden Blütenblätter vieler Polygaleae sind eine petaloide Umbildung der Kelchblätter, der Blütenkiel entwickelt sich nur aus einem einzelnen Kronblatt und die Flügel der Faboiden-Blüte besitzen überhaupt keine Entsprechung in der Blüte der Polygaleae. Prenner (2004) findet zwar auf Ebene der Blütenontogenie Ähnlichkeiten zwischen *Polygala myrtifolia* und den Fabaceen-Blüten, allerdings verweist hierzu Bello et al. (2012) auf die deutlichen Unterschiede der an der Blütengenese beteiligten Entwicklungssequenzen und stellt dem sehr wahrscheinlich monophyletisch entstandenen Blütenmodul der Polygalaceae die ausgeprägte Homoplasie in der Evolution der papilionoiden Fabaceen-Blüten gegenüber.

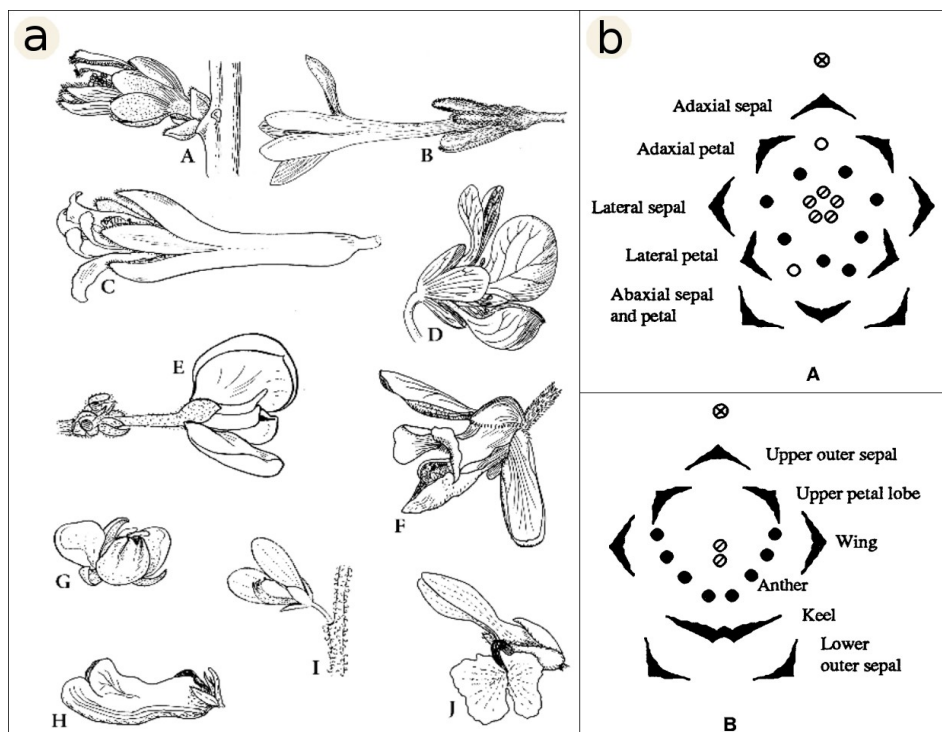


Fig. 1: a) Blütenformen der Polygalaceae A) *Xanthophyllum papuanum*, B) *Diclidanthera penduliflora*, C) *Moutabea aculeata*, D) *Xanthophyllum ramiflorum*, E) *Acanthocladus guayaquilensis*, F) *Bredemeyera floribunda*, G) *Monnina reticulata*, H) *Salomonina cantoniensis*, I) *Polygala boliviensis*, J) *Muraltia heisteria*. (nach Eriksen & Persson 2007) b) Blütendiagramm einer verstärkt radiärsymmetrischen Blüte in *Diclidanthera* (A) vs. einer zygomorphen, papilionaten Blüte in *Polygala* (B). [nach Eriksen 1993a (b) und Eriksen & Person 2007 (a)]



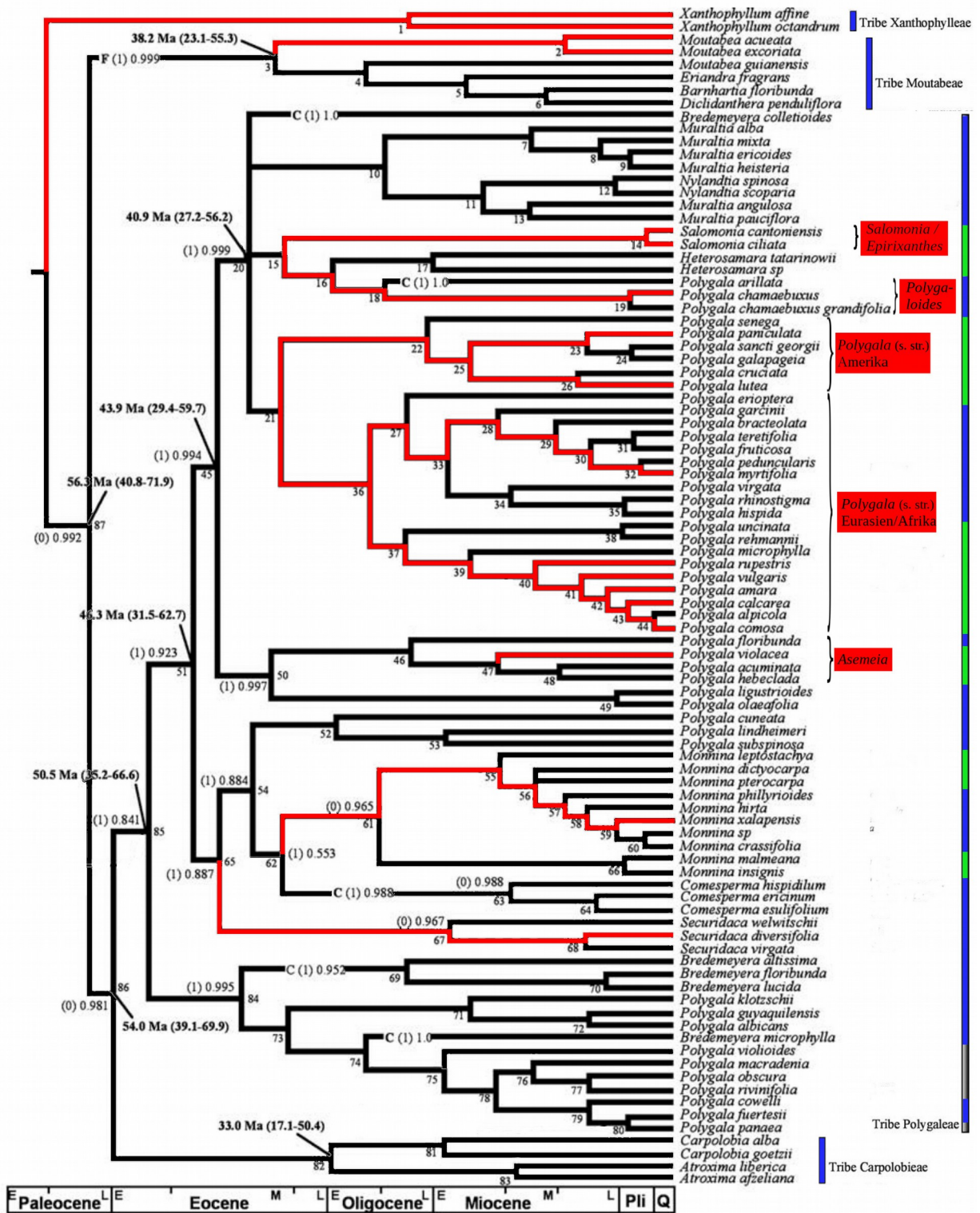
Fig. 2: Typischen Blütenformen innerhalb des Tribus Polygaleae: a) *Securidaca diversifolia*, b) *Moninna xalapensis*, c) *Polygala calcarea*, d) *Polygala baldunii*.

Die morphologische Beschreibung der artenreichsten Gattung des Tribus, *Polygala* [Eriksen & Persson 2007 schätzen die Gattung auf 330 - 425 Arten, während Abbott (2009) von mindestens 500 Arten ausgeht], die Chodat (1891-1893, 1896) in insgesamt 10 Sektionen unterteilt, von denen viele später in subgenerischen Rang erhoben wurden [Blake 1924, Paiva 1998 (zitiert in Forest et al. 2007 und Pastore & Abbott 2012)], beruht zum Teil auf symplesiomorphen, d. h. kladistisch nicht-informativen Merkmalen wie der papilionaten Blüte, der Fruchtform (eine biloculare Kapsel), der Staubblattzahl (8) und dem Fehlen längerer Samenhaare. Die große Heterogenität in der Ausprägung dieser generativen Merkmale wurde zwar bereits früh erkannt [Nieuwland 1914, Jauch 1918 (zitiert in Eriksen 2007)], aber erst durch molekularbasierte Analysen endgültig als konvergent bestätigt (Persson 2001). Es war daher keine allzu große Überraschung, als gleich mehrere, morphologisch wie auch molekular basierte phylogenetische Analysen die Polyphyly der Gattung belegten und es zu teils drastischen Neuordnungen innerhalb des gesamten Tribus Polygaleae kam [Eriksen 1993b, Paiva 1998 (zitiert in Forest et al. 2007), Persson 2001, Forest et al. 2007, Abbott 2011; Pastore 2012, Pastore & Abbott 2012]. Trotz der Tatsache, dass die Klassifizierung innerhalb des Tribus und speziell innerhalb der Gattung *Polygala* s. l. [das sind alle Arten, die derzeit noch unter die Gattung *Polygala* fallen, aber ausserhalb der Kerngruppe (*core group*), d. h. dem Monophylum um die Typusart *Polygala vulgaris* ssp. *vulgaris* L. liegen] bis heute noch nicht in allen Bereichen geklärt ist, trugen diese neuen phylogenetischen Arbeiten maßgeblich zu der Etablierung einer natürlichen Klassifizierung innerhalb der Gruppe bei. Demnach umfassen die Polygaleae neben *Polygala* s. l. die Gattungen *Anthocladus*, *Bredemayera*, *Badiera* (Polygaleae I nach Persson 2001), *Ancyloptropis*, *Comesperma*, *Hualania*, *Monnina* (inkl. *Pteromoninna*; Persson 2001, Forest et al. 2007), *Securidaca*, *Muraltia* inklusive *Nylandtia* (Forest & Manning 2006), *Heterosamara* (Paiva 1998), *Salomonnia*, *Epirixanthes* und *Polygala* s. str. (Polygaleae II nach Persson 2001). Verblieb die intergenerischen Phylogenie der Polygaleae II in dieser frühen Analyse noch unaufgelöst, so haben die Untersuchungen der Folgejahre hier große Fortschritte gebracht (z. B. Forest et al. 2007, Abbott et al. 2011, Mennes et al. 2015, Pastore et al. 2017). Allerdings ist vor allem die Gattung *Polygala* (s. l.) noch ein Feld intensiver Forschung und ihre intragenerische Aufspaltung sowie Abgrenzung zu Gattungen wie *Salomonnia*, *Muraltia*, *Comesperma* und *Ancyloptropis* noch ein Feld aktueller Forschung. So wurde die Gattung *Caamembeca* (vormals *Polygala* Subgenus *Ligustrina*) und die in dieser Studie untersuchte *Asemeia grandiflora* (vormals *Polygala* Subgenus *Hebeclada*) erst vor einigen Jahren in generischen Rang erhoben (Abbott 2011, Pastore 2012, Pastore & Abbott 2012)¹. Auch der in dieser Studie untersuchte heimische Halbstrauch *Polygala chamaebuxus* steht trotz großer geographischer Distanz der südostasiatischen

Klade mit *Salomonina/Epirixanthes* deutlich näher als der Gruppe *Polygala* s. str. (Forest et al. 2007). Aus diesem Grund argumentiert Abbott (2009, 2011) auf Basis von molekularen wie auch morphologischen Merkmalen für eine Ausgliederung der Subgattung *Chamaebuxus* als eigene Gattung *Polygaloides* und behandelt aus vergleichbaren Gründen die ehemaligen Subgenera *Hebecarpa* und *Rhinotropis* ebenfalls als eigenständige Gattungen¹. Darüber hinaus liefert der Autor in seiner großangelegten Studie ebenfalls Grundlagen für die intragenerische Phylogenie der Gattung *Polygala* s. str., indem er entsprechend der geographischen Distanz eine klare systematische Abgrenzung zwischen einer altweltlichen und neuweltlichen Klade nachweist und damit die auf einer deutlich kleineren Datenbasis fußenden Analysen Perssons (2001) und Forests (2007) bestätigt. Vertreter beider Untergruppen sind Bestandteil dieser Arbeit. Ähnliche systematischen Umstrukturierungen geschahen in den letzten Jahrzehnten für die mit bis zu 180 Arten zweitgrößten Gattung *Monnina* (APG IV, in: Stevens 2001 onwards). In einer morphologisch basierten Kladistik wertet Eriksen (1993b) die Gattung als Polyphylum und erhebt neben *Monnina* s. str. die vormaligen Subgenera *Monninopsis* (Chodat 1891-1893; 1896) und *Pterocarya* (Chodat 1891-1893; 1896) als *Ancylotropis* und *Pteromonnina* in generischen Rang. Nachfolgende Analysen auf Basis molekularer, morphologischer und phylogenetischer Daten revidieren diese Ansicht und stützen wieder einen monophyletischen Ursprung der Klade (Persson 2001; Forest et al. 2007, Abbott 2011). Mehrere Vertreter der Gattung gingen in die vorliegende Studie ein. Aufgrund der engen phylogenetischen Beziehung zur einzigen mykoheterotrophen Klade der Polygalaceae *Epirixanthes* ist die artenarme Gattung *Salomonina* [2 (Van der Meijden 1988) bis 5 Arten (Pendry 2001: Klassifizierung genutzt in dieser Arbeit)] für diese Arbeit von besonderem Interesse. Ihre Zugehörigkeit zum Tribus Polygaleae ist anhand morphologischer (Van der Meijden 1988; Eriksen 1993b), molekularer (Persson 2001; Forest et al. 2007, Abbott 2011) sowie kombi-

Fig. 3 (S. 15): Chronogramm der Polygalaceae mit Angabe aller bearbeiteten Entwicklungslinien sowie einiger in dieser Promotion untersuchten Arten (siehe rote Markierungen). Die Kladen mit *Epirixanthes* spp., *Polygala* s. str. Eurasien/Afrika und Amerika, sowie die neu beschriebenen Gattungen *Polygaloides* und *Asemeia* (beide ehemals *Polygala*) sind hervorgehoben. Zentrale Knoten sind mit dem ermittelten evolutiven Alter versehen (molecular clock: Zeitwerte in Klammern repräsentieren die Konfidenzintervalle in dessen Grenzen mit 95%iger Wahrscheinlichkeit der wahre Wert der Altersschätzung des phylogenetischen Knotens liegt). Seitenleiste: Blau markierte Arten sind Gehölze, grün markierte Arten sind ein- bis mehrjährige Kräuter. Für die grau markierten Arten konnte die Lebensform nicht ermittelt werden. Dem Dendrogramm wurde eine Zeitleiste mit den erdgeschichtlichen Epochen zugeordnet. (verändert nach Forest et al. 2007)

¹ Während in Rath et al. (2013) noch der alte Gattungsname *Polygala* genutzt wurde, werden in allen andere Publikationen, der aktuellen Taxonomie entsprechend, die Gattungsnamen „*Polygaloides*“ bzw. „*Asemeia*“ genutzt.



nierter morpho-molekularer Studien eindeutig geklärt (Bello et al. 2012). Mennes et al. (2015) belegen in einer vertieften, molekularbasierten phylogenetischen Analyse der Gattung *Epirixanthes* die besonders enge Verwandtschaft von *Salomonina* und *Epirixanthes*. Damit verifizieren die Autoren endgültig vorangegangene, morphologisch basierte Vermutungen in diese Richtung (Bentham & Hooker 1862, Chodat 1891-1893, 1896, Hutchinson 1967, Van der Meijden 1988; vgl. Fig. 4). Für eine graphische Übersicht aller der in dieser Studie beteiligten Kladen, ihrer systematischen Stellung und phylogenetische Entwicklung, wird auf die Darstellung in Figur 3 verwiesen.

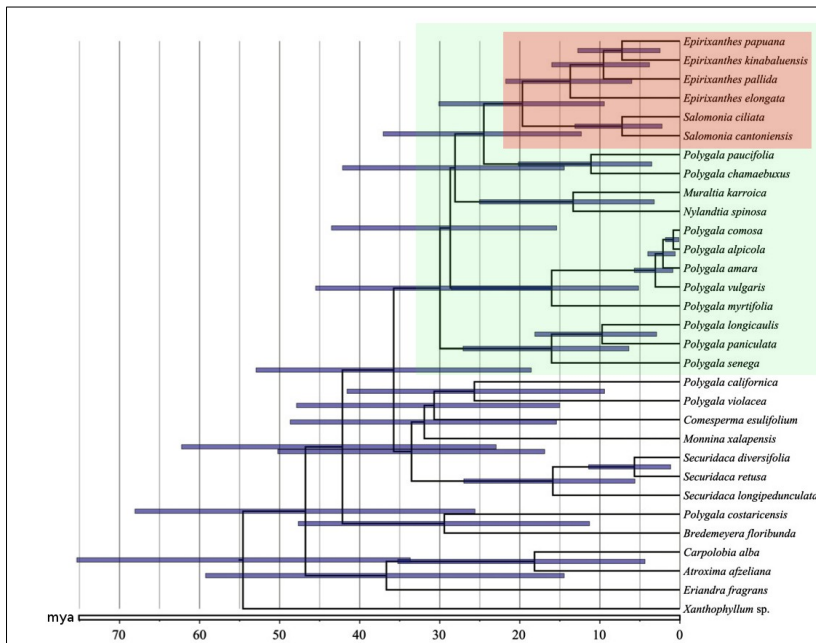


Fig. 4 Chronogramm der Polygalaceae mit den phylogenetischen Beziehungen innerhalb der phylogenetisch abgeleiteteren Gruppen *Polygala* s. str., *Epirixanthes* und *Salomonina* (hellblau hinterlegt). Die besonders abgeleitete Klade mit den Schwestergattungen *Salomonina* und *Epirixanthes* spp. ist hellrot hinterlegt. Blaue Balken repräsentieren die Konfidenzintervalle der Altersschätzung (Kriterium: 95 %, vgl. Fig. 3). (verändert nach Mennes et al. 2015)

I.3 Polygalaceae – paläogeographischer und paläoklimatischer Hintergrund

Früheste Fossilien (Pollen), die gesichert Vertretern der Polygalaceae zuzuordnen sind, stammen aus dem frühen bis mittleren Eozän und späten Miozän [ca. 56 - 38 million years ago (mya) bzw. ca. 7 - 5,3 mya; Huang 1980 (zitiert in Bello et al. 2009), Muller 1981, Martin 1982, Zhi-Chen et al. 2004] und sind damit deutlich jünger zu datieren als die bisher ältesten Fossilien mit ungesichertem Verwandtschaftsstatus (Teile einer Flügelnuss mit großer Ähnlichkeit zur Samara von *Securidaca*), welche in das Paläozän (66 - 56 mya) fallen (siehe u. a. Muller 1981, Magallón et al. 1999, Forest et al. 2007, Bello et al. 2009). Dennoch sind zumindest einige Fossilbelege (Pollen von *Monnina* cf.) aus dem Paläozän vermutlich authentisch, denn auch molekular basierte Phylogenien (*molecular clock*) verorten den Beginn der Diversifizierung (*crown age*) der Polygalaceae in einem sehr ähnlichen Zeitrahmen [60,4 mya (+/- 8,0 mya) nach Forest et al. 2007; 57,4 mya (+/- 8,11 mya) nach Bello et al. 2009]. Die Trennung der Polygalaceae von ihrem Schwestertaxon in den Fabales (*stem*

age) fällt auf Basis molekularer Daten mehrerer Analysen übereinstimmend in die ausgehende Kreidezeit [68 - 66 mya nach Wikström et al. 2001; 60 - 70 mya nach Lavin et al. 2005; Ø 66,9 mya (84,7 - 53,7 mya) nach Forest et al. 2007]. Die Abtrennung der Moutabeae, Carpolobieae und Polygaleae vom ursprünglichsten Tribus Xanthophylleae erfolgte nach heutigem Verständnis in einem Zeitraum von der Mitte des Paläozäns bis in das beginnenden Eozän ab (ca. 60 - 54 mya; vgl. S. 15, Fig. 3). Die Kladogenese der meisten Gattungen in der Familie begann allerdings erst später von der Mitte des mittleren Eozäns bis zum Ende des Oligozäns (ca. 46 - 23 mya) mit der größten intragenerischen Diversifizierungsrate im Miozän und Pliozän (ca. 23 - 2,6 mya; Forest et al. 2007, Mennes et al. 2015). Klimatisch war diese Epoche durch eine merkliche Abkühlung zu Beginn des Paläozäns, gefolgt von drastischer Erwärmung zum Ende dieser Epoche (Paläozän/Eozän-Temperaturmaximum, PETM; vor ca. 55,5 mya) und einer darauf folgenden Stabilisierung des Weltklimas auf einer niedrigeren, allerdings immer noch warmen Durchschnittstemperatur geprägt (Eozän-Temperaturoptimum vor ca. 55 - 47 mya), die mit einer globalen Ausbreitung tropischer Regenwälder bis in nördliche Breitengrade während dieser langanhaltend nahezu eisfreien Phase einherging. Erst gegen Ende des Eozäns und zu Beginn des Oligozäns kühlte sich die globale Temperatur wieder deutlich ab und eine Vereisung der Pole setzte ein, was letztlich den Rückzug der tropischen Regenwälder in Richtung Äquator bedingte. Während dieser Phase entfernten sich die Reste der beiden Superkontinente Laurasia und Gondwana, welche die heutigen Kontinentalplatten während der Kreidezeit noch teilweise vereinigten, immer weiter voneinander und die Teilkontinente drifteten langsam in Richtung ihrer heutigen Position. Forest et al. (2007) können die Entwicklung der Elaiosomen zeitlich in ebendieser erdgeschichtlichen Phase verorten und weisen der Entwicklung von Samenanhängseln eine zentrale Rolle in der Radiation der Polygalaceae zu (vgl. Kapitel I.5). Erst im ausgehenden Oligozän stiegen die Temperaturen phasenweise wieder an und im folgenden Miozän (ca. 23 - 5,3 mya) kam es zu einem erneuten, allerdings moderaten Temperaturoptimum, das durch mediterranes bis tropisches Klima bis in nördliche Breitengrade geprägt war (Mittelmiozän-Klimaoptimum, ca. 19 - 15 mya). Die Kontinente nahmen während dieser Zeitspanne endgültig ihre heutige Position ein (die Landbrücke zwischen Nord- und Südamerika bildete sich allerdings erst später während des Pliozäns), der antarktische Zirkumpolarstrom etablierte sich und aufgrund der globalen Warmphase schmolzen die polaren Eismassen nahezu vollständig. Der evolutive Schritt der extinkten Vorläufer der Gattung *Epirixanthes* zur Mykoheterotrophie fällt nach den molekularbasierten Dendrochronogrammen in die Phase klimatischen Optimums des mittleren Miozäns und der damit einhergehenden Ausbreitung tropischer Regenwälder in Asien (Mennes et al. 2015; siehe auch Kapitel IX.3).

I.4 Zusammenhang zwischen Phylogenie und Lebensform

Bereits die Phylogramme der ersten, morphologisch basierten kladistischen Analyse (Eriksen 1993b) sehen die großen, verholzten Bäume, Sträucher und Lianen der Xanthophylleae und Moutabeae an der Basis der Polygalaceae und stimmen in dieser Hinsicht mit den molekularen Phylogenien überein (Persson 2001, Forest et al. 2007, Abbott 2011, Bello et al. 2012, Pastore 2017; vgl. S. 15, Fig. 3). Auch innerhalb des Tribus Polygalaea setzt sich dieser Trend fort. So steht die Gattung *Securidaca* innerhalb des abgeleiteten Tribus Polygaleae an basalerer Position und besteht ausschließlich aus größeren holzigen Lebensformen (Lianen, Sträucher und kleine Bäume). Komplizierter stellt sich die Lage in der Gattung *Monnina* dar. Neuere Erkenntnisse deuten stark auf einen reversen Trend in diesem Taxon hin, bei dem die holzigen Lebensformen (Sträucher und kleine Bäume) abgeleitet, die Krautformen hingegen ursprünglicher sind (Abbott 2011, Freire-Fierro 2015; vgl. Fig. 3). Dennoch existieren zahlreiche holzige Vertreter in der Gattung und die Position von *Monnina* innerhalb des Tribus Polygaleae ist ebenfalls basaler als die der phylogenetisch „moderneren“ *Salomonina/Epirixanthes*- und *Polygala* s. str.-Klade, die ausschließlich (*Salomonina*, *Epirixanthes*) bzw. sehr zahlreich (*Polygala* s. str.) krautige Formen umfasst. Innerhalb der Klade *Polygala* s. str. ist das Bild weniger eindeutig. Es stimmt zwar, dass die abgeleiteteren Arten in *Polygala* häufig eine krautige Lebensform aufweisen, dennoch zeigt die basale Position einjähriger Kräuter (z. B. *Polygala erioptera*) innerhalb einer Subklade abgeleiteter, strauchiger bzw. baumförmiger Arten (u. a. die auch in dieser Arbeit untersuchte *P. myrtifolia*), dass krautige Formen nicht zwingend die phylogenetisch „progressivsten“ Formen in dieser Gattung stellen (vgl. Fig. 3).

I.5 Generative Verbreitungsmechanismen in den Polygalaceae

Die Ausbreitungsstrategien der Polygalaceae sind äußerst mannigfaltig. Beeren mit saftig-fleischigem (*Xanthophyllum*, *Carpolobia*, *Atroxima*) oder ledrigem (*Balgoya*, *Diclidanthera*, *Eriandra*) bzw. trockenem (*Moutabea*) Mesokarp sowie Steinfrüchte (*Monnina*, *Muraltia* subg. *Psiloclada*) sind typisch für zoochore Verbreitung. Trockene, runde (*Ancylotropsis*, *Pteromonnina*) oder ahornähnlich (*Securidaca*) geformte Schließfrüchte mit ausgeprägter Samara (eine flächige Ausweitung des Fruchtwand) charakteristisch für die Verbreitung über die Luft (*Anemochorie*). Daneben existieren häufig trockene (*Polygala*, *Muraltia*, *Comesperma*, *Salomonina*) oder fleischige Kapseln (*Epirixanthes*, *Salomonina*, *Bredemayera*) deren Samen Samenanhängsel (*Elaiosomen*) in Form eines Auswuchses der Samenschale oder der Samenbasis (*Chalaza*) besitzen [man spricht bei den Elaiosomen je nach Bildungsort von einer *Caruncula* (Samenschale) oder *Strophiole*

(Chalaza)], was i. d. R. auf eine zoochore Ausbreitungsstrategie hinweist (Leins & Erbar 2000). Die Ausbildung von carunculären und chalazalen Elaiosomen an den zumeist relativ kleinen Samen vieler Arten des Tribus Polygaleae deutet stark auf eine Verschleppung durch Ameisen hin (*Myrmecochorie*). Hierbei werden die Ameisen durch die nahrhaften Samenanhängsel angelockt und tragen diese in ihren Bau. Dies wurde für *Polygala vulgaris* eingehend dokumentiert, bei der z. B. schwarze Wegameisen (*Lasius niger*) und die Gemeine Rasenameise (*Tetramorium caespitosum*) wichtige Vektoren der Samenverbreitung sind (Lack & Kay 1987, Oostermeijer 1989). Forest et al. (2007) liefern in einer großangelegten Studie überzeugende Belege für die Annahme, dass die carunculären und chalazalen Elaiosomen in den Polygalacea in ihrer Funktion ursächlich nicht als Fraßköder für Ameisen evolvierten und auch keine zeitliche Korrelation zwischen der signifikant ansteigenden Diversifizierung des artenreichsten Tribus Polygaleae (an der Grenze von Paläozän und Eozän bzw. im unteren Eozän) und dem Diversifizierungsanstieg in den Hauptlinien der Ameisen (beginnend in der ausgehenden Kreidezeit) vorliegt. Nur für eine einzige, allerdings sehr artenreiche Subklade innerhalb der Polygaleae (umfasst u. a. *Polygala* s. str., *Polygaloides chamaebuxus*, sowie die vermutlich sekundär nicht-myrmecochore *Salomonina* spp. und damit die meisten der hier untersuchten Arten) wurde eine zeitliche Korrelation zwischen Anstieg der Artenzahl und dem verstärkten Auftreten von Ameisen im Fossilbefund gegen Ende des mittleren Eozäns (ca. 40,9 mya) nachgewiesen. Hier also könnte tatsächlich ein Zusammenhang zwischen Diversifizierungsschub innerhalb der Klade und der Spezialisierung auf eine Samenverbreitung über Ameisen vermutet werden. Allerdings bezweifeln die Autoren auch in diesem Falle die Alternativlosigkeit dieses Erklärungsmusters. Stattdessen betonen sie zwar die zentrale Bedeutung der Elaiosomen für die Speziation in der Familie, speziell des Tribus Polygalae, sehen die funktionelle Triebfeder für diesen Diversifizierungsschub allerdings nicht in der Myrmecochorie allein. Vielmehr spricht die zeitliche Korrelation des Auftretens der carunculären Elaiosomen in der Stammlinie der Polygaleae (54 - 50,5 mya) mit den global drastisch steigenden Temperaturen im Paläozän/Eozän-Übergang stark für deren ursächliche Funktion im Wasserhaushalt des Samens (Speicherung, Hydrierung) oder Dormanz - eine Vermutung, die bereits bei Chodat anklingt, wenn er eine Funktion des Samenanhängsels in der erleichterten Keimung sieht (Chodat 1891 - 1893, 1896). Diese keimphysiologische Interpretation des Elaiosoms erscheint speziell vor dem Hintergrund einer sich schnell ändernden, zunehmend wärmeren und trockeneren Umwelt als deutlicher Selektionsvorteil und wäre demnach erst später durch die ökologische Funktion in der Samenverbreitung ergänzt bzw. ersetzt worden (Forest et al. 2007).

II Mykorrhiza - eine Einführung

II.1 Ektomykorrhiza (ECM)

Die Erkenntnis, dass nahezu alle Landpflanzen (Wang & Qiu 2006, Brundrett 2009) eine morpho- wie physiologisch innige, i. d. R. mutualistische Symbiose mit Vertretern verschiedener Pilzgruppen eingehen, stammt aus der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts. In seiner grundlegenden Arbeit „*Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze*“ untersuchte Frank (1885a) zahlreiche Vertreter heimischer Laub- und Nadelbäume auf deren Vergesellschaftung mit Trüffeln aus der Abteilung der Schlauchpilze (Ascomycota). Er war der Erste, der auf Basis seiner detaillierten morphologischen Befunde dezidiert ausschloss, dass es sich bei den pilzlichen Symbionten um Kommensalen oder gar Parasiten handelt. Vielmehr schlussfolgerte er auf eine mutualistische Beziehung zwischen Wirtspflanze und Pilzorganismus, in der der Pilz die Versorgung der Pflanze mit Nährstoffen und Wasser übernimmt und hierfür eine symbiotische Gegenleistung von der Wirtspflanze erhält, welche Frank selbst noch nicht experimentell nachwies (er vermutete aber bereits, dass der Pilz assimilierte, kohlenstoffhaltige „Nahrungsstoffe“ vom Pflanzenwirt bekommt), von der wir heute aber wissen, dass es sich hierbei tatsächlich vornehmlich um Assimilate handelt (Frank 1888, Smith & Read 2008). Zahlreiche morphologische und physiologische Arbeiten haben seither in weiten Teilen Franks Interpretation der Symbiose bestätigt (Smith & Read 2008). Für Frank resultierte die Verschmelzung von pflanzlicher Wurzel und pilzlichem Myzel in einer Lebensgemeinschaft, die vergleichbar den Flechten, weder Pflanze noch Pilz, sondern eine ganz neue morphologische und physiologische Einheit darstellt, die er abgeleitet vom griechischem „mýkēs“ für „Pilz“ und „rhiza“ für „Wurzel“ als *Mycorrhiza* (Pilz-Wurzel) bezeichnete. Dieser Mykorrhizatypus wurde von Frank in einem seiner späteren Artikel als *ektotrophische* Form der Symbiose bezeichnet (Frank 1887) und ist durch die Ausbildung eines dichten Hyphenmantels um die charakteristisch in ihrem Längenwachstum gehemmten Seitenwurzeln gekennzeichnet. Je nach Wirtsart können Hyphen der innersten Mantelschicht zwischen die Zellen der Rhizodermis (Angiospermen) oder auch tiefer zwischen den Zellen des Cortexparenchym (Pinaceae) wachsen, um dort ein dichtes Netzwerk extrem dünnwandiger, eng den Wirtszellwänden anliegender Hyphen auszubilden. Zwischen den Hyphen dieser nach seinem Erstbeschreiber Hartig (1840) als *Hartigsches Netz* bezeichneten Struktur und den Wirtszellen findet der Stoffaustausch zwischen den beiden Organismen statt (vgl. S. 22 Fig. 5). Heute bezeichnen wir diese Form der Mykorrhiza als *Ektomykorrhiza* (ECM, Peyronel 1969). Die Ektomykorrhiza ist die typische Mykorrhiza der Gehölze in den kühlgemäßigten Breiten der Nord-

und Südhalbkugel, zumeist Laub- und Nadelbäumen, wie in hiesigen Breiten der Buche (Fagaceae), Birke oder Haselnuss (Betulaceae) bzw. Vertreter aus der Familie der Kiefern- und Zypressengewächse (Pinales; Pinaceae, wenige Cupressaceae). Auf der Südhalbkugel findet man die ECM in der Gattung Eucalyptus (Myrtales, Myrtaceae) und in den Scheinbuchen (Fagales, Nothofagaceae) (Smith & Read 2008). Genauere Untersuchungen in der zentraltropischen Vegetationszone, lassen allerdings darauf schließen, dass auch in der Gehölzflora dieser Region die Ektomykorrhiza deutlich häufiger vorkommt als bisher angenommen. Prominente Vertreter tropischer ECM Wirtspflanzen sind z. B. die Dipterocarpaceae, die Sarcolaenaceae sowie Asteropeiaceae (Ducousso et al. 2004, 2008) und die Caesalpenioideae in den Fabaceae (Taylor & Alexander 2005). Die pilzlichen Träger der Symbiose gehören mehrheitlich zur Abteilung der Ständerpilze (Basidiomycota) oder, seltener, der Schlauchpilze (Ascomycota), in einem Fall treten auch Vertreter der Gattung *Endogone* (Mucoromycotina) in eine ECM mit Kiefern der Art *Pinus contorta* ein (Walker 1985, Smith & Read 2008). Physiologisch werden durch die Ektomykorrhiza die Aufnahme von mineralischen Nährelementen, vor allem Stickstoffverbindungen und Phosphat verbessert. Beide Verbindungen können sowohl aus anorganischen (preferenziell Ammonium, aber auch Nitrat) wie auch organischen Quellen (Aminosäuren, Proteine) mobilisiert werden (z.B. Melin & Nilson 1953, Norkrans 1950, Lundeberg 1970, Müller et al. 2007). Darüber hinaus werden auch weniger immobile, für Pflanzen leichter zugängliche Mineralstoffe, vor allem Kalium, aber auch Magnesium, Calcium und Schwefel sowie Spurenelemente wie Kupfer, Zink, Mangan, Nickel, oder Molybdän (Smith & Read 2008, Ruytinx et al. 2016) in die Wirtspflanze transferiert. Diese signifikante Verbesserung der Nährstoffsituation sowie die mykorrhiza-induzierte Erhöhung der Pathogen- (z. B. Marx 1969, Sinclair & Sylvia 1982; Sylvia & Sinclair 1983), Schwermetall- (Luo et al. 2014), Salz- und Trockenheitsresistenz (Lehto & Zwiazek 2011, Luo et al. 2011, Brunner et al. 2015; Moser et al. 2015) begünstigen im starken Maß das pflanzliche Wachstum und erhöhen die ökologische Fitness (Rosenberg & Bouchard 2015) des pflanzlichen Symbionten (Read et al. 2004). Eine Beobachtung, die im Grundsatz für alle Mykorrhizaformen gültig ist (Smith & Read 2008). Trotz ihrer vergleichsweise geringen Verbreitung in nur 2 % aller Angiospermen (Brundrett 2009) spielt die Ektomykorrhiza aufgrund der großen Individuendichte der meist habitatprägenden Wirtspflanzen eine große ökologische Rolle. Auch legen Studien nahe, dass die ECM für die erleichterte Etablierung von Jungpflanzen in bestehenden Hyphennetzwerken und unter Bedingungen stärkerer Beschattung oder Trockenheit für erhöhte Vitalität der Sämlinge verantwortlich ist (Simard et al. 1997, Bingham & Simard 2011, Nara 2015). Darüber hinaus gewährleistet die ECM auf makroökologischer Ebene die Umverteilung sowie temporäre Fixierung

großer Mengen CO₂ [zwischen 10 - 50 % des von der Wirtspflanze assimilierten Kohlenstoffs können in den Pilzsymbionten transferiert werden; Vogt et al. 1982; Finlay & Söderström 1992; Hobbie 2006, Plett & Martin 2011].

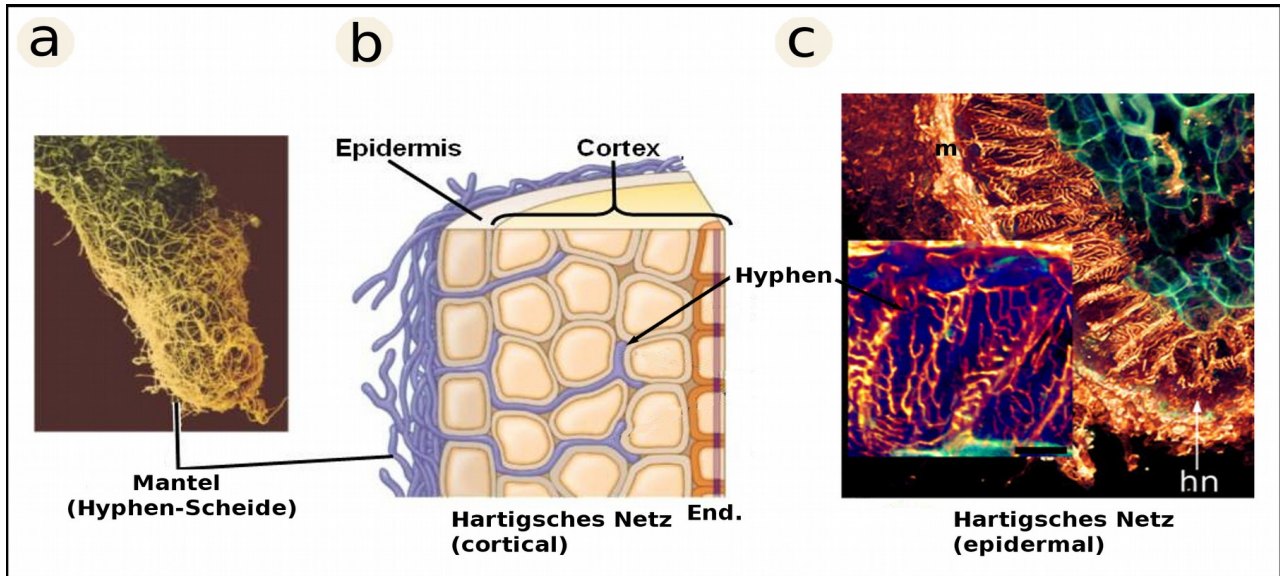


Fig 5: a) ECM-Kurz Wurzel umgeben von dichtem Hyphenmantel (REM-Aufnahme) b) Schema einer corticalen ECM mit Hyphen des Hartigschen Netzes zwischen Epidermis- und Cortexzellen (End. = Endodermis). c) Konfokalmikroskopische Aufnahme einer epidermalen ECM mit dichtem Mantel (m) und Hartigschem Netz (hn) ausschließlich zwischen den Zellen der Epidermis. In der Ausschnittsvergrößerung (ca. 160° nach rechts gedreht) abgeflachte, labyrinthartig verzweigte Hyphen des Hartigschen Netzes zwischen den radial verlängerten Epidermiszellen (blau). Zellen des Cortex und Zentralzylinders türkisfarben (Maßstab = 10 µm). (verändert nach <https://en.wikipedia.org/wiki/Ectomycorrhiza> & Rath et al. 2014)

II.2 Endomykorrhiza

II.2.1 Ericoide Mykorrhiza (ERM)

Bereits Frank (1887) erkannte, dass die ECM nicht die einzige Form der mutualistischen Symbiosen zwischen Pflanzen und Pilzen im Bereich der Wurzeln ist. So stellt er der *ektotrophischen* eine *endotrophische* Form der Mykorrhiza gegenüber (heute *Endomykorrhiza* genannt; Peyronel 1969), die er in mehreren Vertretern der Ericaceae beobachtete und die sich vor allem durch die intrazelluläre Besiedlung der auffällig voluminösen Wurzelzellen mit dichten Hyphenknäueln von der Ektomykorrhiza unterscheidet (vgl. S. 25, Fig. 6b). Bei der besiedelten Wurzelzone handelt es sich stets nur um die Zellen der äußersten Gewebelage, einer anatomisch modifizierten Rhizodermis. Die Etablierung eines für die ECM typischen Hartigschen Netzes unterbleibt nach

dieser klassischen Beschreibung der *ericoiden Mykorrhiza (ERM)* ebenso wie die intrazelluläre, laterale und longitudinale Zell-Zellbesiedlung durch den Pilz, welcher daher von außen jede Rhizodermiszelle gesondert besiedelt. Andere Studien beschreiben allerdings auch Hyphenpassagen zwischen benachbarten Rhizodermiszellen (Bonfante-Fasolo & Gianinazzi-Pearson 1979, Peterson et al. 1980, Perotto et al. 1995, Peterson et al. 2004, Massicotte et al. 2005b; S. 25, Fig. 6b). Weiterhin sind die sehr dünnen Wurzeln vieler Ericaceae (*Haarwurzeln* nach Beijerinck 1940) durch ihre anatomische Reduktion auf wenige, für die Symbiose mit dem Pilz relevanten Gewebe außergewöhnlich angepasst an die mykotrophe Lebensweise (Peterson et al. 2004; Fig. 6a). Innerhalb der Ericaceae wird diese Form der Mykorrhiza von zahlreichen Vertretern der Unterfamilien Ericoideae, Vaccinioideae, Harrimanelloideae, Cassiopoideae und den südhemispherische Styphelioideae (vormals Epacridaceae) ausgebildet und traditionell als eigenständige Form angesehen (Smith & Read 2008). Alternative Einschätzungen der strukturellen Varianz innerhalb der bestehenden Mykorrhiza-Kategorisierung und der großen Ähnlichkeit der rhizodermalen Pilzbesiedlung der ERM mit der ebenfalls von Mitgliedern der Ericaceae (Unterfamilie Arbutoideae) ausgebildeten sog. arbutoiden Mykorrhiza (vgl. Kapitel II.4) lassen eine Einordnung der ericoiden Mykorrhiza in die neue vorgeschlagene Kategorie des Formenkreises „ektomykorrhiza-verwandt“ (*ectorelated*) äußerst plausibel erscheinen (Imhof 2009). Diese Einordnung wird auch durch die Beobachtung „ericoider“ Mykorrhizen mit ausgebildetem Hyphenmantel (*sheathed ericoid mycorrhiza*, nach Vohník et al. 2012) und das Auftreten interzellulärer Strukturen, ähnlich einem Hartigschen Netz gestützt (Massicotte et al. 2005b, Setaro et al. 2006a,b; Vohník et al. 2012, Greuner 2015).

Schon Frank (1887) befand die Hyphenknäuel in den Zellen der Epidermis als zentral für den Nährstofftransfer in der ERM - eine Interpretation, die im Laufe der Zeit über physiologische und strukturelle Untersuchungen Bestätigung fand (Peterson & Massicotte 2004). Hierbei belegen ultrastrukturelle Untersuchungen die Bedeutung vitaler Pilzstrukturen für den Nährstofftransport in die Wirtspflanze (Duddridge & Read 1982b).

Die traditionelle Sicht einer vergleichsweise engen Gruppe pilzlicher Träger der Symbiose, die zumindest auf der Nordhalbkugel sehr oft dem *Rhizoscyphus* (Syn. *Hymenoscyphus*) *ericae* - Aggregat (Ascomycota, Helotiales, Helotiaceae) entstammen (Pearson & Read 1973, Read 1974; Vrålstad et al. 2000, 2002a,b; Hambleton & Sigler 2005, Grelet et al. 2010), hat zu traditionellen Einschätzung der ERM als sehr eigenständiger Mykorrhizaform beigetragen. Seit einiger Zeit mehren sich allerdings Hinweise darauf, dass neben dieser engen systematischen Gruppe auch weitere Ascomyceten aus den Helotiales und den Gattungen *Capronia* und *Oidiodendron* (z. B.

Stoyke et al. 1992, Bougoure et al. 2007) und darüber hinaus auch Basidiomyceten mit Nähe zu den Trechisporales sowie solche aus den Familien Sebacinaceae, Atheliaceae, Thelephoraceae mit großer Wahrscheinlichkeit Symbiosepartner in der ERM sind. Unter diesen befinden sich interessanterweise Arten, die bekannt für die Ausbildung einer Ektomykorrhiza in typischen ECM-Wirten sind oder eine endomykorrhiza-ähnliche Assoziation in einigen Lebermoosen (Jungermanniales) ausbilden. Auch wenn molekularsystematisch und morphologisch die Ausprägung einer ERM und ECM durch dasselbe Pilz-Isolat mittlerweile belegt wurde (Villarreal-Ruiz et al. 2004, 2012), der morphologische Nachweis für die Ausbildung einer Hyphenverbindung zwischen ERM- und ECM-Pflanzen im natürlichen Habitat steht weiterhin aus (z. B. Allen et al. 2003, Villarreal-Ruiz et al. 2004, 2012; Upson et al. 2007, Bourgoure et al. 2007, Selosse et al. 2007, Grelet et al. 2010, Vohník et al. 2012, Bruzone et al. 2015). Sollte dieser in absehbarer Zeit erbracht werden, würde dies unser bisheriges Bild von der Signifikanz gemeinsamer Hyphennetzwerke für den Interspezies-Stoffaustausch zwischen mykorrhizierten Wirtspflanzen nachhaltig erweitern (Cairney & Meharg 2003). Letztlich scheinen auch Pilze (*Phialocephala fortinii* und verwandte Arten) aus der Kategorie der DSEs (*dark septate endophytes*) ericoid-mykorrhiza-ähnliche Strukturen ausbilden zu können (Stoyke et al. 1992, Grelet et al. 2016). Offenbar stammen die Symbiosepartner der ericoiden Mykorrhiza also aus einem deutlich breiteren systematischen Spektrum als ursprünglich angenommen und dies scheint in einigen Fällen einen starken Einfluss auf die strukturelle Ausprägung der Symbiose bzw. die bereits angesprochene morphologische Abweichung von ihrer klassischen Definition auszuüben. So sind die zunehmenden Belege von Ericaceae mit eher untypischer Mykorrhiza-Morphologie bzw. morphologischen Ähnlichkeiten zur ECM (Hyphenmantel, Hartigsches Netz; vgl. Kapitel II.1) vermutlich auch über den Einfluss des Pilzgenoms erklärbar (Massicotte et al. 2005b, Vohník et al. 2012).

Es handelt sich bei den Wirtspflanzen der ericoiden Mykorrhiza um eine sehr spezialisierte, ausgesprochen mykotrophe Gruppe. Die ERM scheint eine spezielle Anpassung an saure Rohhumusböden mit geringer bakterieller Aktivität und damit verbunden einer ausgeprägten Armut frei zugänglicher Phosphat- und Stickstoffverbindungen zu sein. Sie schützt den Wirt offenbar ebenfalls effektiv vor den toxischen Effekten erhöhter Schwermetallkonzentrationen im Boden (Cairney & Meharg 2003). Die Symbiose gilt als vergleichsweise jung auf evolutiver Skala (Brundrett 2002) und die assoziierten Pilzgruppen besitzen im Vergleich zu ECM-Pilzen ausgeprägte saprotrophe Eigenschaften, die es den Ericaceae erlauben, ihren Phosphat- und Stickstoffbedarf speziell in diesen für andere Mikroorganismen schwerer besiedelbaren Habitaten zu sichern (Cairney & Burke 1998, Read et al. 2004).

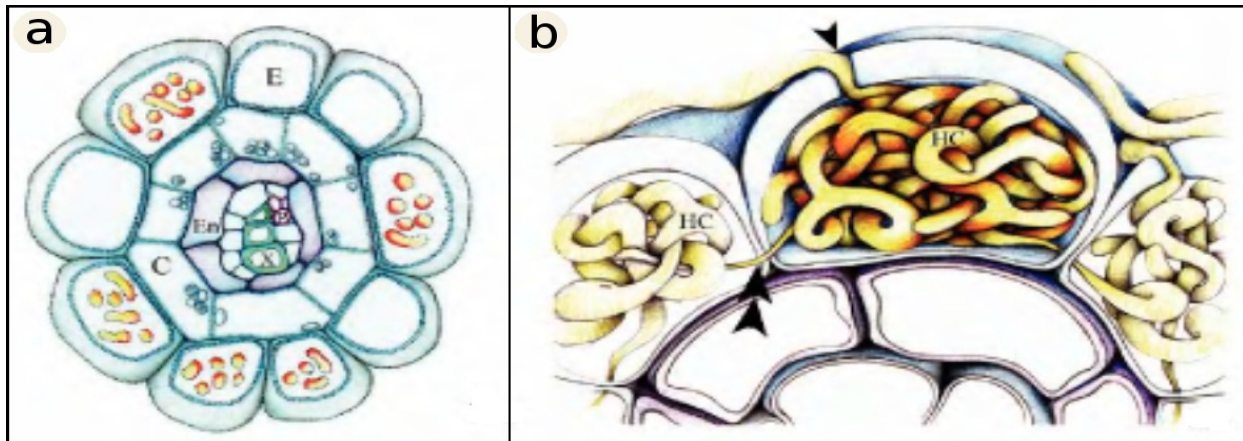


Fig. 6: Querschnitt (schematisch) einer Ericaceen-Haarwurzel. E = vergrößerte Epidermiszellen, C = einzelne Lage des (Rest)cortexparenchmys, En = Endodermis, X = Xylem P = Phloem. b) Ausschnittsvergrößerung (schematisch) der Rhizodermiszellen. Pfeilspitze zeigt den radialen Eintritt einer Außenhyphye in die Rhizodermiszelle und anschließende Ausbildung dichter Hyphenknäuel in der Wirtszelle (HC). Tangentiale Hyphenübertritte zwischen besiedelten Zellen sind ebenfalls möglich (Doppelpfeilspitze). (nach Peterson et al. 2004)

II.2.2 Orchideen-Mykorrhiza (OM)

Die *Orchideen-Mykorrhiza (OM)* erweist sich aufgrund ihrer vergleichsweise einfachen experimentellen Zugänglichkeit [eine Vielzahl der pilzlichen Symbionten lassen sich problemlos in Reinkultur ohne ihre Wirtspflanze halten und erfüllen damit ideal die Kriterien nach Koch's Postulat von Isolation, Kultivierung und Reinokulation mit Reetablierung der Symbiose (Selosse et al. 2010, Waterman et al. 2013)] und der großen Bandbreite unterschiedlichster Abstufungen mykoheterotropher Lebensweise in den Orchidacea als eines der ergiebigsten Modelle für die Physiologie und Evolution der Mykoheterotrophie im Pflanzenreich. Zwangsläufig umfasst dieses Kapitel daher Aspekte, welche im Abschnitt zur Mykoheterotrophie erneut aufgegriffen und vertieft werden. Aufgrund der großen inhaltlichen Schnittmenge zu arbuskulär mykorrhizierten Pflanzen wie den Polygalaceae im Bereich der Evolution von Mykoheterotrophie, erscheint es aber gerechtfertigt die Orchideen und ihre Mykorrhiza detaillierter zu beschreiben.

Die OM zeichnet sich durch intrazelluläre Hyphenknäuel in den Zellen des Cortexparenchyms der Wurzeln, und, was den Begriff Mykorrhiza in seiner ursprünglichen, morphologischen Definition zugegebenermaßen strapaziert, häufig auch in den Rhizomen (sog. *Mycorrhizome*, nach Furman & Trappe 1971) oder gar den Niederblättern der Orchideen aus (Burgeff 1932, Smith & Read 2008; vgl. S. 29, Fig. 7). Aufgrund der weiten geographischen Verbreitung der Orchidaceen, ihrer Abhängigkeit von intakten Lebensräumen und natürlich ihrer extrem großen Artenzahl (mit ca.

26.000 Arten gehören ~ 7 % aller Angiospermen zu den Orchidaceen; APG IV, in: Stevens 2001 onwards), spielt diese Form der Mykorrhiza eine wichtige Rolle innerhalb vieler natürlicher Ökosysteme (Swarts & Dixon 2009, Bastian 2013). Orchidaceae sind die phylogenetisch basalste Klade innerhalb der Asparagales (Chase 2005) und nach bisherigen Erkenntnissen die einzige Gruppe innerhalb der Ordnung ohne Vertreter mit einer arbuskulären Mykorrhiza. Leider existiert eine ausgeprägte phylogenetische Lücke zwischen den Orchidaceae und ihren nächsten Verwandten in den Asparagales (APG IV, in: Stevens 2001 onwards; Ramírez et al. 2007). Dennoch ist sich die Forschung mittlerweile einig, dass in der Stammlinie der Orchidaceae ein einschneidender Symbiontenwechsel von phylogenetisch ursprünglicheren, arbuskulären Mykorrhizapilzen (Glomeromycota) hin zu phylogenetisch moderneren Basidiomyceten bzw. in einigen Fällen auch Ascomyceten vollzogen wurde (z. B. Brundrett 2002, Selosse 2004; Rasmussen & Rasmussen 2009, Yukawa et al. 2009). Die pilzlichen Träger dieser Symbiose sind eine systematisch äußerst heterogene Gruppe. Vor der Entdeckung der entsprechenden generativen Fruchtkörper der Symbionten, fasste man die pilzlichen Symbiosepartner der meisten Orchideen in der Formgattung *Rhizoctonia* DC zusammen (z. B. Bernard 1908 zitiert in Selosse et al. 2011, Hadley 1970, Taylor et al. 2002, Rasmussen 2003, Daernaley 2012). Erst nach der erfolgreichen Induktion des Teleomorphs (d. h. der sexuellen, meiosporenausbildenden Hauptfruchtform) zahlreicher Orchideensymbionten (Warcup & Talbot 1967, 1971, 1980) stellte sich *Rhizoctonia* als polyphyletische Gruppe heraus. Dieser Befund wurde in den letzten Jahren durch zahlreiche molekularsystematische Analysen untermauert (zusammengefasst in Taylor et al. 2002, aktualisiert in Smith & Read 2008 und Dearnaley et al. 2012). Man fasst unter dem in der Mykorrhizaforschung immer noch häufig genutzten Begriff „*Rhizoctonia*-Gruppe“ (*Rhizoctonias* in der englischsprachigen Fachliteratur), d. h. *Rhizoctonia* s. l., Vertreter der Sebacinaceae (nur *Sebacina*-Gruppe B, *Sebacina*-Gruppe A bildet mit diversen Wirtspflanzen eine ECM), Tulasnellaceae und Ceratobasidiaceae und damit zahlreiche Saprophyten, aber auch einige aggressive Pflanzenpathogene (Rasmussen 2002, Rasmussen & Rasmussen 2007, 2009). Auch aktuelle Studien belegen die überaus weite Verbreitung von Vertretern dieser Gruppe in sehr vielen und vor allem auch phylogenetisch basalen Gruppen autotropher Orchideen hin, so dass mit einiger Sicherheit bei dieser Pilzgruppe von den ursprünglichsten und immer noch bedeutendsten Symbiosepartnern der rezenten Orchideen auszugehen ist (Rasmussen & Rasmussen 2007, Yukawa et al. 2009, Motomura et al. 2010). Neuere Analysen deuten aber auf ein noch weiter zu fassendes Spektrum der Symbiosepartner hin. In grünen wie chlorophylllosen Orchideen aus temperaten Regionen konnten Symbiosepartner identifiziert werden, bei denen es sich nicht um Saprophyten, sondern eindeutig

um ECM-ausbildende Symbionten in benachbarten Bäumen handelt. Diese Gruppe umfasst vereinzelt auch ECM-ausbildende Ascomyceten (*Tuber* spp., diverse ECM-Pezizales), häufiger aber Basidiomyceten u. a. aus den Sebacinaceae (Sebacina A), Russulaceae, Arten der *Telephora-Tomentella*-Gruppe sowie einen der wenigen ECM-ausbildenden Vertreter der Gattung *Ceratobasidium* (z. B. Taylor & Bruns 1997, 1999; Selosse et al. 2002, Bidartondo et al. 2004, Selosse et al. 2004, Girlanda et al. 2006, Otero et al. 2007, Yagame et al. 2008, Bougoure et al. 2009, Ogura-Tsujita et al. 2012). Letztlich findet man speziell in den Tropen neben den auch dort häufig anzutreffenden *Rhizoctonias* weitere saprophytische und parasitäre Streu- und Holzzersetzer als Symbionten, die sich aus diversen Gruppen von Basidiomyceten zusammensetzen (u. a. *Marasmius*, *Resinicium*, *Gymnopus*, *Mycena*, *Armillaria*, *Erythromyces* sowie verschiedenen Coprinaceae z. B. Kusano 1911, Burgeff 1932, Kikuchi et al. 2008, Umata 1995, Yamato et al. 2005, Dearnaley 2006, Martos et al. 2009, Dearnaley & Bougoure 2010, Girlanda et al. 2011). Interessanterweise detektieren empfindliche, molekulare Nachweisverfahren sowohl in den ECM-assoziierten Orchideen einzelne Isolate von *Rhizoctonia* s. l. als auch ECM-Pilze in *Rhizoctonia*-vergesellschafteten Orchidaceen (z.B. Bidartondo et al. 2004, Abadie et al. 2006, Stark et al. 2009). Ein interessanter Befund, der die verbreitete Auffassung eines zweiten, signifikanten Symbiontenwechsels in den Orchideen, nun von *Rhizoctonias* zu ECM-Pilzen, stützt (Brundrett 2002, Selosse et al. 2010) und die Vermutung nahelegt, dass dieser Vorgang auch in rezenten Arten ein weiterhin sehr realistisches Szenario darstellt (Dearnaley et al. 2012, 2016). Ähnlich, aber auf ontogenetischer Ebene, gibt es Hinweise auf einen Symbiontenwechsel innerhalb der Individualentwicklung einiger Orchideen aus den Gattungen *Gastrodia*, *Goodyera* und *Erythrorchis* (Dearnaley et al. 2007). Für eine umfassendere Darstellung an der Symbiose mit Orchideen beteiligter Pilzgruppen siehe Dearnaley et al. (2012, 2016).

Auch in der Orchideen-Mykorrhiza werden die intrazellulären Hyphenknäuel als Schnittstelle für den Stoffaustausch zwischen den Symbionten betrachtet (z.B. Frank 1887, Burgeff 1909, Peterson & Massicotte 2004, Dearnaley et al. 2016). Je nach Wirtsart kann das Besiedlungsmuster in den Wurzeln und Rhizomen diffus oder durch eine komplexe Zonierung des Pilzes in äußere, spezialisierte Zelle für den Hypheneintritt (sog. „*Passagezellen*“, anatomisch handelt es sich um Kurzzellen der Exodermis; Janse 1897, Esnault et al. 1994) eine periphere „*Pilzwirtsschicht*“ (Hyphen verbleiben längerfristig vital) und zumeist weiter innen und manchmal (*Neottia nidus-avis*) auch zusätzlich außerhalb der Wirtsschicht gelegenen „*Pilzverdauungsschichten*“ mit spezialisierten „*Verdauungszellen*“ (Hyphen denaturieren zügig) gekennzeichnet sein (Magnus 1900, Kusano 1911). Spätere Autoren greifen diese Bezeichnungen auf, nutzen diese Terminologie

auch für andere Formen der Endomykorrhiza oder betonen zumindest die Existenz intensiver Hyphendegeneration in distinkten Bereichen des Cortexparenchyms (Penzig 1901, Marcuse 1902, Burgeff 1909, 1932; Van der Pijl 1934, Fuchs & Ziegenspeck 1924, Burges 1939, Wang et al. 1997, Rasmussen & Rasmussen 2009, Imhof et al. 2013). Viele dieser frühen Studien wie auch nachfolgende Autoren belegen darüber hinaus feinstrukturelle Unterschiede in der Zellanatomie [z. B. das (transiente) Fehlen von Stärke und Hypertrophie der Zellkerne und des Nukleolus in den vital besiedelten Wirtszellen] und der Struktur der Hyphenknäuel beider Zelllagen (Magnus 1900, Marcuse 1902, Burgeff 1909, 1932; Rasmussen 1990, Uetake et al. 1992, Wright et al. 2005). Burgeff (1932, 1943) unterscheidet darüber hinaus noch zwischen zwei unterschiedlichen Formen pilzlicher Degeneration in den Wirtszellen. So beschreibt er zum einen den Abbau von Hyphenknäueln, welche bei diesem Prozess amorph verklumpen (S. 29, Fig. 7) und zum anderen eine Variante, in der, ausgehend von peripheren Hyphenknäueln, einzelne Hyphen in die Zellen des inneren Cortexparenchyms eindringen, sich an ihrer Spitze öffnen und dann ihren Zellinhalt in die Wirtszelle ergießen (elektronenmikroskopische Untersuchungen lassen aber zumindest für die Orchideen Zweifel an einem regelrechten Austritt von pilzlichem Zellinhalt in das Wirtszellcytoplasma aufkommen; vgl. Wang et al. 1997 in Rasmussen 2002). In beiden Fällen wird ein starker Einfluss der Wirtszelle, ein lytischer Prozess, als Ursache für die hyphale Degeneration vermutet und ein (Nähr-)Stofftransfer in die Wirtszelle impliziert (Magnus 1900, Kusano 1911, Burgeff 1909, 1932; Fuchs & Ziegenspeck 1924, Lewis 1973, Peterson et al. 1996, Wang et al. 1997, Bidartondo 2005, Taylor 2004, Rasmussen & Wigham 2002, Rasmussen & Rasmussen 2009, 2015). Diese ernährungsphysiologische Interpretation der degenerierenden Pilzstrukturen wird bereits relativ frühzeitig in der Mykorrhizaforschung greifbar, wenn Forscher wie Frank (1891) von „pilzfressenden“ Pflanzen sprechen oder Bernard den Begriff „*Phagocytosis*“ wählt (z.B. Bernard 19011 zitiert in Selse et al. 2011). Ein „Verdau“ der Hyphen durch den Orchideenwirt als primärer Weg zur Stoffakquirierung wurde allerdings wiederholt in Frage gestellt und der Abbau der pilzlichen Biomasse auch als Teil einer dosierten, wirtsinduzierten Pathogenabwehr und damit Kontrolle über den „aggressiven“ pilzlichen Symbionten verstanden (z. B. Bernard 1911 zitiert in Selse et al. 2011; Burges 1939, Hadley & Williamson 1971, Beyrle et al. 1995). Gestützt wurde diese Vorstellung durch die Beobachtung eines symbioseinduzierten Wachstumsschubes in jungen Orchideenpflanzen, zeitlich vor eintretender Lysis der Hyphenknäuel (Hadley & Williamson 1971). Neuere Verfahren, wie z. B. die hochauflösende Isotopen-Massenspektroskopie, haben allerdings die ursprüngliche Interpretation des Verdau der pilzliche Biomasse als ein Weg der Stofftransfers in Richtung des Pflanzenwirts zumindest für die Orchideen rehabilitiert (Wang et al. 1997, Bougoure

et al. 2014, Kuga et al. 2014). Dies ist im Übrigen ein wichtiger Unterschied zur ebenfalls intrazellulären ericoiden Endomykorrhiza, in der nur vitale Hyphen an dem Stoffaustausch beteiligt zu sein scheinen (Duddridge & Read 1982b). Daher ist es wenig erstaunlich, dass offenbar auch in der OM Transferprozesse über die Cytoplasmamembranen des Pilzes und der Wirtspflanze entlang der physiologisch intakten symbiotischen Schnittstelle zwischen den intrazellulären Hyphen und der Wirtszelle von einer gewissen Bedeutung für den Kohlenstoff- und Stickstofftransfer in die Zellen der Pflanze sind (Kuga et al. 2014, Dearnaley et al. 2016). Auch hier weiß man bisher wenig über die physiologischen Abläufe während des Transfers.

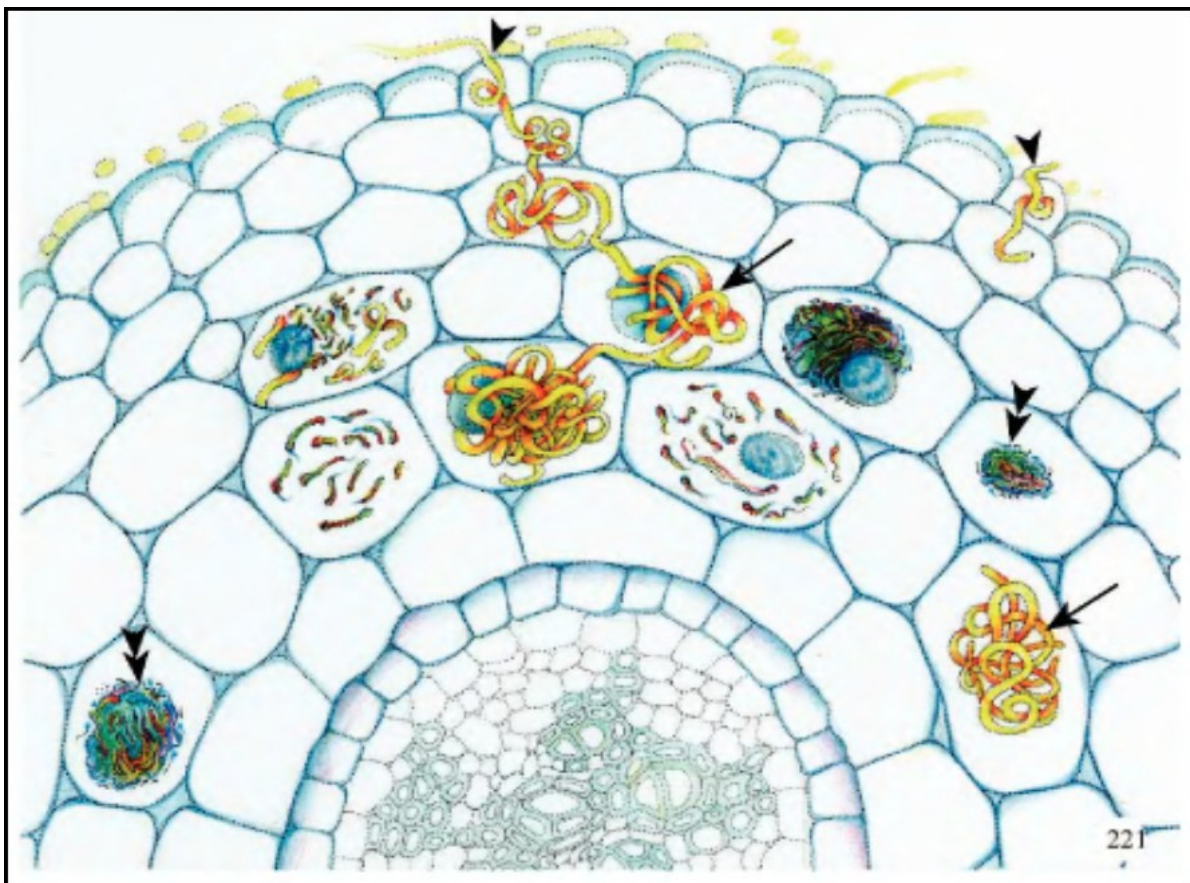


Fig. 7: Mykorrhizastrukturen in den Wurzeln einer Orchidee. Nach Penetration der Rhizodermis durch die Außenhyphen (Pfeilspitze) wachsen die Hyphen von Zelle zu Zelle ins Innere des Cortexparenchym und bilden dabei dichte Hyphenknäuel, welche in den tieferen Lagen des Cortexparenchym zu amorphen Klumpen degenerieren („Verdau“). (nach Peterson et al. 2004)

Alle Orchideen gelten als im besonderen Maße abhängig von ihrer Mykorrhiza, denn ohne eine sehr frühzeitige Besiedlung der winzigen, nahezu endospermlosen Samen durch den Pilz unterbleibt deren Keimung und Weiterentwicklung zum ontogenetischen Stadium des sog. Vorkeims oder

Protocorms (vgl. Fig. 8; Bernard 1899, Arditti 1967). Bis zur Ausbildung erster Photosyntheseorgane existiert die junge Pflanze daher in vollständiger Abhängigkeit vom Pilzsymbionten für ihre Versorgung mit Kohlenhydraten, aber vermutlich auch Stickstoff und mineralischen Nährelementen (Arditti 1980, Manning & Staden 1987, Fochi et al. 2017).

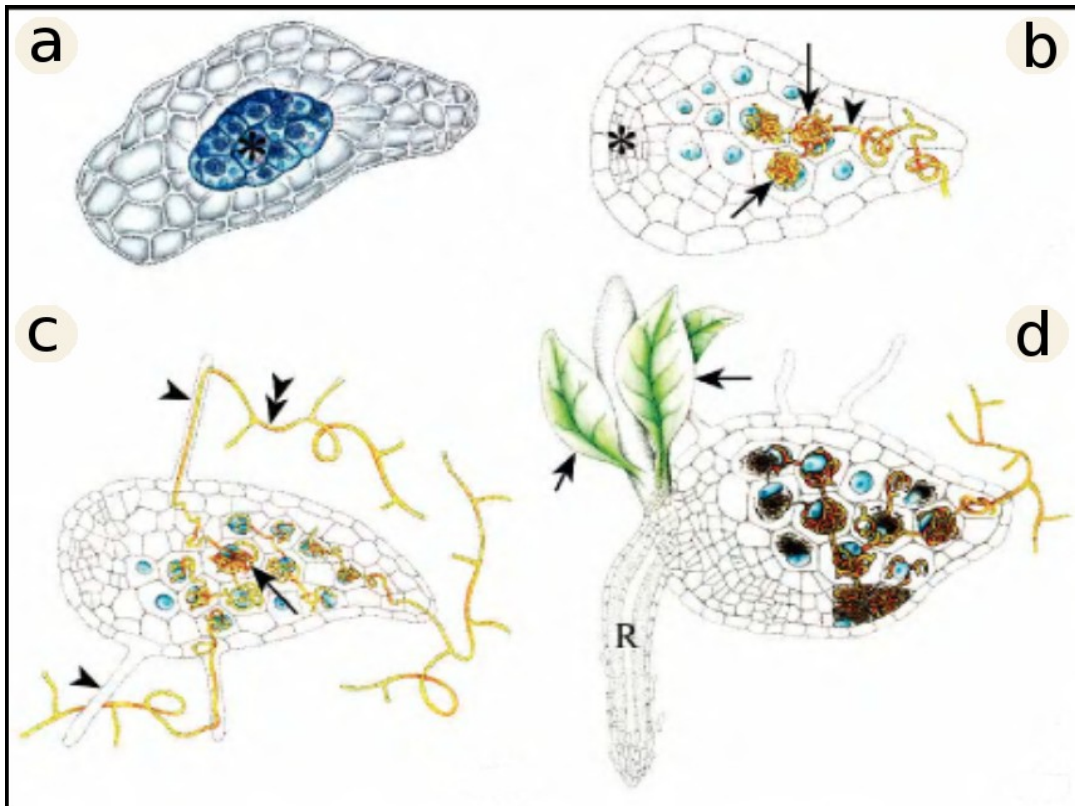


Fig. 8: Stadien der initialen Mykoheterotrophie in den Orchideen. a) Staubkorn mit extrem reduziertem Embryo (Stern) vor Besiedlung durch Pilzsymbionten. b) Junges Protocorm besiedelt mit dichten Hyphenknäueln (Pfeil). Der Pilz wächst über die Zellen des Suspensors in den Embryo ein. Stern = Meristem des jungen Keimlings. c) Alternative Besiedlung des Protocorms über Trichome (Pfeilspitze). Doppelpfeilspitze = Außenhyphen. Pfeil = vitale Hyphenknäuel. d) Älteres Protocorm, dicht besiedelt mit Hyphenknäueln (vital und degeneriert). Die Bildung grüner Blätter und der ersten Wurzel (R) kennzeichnet den Übergang vom mykoheterotropen zum autotropen Ontogeniestadium des Keimlings. (nach Peterson et al. 2004)

Doch selbst für das Adultstadium autotropher Orchideen fehlte lange der Nachweis einer mutualistischen Kompensation des Pilzes von seiten des Pflanzenwirtes (Hadley & Purves 1975, Alexander & Hadley 1985, Rasmussen & Rasmussen 2007, 2009; Dearnaley et al. 2012). Auf Basis dieser Datenlage und nicht zuletzt aufgrund der potentiell instabilen Natur der Symbiose, welche nicht selten in der Abtötung eines der beiden „Partner“ endet (Hadley 1970), fiel es lange Zeit schwer, die Orchideen-Mykorrhiza als echten Mutualismus zu betrachten. Eher wurde von einem

necrotrophen Parasitismus des Pflanzen„wirts“ an seinem pilzlichen Symbionten gesprochen (Lewis 1973) oder gar gewisse Ähnlichkeiten zu einer Räuber-Beute-Beziehung („*mycophagy*“) angeführt (Rasmussen & Rasmussen 2007, 2009). Erst in den letzten Jahren mehrten sich die Belege für einen bidirektionalen Stofffluss auch in der Orchideen-Mykorrhiza. So kann mittlerweile als gesichert gelten, dass in den Adultstadien grüner, autotropher Orchideen der pilzliche Symbiont im Austausch für Phosphat und Stickstoff von der Wirtspflanze signifikante Mengen Kohlenhydrate erhält (Cameron et al. 2006, 2008; Látalová & Baláž 2010, Liebel et al. 2010, Fochi et al. 2017, Dearnaley & Cameron 2017) und dieser damit eventuell seine „Kohlenstoffschuld“ aus der Keimphase „zurückzahlt“ [*delayed carbon pay back; take now - pay later* (vgl. Bidartondo 2005, Cameron et al. 2006, Leake et al. 2008, Field et al. 2015b)]. Diese Sicht wird auch durch Studien gestützt, die *Rhizoctonia*-assoziierte Orchideen stark eingenistet in die pilzlichen Netzwerke finden, ein Befund, der eher für eine mutualistische denn antagonistische Interaktion in diesen Gruppen spricht (Jacquemyn et al. 2010, Martos et al. 2012, Dealarney et al. 2016). Inwiefern ein reziproker und damit mutualistischer Stofftransfer in autotrophen Orchideen unter natürlichen Bedingungen in signifikanter Menge stattfindet, bleibt allerdings immer noch unklar. So argumentieren Rasmussen & Rasmussen (2009) auf der Basis physiologischer Studien (Beyrle & Smith 1993, Beyrle 1995), dass bei Vorhandensein ausreichender organischer Substrate (Holz, Laub etc.) der Pilz auch während der photosynthetischen Lebensphase der Wirtspflanzen weiterhin einseitig als C-Quelle von der Pflanzen ausgenutzt wird. Endgültig klären können wird man die Fragestellung nach dem mutualistischen Charakter der OM allerdings erst, wenn Methoden gefunden werden, auch in Pilzen den Parameter Fitness eindeutig zu bestimmen (vgl. Pringle & Taylor 2002 für einen Einblick in die Problematik) und dadurch nachvollziehbar wird, auf welcher Ebene der Pilz durch die Orchidee unter Umständen in Mitleidenschaft gezogen werden kann (vgl. Kapitel IX.4). Auch wenn also die Frage der mutualistischen Reziprozität des Kohlenstoff- (und Stickstoff-)flusses in adulten, chlorophyllhaltigen Orchideen per se nicht endgültig geklärt ist, so kann zumindest für eine stetig wachsende Zahl Orchideen ein dauerhafter Netto-Transfer von pilzstämmigem Kohlenstoff (und Stickstoff) auch in den photosynthetisch aktiven Adultstadien der Pflanzenwirte als gesichert gelten (Selosse & Roy 2009). Diese Gruppe partiell mykoheterotropher Arten betreibt zwar als Adultpflanze in unterschiedlichem Ausmaß Photosynthese, nutzt daneben aber den Pilz für die heterotrophe Akquirierung eines häufig beträchtlichen Teils ihres Kohlenstoff- und Stickstoffbedarfs (z. B. Gebauer & Meyer 2003, Dearnaley et al. 2012). Mehr noch, solche Arten wie z. B. *Corallorhiza trifida* (Korallenwurz) und *Limodorum abortivum* (Violetter Dingel) können bereits einen so deutlich verringerten Chlorophyllgehalt und eine signifikante Reduktion der Blatt-

und Sprossorgane aufweisen, dass sie äußerlich bereits sehr stark den mykoheterotrophen Orchideen ähneln (Zimmer et al. 2008, Girlanda et al. 2011). Mit der vergleichsweise große, chlorophyllhaltige Blätter ausbildenden heimischen *Cephalanthera damasonium* (Weißes Waldvöglein) und der auch entlang der Wegränder am Fachbereich Biologie häufig auftretenden *Epipactis helleborine* (Breitblättriger Stendelwurz), wurden darüber hinaus Pflanzen nachgewiesen, welche unter voranschreitender künstlicher Beschattung oder bei Reduktion der Photosynthesepigmente [d. h. starker Blattpanaschierung bis hin zu chlorophylllosen „Albinvarianten“] fähig sind, die mykoheterotroph generierte Kohlenstoffmenge zu erhöhen und somit flexibel an die verringerte Photosyntheseausbeute in ihren Habitaten anzupassen (Julou et al. 2005, Preiss et al. 2010, Stöckel et al. 2011). Solche, zumeist an schattige Waldhabitats angepasste Orchideen erhalten also über ihre gesamte Individualentwicklung hinweg genügend Kohlenstoff zur Deckung eines nicht unerheblichen Anteils ihres katabolischen und anabolischen Bedarfs (in *C. damasonium* konnte dies bis zu 85 % des insgesamt von der Pflanze akquirierten Kohlenstoffs ausmachen; Gebauer & Meyer 2003) - eine Anpassung, die zumindest für *E. helleborine* vornehmlich der Unterstützung der unterirdischen Kormus (Wurzeln und Rhizome bzw. Knollen) und der Überdauerung dormanter Phasen bzw. der Sproßinduktion zu Beginn der Vegetationsperiode zu dienen scheint, während die Photosynthese den oberirdischen Spross während der Entwicklung der generativen Organe mit Kohlenstoff versorgt (Gonneau et al. 2014). Zuerst wurde diese ökophysiologische Kategorie in der vergleichsweise kleinen Gruppe solcher Orchideen nachgewiesen, welche sehr spezifisch mit Gruppen ektomykorrhiza-ausbildender Pilze eine tripartide Symbiose eingehen und damit der autotrophe ECM-Wirt die ultimative Quelle des Kohlenstoffs darstellt (z. B. Bidartondo et al. 2004, Julou et al. 2005, Zimmer et al. 2007, Liebel et al. 2010, Yagame et al. 2012). Ein Befund, der die Annahme nahelegt, dass diese Art der physiologischen Verknüpfung offenbar ein höheres Potential für die dauerhafte Kohlenstoff- (und Stickstoff-) Versorgung adulter Orchideen besitzt als die Symbiose mit „typischen“ *Rhizoctonias*, zumindest für die Orchideen in den temperaten Regionen (Taylor et al. 2002, Rasmussen 2002, Martos et al. 2009). Der Symbiontenwechsel von saprophytischen *Rhizoctonias* zu ECM-Pilzen könnte daher die Evolution solcher Lebensformen gefördert haben (Selosse et al. 2004, Bidartondo 2005) und wird aus diesem Grund für die Unterfamilie Neottieae (mit den partiell MHP-Gattungen *Epipactis*, *Cephalanthera*, *Limudurum*) als Präadaption für die Besiedlung schattiger Lebensräume betrachtet (Taylor & Bruns 1997, Abadie et al. 2006). Neuere Studien belegen allerdings, dass eine derartige „mixotrophe“ Ernährungsform auch in *Rhizoctonia*-assoziierten Orchideen existiert (Liebel et al. 2010, Girlanda et al. 2011, Sommer et al. 2012) und aufgrund der im Vergleich zu den

ECM-assoziierten, partiell mykoheterotrophen Pflanzen, weniger deutlichen, heterotrophen ^{13}C -Signatur (allerdings weiterhin mit einer auffälligen ^{15}N Signatur) bisher unterschätzt wurde (Stöckel et al. 2014, Selosse & Martos 2014). Diese Annahme konnte erst kürzlich durch ein modifiziertes Verfahren der isotonenbasierten Identifizierung der mykoheterotrophen C-Akquirierung bestätigt werden (Gebauer et al. 2016, Schweiger et al. 2019; vgl. Kapitel IIX.4 & IIX.4.1).

Als extremste Stufe der physiologischen Abhängigkeit vom pilzlichen Symbiosepartner haben sich in den Orchidaceae so zahlreich wie in keiner anderen Pflanzengruppe chlorophylllose, mykoheterotrophe Arten entwickelt. Diese Arten sind wiederum besonders zahlreich unter den ECM-assoziierten Gruppen (s. o.) und häufig äußerst spezifisch bezüglich ihres Pilzsymbionten (z.B. Gebauer & Meyer 2003, Dearnaley et al. 2012, Merckx 2013). Nach heutigen Erkenntnissen weniger zahlreich sind chlorophylllose Arten, die mit Nicht-*Rhizoctonia*-Saprophyten vergesellschaftet sind (Martos et al. 2009). Diese Arten findet man ausschließlich in tropischen Regionen, ein Befund, welcher dahingehend gedeutet wird, dass nur in dem warm-humiden Klima der Tropen eine ausreichend hohe Stoffwechselaktivität der saprophytischen bzw. parasitären Pilze den Kohlenstoffbedarf mykoheterotropher Pflanzen gewährleisten kann (Dearnaley et al. 2012).

II.2.3 Arbuskuläre Mykorrhiza (AM)

Eine weitere Form der Endomykorrhiza ist die *arbuskuläre Mykorrhiza (AM)*. Die Erforschung dieser Symbiose rückte erst in den letzten 40 Jahren in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses (Koide & Mosse 2004). Dies korreliert allerdings nicht mit ihrer besonderen ökologischen Bedeutung als die am weitesten verbreitete Form der Mykorrhiza, sowohl auf systematischer als auch auf geographischer Skala (Wang & Qiu 2006, Smith & Read 2008, Brundrett 2009). Aufgrund ihrer besonderen Bedeutung für die vorliegende Arbeit wird im Anschluss an diese allgemeine Einführung genauer auf die arbuskuläre Mykorrhiza eingegangen (vgl. Kapitel III).

II.2.4 Endomykorrhiza-ähnliche Assoziationen

Nicht unerwähnt bleiben sollen die mykorrhiza-ähnlichen Symbiosen der Gametophyten zahlreicher Leber- und Hornmoose (Bryophyta s. l.) sowie der Gefäßsporenpflanzen [Pteridophyta s. l., d. h. Bärlapppflanzen (Lycopodiopsida) und Farne (Monilophyta, d. h. Schachtelhalme, Marattiopsida, echte Farne und Gabelblattgewächse)]. Die geringe Anzahl physiologischer Studien erlaubt keine verallgemeinernde Aussage über den mutualistischen Charakter all dieser Symbiosen in den Bryophyten und Pteridophyten, wenngleich dies auf Basis der häufig mykorrhiza-ähnlichen intrazellulären Morphologie (z. B. Read et al. 2000, Schüßler 2000, Russel & Bullman 2005,

Ogura-Tsujita et al. 2013, 2016; Desirò et al. 2013, Pressel et al. 2016) und den wenigen, physiologischen Untersuchungen stark anzunehmen ist (vgl. Duckett et al. 2006b, Humphreys et al. 2010, Field et al. 2012, Field et al. 2015a,b, 2016). Dennoch, um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass in diesen Symbiosen der Gametophyt bzw. in einigen Fällen auch die Axenorgane des Sporophyten (z. B. *Psilotum*, Gabelblattgewächse) vom Pilzsymbionten besiedelt werden, wurde für diese Symbiosen die Begrifflichkeit *Mykothallus* bzw. *Mykorrhizoid* (Pocock & Duckett 1985, Boullard 1988, Duckett et al. 1991), *mykorrhiza-ähnliche Assoziation* (Kottke & Nebel 2005) oder *Paramykorrhiza* eingeführt. Somit werden diese Symbiosen auch sprachlich von den *Eumykorrhizen* in den Wurzeln der Sporophyten von Bärlappen, Farnen und Samenpflanzen klar unterschieden (Strullu-Derrien & Strullu 2007). Darüber hinaus existieren in Einzelfällen auch Bestrebungen eine gesonderte Bezeichnung einzuführen, wie im Falle der foliosen Lebermoose in der Unterklasse Jungermanniidae die *jungermannioiden Mykorrhiza* (Kottke et al. 2003). Smith & Read (2008) befürworten allerdings die Nutzung des neutralen Begriffs *symbiotische Assoziationen* (Read et al. 2000) für all diese unterschiedlichen symbiotischen Verhältnisse, bis umfassendere Untersuchungen in diesem Feld erfolgt sind. Pilzliche Symbionten dieser Assoziationen können in einigen wenigen Fällen Asco- und Basidiomyceten sein, in den allermeisten Fällen findet man aber Vertreter der Glomeromycota (z. B. Duckett & Read 1995, Read et al. 2000, Bidartondo et al. 2003, Duckett et al. 2006b, Ligrone et al. 2007, Field et al. 2015a,b,c; Desirò et al. 2013, Rimington et al. 2015, Pressel et al. 2010, 2016). Letzteres war bis vor einigen Jahren die anerkannte Lehrmeinung. Nach neueren Erkenntnissen handelt es sich bei den symbiotisch assoziierten Pilzen in den Thalli der phylogenetisch ursprünglichsten Vertreter der rezenten Lebermoose *Haplomitrium* und *Treubia* (Haplomitriopsida; Wikström et al. 2009) aber nicht wie lange postuliert um Vertreter der Glomeromycota (Carafa et al. 2003, Duckett et al. 2006a, Ligrone et al. 2007), sondern um Arten aus der Unterabteilung Mucoromycotina (Bidartondo et al. 2011, Field et al. 2015a). Diese pilzliche Symbiontengruppe wurden erst vor wenigen Jahren als eigenständiges Taxon beschrieben (Hibbet et al. 2007) und ist phylogenetisch mindestens genauso alt (Lin et al. 2014) oder sogar älter als die Glomeromycota (James et al. 2006). Daher, und vor dem Hintergrund der basalen Position der Moose (d. h. der Leber-, Laub- und Hornmoose) in der Landpflanzenevolution (Kenrick and Crane 1997, Qiu et al. 1998, 2007, Liu et al. 2014, Cox et al. 2014, Wickett et al. 2014), erscheint es höchst wahrscheinlich, dass neben den Glomeromycota auch diese Pilzgruppe bereits sehr früh an der Ausbildung symbiotischer Assoziationen beteiligt war (Bidartondo et al. 2011, Desirò et al. 2013, Field et al. 2015a, Rimington et al. 2015, 2016, Strullu-Derrien et al. 2016; vgl. Kapitel III.5).

II.3 Ektendomykorrhiza

Neben der „reinen“ Form einer Ektomykorrhiza, welche keine intrazelluläre Besiedlung des pflanzlichen Symbionten umfasst, wurden im Verlauf der Forschung weitere Formen der Mykorrhiza charakterisiert, die neben beiden oder zumindest einem der zentralen Merkmale der Ektomykorrhiza, dem Hyphenmantel und Hartigschen Netz, auch die intrazelluläre Besiedlung von Rhizodermis bzw. Cortexparenchymzellen aufweisen. Hier ist zum einen die *Ektendomykorrhiza* im engeren Sinne zu nennen, die zwar bereits von Melin (1923) als *ectendotrophische Mykorrhiza* morphologisch charakterisiert wurde, allerdings erst durch die Arbeiten von Laiho und Mikola (Laiho & Mikola, 1964, Laiho 1965) genauer beschrieben und in Zusammenhang mit speziellen Pilzsymbionten gestellt wurde (sog. *E-Strain Fungi*). Die wesentlichen Unterschiede zur Ektomykorrhiza sind zum einen das vereinzelte Auftreten intrazellulärer, verzweigter Pilzhyphen in den Zellen der Rhizodermis sowie des Cortexparenchyms und zum anderen ein nur gering ausgeprägter Hyphenmantel (Yu et al. 2001). Die Ektendomykorrhiza wurde bisher nur in der Gattung *Pinus* und *Larix* beobachtet (Laiho & Mikola 1964; Laiho 1965; Scales & Peterson 1991) und nur dann, wenn diese mit einzelnen Arten der Ascomyceten-Gattungen *Wilcoxia*, *Sphaerospora*, *Phialophora* und *Chloridium* besiedelt waren (Mikola 1988, Yu et al. 2001). In älteren Entwicklungsstadien des Pflanzenwirts wird die Ektendomykorrhiza meist durch eine typische Ektomykorrhiza ersetzt und auch über die physiologische und ökologische Relevanz dieser Mykorrhiza für die Wirtspflanzen ist derzeit noch wenig bekannt. Auf Basis erster Untersuchungen wurde geschlussfolgert, dass der Assimilatbedarf der Pilze in der Ektendomykorrhiza geringer als der einer ECM zu sein scheint. Vor diesem Hintergrund wurde die Vermutung geäußert, die Ektendomykorrhiza sei speziell für die initiale Unterstützung von Keimlingen vorteilhaft (Yu et al. 2001, Smith & Read 2008).

II.4 Cavendishioide-, arbutoide- und monotropoide Mykorrhiza

Der eigentlichen Ektendomykorrhiza strukturell sehr ähnlich, allerdings ausgebildet von anderen Wirts-Pilzkombinationen und daher traditionell als eigenständige Formen betrachtet, sind die *cavendishioide-*, *arbutoide-* sowie die *monotropoide Mykorrhiza* (Molina & Trappe 1982, Brundrett 2004, Smith & Read 2008). Man findet diese ausschließlich in diversen Unterfamilien bzw. Triben der Ericaceae, so dass ihr Anteil an den mykorrhizierten Angiospermen vergleichsweise gering ist (Wang & Qiu et al. 2006). Die derzeit noch nicht als eigenständige Mykorrhizaform akzeptierte cavendishioide Mykorrhiza (nach *Cavendishia nobilis*, der ersten Art, in der diese Form detailliert beschrieben wurde; Setaro et al 2006a,b), welche fast ausschließlich in einigen tropischen Vertretern

der ansonsten eine ericoide Mykorrhiza ausbildenden Unterfamilie Vaccinioideae beschrieben wurde, ist gekennzeichnet durch einen mehr oder minder dichten Hyphenmantel und ein Hartigsches Netz, ausgehend von denen die Zellen der Rhizodermis mit dichten Hyphenknäueln besiedelt werden. Sehr ähnlich strukturiert ist die arbutoide Mykorrhiza in der Unterfamilie Arbutuoideae (z. B. *Arbutus unedo*, vgl. Fig. 9) und den aktuell als Tribus unbestimmter intrafamiliärer Stellung betrachteten Pyroleae (Liu et al. 2010, Braukmann & Stefanovic 2012). In beiden Formen verläuft die physiologische Interaktion mit vermutlich ebenfalls hauptsächlich über vitale Hyphenknäuel (vgl. Kapitel II.2.1, ERM) und das Hartigsche Netz.

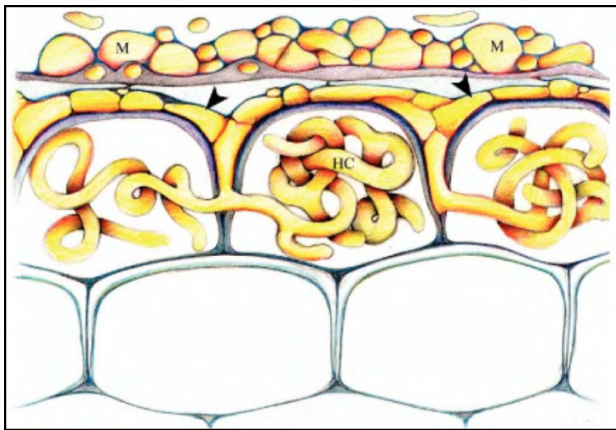


Fig. 9: Merkmale einer arbutoiden Mykorrhiza. M = Hyphenmantel. Hartigsches Netz (Pfeilspitze) und Hyphenknäuel in den Rhizodermiszellen (HC). (nach Peterson et al. 2004)

Auch die monotropoide Mykorrhiza der bis vor wenigen Jahren in der Unterfamilie Monotropoideae zusammengefassten (Kron et al. 2002, Neyland & Merchant 2011), mittlerweile aber als jeweils eigenständiger Tribus betrachteten mykoheterotrophen Monotropaeae und Pterosporeae (Braukmann & Stefanovic 2012), zeichnet sich durch einen dichten Hyphenmantel und ein epidermales Hartigsches Netz aus (Kamienski 1881, 1882; Peterson et al. 2004). Ausgehend von inneren Mantel bzw. Hartigschen Netz werden die Zellen der Rhizodermis durch kurze Hyphen penetriert (sog. *hyphal pegs*; vgl. Peterson & Massicotte 2004, vgl Fig. 10). Die Wandung dieser Hyphen sowie die der anliegenden Wirtszellen löst sich an der Spitze der *pegs* auf, es entsteht eine membranbegrenzte Ausbuchtung in das Wirtszelllumen und Stoffe aus der Hyphe werden auf bisher noch nicht näher verstandene Weise in die Wirtszelle transferiert, ein Prozess, den man wie in der Orchideen-Mykorrhiza als *Ptyophagie* bezeichnet, auch wenn auf ultrastruktureller Ebene deutliche Unterschiede vorliegen. Ein einheimischer Vertreter dieser auffälligen Pflanzengruppe ist der Fichtenspargel (*Hypopitys monotropa*, Syn. *Monotropa hypopitys*). Bei den pilzlichen Symbiosepartnern der arbutoiden und monotropoiden Mykorrhiza handelt es sich mehrheitlich um Basidiomyceten und hier zumeist um bekannte ektomykorrhiza-ausbildende Gruppen wie z. B.

Vertreter der Gattungen *Laccaria*, *Tricholoma*, *Rhizopogon*, *Russula* und *Coenococcum* (vgl. Zimmer et al. 2007, Bidartondo & Bruns 2001, 2002; Smith & Read 2008). In der cavendishioiden Mykorrhiza wurden Arten der Sebaciniales nachgewiesen (Setaro et al. 2006a). Für all diese Mykorrhizaformen, die neben dem Hyphenmantel und dem Hartigschen Netz auch intrazelluläre Hyphen aufweisen, wird eine wichtige Funktion dieser Hyphen für die physiologische Interaktion mit der Wirtspflanze angenommen (Peterson & Massicotte 2004, Smith & Read 2008).

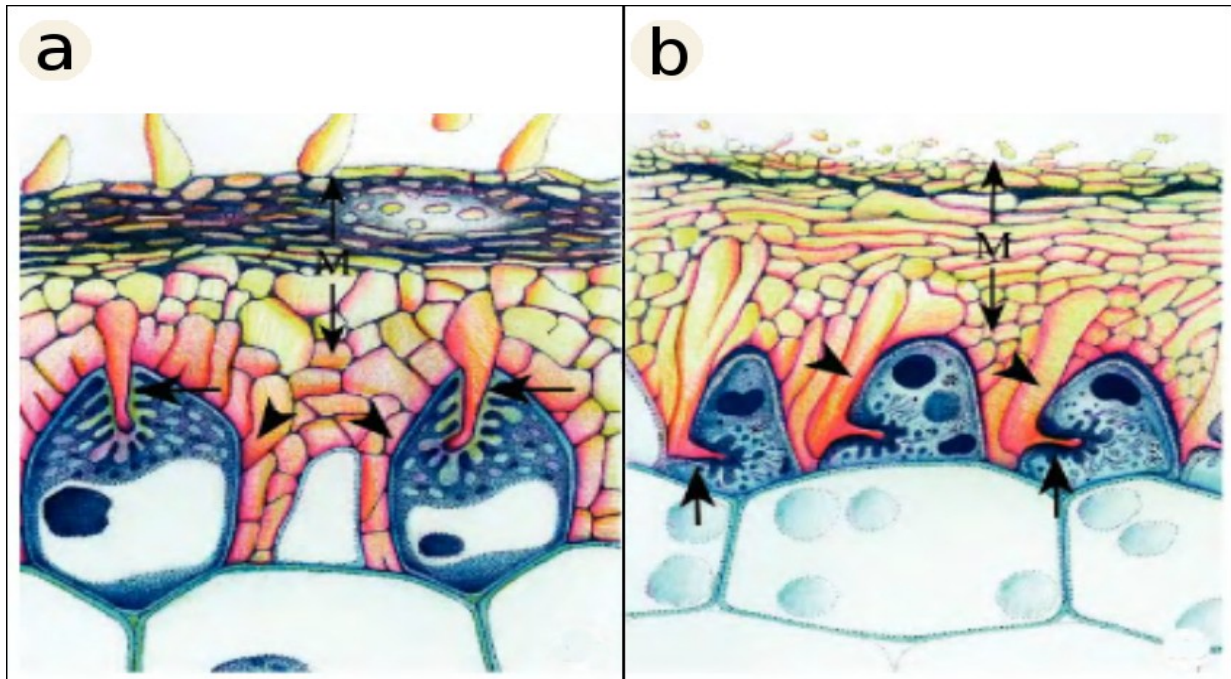


Fig. 10: a) Merkmale der monotropoiden Mykorrhiza von *Hypopitys*. Ausgedehnter Mantel (M) mit ausgeprägter azellulärer Matrix (blauer Bereich im Mantel). Hartigsches Netz zwischen Rhizodermiszellen. Radiales Eindringen der Hyphen (*pegs*) in die Zellen. b) Merkmale einer monotropoiden Mykorrhiza in *Pterospora* spp. Hyphenmantel (M) weniger massiv als in *Hypopitys* und mit reduzierter Matrixschicht. Hyphen des Hartigschen Netzes (Pfeilspitze) dringen tangential in die Zellen der Rhizodermiszellen ein und bilden *pegs* (Pfeile). (nach Peterson et al. 2004)

II.5 Mykorrhiza-ähnliche Assoziationen

In den letzten Jahren verdichteten sich Hinweise auf die besondere Fähigkeit einiger Pilze, endomykorrhiza-ähnliche Strukturen in Kombination mit signifikanten Wachstumssteigerungen in systematisch teils sehr unterschiedlichen Wirtspflanzen auszubilden, darunter auch in solchen Wirtsarten, welche bis dahin als nicht mykorrhizierbar galten (Franken 2012, Varma et al. 2012, Ray & Craven 2016). Prominenteste Beispiele sind die beiden Vertreter in der monophyletischen Sebacina B Gruppe [vormals Sebacinaceae, vor wenigen Jahren neubeschrieben als eigenständige

Familie Serendipitaceae, Weiß et al. 2014] *Serendipita (Piriformospora) indica* und *Serendipita (Sebacina) vermifera* (Verma et al. 1998; Ray & Craven 2016). Allerdings steht die Erforschung der ökophysiologischen Charakteristika und genauen Ursachen der zweifelsohne in vielen Fällen signifikant positiven Effekte auf die Wirtspflanze in vielen dieser Assoziationen noch am Anfang und *S. indica* besitzt darüber hinaus eine ausgeprägte necrotrophe Phase in ihrem symbiotischen Zyklus (Schäfer et al. 2007, Lahrman et al. 2013).

Die von der Formengruppe der dunkel septierten Endophyten (*dark septate endophytes*, DSE, nach Jumpponen & Trappe 1998; hierbei handelt es sich hauptsächlich um Ascomyceten aus der Ordnung Heliales; Wilson et al. 2004) ausgebildeten, vornehmlich intrazellulären Wurzelendosymbiosen können aufgrund der bisher nicht nachgewiesenen vitalen wirtsseitigen Interaktionsschnittstelle und der teils sehr variablen und nicht selten abträglichen physiologischen Auswirkung auf die Wirtspflanze derzeit nicht zweifelsfrei zu den mutualistischen Pflanze/Pilz-Symbiosen gerechnet werden (Mandyam & Jumpponen 2014).

Abschließend zu dieser grundlegenden Darstellung aller derzeit akzeptierten Formen der Mykorrhiza, werden diese mit ihren wesentlichen morphologischen Charakteristika sowie den an ihrer Ausprägung beteiligten Pilz- und Pflanzengruppen in tabellarischer Form dargestellt (vgl. Fig. 11).

Table 1.1 The characteristics of the important mycorrhizal types. The structural characters given relate to the mature state, not the developing or senescent states. Entries in brackets indicate rare conditions.

Kinds of mycorrhiza	Arbuscular mycorrhiza	Ectomycorrhiza	Ectendomycorrhiza	Arbutoid mycorrhiza	Monotropoid mycorrhiza	Ericoid mycorrhiza	Orchid mycorrhiza
Fungi septate	–	+	+	+	+	+	+
aseptate	+	–	–	–	–	–	–
Intracellular colonization	+	–	+	+	+	+	+
Fungal mantle	–	+	+ or –	+ or –	+	–	–
Hartig net	–	+	+	+	+	–	–
Achlorophyllous	– (+)	–	–	–	+	–	+†
Fungal taxa	Glomero	Basidio/Asco (Glomero)	Basidio/Asco	Basidio	Basidio	Asco	Basidio
Plant taxa	Bryo Pterido Gymno Angio	Gymno Angio	Gymno Angio	Ericales	Monotropoideae	Ericales Bryo	Orchidales

† All orchids are achlorophyllous in the early seedling stages. Most orchid species are green as adults. The fungal taxa are abbreviated from Glomeromycota, Ascomycota and Basidiomycota; the plant taxa from Bryophyta, Pteridophyta, Gymnospermae and Angiospermae.

Fig. 11: Das aktuell gebräuchlichste Klassifizierungssystem in der Mykorrhizaforschung mit allen Mykorrhizahaupttypen und Angabe der beteiligten Pilz- und Pflanzengruppen (nach Smith & Read 2008)

III Arbuskuläre Mykorrhiza - ein Überblick

III.1 Einführung AM und grundsätzliche Merkmale der Symbiose

Die arbuskuläre Mykorrhiza konnte für lange Zeit als „Stiefkind“ der Mykorrhizaforschung betrachtet werden (Koide & Mosse 2004). Zwar wurden erste intrazelluläre Strukturen, die aus heutiger Sicht betrachtet mit großer Wahrscheinlichkeit einer AM zuzuordnen sind, bereits früh beschrieben (Nägeli 1842) und in den folgenden Jahrzehnten auch eingehend morphologisch charakterisiert (z. B. Schlicht 1888, 1889; Groom 1895a,b; Marcuse 1902, Gallaud 1905, Lohman 1917, Jones 1924), weiterführende Experimente allerdings sowie die Einsicht in den mutualistischen Charakter der Symbiose blieben bis in die 60er Jahre des 20. Jahrhunderts weitestgehend aus (Koide & Mosse 2004). Gründe hierfür sind vor allem in der bis heute fehlgeschlagenen axenischen Kultivierung der obligat biotrophen Symbionten zu suchen (Gerdemann 1971, Declerck et al. 2005), welche die eindeutige Identifizierung und systematische Zuordnung der Pilze sehr erschwerte und die physiologische Charakterisierung des pilzlichen Symbionten (ohne seinen Wirt) bis heute ausschließt. Auf Basis zahlreicher Arbeiten ab den späten 60er Jahren des 20. Jahrhunderts, welche die i. d. R. positiven physiologischen Effekte dieser Mykorrhizaform auf die Wirtspflanze nachwiesen, entwickelte sich ein immer stärkeres Interesse für diese Form der Endomykorrhiza. Es ist daher nicht verwunderlich, dass mit der Tagung zur Thematik Endomykorrhiza unter Leitung von Sanders, Tinker & Mosse auch der eigentliche Startschuss in der AM-Forschung in diesen zeitlichen Rahmen fällt (Sanders et al. 1975). Von Anfang an von großem Interesse war neben der Systematik der beteiligten Pilze und deren Effekte auf das Wirtswachstum auch die außerordentlich weite Verbreitung dieser Symbiose in der Natur (vgl. Kapitel VII). So belegen neuere Analysen, dass ein Großteil aller Gefäßpflanzen sowie die Mehrheit aller Leber- und Hornmoose eine Mykorrhiza ausbilden, die zumindest eines der drei typischen morphologischen Merkmale der AM, d. h. großlumige, in der Regel un- oder selten septierte Hyphen mit zahlreichen Zellkernen (coenocytische Organisation), inter- oder intraradikale, blasige Auftreibungen der Hyphen, sog. Vesikel (Janse 1897), und letztlich intrazellulär ausgebildete, hochverzweigte Hyphenstrukturen, die sog. Arbuskel (Gallaud 1905) zeigen.

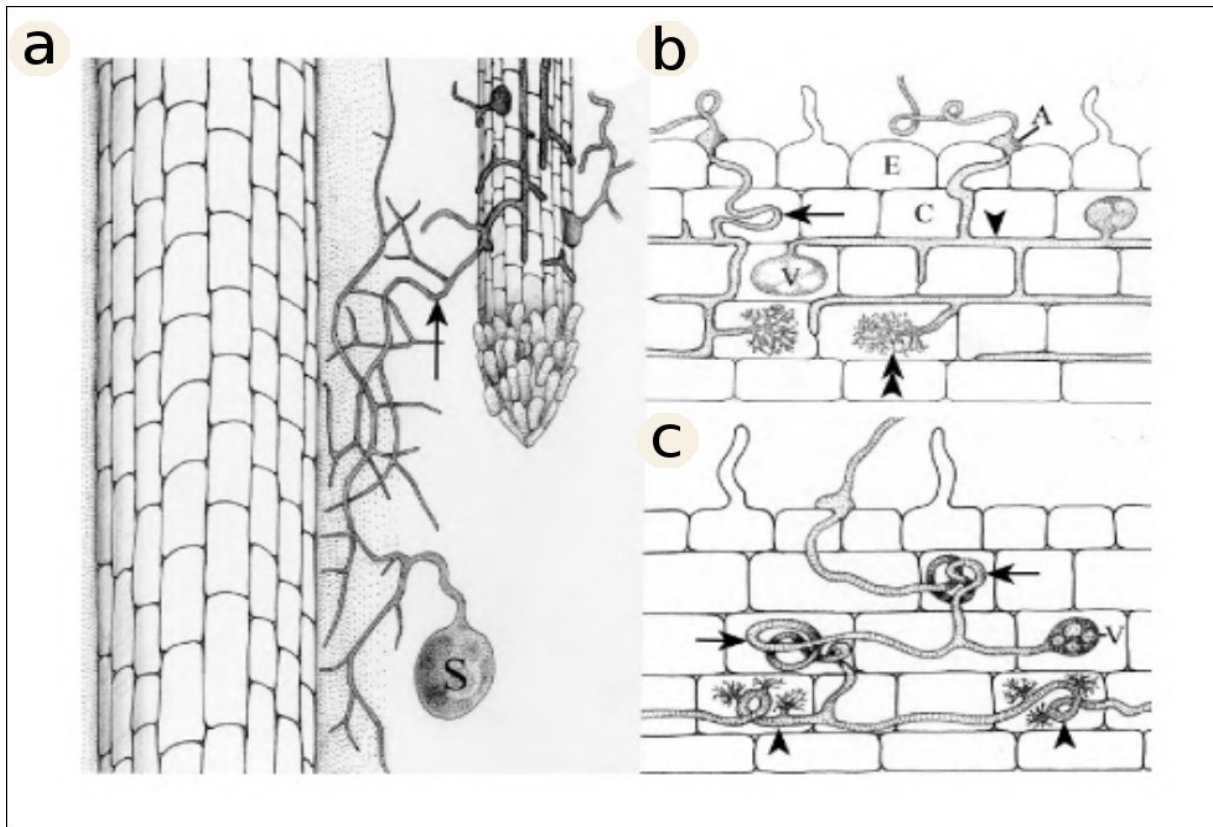
AM-Pilze (*arbuscular mycorrhizal fungi*, AMF) proliferieren durch robuste, teils aussergewöhnlich große (bis zu 0,8 mm Durchmesser sind belegt), protein-, lipid- und glykogenhaltige Sporen (Bécard et al. 1991, Bécard & Peffer 1993, Bentivenga & Morton 1995, Avio & Giovannetti 1998, Bago et al. 2000, Klironomos & Hart 2002, Smith & Read 2008), oder alternativ, und in vielen Habitaten von besonderer Bedeutung, ausgehend von vitalen Besiedlungen in den Wurzeln der

Nachbarnpflanzen (Hyphennetzwerke; Read et al. 1976, Smith & Read 2008, vgl. Kapitel VII). Molekulare Identifizierungsverfahren legen darüber hinaus nahe, dass nicht alle AMF regelmäßig Sporen ausbilden und solche Arten daher in besonderem Maß auf intakte Hyphennetzwerke für ihre Ausbreitung angewiesen sind (Rosendahl & Stukenbrock 2004). In vielen Verwandtschaftsgruppen der AM-Pilze, mit Ausnahme der Gattungen *Scutellospora* und *Gigaspora*, wurden auch abgestorbene Wurzelfragmente als Quelle erfolgreicher Inokulation beobachtet, sodass offenbar auch asymbiotische Hyphen(abschnitte) bzw. die reservestoffreichen Vesikel als Überdauerungseinheiten fungieren können (Kinden & Brown 1975b, Bierman & Linderman 1983, Tommerup & Abbott 1981, Klironomos & Hart 2002). Im Falle der Proliferierung über Sporen können diese entweder längere Zeit dormant sein (Tommerup 1984, Haugen & Smith 1992) oder direkt mit einer großlumigen Keimhyphne auskeimen. Die Keimhyphne kann mit ihrem Energievorrat nur begrenzt wachsen (Bago et al. 2000). Daher ist ein gerichtetes Wachstum in Richtung der Wirtswurzel überaus wichtig und erfolgt nach neueren Erkenntnissen entlang eines Gradienten spezifischer Vertreter einer noch nicht lange bekannten Gruppe von Apocarotinoid-stämmigen Pflanzenhormonen, den Strigolaktonen (Umehara et al. 2008). Diese werden von der Wirtswurzel ausgeschieden und induzieren neben dem gerichteten Hyphenwuchs auch die vermehrte Verzweigung des präsymbiotischen Hyphensystems [*branching factors (BF)*, Akiyama et al. 2005; vgl. auch S. 43, Fig 12a]. Neben den offenbar essentiellen Strigolactonen existieren aber noch weitere extraradikale Signalstoffe die das Hyphenwachstum beeinflussen. Längere Zeit wurden hier Flavonoide als besonders wirksame Fraktion angesehen (Smith & Read 2008), da sie ebenfalls die Verzweigung und den Längenwuchs der Hyphen erhöhen (u. a. Tamasloukht et al. 2003, Nagahashi & Douds 2011). Bindet man aber die exsudierten Flavonoide durch ein spezifisches Adsorbens, so werden die Wurzeln trotzdem besiedelt. Auch werden Flavonoide nicht von allen AM-Wirten gebildet und sind daher trotz ihrer unzweifelhaft förderlichen Wirkung offenbar nicht essentiell (Bécard et al. 1995). Pflanzen, die grundsätzlich nicht oder nur gelegentlich mykorrhiziert werden, man spricht in letzterem Fall auch von fakultativ mykorrhizierten Arten (z. B. einzelne Vertreter der Cyperaceae), zeigen interessanterweise keine vergleichbare Ausschüttung derartiger Signalstoffe (Giovannetti et al. 1993b, Smith & Read 2008). Im Extremfall exsudieren solche Pflanzenarten sogar Verbindungen die mit dem chemischen Erkennungsprozess zwischen den eigentlichen AM-Wirtspflanzen und deren Pilzsymbionten interferieren (so belegt für *Lupinus spec.*; Giovannetti et al. 1993). Nach Kontakt der Hyphen mit der Wurzeloberfläche (Rhizodermis oder Exodermis) verändert sich die Hyphenmorphologie und es wird ein rundlich-flächiges Kontaktorgan, das sog. Appressorium, auch als Hyphopodium bezeichnet, ausgebildet. Hierbei scheinen Cutin-Monomere

in der tangentialen Außenwand der Rhizodermiszellen als Triggermoleküle für die Appressoriumformierung zu dienen. Eine wirtsspezifische Komponente bei der Zusammensetzung der perzeptierten Zellwandmonomere scheint auch hier für die erfolgreiche Initiierung der Appressoriumbildung entscheidend, da Rhizodermisfragmente von Nicht-Wirten keine Bildung des Kontaktorgans auslösen (Nagahashi & Doude 1997, Giovannetti & Sbrana 1998). In Pflanzen, die eine Exodermis aufweisen [d. h. eine Casparystreifen ausbildende, suberinisierte subepidermale (hypodermale) Zelllage], können die Penetrationshyphen über spezielle, wenig suberinisierte Durchlasszellen in die Wirtswurzel eindringen (z. B. Gallaud 1905, Kinden & Brown 1975a). Grundsätzlich ist anzumerken, dass eine erfolgreiche Besiedlung in einige Fällen auch ohne die Formierung eines morphologisch identifizierbaren Appressoriums erfolgen kann (Smith & Read 2008; vgl. S. 43, Fig. 12a, b). Nach der eigentlichen Penetration verläuft die Hyphe innerhalb der Zelle des Abschlussgewebes mehr oder minder stark gewunden in radialer Richtung und dringt in die Zellen der äußersten Cortexzelllage ein, wo sie sich über einige, i. d. R. wenige Zellpassagen hinweg in tangentialer und longitudinaler Richtung ausbreitet, bevor es in den tieferen Lagen des Cortexparenchyms zum Übertritt der Hyphe in den Interzellularraum kommt (*Arum*-Typ; vgl. S. 43 & 45, Fig. 12b, 13a). Alternativ kann die Hyphe weiter intrazellulär von Zelle zu Zelle wachsen und dabei dichte Hyphenknäuel ausbilden (*Paris*-Typ; vgl. Fig. 12c & 13b). In beiden Fällen werden vom Pilz spezifische, stark verzweigte (strauchförmige) physiologische Schnittstellen innerhalb der Wirtszellen ausgebildet, die bereits erwähnten Arbuskel. Zeitlich nachgelagert entwickeln sich in vielen Fällen auch die schon angesprochenen, charakteristisch geformten Speicherorgane des Pilzes, die Vesikel (z. B. Bonfante-Fasolo 1984, Giovannetti & Sbrana 1998; Fig. 12b). Die morphologische Ausprägung der Arbuskel ist deutlich unterschiedlich in *Arum*- und *Paris*-Typ (vgl. Fig. 12 a,b & 13c,d). Für die Realisierung des Übertritts in die Wirtszelle wurden lange Zeit sowohl mechanische wie auch enzymatische Prozesse vonseiten der Hyphe in Betracht gezogen (Cox & Sanders 1974, Kinden & Brown 1975b, García-Romera et al. 1990, 1991; Bonfante & Perrotto 1995). Neuere Daten finden allerdings keine Hinweise auf pflanzenzellwanddegradierende Enzyme im Genom des Modell-AM-Pilzes *R. irregularis* DAOM-197198, weshalb offenbar die Wirtszelle selbst für die punktuelle Lysis der eigenen Zellwand verantwortlich zu sein scheint (Tisserant et al. 2013). Die Zeitspanne, in der die Arbuskel als vital und damit physiologisch aktiv anzusehen sind, unterscheidet sich teils stark in den unterschiedlichen Wirtspflanzen. So zeigen schnell wachsende Krautformen (z. B. Getreide wie Mais und Weizen), eine eher kurze Vitalitätsspanne der Arbuskel von nur wenigen (5 - 7) Tagen (von diesen sind 2 - 3 Tage für die Formation des Arbuskels abzuziehen), während langsamwüchsigerer, an nährstoffärmere, schattige Waldstandorte angepasste

Pflanzen Arbuskel mit einer deutlich längeren Vitalitätsspanne im Bereich von mehreren Wochen bis Monaten ausprägen (Brundrett, et al. 1985, Alexander et al. 1988, 1989; Brundrett & Kendrick 1990). Nach Abklingen der Vitalität degenerieren die Pilzstrukturen sukzessiv zu amorphen Klumpen, auf die simultan eine Matrix aus Wirtscellulose aufgelagert wird (z. B. Marcuse 1902, Cox & Sanders 1974, Rath et al. 2013). Die enzymatische Aktivität der Wirtswurzel kann die amorphen Reste der Arbuskel bzw. Hyphenknäuel letztlich auch vollständig aus den Zellen entfernen und somit Raum für eine erneute Besiedlung schaffen (Brundrett 2002). Weitere auffällige Veränderungen der Wirtszellen während der Besiedlung sind die Hypertrophierung des Zellkerns (verbunden mit einer Zunahme des Gehalts dekonsensierten Chromatins; Berta 1990), welcher seine periphere Position zugunsten einer zentralen, in direkter Nähe zu den intrazellulären Pilzstrukturen aufgibt sowie eine extreme Umstrukturierung des Cytoskeletts, eine Zunahme des Cytoplasmavolumens und die starke Fragmentierung der Vakuole (Balestrini et al. 1992, Smith & Read 2008). Parallel zu der Etablierung innerhalb der Wurzeln (intraradikal) bildet der Pilz ein lockeres Netzwerk teils großlumiger, derbwandiger Hyphen auf der Wurzeloberfläche (extraradikal) aus, die ähnlich wie die Keimhyphne in direkter Nähe potentieller Wirtswurzeln vermehrt in dünnere Hyphen aufzweigen können und über die Substratbarriere hinweg neue Besiedlungen in benachbarten Wurzeln initiieren (*runner hyphae* nach Friese & Allen 1991). Andere Formen der extraradikalen Hyphen wachsen verstärkt in das umgebende Erdreich, verzweigen sich dabei immer feiner und erschließen somit die feinen Poren des Bodens, wodurch die äußerst effektive Aufnahme mineralischer Nährstoffe erst möglich wird - ein essentieller Vorteil, der allerdings nicht spezifisch für die AM ist, sondern in allen Mykorrhizaformen vorliegt (Peterson et al. 2004).

Fig. 12 (S. 43): Grundsätzlicher Ablauf der Besiedlung in einer AM. a) Angeregt durch wurzelstämmige *Branching-Faktoren* verzweigt sich die aus der Spore (S) wachsende Keimhyphne in der Nähe einer Wirtswurzel. Nach Kontakt mit der Wurzeloberfläche explorieren dicht der Rhizodermis anliegende Laufhyphen die Wurzel und bilden an ihren Ausläufern Appressorien. b) *Arum*-Typ: Ausgehend von den Appressorien (A) penetriert der Pilz die Rhizodermis und besiedelt die Wurzel zunächst unter Ausbildung intrazellulärer Hyphenschlaufen (Pfeil). Später erfolgt die Besiedlung des Cortexparenchyms durch interzelluläre Hyphen (Pfeilspitze), welche seitlich inserierende, terminale Arbuskel in die Zellen ausbilden (doppelte Pfeilspitze) E = Epidermis (= Rhizodermis), V = Vesikel (diese können entgegen der Zeichnung auch häufig interzellulär gebildet werden) c) *Paris*-Typ: Besiedlung ausschließlich über intrazelluläre Hyphenknäuel (Pfeil), die häufig kleine, laterale Arbuskel ausbilden (Pfeilspitze). (nach Peterson et al. 2004)

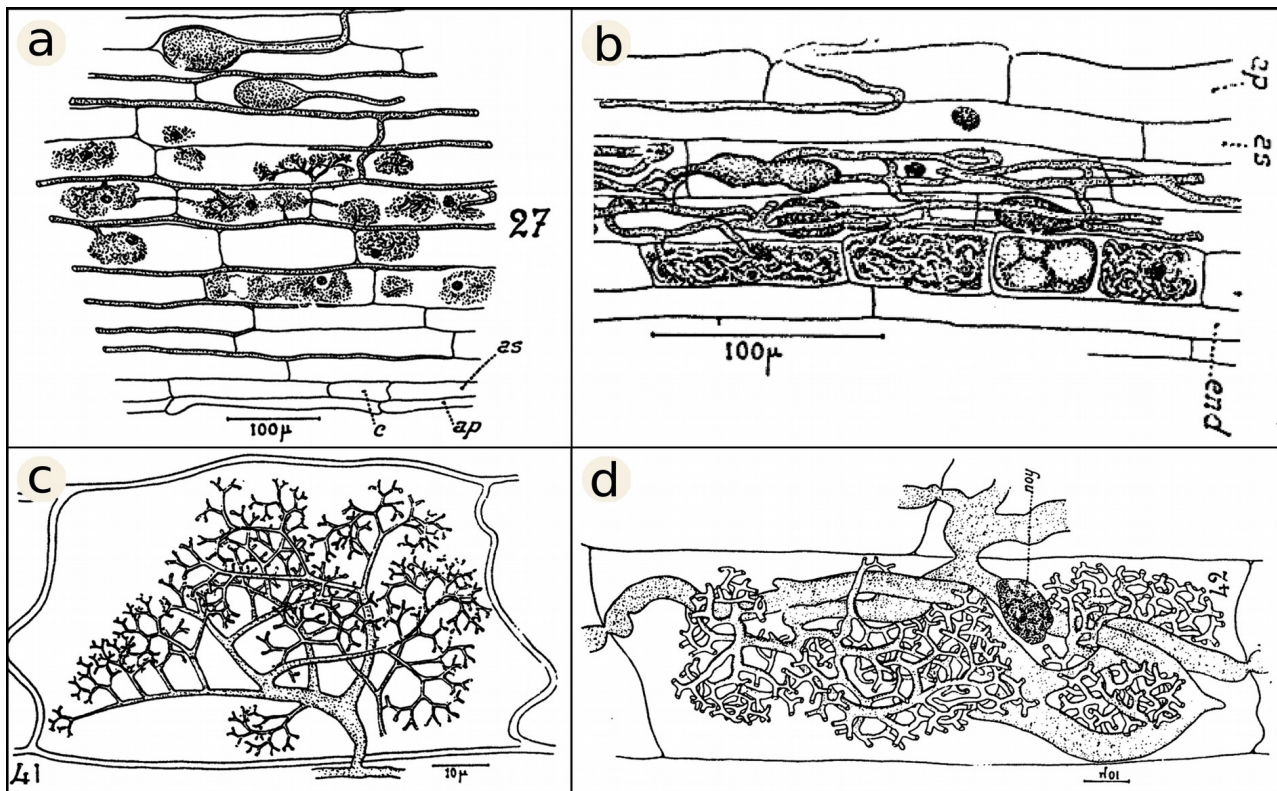


III.2 Morphologische Ausprägungen der Symbiose innerhalb der Wirtswurzel im Detail

Die arbuskuläre Mykorrhiza ist charakterisiert durch eine außerordentliche Vielfalt unterschiedlicher Kolonisierungsmuster in den Wurzeln ihrer pflanzlichen Wirte (Imhof 2009). Diese Muster werden auch als Kolonisierungsmuster, Struktur- oder, wie auch in dieser Arbeit, als Morphotypen bezeichnet und wurden in einer Reihe von zeitgenössischen Studien untersucht. In vielen Fällen geschah dies vor dem Hintergrund, die beteiligten AMF in Wurzeln aus Feldproben anhand ihrer intraradikalen Charakteristika zu quantifizieren und von anderen Mykorrhizaformen unterscheidbar zu machen (u. a. Abbott 1982, Brundrett et al. 1996; Merryweather & Fitter 1998 a,b; Smith & Smith 1997, Dickson et al. 2007). Lange vor diesen Studien aber erfolgte bereits eine eingehende morphologische Bearbeitung unterschiedlicher Ausbreitungsmuster arbuskulärer Mykorrhizapilze in den Wurzeln diverser Wirtspflanzen durch Gallaud (Gallaud 1905). Einzelne der von ihm bereits damals sehr detailliert beschriebenen Morphotypen umfassen in Wirklichkeit Vertreter sehr unterschiedlicher Mykorrhizaformen (*Série des Orchidées*, umfasst u. a. Vertreter der Orchideen-Mykorrhiza), andere wiederum werden trotz morphologischer Eigenheiten heute einer arbuskulären Mykorrhiza bzw. mykorrhiza-ähnlichen Assoziation mit Vertretern der Glomeromycota zugeordnet (*Série des Hepatiques*). Auf Basis seiner Studien unterscheidet Gallaud

zwei morphologisch stark gegensätzliche Formen, die er nach den beiden zugehörigen Wirtspflanzen in eine Serie des Typs *Arum maculatum* (*Série de l'Arum maculatum*; kurz *Arum*-Typ) und eine Serie des Typs *Paris quadrifolia* (*Série du Paris quadrifolia*, kurz *Paris*-Typ) einteilt (S. 45, Fig. 13 a,b). Der *Arum*-Typ zeichnet sich durch eine sehr kurze intrazelluläre Phase direkt nach der Penetration aus. Dieser folgt ein ausgedehntes interzelluläres Hyphenwachstum, welches nur durch die intrazelluläre Ausbildung von Arbuskeln unterbrochen wird (Fig. 13a). Diese *terminalen Arbuskel* sind seitliche Auswüchse der interzellulären Hyphen und wie die Bezeichnung „terminal“ bereits andeutet, räumlich abgeschlossene Strukturen, welche nicht in die Nachbarzellen eindringen (Fig. 13c). Vesikel werden beim *Arum*-Typ i. d. R. ebenfalls interzellulär gebildet. Demgegenüber zeigt der *Paris*-Typ ein ausschließlich intrazelluläres Hyphenwachstum mit verknäulten und verzweigten Hyphen (*hyphal coils*, Smith & Smith 1997), welche ihre Fähigkeit von Zelle zu Zelle zu wachsen beibehalten (Fig. 13b). An diesen Hyphen inserieren lateral kleinere Arbuskel. In der ursprünglichen Definition nach Gallaud findet man diese arbuskelbesetzten Knäuel stets in definierten Zelllagen (S. 43 & 45, Fig. 12c & 13d). Letzteres kann aber nach heutiger Wissensstand auch abweichen und die sog. *arbuskulären Knäuel* (*arbusculate coils*, Yawney & Schultz 1990, Cavagnaro et al. 2001a) sind in Zellen unterschiedlicher Lagen des Cortexparenchyms auffindbar (Dickson et al. 2007). Diese auch als *zusammengesetzte Arbuskel* (*composite arbuscule*, Gallaud 1905) bzw. *interkalare Arbuskel* (*intercalary arbuscules*, Smith & Smith 1997) bezeichneten Strukturen können in einigen Wirtspflanzen allerdings fehlen bzw. nur sehr reduziert ausgebildet sein (z. B. Peterson 1981, Smith & Smith 1996, Imhof 1997). Dies erschwerte eine Zuordnung dieser Formen zur AM von Beginn an und führte zu Unklarheiten bezüglich des tatsächlichen Mykorrhizastatus einzelner Pflanzenarten (Smith & Smith 1997). Auch die Vesikel werden im *Paris*-Typ stets in den Wirtszellen ausgebildet. Lange Zeit vermutete man aufgrund der überproportionalen Häufung des *Arum*-Typs in den besonders intensiv untersuchten krautigen Nutzpflanzen, dieser Morphotyp wäre am häufigsten in der Natur vertreten (Smith & Read 2008). Auf Basis zahlreicher Analysen in den letzten 3 Jahrzehnten geht man mittlerweile aber von einer vergleichbaren Abundanz des *Paris*-Typs in den natürlichen Habitaten aus (Cooke et al. 1993, Smith & Smith 1997; Dickson et al. 2007).

Fig. 13 (S. 45): a) Vornehmlich interzelluläre Cortexbesiedlung in *Allium sphaerocephalum* (*Arum*-Typ) mit terminalen Arbuskeln in den Zellen . b) Intrazelluläre Besiedlung in *Anemone nemorosa* (*Paris*-Typ) mit lockeren Knäueln in den äußeren Cortextlagen und arbuskelbesetzten, dichten Knäueln in der innersten Zelllage direkt oberhalb der Endodermis (end.). c) Feinverzweigtes terminales Arbuskel des *Arum*-Typs in *Arum maculatum*. d) *Paris*-Typ-Knäuel mit lateralen Arbuskeln in *Sequoia gigantea*. (nach Gallaud 1905)



Im Gegensatz zum *Arum*-Typ, welcher eine vergleichsweise weiträumige Ausbreitung der linear verlaufenden Interzellularhyphen zeigt, zeichnet sich der *Paris*-Typ in der Regel durch eine eher kleinräumige Kolonisierung der Wurzeln aus. Die Tendenz zur Ausbildung von teils stark verzweigten und eng miteinander verschlungenen Hyphen in den Zellen sowie die Annahme einer erschwerten Hyphenpassage von Zelle zu Zelle (im Gegensatz zur erleichterten Passage der Hyphen durch die Interzellularräume im *Arum*-Typ), wird als Ursache für die postulierte geringere Ausbreitungsgeschwindigkeit und dadurch nestartige Besiedlung in *Paris*-Typen diskutiert (Brundrett & Kendrick, 1990, Rosewarne et al. 1997, Cavagnaro et al. 2001b, Smith & Read 2008). Untersuchungen von Dickson (2004) deuten allerdings darauf hin, dass auch in *Paris*-Typen eine ähnlich hohe Besiedlungsdichte pro Zeiteinheit erreicht werden kann wie im *Arum*-Typ.

Gallaud (1905) wies dem pilzlichen Endophyten einen maßgeblichen Einfluss auf die strukturelle Ausprägung des Morphotyps zu. Diese Vorstellung wurde aber schon durch Barrett (1958 zitiert in Smith & Smith 1997), später von Gerdeman (1965), Jacquelinet-Jeanmougin & Gianinazzi-Pearson (1983) sowie Demuth & Weber (1990) eindrucksvoll widerlegt, als ein einzelnes Pilzisolat, je nach Wirtspflanzenarten, sowohl *Arum*- als auch *Paris*-Typen induzieren konnte. Trotz dieser starken Belege für den besonderen Einfluss des Wirtes auf die Ausprägung des Morphotyps ist auch die Pilzidentität ein wichtiger Faktor während der Mykorrhizamorphogenese. So beobachtete bereits

Gerdemann (1965) strukturelle Unterschiede der Mykorrhizamorphologie in Abhängigkeit von den genutzten Pilzisolaten - ein Befund, der in den folgenden Jahrzehnten in mehreren Experimenten eindrucksvoll bestätigt wurde (Abbott 1982, Alexander et al. 1988, Demuth et al. 1991, Cavagnaro et al. 2001b, Dickson 2004, Smith et al. 2004). An der grundsätzlichen Sichtweise, welche dem Pflanzenwirt eine besonders wichtige Rolle bei der Ausprägung des Morphotyps zuschreibt, konnten diese Daten hingegen bisher wenig ändern, zumal häufig auch auf Ebene der Familie in den Wirten eine weitestgehend homogene Ausprägung der Mykorrhizastrukturen beschrieben werden kann und der pilzliche Einfluss nicht selten eher auf feinstruktureller Ebene erkennbar wird (Smith & Smith 1997, Demuth et al. 1991, Dickson 2004). Bezüglich der morphologischen bzw. physiologischen Faktoren, die über die Ausbildung des einen oder anderen Typs entscheiden, herrscht im Detail bis heute noch keine endgültige Klarheit. Brundrett & Kendrick (1990) prüfen in ihren Studien die Hypothese, dass die Größe und Zahl der Interzellularen im Wurzelcortex einen wichtigen Einfluss auf die Art (d. h. *Arum*-, vs. *Paris*-Typ) und Geschwindigkeit der pilzlichen Ausbreitung besitzen. So finden sie in Wirtswurzeln mit großen Interzellularräumen im Cortexparenchym den *Arum*-Typ und korrelieren dies mit der schnelleren Besiedlungsrate in diesem Morphotyp. Zweifelsohne ist diese Logik nachvollziehbar und kann tatsächlich eine Ursache für die schnellere Ausbreitung des *Arum*-Typs in Wurzeln sein. Kleine bzw. fehlende Interzellularen als wesentliche Bedingung für die Ausbildung des *Paris*-Typs zu betrachten, wird aber aus guten Gründen abgelehnt. So betont bereits Gallaud (1905), dass man den *Paris*-Typen auch in Pflanzen mit ausgeprägten Interzellularen im Wurzelcortex findet - eine Beobachtung, die sich auch für weitere *Paris*-Typen anführen ließe (Smith & Smith 1997). Ganz offensichtlich müssen also andere, sehr wahrscheinlich stark vom Wirtsgenom beeinflusste Phänomene an der Morphogenese der Mykorrhiza beteiligt sein (Smith & Smith 1997, Brundrett 2002, vgl. Kapitel IV.1.2 für eine detailliertere Beschreibung).

Neben den beiden „Haupt-Typen“ (d. h. *Arum*-Typ und *Paris*-Typ), findet man in der Natur auch Zwischenformen, welche als *intermediäre Typen (intermediate types)* bzw. bei nur geringfügiger Abweichungen von einem der beiden Grundformen z. B. auch als *near-Paris*-Typen bezeichnet werden (Smith & Smith 1997, Cavagnaro et al. 2001b, Dickson 2004). Für die Klassifizierung der AM stellt sich daher das Problem, aussagekräftige Merkmalskombinationen zu definieren, die eine eindeutige Klassifizierung auch dieser Typen zulassen. Erste Versuche einer feineren Kategorisierung der AM unter Einbeziehung der Zwischentypen finden sich in dem System von Dickson (2004; vgl. S. 47, Fig. 14). Zwar bietet dieses klare Merkmale für die Abgrenzung unterschiedlicher Morphotypen innerhalb eines strukturellen Kontinuums, dessen diametrale

Endpunkte die von Gallaud beschriebenen Typen *Arum* und *Paris* darstellen, es bleibt allerdings fraglich, inwiefern diese künstlich generierten Typen auch in der Natur eine ökologische Relevanz besitzen und wie repräsentativ ihr System ist. Alleine die Arbeiten in der Arbeitsgruppe Weber/Imhof deuten auf eine wesentlich komplexere Situation bezüglich dieser Fragestellungen hin (Aristodimou 2014). Imhof (2009) verweist in diesem Zusammenhang auf die Notwendigkeit einer modifizierten Nomenklatur, indem er darlegt, dass die aktuelle, undifferenzierte Zusammenfassung aller AM-Morphotypen unter der Klassifizierung „arbuskuläre Mykorrhiza“ der tatsächlichen strukturellen Komplexität der AM nicht ausreichend Rechnung trägt. Er schlägt daher eine Neuklassifizierung der bekannten Mykorrhizaformen vor, bei der *Arum*-, Intermediäre-, *Paris*- und die zahlreichen, zumeist komplex strukturierten, sog. speziellen *Paris*-Typen (*special Paris*-typs, Imhof & Weber 2000) mykoheterotropher Angiospermen als gleichwertig neben dann als Subtypen zu bewertenden Mykorrhizaformen wie der arbutoiden und monotropoiden Mykorrhiza stehen. Dieses System wird sich hoffentlich nicht nur wegen seiner inneren Logik durchsetzen, sondern auch aufgrund der systemimmanenten Möglichkeit, konvergente Entwicklungstendenzen in den Mykorrhizaformen leichter miteinander vergleichen zu können. Abschließend sei noch auf den Versuch einer angepassteren Klassifizierung durch Brundrett (2004) verwiesen. Sein System unterscheidet „lineare“ (*linear*) und „verknäuelten“ (*coiled*) Hyphenausbreitung, wobei erstere dem *Arum*-Typ und letztere dem *Paris*-Typ entsprechen. Für den „Coiled-Typus“ definiert der Autor darüber hinaus noch weitere Untertypen. Da aber auch einige der speziellen *Paris*-Typen eine lineare Hyphenausbreitung zeigen, und sein System auch die Zwischentypen nicht erfasst, konnte sich dieses System bisher nicht durchsetzen (Smith & Read 2008).

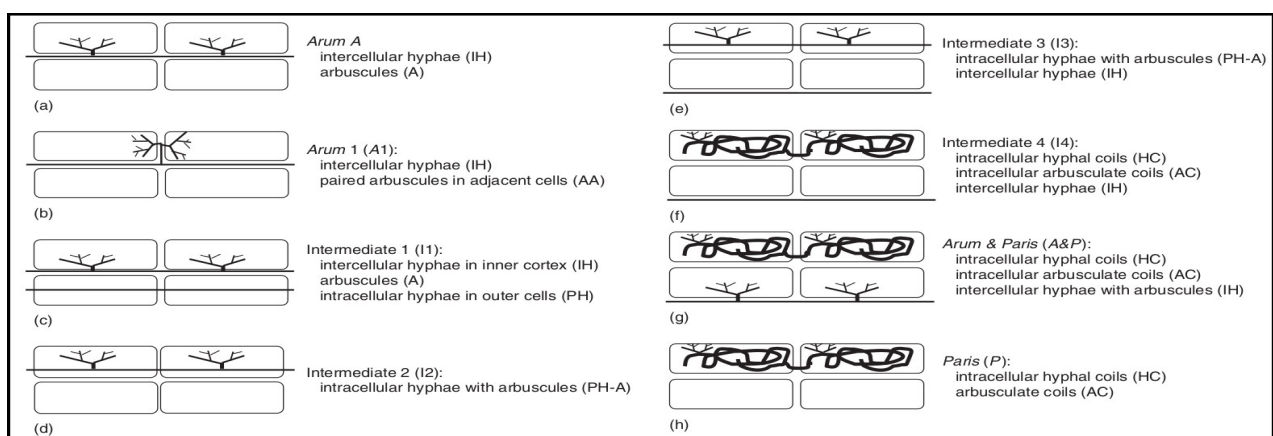


Fig. 14: Kontinuum arbuskulärer Mykorrhiza (Morpho)typen von a) „reinem“ *Arum*-Typ bis h) „reinem“ *Paris*-Typ mit sechs intermediären Zwischenformen ansteigender intrazellulärer Hyphenausbreitung und Hyphenverknäuelung. (nach Dickson 2004)

Die physiologischen Eigenschaften der AM wurden sehr lange vornehmlich an Pflanzen mit einem *Arum*-Typs untersucht (Dickson et al. 2007, Smith & Smith 2012). Mit der Ausnahme der Arbeiten von Gerdeman (1965) und Gray & Gerdeman (1967) erfolgten erst in den letzten beiden Jahrzehnten weitere Untersuchungen über die, offenbar ebenfalls wachstumssteigernde, Auswirkung eines *Paris*-Typs auf die Wirtspflanze (Demuth 1993, Cavagnaro et al. 2003, Smith et al. 2004) sowie ultrastrukturelle und molekulare Analysen der physiologischen Schnittstelle in diesem Morphotyp (Dickson & Kolesik 1999, Karandashov et al. 2004, Van Arle et al. 2005, Glassop et al. 2005). Trotz des immer noch unvollständigen Bildes sprechen diese Untersuchungen stark für eine ähnliche Kapazität der auf den ersten Blick so unterschiedlich erscheinenden Schnittstellen des terminalen Arbuskel (*Arum*-Typ) und des arbuskulären Knäuels (*Paris*-Typ), die Wirtspflanzen effizient mit mineralischen Nährstoffen zu versorgen (Smith & Smith 2011).

Die Diversität der strukturellen Ausprägung der AM deutet stark auf eine wichtige, sehr wahrscheinlich öko(physio)logische Funktion hin, welche zu der konsistenten Ausprägung einzelner Morphotypen in spezifischen Verwandtschaftsgruppen der Pflanzenwirte geführt haben könnte (Dickson et al. 2007). Bis heute stellt die funktionelle Interpretation der Morphotypen aber zumindest in grünen, autotrophen Pflanzen ein beträchtliches Problem dar. Dennoch versuchen Brundrett & Kendrick (1990) die relativ langsame Ausbreitungsgeschwindigkeit und verlängerte Vitalitätsspanne des *Paris*-Typs in einigen der von ihnen untersuchten Wirtspflanzen aus Waldhabitaten als Anpassung an eine nachhaltiger mutualistische Strategie gegenüber der aus ihrer Sicht eher an kurzfristig hohe Besiedlungs- und Nährstofftransferaten angepasste *Arum*-Typ-Strategie in schnellwüchsigeren Nutzpflanzen (z. B. Getreide) zu interpretieren. Auch Smith & Smith (1996, 1997) und Dickson (2004) diskutieren potentielle physiologische Implikationen der strukturellen Unterschiede von *Arum*- und *Paris*-Typ. Die Autoren befassen sich hierbei z. T. auch mit grundsätzlichen Merkmalen der besonders komplexen, stets intrazellulären und i. d. R. arbuskellosen Morphotypen in mykoheterotrophen Pflanzen (Imhof 1997, Imhof et al. 2013) - ein Aspekt, der in den folgenden Kapiteln noch eingehender behandelt wird.

III.3 Evolution der arbuskulären Mykorrhiza

Die Bewertung der AM als sehr frühe Entwicklung in der Mykorrhiza-Evolution wird seit längerem durch morphologische und in den letzten zwei Jahrzehnten auch von molekularen Daten gestützt. Trappe (1987) kann in diesem Sinne als der erste Forscher betrachtet werden, welcher auf Basis der nahezu ubiquitären Verbreitung der AM in den Wurzeln der Angiospermen die Vermutung äußerte, dass diese Symbiose den ursprünglichen, also plesiomorphen Zustand in dieser Pflanzengruppe

darstellt. Wang & Qiu (2006) erweitern diese Einschätzung mit ihrer sehr umfangreichen, alle Kontinente umfassenden Meta-Analyse über den Mykorrhizastatus von 3617 Pflanzenarten aus 263 Familien inklusive Vertretern der zahlreichen Lebermoose und einiger Hornmoose (Bryophyten s. l.) auf alle embryophischen Landpflanzen. Vor diesem Hintergrund erscheint der Nachweis eines nahezu identischen (d. h. homologen bzw. genauer orthologen) Satzes AM-spezifischer Symbiosegene in allen diesbezüglich untersuchten Landpflanzengruppen (Wang et al. 2010, Delaux et al. 2013) nicht verwunderlich und liefert einen weiteren deutlichen Hinweis auf die sehr frühe Entstehung mykorrhiza-ähnlicher Assoziationen in der Landpflanzenevolution (z. B. Berbee & Taylor 1993, Field et al. 2015c, Strullu-Derrien et al. 2016; vgl. S. 51, Fig. 15). Auf der pilzlichen Seite der Symbiose lieferten Funde fossiler Überreste von AMF-ähnlichen Sporen und Hyphen eines glomeromyceten-ähnlichen Pilzes (*Palaeoglomus grayi*) aus dem Ordovizium (Altersdatierung: ~ 460 mya) erste fossiliengestützte Hinweise auf ein sehr frühzeitiges Auftreten dieser Verwandtschaftsgruppe an Land, erlauben aufgrund des fehlenden pflanzlichen Kontexts allerdings keinen Rückschluss auf eine mögliche symbiotische Lebensweise dieses Organismus (Redecker et al. 2000b, 2002). Auch die zeitliche Einordnung des Fundes ist nicht unumstritten (Taylor et al. 2014), diese wird aber zumindest auf Basis molekularer Daten (*molecular clock*) zum Ursprung der frühesten Vertreter glomeromycota-ähnlicher Pilze gestützt (Simon et al. 1993, Redecker et al. 2000a, Taylor & Berbee 2006). Ebenso belegen Funde von Sporen ursprünglicher, praetracheophytischer Embryophyten aus dem unteren bis mittleren Ordovizium (480 - 460 mya; Strother et al. 1996, Sanderson 2003; Wellman et al. 2003, Wellman 2010, Rubinstein 2010) die Existenz einer etablierten Landpflanzenflora lange vor der vermuteten Abspaltung erster tracheophytischer Embryophyten im späten Silur vor etwa 420 mya (Wellman 2010, Kenrick et al. 2012) und deuten ebenfalls auf eine zeitlich ausgedehnte Koexistenz von Glomeromyceten (bzw. deren Vorläufern) und praetracheophytischen, bryophytenähnlichen Landpflanzen hin. Da viele der rezenten Leber- und Hornmoose aber bis heute eine „Mykorrhiza“ mit Vertretern der Glomeromycota ausbilden (Rimington et al. 2016, vgl. Kapitel III.4 & III.5) kann trotz derzeit fehlender Fossilbelege aus dieser allerfrühesten Phase terrestrischer Pflanzenbesiedlung mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass auch schon lange vor der Entstehung tracheophytischer Organisationsformen eine enge Symbiose zwischen „niederen“ Landpflanzen und frühen Vertretern der Glomeromycota existiert hat und dies eventuell ein essentieller Vorteil, eventuell sogar die Bedingung für die Anpassung der noch wurzellosen, vermutlich noch sehr algenähnlichen und daher kaum an die spezifischen Schwierigkeiten der Mineralstoffversorgung an Land angepassten Pflanzen war; eine Hypothese, die bereits in den 60er und 70er Jahren in der

Forschung formuliert wurde (Nicolson 1967; Pirozynski & Malloch 1975, Malloch et al. 1980) und später durch molekularphylogenetische Daten substantiviert werden konnte (Simon et al. 1993, Parniske 2008, Wang et al. 2010). Die Ursprünge der arbuskulären Mykorrhiza reichen aber vermutlich noch tiefer in das Paläozoikum hinein. Dies wird deutlich, wenn man den Bereich der Fossilbefunde verlässt und molekularen Studien folgt, die in den letzten Jahren deutliche Belege für die Existenz von Orthologa solcher Symbiosegene in Vertretern der Armleuchteralgen (Charophyceae) fanden, die in Landpflanzen für die initialen Schritte der AM-Ontogenese verantwortlich sind (Delaux et al. 2013, 2015). Diese Gruppe von Süßwasseralgen wird auf Basis aktueller Phylogenien und der komplexen morphologischen Organisation zusammen mit weiteren Vertretern des Paraphylums Charophyta, den Coleochaetales und den Schmuckalgen (Zygnematophyceae), als engste Verwandtschaftsgruppe zu den Landpflanzen betrachtet (Cox et al. 2014, Wickett et al. 2014) und scheint bereits mit anderen, eventuell sogar pilzlichen Organismen, eine Symbiose eingegangen zu sein (Delaux et al. 2012, 2013). Ein Teil der mykorrhizaspezifischen Gene sind also offenbar weitaus älter als die terrestrische Symbiose selbst und diese könnte auf der pflanzlichen Seite das molekulare „Rüstzeug“ für die eigentliche Mykorrhiza-Symbiose bereitgestellt haben (Delaux et al. 2012, Selosse et al. 2015) - eine Idee, die in ihrer Essenz große Ähnlichkeit zu der 40 Jahre älteren Hypothese von Pirozynski & Malloch (1975) aufweist. Derartige Vorstellungen werden heute mehr und mehr präzisiert und ein primär endophytisches, schwach parasitäres oder kommensalisches Stadium der beteiligten Pilze, bei dem diese vom Schutz und den „überschüssigen“ Assimilaten, die Wirte aber vermutlich durch erhöhte Resistenz vor parasitischen Pilzen profitiert hätten, wird als ein initiales Szenario zwischen den Vorläufern späterer Mykorrhizapilze und frühesten Landpflanzen skizziert (Brundrett 2002). Dies könnte ein bis heute andauerndes Prinzip bei der Entstehung gänzlich neuer Wirts-Pilz-Kombinationen und damit, im Extremfall, auch neuartiger Mykorrhizaformen sein (Brundrett 2002, 2006; Selosse et al. 2010, Weiss et al. 2011).

Innerhalb der Glomeromycota existiert darüber hinaus eine weitere Form pilzlich-pflanzlicher Symbiosen. Ähnlich den Verhältnissen in Flechten interagiert hier ein phylogenetisch ursprünglicher Vertreter der Glomeromycota (*Geosiphon pyriformis*, Geosiphonaceae) mit einer stickstofffixierenden Blaualge (*Nostoc*) als autotrophen Endosymbionten, wobei in diesem speziellen Falle der Pilz ein intrazelluläres Habitat (in Form blasenartig aufgetriebener Hyphen) für die Alge bereitstellt, die Stelle des Makrosymbionten einnimmt und damit die morphologische Situation in der arbuskulären Mykorrhiza de facto umkehrt (Schüßler et al. 1994). Vor einem evo-

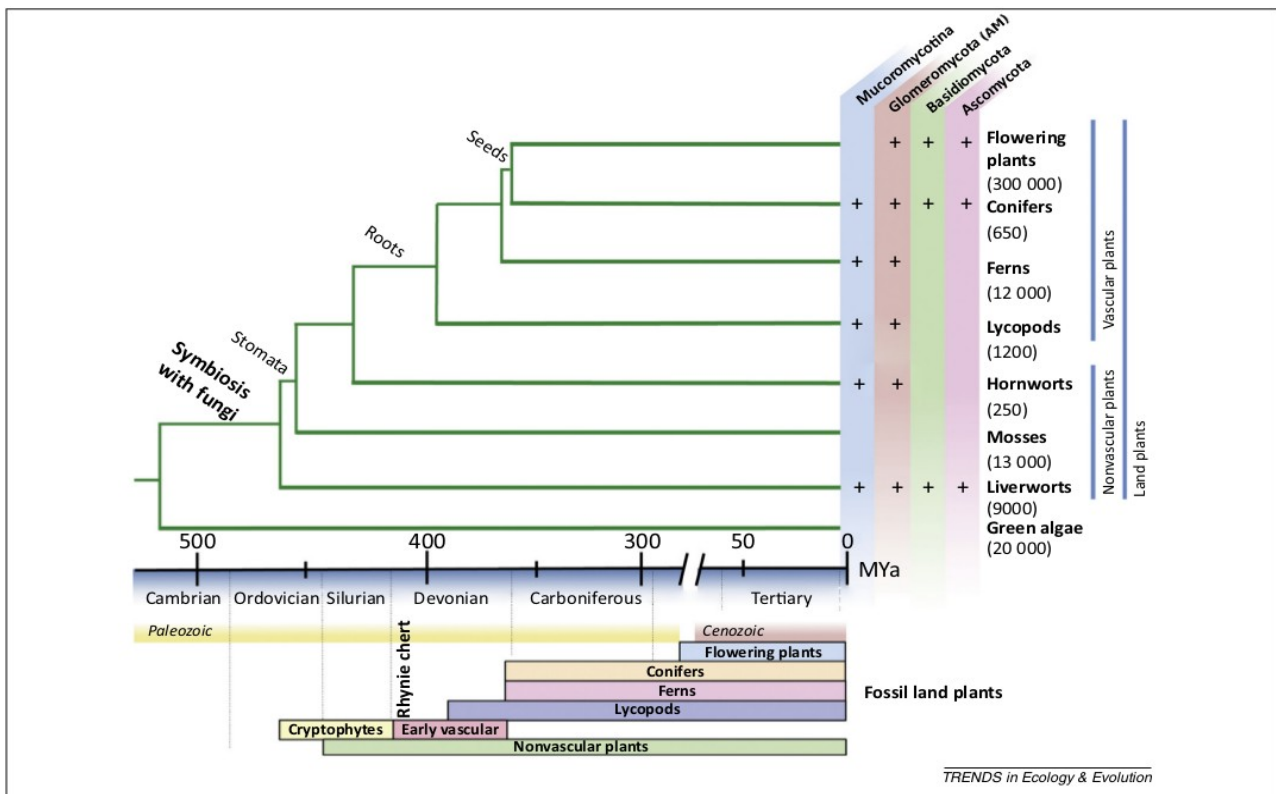


Fig. 15: Chronogram aller Hauptgruppen terrestrischer Embryophyten (+ Grünalgen) mit Angabe der assoziierten Mykorrhizipilze und zentraler evolutionärer Innovationen wie: frühe mykorrhiza-ähnliche Symbiosen (*symbiosis with fungi*), Stomata, Wurzeln und Samen. Zahlenwerte in Klammern geben die Zahl der Wirtsarten an, welche die entsprechende Symbioseform heute noch ausbilden. (nach Field et al. 2015c)

lutionshistorischen Hintergrund wurde diese Form des Zusammenlebens, basierend auf der Bereitstellung von Schutz und mineralischen Nährstoffen (bereitgestellt vom Pilz) im Austausch von Kohlenhydraten und Stickstoff (bereitgestellt durch die Alge), als wichtiger Entwicklungsschritt in der Evolution früher mykorrhiza-ähnlicher Symbiosen diskutiert (Gehrig et al. 1996, Schüßler & Kluge 2001, Redecker et al. 2000a, Schüßler 2002). Diese Hypothese wird zwar weiterhin verfolgt (Schüßler 2012), ist aber für *Geosiphon* selbst auf phylogenetischer Ebene nicht mehr haltbar, da die Einbettung von *G. pyriformis* in die AM-ausbildenden Archaeosporales in diesem speziellen Fall deutlich für einen Wechsel von einer ursprünglich ausgebildeten arbuskulären Mykorrhiza hin zu der Symbiose mit *Nostoc* spricht (Redecker et al. 2000a, 2006). Handelt es sich bei den bisher aufgeführten Hinweisen um molekularbiologisch basierte Belege für einen sehr frühen evolutiven Ursprung der AM, so existieren aber auch eindeutige morphologische Hinweise auf eine mykorrhiza-ähnliche Einheit von pflanzlichen Geweben und pilzlichen Strukturen. Diese sind allerdings bedeutend jünger und stammen aus den fossilen Belegen des

Rhynie-Cherts in Schottland, wo mit einer Reihe von Funden ursprünglicher, praetracheophytischer und tracheophytischer Landpflanzen aus dem unteren Devon (~ 400 mya) die frühesten Fossilien der Paläomykorrhizaforschung gefunden wurden. In einer genaueren Analyse des außergewöhnlich gut erhaltenen Materials konnte in dem Achsengewebe dieser Urpflanzen interzelluläre Hyphen, Arbuskel und Vesikel nachgewiesen werden (Stubblefield et al. 1987, Remy 1994, Taylor et al. 1995, Dotzler et al. 2006, 2009; vgl. S. 53, Fig 16).

III.4 Arum- und Paris-Typ aus evolutiver Perspektive

Nicht abschließend geklärt werden kann bis heute das evolutive Alter der unterschiedlichen Morphotypen in der AM (Smith & Smith 1997, Strullu-Derrien et al. 2016). Nach gängiger Sichtweise handelt es sich bei dem vergleichsweise einfach aufgebauten *Arum*-Typ um eine sehr frühe evolutive Entwicklung in der Landpflanzenevolution (Smith & Read 2008). Diese Sichtweise beruht auch auf den Befunden *Arum*-Typ-ähnlicher Strukturen in einigen der bisher ältesten Fossilien ursprünglicher Landpflanzen aus dem *Rhynie-Chert* (unteres Devon: ~ 396 mya) wie *Aglaophyton major* (Protracheophyta), deren Gametophyt *Lyonophyton rhynensis* und *Horneophyton lignieri* (Remy et al. 1994, Taylor et al. 1995; Fig. 16a, b). Allerdings wurden in weiteren Fossilien aus dieser Epoche wie *Nothia aphylla* (Krings et al. 2007a,b), aber auch in den Funden späterer Phasen (oberes Karbon: ~ 315 mya) wie den Bärlapppflanzen (Lycopodendrales, Schuppen- und Siegelbäume), den Cordaiten [eine extinkte Schwestergruppe der Pinophyta (Coniferophyta)], den Samenfarne (Glossopteridales, Pteridospermatophyta) der Gattung *Glossopteris* aus dem Perm (260 - 252 mya) und *Antarcticycas* (Cycadopsida) aus dem unteren bis mittleren Trias (252 - 235 mya) entweder eine parallele inter- wie auch intrazelluläre, oder ausschließlich intrazelluläre *Paris*-Typ-ähnliche Besiedlung dokumentiert (Stubblefield et al. 1987, Phipps & Taylor 1996, Strullu-Derrien et al. 2009, Krings et al. 2011, Harper et al. 2013; Fig. 16c, d1&2). Mit der relativ neuen Erkenntnis, dass es sich bei den interzellulären Strukturen in einigen dieser fossilen Belege vermutlich nicht um arbuskuläre Mykorrhizapilze, sondern um Vertreter der Mucoromycotina handelt (vgl. Kapitel III.5), die parallel zu AM-Pilzen die Gewebe der untersuchten Pflanzen besiedelten (Strullu-Derrien et al. 2014, Strullu-Derrien et al. 2016), wird die Häufigkeit des *Arum*-Typs im Fossilbefund allerdings neu zu bewerten sein.

Man kann also zusammenfassen, dass es deutliche Indizien für beide Morphotypen schon in den frühen Landpflanzen gibt. Diese Auffassung wird auch von dem gehäuftem Auftreten des *Paris*-Typs in den rezenten Vertretern phylogenetisch ursprünglicher Gruppen wie den Horn- und Lebermoosen (Anthocerotopsida, Marchantiophyta), den Bärlappgewächsen (Lycopodiaceae), Farnpflanzen

[Moniliphyta d.h. Equisitaceae (Schachtelhalmgewächse), Psilotaceae (Gabelblattgewächse), Marratiopsida und „echten“ d. h. leptosporangiaten Farnen (Filicoposida)] sowie den AM-ausbildenden Vertretern der Nadelblattgewächse gestützt (Smith & Smith 1997, Brundrett 2002, Ligrone et al. 2007, Dickson 2007).

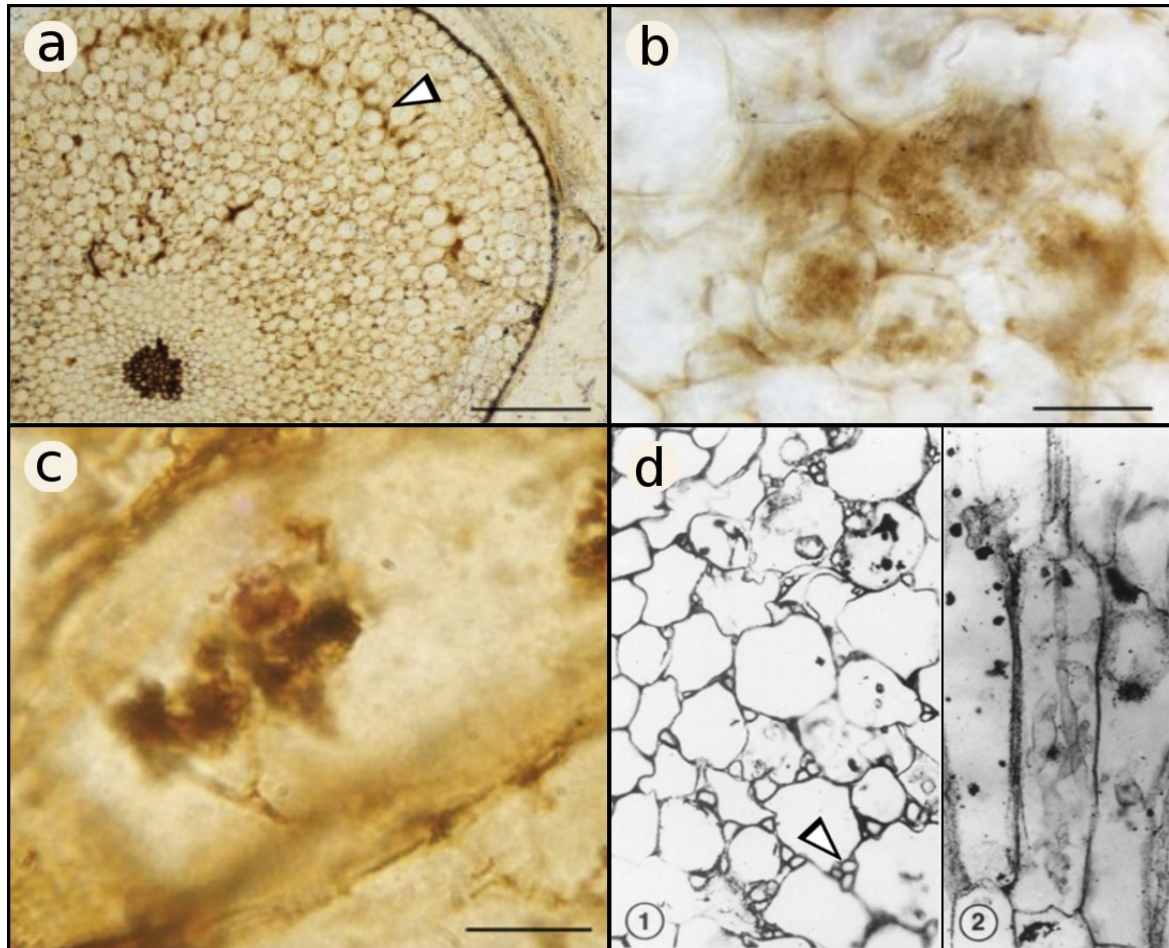


Fig. 16: Dünnschliffe versteinertes Pflanzenfossilien mit arbuskulärer Mykorrhiza. a) *Arum*-Typ-ähnliche Besiedlung in *Aglaopyhton major*. Pfeilspitze = ringförmige Zone interzellulärer Pilzbesiedlung entlang des Achsen- bzw. Telomquerschnitts, Maßstab = 0,55 mm. b) Ausschnittsvergrößerung der Besiedlungszone in a): feinverzweigte Strukturen mit großer Ähnlichkeit zu terminalen Arbuskeln in den besiedelten Zellen. Maßstab = 30 μm c) Arbuskel-ähnliche Struktur in den Zellen einer Wurzeln von *Cordaites*. d.1) Interzelluläre Hyphen (Pfeilspitze) und d.2) intrazelluläre Pilzbesiedlung in *Antarcticycas*. [verändert nach Kenrick & Strullu-Derrien 2014 (a, b) und Phipps & Taylor 1996 (c, d)]

III.5 Arbuskuläre Mykorrhiza oder Mucoromycotina-Endosymbiose: Wer war zuerst da?

Die Einschätzung der AM als ursprünglichste Mykorrhizaform und essentielle Komponente für die Evolution der frühen Landpflanzen wurde in den letzten Jahren durch neue Forschungsergebnisse

herausgefordert. 2011 lieferte die Arbeit von Bidartondo et al. molekularphylogenetische Belege für die endosymbiotische Assoziation von Vertretern der ursprünglichen Pilzgruppe Mucoromycotina zu phylogenetisch ursprünglichsten rezenten Verwandtschaftsgruppen terrestrischer Landpflanzen, den Lebermoos-Gattungen *Haplomitrium* und *Treubia* (Haplomitriopsida), deren Mykorrhiza auf Basis morphologischer Ähnlichkeiten bis dahin der AM zugeordnet wurden (Carafa et al. 2003, Duckett et al. 2006a). In den folgenden Jahren konnten über molekulare und strukturelle Untersuchungen weitere Arten aus den Leber- und Hornmoosen sowie Bärlappgewächsen und Farnen entdeckt werden, die neben Glomeromyceten auch und z. T. sogar simultan mit Mucoromycotina-Pilzen symbiotisch assoziiert sind (Desirò et al. 2013, Rimington 2015). Neben der weiten Verbreitung in diesen rezenten Pflanzen belegen neue Auswertungen fossiler Urpflanzen der Rhynie-Fundstätte (s. o.), dass auch in den Pflanzengesellschaften des Devons bereits hybride Symbiosen von Landpflanzen, Glomeromycota und weiteren Pilzen, welche vermutlich den Mucoromycotina zuzuordnen sind, existierten (Krings et al. 2007a,b; Strullu-Derrien et al. 2014). Auch physiologische Analysen belegen den mutualistischen Charakter dieser Mucoromycotina-Assoziation in den rezenten Lebermoosen (Field et al. 2015a, 2016) und deuten ebenfalls daraufhin, dass die frühen Landpflanzen offenbar einen Nutzen aus einer derartigen Symbiosen zogen und eine solche Verbindung daher ein vermutlich ebenso großer Selektionsvorteil für deren Etablierung an Land war wie die zu den Glomeromycota (Bidartondo et al. 2011, Field et al. 2015c). Dies würde auch eine zwanglose Erklärung für die auffällige Häufung phylogenetisch moderner Vertreter der Glomeromycota in einigen der phylogenetisch fortschrittlicheren Kladen der Lebermoosen sein - eventuell das Resultat eines direkten Wechsels in diesen Pflanzengruppen von den Mucoromycotina zu moderneren Vertretern der Glomeromyceten aus der Familie der Glomeraceae (Field et al. 2015c). Erstaunlich ist ebenfalls die, verglichen mit Vertretern der Glomeromycota, bessere symbiotische Performance der Mucoromycotina in den diesbezüglich untersuchten Lebermoosen unter den derzeitigen atmosphärischen CO₂-Konzentrationen - ein Verhalten, das sich allerdings in den höheren Pflanzen umkehrt (Field et al. 2015a, 2016). Dies provoziert die bis auf Weiteres ungeklärte Frage, welche Faktoren in den ursprünglichen Landpflanzen für einen Wechsel der Symbionten hin zu den Glomeromycota verantwortlich zeichneten (siehe Field et al. 2015c, 2016 für eine eingehendere Analyse dieser interessanten Problematik). Ob die Symbiose mit Mucoromycotina, Glomeromycota oder eine duale Form mit Vertretern beider Pilzgruppen das ursprünglichste Szenario in der Landpflanzenevolution darstellt, die AMF stellt trotz der neuen Datenlage ohne Zweifel eine der ältesten Entwicklungslinien pflanzlich-pilzlicher Symbiosen dar. Stellen sich die molekularen Daten der letzten Jahre als valide heraus, welche nicht mehr von einer

basalere Stellung der Mucoromycotina ausgehen (vgl. Schüßler et al. 2001, James et al. 2006), sondern die Theorie einer sehr nahen Verwandtschaft (Lee & Young 2009, Tisserant et al. 2013, Lin et al. 2014) bzw. einer einzigen Stammgruppe von Mucoromycotina und Glomeromycota (als Subphylum Glomeromycotina, Spatafora et al. 2016) stützen, so könnte man vermutlich auch von einem gemeinsamen stammesgeschichtlichen Ursprung beider Endosymbiosen ausgehen. Da dieser Vorfahre allerdings deutlich älter als die ersten Landpflanzen datiert (Young et al. 2015), würde dieses Szenario gut zu der bereits angesprochenen Hypothese einer bereits vor dem pflanzlichen Landgang existierenden aquatischen Symbiose zwischen spezifischen Algengruppen und Pilzen aus dem Verwandtschaftskreis der Glomeromycota bzw. Mucoromycotina passen.

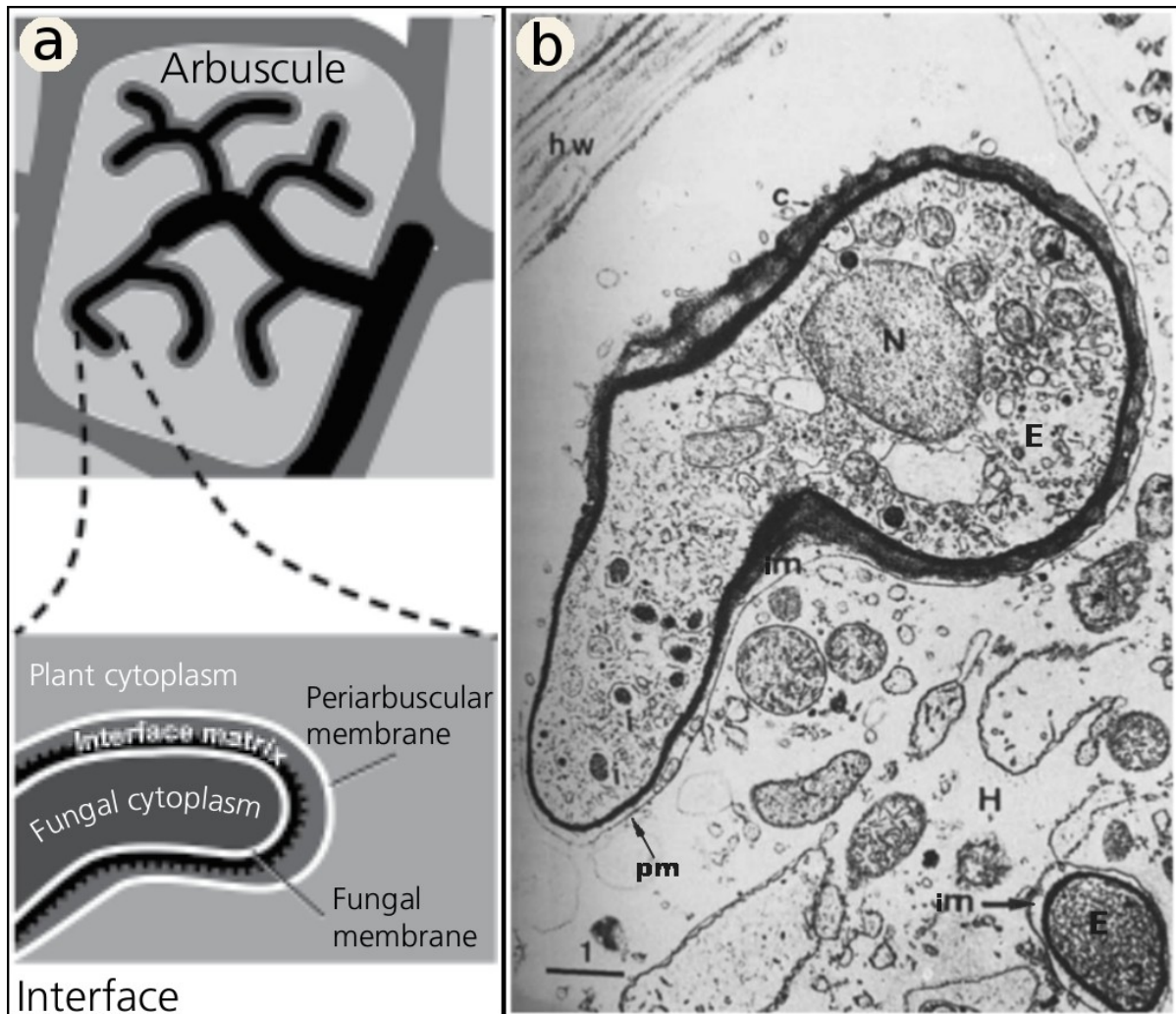
III.6 (Öko-)Physiologie der arbuskulären Mykorrhiza

III.6.1 Anatomie der symbiotischen Schnittstelle

Ein wesentliches Kriterium einer jeden funktionellen Mykorrhiza ist die Ausbildung physiologischer Schnittstellen zwischen Wirt und Symbiont für den bidirektionalen Transfer der zumeist mineralischen Nährstoffen in Richtung Wirtspflanze bzw. Wirtsassimilate in den Pilz. In der AM erfolgt dieser Stoffaustausch entlang spezialisierter, intrazellulärer Hyphenstrukturen, wobei hier zuerst die Arbuskel anzusprechen sind. Bei den Arbuskeln handelt es sich um das charakteristische Merkmal der AM. Diese werden trotz der Tatsache, dass sie in seltenen Fällen nicht oder strukturell stark reduziert ausgebildet werden (e.g. Alexander 1988, Smith & Smith 1996) bisher als die wesentliche Synapomorphie der AMF betrachtet (Morton & Benny 1990). Die phylogenetische Aussagekraft der Arbuskelbildung wird aber durch die erst kürzlich erfolgte Einordnung der ebenfalls arbuskelausbildenden Verwandtschaftsgruppe der sog. *fine root endophytes* (FRE, ehemals *Rhizophagus tenuis*, Glomeromycota) in die Mucoromycotina neu zu bewerten sein (Orchard et al. 2017). Wie der Name bereits suggeriert (von lat. *arbuscula* = Bäumchen) entsteht ein typisches Arbuskel durch dichotome (Kinden & Brown 1975c, Cox & Sanders 1974) Verzweigung der in die Zelle eintretenden Stammhyphes. Gegen Ende ihrer Ausdifferenzierung entsteht eine große Zahl feinsten Hyphenäste, deren Enden einen Durchmesser von nur 0,3 - 1 µm aufweisen und die in ihrer Gesamtheit eine beträchtlich vergrößerte Oberfläche für den Stoffaustausch zwischen Pilz- und Pflanzenzelle bereitstellen (Kinden & Brown 1975c, Cox & Tinker 1976, Gianinazzi 1991, Dickson & Kolesik 1999). Wie bei allen intrazellulären Strukturen, die von Mykorrhizapilzen ausgebildet werden, durchstößt auch bei der AM der Symbiont nie das pflanzliche Plasmalemma, stets bleiben die Hyphen des Pilzes außerhalb des

Wirtscytoplasmas (Dexheimer & Pargney 1991). Es handelt sich also lediglich um eine Invagination der Wirtszelle (so bereits von Gallaud 1905 vermutet und von Cox & Sanders 1974 über Transmissions-Elektronenmikroskopie bestätigt), letztlich entsteht somit eine physiologisch und dementsprechend ultracytologisch hochspezialisierte Erweiterung des pflanzlichen Apoplasten, dessen ultrastruktureller Aufbau und enzymatische Ausstattung in den letzten Jahrzehnten immer weiter entschlüsselt wurde (z. B. Gianinazzi et al. 1979, Dexheimer et al. 1979, Bonfante-Fasolo et al. 1981, Marx et al. 1982, Gianinazzi-Pearson et al. 1991, 2000; Bonfante & Perotto 1995, Bonfante & Genre 2010, Genre & Bonfante 2016). An den massiven Stammhyphen der Arbuskel findet man eine wirtszellstämmige Apposition von pflanzlichem Primärwandmaterial, dessen Dicke mit zunehmender Entfernung zum Arbuskelursprung stetig abnimmt und gegen Ende der feinsten Arbuskelendäste nicht mehr als konsistente Zellwand betrachtet werden kann, sondern nur noch aus einer dünnen Lage wenig - bis unpolymerisierter Primärwandkonstituenten wie Pektinen, Xyloglucanen, β -1,4-Glucanen, unveresterten Polygalacturonanen, Arabinogalactanen und hydroxyprolinreichen Glycoproteinen (HRGPs) (Bonfante & Perotto 1995; Gianinazzi-Pearson 1996, Hause & Fester 2005) besteht. Auch auf der Pilzseite ist die Hyphenwand der Arbuskelendäste ultrastrukturell modifiziert und signifikant dünner als die der Stammhyphne (Dexheimer et al. 1979, Bonfante-Fasolo 1984, Bonfante 2001). An der physiologischen Schnittstelle selbst, d. h. entlang der feinen Arbuskeläste des Symbionten, wird das Wirtsplasmalemma als Periarbuskuläre Membran (PAM) bezeichnet. Zwischen den Zellwänden der Symbionten befindet sich ein schmaler Zwischenraum von ca. 80 - 100 nm Durchmesser, der auch als Matrix bezeichnet wird und in dem u. a. Oligomere der pflanzlichen Primärwand nachweisbar sind (s. o.). Die PAM ebenso wie das Plasmalemma des Pilzes entlang der Arbuskel sind bezüglich ihrer ultracytologischen Komposition und Enzymausstattung spezifisch an den Stofftransfer vom Pilz in die Wirtszelle und vice versa angepasst und werden zusammen mit der Matrix, der Pilzzellwand und dem Pilzplasmalemma auch als symbiotisches Interface bezeichnet (Scannerini & Bonfante 1983; vgl. S. 57, Fig. 17a,b für eine Übersicht dieser Thematik).

Fig. 17 (S. 57): a) Schematischer Aufbau der symbiotischen Schnittstelle (*symbiotic interface*) des Arbuskels. In der Ausschnittsvergrößerung erkennt man von außen nach innen aufgezählt das pilzliche Plasmalemma (weiß), die pilzliche Zellwand (schwarz gezackt), die *interface matrix* (dunkelgrau) und die periarbuskuläre Membran (weiß) b) TEM-Aufnahme zweier Arbuskelendäste (E) innerhalb des Wirtszellcytoplasmas (H) mit ultracytologischer Auflösung der Wirt-Pilzschnittstelle. im = interfascikulärer Zwischenraum bzw. Matrix (entspr. *interface matrix*); pm = periarbuskuläre membran; c = wirtszellstämmige Zellwandauflagerung; N = Pilznucleus. Maßstab = 1 μ m. [verändert nach Bonfante & Genre 2016 (a) und Dexheimer et al. 1979 (b)]



Die bisherigen Ausführungen stammen von Untersuchungen am Modell des *Arum*-Typs mit seinen terminalen Arbuskeln. Aufgrund ihrer offensichtlichen Anpassung an den intersymbiotischen Stofftransfer wurden Arbuskel lange als das zentrale Charakteristikum einer physiologisch aktiven, mutualistischen AM betrachtet (Bécard & Piché 1989, Gianinazzi-Pearson et al. 1995). Wie verhält es sich nun aber mit der Ultrastruktur des symbiotischen Interface in den diesbezüglich weit weniger gut erforschten *Paris*-Typen? Die bisherigen Untersuchungen deuten auf eine große Ähnlichkeit im ultracytologischen Aufbau der intrazellulären Schnittstelle zwischen lateralen Arbuskeln und Wirtsplasmalemma hin (Karandashov et al. 2004, Smith et al. 2004, Dickson et al. 2007). Allerdings wird das Interface beim *Paris*-Morphotyp durch die intrazellulären Hyphenknäuel signifikant ergänzt, denn die Hyphenknäuel scheinen der Proteinausstattung des anliegenden Pilz- und Wirtsplasmalemmas nach zu urteilen ebenfalls am Stofftransfer zwischen den Symbionten beteiligt zu sein. Da auch die *Paris*-Typ-Knäuel eine vergleichbar große stoffwechselaktive Oberfläche wie terminale (*Arum*-Typ) Arbuskel besitzen können, deutet dies auf eine ähnlich

wichtige Rolle dieser Strukturen im Stoffaustausch hin (Dickson & Kolesik 1999). Dickson und Kolesik verweisen hierbei allerdings auch auf das größere Volumen-Oberfläche-Verhältnis in den terminalen Arbuskeln des *Arum*-Typs, so dass diese Struktur vor dem Hintergrund der geringeren anabolischen Investition für dessen Etablierung als speziell angepasst an einen sehr effizienten Stofftransfer gelten darf.

III.6.2 Stoffflüsse zwischen den Symbionten

Phosphat

Die Verbesserung der Aufnahme von Phosphat (P) wurde bereits frühzeitig als ausschlaggebend für das Wachstumssteigerung arbuskulär mykorrhizierter Pflanzen (vgl. Koide & Mosse 2004) erkannt (bis zu 90 %, in Einzelfällen sogar 100 % des Phosphats im Wirtsgewebe kann über den AM-Pilz in die Pflanze transferiert worden sein; Smith & Smith 2011; Van der Heijden et al. 2015). Die extraradikalen Hyphen der AM-Pilze besitzen nur eine sehr eingeschränkten Fähigkeit Kohlenhydrate aufzunehmen (Azcón-Aguilar et al. 1999, Bago et al. 2000). Neben der Besiedlung weiterer Wirte, dient das Außenhyphensystem daher vornehmlich dem Zweck, neue Bodenareale als Quelle der Mineralstoffversorgung, also vor allem Phosphat, für die Wirtspflanze zu erschließen. Letztere Funktion wird durch die voranschreitend feineren Verzweigungen des Außenhyphensystems gewährleistet, welche zum einen die feinporigen Bodenstrukturen explorieren und zum anderen die Nährstoff-Verarmungszone überwinden können, die sich zwangsläufig aufgrund der wirtseigenen Mineralstoffaufnahme in der Wurzelperipherie ausbildet. Diese signifikante Verbesserung der Mineralstoffaufnahme ist besonders für die Aufnahme des essentiellen Makronährstoffs Phosphat von großer Bedeutung, da dieses Element im Boden bei typischen pH-Regimen vornehmlich als negativ geladenes, wenig mobiles Orthophosphat-Ion (HPO_4^{2-} bzw. H_2PO_4^-) auftritt, häufig in Form von Aluminium-, Calcium- oder Eisensalzen (Bialeski 1973, Rhodes & Gerdemann 1975, Saito & Ezawa 2016). In den letzten Jahren lieferten verfeinerte methodische Ansätze ein besseres Verständnis der Morphologie und der physiologischen Funktion des bis dahin experimentell äußerst schwer zugänglichen, gleichwohl für den symbiotischen Mineralstofftransfer so zentralen, extradikalen Teil des pilzlichen Mikrosymbionten. So konnte an den Enden der verzweigten Hyphen des Außenhyphensystems, eine bäumchenartig dichotom verzweigte Struktur, die große Ähnlichkeit mit den intraradikalen Arbuskeln zeigt, nachgewiesen werden. Wegen dieser morphologischen Ähnlichkeit wurde zuerst der Begriff *arbuscule like branches* bzw. *arbuscule like structures* (Mosse & Hepper 1975, Bago et al. 1998a) und später

branched absorbing structures (BAS) für diese Strukturen geprägt (Bago et al. 1998b). Aufgrund ihrer Ausbildung zeitlich erst nach erfolgter intraradikaler Besiedlung, ihrer feinen Verzweigung und dünnen Zellwände sind die BAS optimal für die Aufnahme mineralischer Nährstoffe geeignet. Eine Hypothese, die auch durch ihre an Arbuskel erinnernde, kurze Lebensdauer und der daher anzunehmenden ebenfalls hohen Stoffwechselaktivität Unterstützung erfährt (Bago 2000). Somit erscheint der arbuskuläre Mykorrhizapilz in besonderem Maße angepasst, mineralische Nährstoffe aus dem Boden zu mobilisieren und der Wirtswurzel zukommen zu lassen. Für Phosphat konnten auch schon vergleichsweise früh zwei verantwortliche Hochaffinitäts-Phosphattransporter (GiPT & GvPT, *Glomus irregularis* bzw. *Glomus versiforme phosphate transporter*, ein H⁺/Pi-Symporter) in der Plasmamembran der Außenhyphen von *Rhizophagus irregularis* und *Glomus versiforme* identifiziert werden (Harrison & Van Buuren 1995, Maldonado-Mendoza et al. 2001). In der Folgezeit wurden weitere Pi-Importer wie der (*low-affinity*)-P-transporter Pho91p in den AMF nachgewiesen. Diese Transporter fand man interessanterweise nicht nur in den Außenhyphen, sondern zusätzlich (GiPT) bzw. exklusiv GmosPT (*Glomus mosseae phosphate transporter*) intraradikal im Plasmalemma der Arbuskel, wo sie vermutlich mit den wirtseigenen P-Importern um Phosphat im Matrixraum konkurrieren und daher offenbar an der Stoffflussregulation beteiligt sind (Benedetto et al. 2005, Balestrini et al. 2007, Gomez-Ariza et al. 2009, Tisserant et al. 2012). Positive Expressionsfaktoren der Hochaffinitäts-Transporter sind eine geringe P-Konzentration im Boden und im Cytoplasma des Pilzes (Maldonado-Mendoza et al. 2001). Das über die Transporter aufgenommene Orthophosphat wird nach aktuellem Forschungsstand in Form von Poly-Phosphat in den pilzlichen Vakuolen in Richtung der symbiotischen Schnittstelle im Inneren der Wurzel transportiert. Eventuell ist auch eine wiederholte De- und Repolymerisierung am Tonoplasten ein Teil des Transports, in jedem Falle scheint aber ein simultaner Einstrom von Kationen (Mg²⁺, Ca²⁺, K⁺, Na⁺) aus dem Medium in das Cytoplasma und von dort in die Vakuole den negativen Ladungsträger Phosphat elektrochemisch zu kompensieren (Kikuchi et al. 2014, 2016). Als treibende Kraft für den Phosphateinstrom wird sowohl ein Diffusionsgradient, aufrechterhalten über eine Phosphat-Senke in den intraradikalen Teilen des Hyphensystems, als auch ein Wasserstrom in das Außenhyphensystem diskutiert. In ersterem Falle wäre der P-Verbrauch des Wirtes die eigentliche Ursache für den P-Sink im intraradikalen Hyphensystem und in letzterem ist der Antrieb die Wirtspflanzentranspiration, welche ein Wasserpotentialgefälle erzeugt, dessen Gradient sich über wirts- und pilzspezifische Aquaporine bis in die Peripherie des Außenhyphensystems fortsetzt. Letzeres Modell scheint sich in der Forschung durchzusetzen (vgl. Kikuchi et al. 2016, Saito & Ezawa 2016, Ezawa & Saito 2018).

Der Phosphattransfer vom Pilz in den Wirt findet nach bisherigen Erkenntnissen vornehmlich an der physiologischen Schnittstelle der feinen Verzweigungen des Arbuskels statt. Die Exportform des Phosphats ist, wie bei der initialen Aufnahme aus dem Boden, inorganisches Orthophosphat (vgl. Smith & Read 2008 S. 118 pp. für eine Übersicht). Über ultracytoenzymologische (Marx et al. 1982, Gianinazzi-Pearson & Gianinazzi 1988, Gianinazzi-Pearson et al. 1991) und später auch molekulare Verfahren (Krajinski et al. 2014, Wang et al. 2014) wurde der Nachweis von H⁺-ATPase-Aktivität bzw. deren Expremierung an der PAM und der pilzseitigen Plasmamembran entlang der vitalen Arbuskeläste und dem Arbuskelstamm erbracht und somit auch die Erklärung für die charakteristische Ansäuerung des interfascikulären Zwischenraums (Guttenberger 1998 zitiert in Bago 2000). Diese Befunde deuten stark auf eine chemiosmotische Energetisierung entlang des symbiotischen Interface hin und stützen die Funktion des Arbuskels bzw. der arbuskulären Knäuel als zentrale Orte des bidirektionalen Stofftransfers (Bago 2000). In den letzten Jahren konnte dieses Modell durch den molekularen Nachweis von Phosphattransportern in der PAM sowie Zuckertransportern in der pilzlichen Cytoplasmamembran weiter ausgebaut werden (z.B. Harrison et al. 2002; Helber et al. 2011). Drei unterschiedliche Typen von mykorrhizaassoziierten Phosphattransportern an der PAM können hierbei unterschieden werden. So existieren solche, die erst über die Ausbildung von Arbuskeln bzw. Hyphen-Knäueln in ihrer Expression induziert werden [sog. mykorrhizaspezifische Phosphattransporter wie z.B. MtPT4 (aus *Medicago truncatula*) und OsPT11 (aus *Oryza sativa*)] und wiederum andere, die eine Grundexpremierung aufweisen, in besiedelten Wurzelzellen allerdings deutlich stärker expremiert werden [sog. induzierbare Phosphattransporter, z.B. LjPt3 (aus *Lotus japonicus*)] letztlich wurde eine weitere eigenständige Gruppe von Phosphattransportern beschrieben, OsPT13 und AsPT1 (letzterer stammt aus *Astragalus sinicus*), die vermutlich nicht primär für den eigentlichen Phosphattransfer in das Wirtscytoplasma, sondern für die Regulation der Symbiose und hier vor allem die Arbuskelentwicklung und deren Vitalitätsspanne mitverantwortlich sind (vgl. Kapitel III.6.3). In diesem Zusammenhang scheinen allerdings auch mykorrhizaspezifische Transporter, wie der bereits erwähnte MtPT4, eine wichtige Rolle zu spielen. Abschließend ist zu betonen, dass die tatsächliche Transferrate des Phosphats ebenfalls stark von der jeweiligen Pilz-Wirtskombination abhängt und unterschiedliche Pilzisolat hierbei deutliche Unterschiede zeigen (Klironomos et al. 2003, Mensah et al. 2015; vgl. Kapitel III.7).

Weitere Nährstoffe

Die besondere Bedeutung des Phosphats für die in der Regel positive Wirtsreaktion auf die Mykorrhizierung sollte nicht darüber hinwegtäuschen, dass auch andere Nährstoffe vom Pilz in die Pflanze transferiert werden. Neben Schwefel, Kalium und Magnesium, deren tatsächliche Bedeutung als mykorrhizatransferierte Nährstoffe noch unsicher bzw. in einigen Fällen vermutlich eher gering (aufgrund der i. d. R. hohen Verfügbarkeit im Boden) oder indirekt sind (über eine P-induzierte Wachstumssteigerung des Wirtes und eine damit verbesserte endogene Aufnahmefähigkeit) und den Mikronährstoffen (Eisen, Chlor, Kupfer, Zink, Mangan, Nickel, Bor, und Molybdän; Smith & Read 2008, Allen & Shachar-Hill 2009, Watts-Williams & Cavagnaro 2014, Garcia & Zimmermann 2014, Garcia et al. 2016, Ruytinx et al. 2016) ist hier vor allem Stickstoff (N) zu nennen (Bücking & Kafle 2015). Lange herrschte die Auffassung, die AM habe im Gegensatz z. B. zur ericoiden Mykorrhiza wenig Bedeutung für die Aufnahme dieses, neben Phosphat, wichtigsten mineralischen Pflanzennährstoffs. Diese Annahme basierte auf Indizien, wie das häufige Vorkommen der AM in nicht N-limierten Habitaten, der im Vergleich zu Phosphat höheren Bodenmobilität der physiologisch relevanten anorganischen Stickstoffquellen wie Ammonium (NH_4^+) und Nitrat (NO_3^-). Neuere Daten sprechen allerdings dafür, dass auch Stickstoffverbindungen über die Außenhyphen des AMF aufgenommen und in die Wirtswurzeln transferiert werden (Ames et al. 1983; Johansen et al. 1996; Jin et al. 2005, Hodge et al. 2010). Der Nährstoff wird von den Hyphen, aber nicht ausschließlich in anorganischer Form (preferentiell in Form von Ammonium), sondern wie lange Zeit unbekannt, ebenfalls aus organischen Quellen mobilisiert (Leigh et al. 2009). Im Falle des Nitrats, wird dieses direkt nach der Aufnahme zu Ammonium reduziert (Leigh et al. 2009) und nach dessen Primärfixierung in Glutamin (Tian et al. 2010) und Umwandlung in Arginin von den Außenhyphen in die intraradikalen Hyphenanteile transportiert (z. B. Cruz et al. 2007, Fellbaum et al. 2012b). In den Arbuskeln wird Ammonium vom Arginin abgespalten und sehr wahrscheinlich auch als solches in den interfascikulären Zwischenraum transloziert. Hierbei scheint nach bisherigen Erkenntnissen kein aktiver Export von Ammonium, sondern nur dessen passiver (d. h. diffusionsgetriebener) Efflux vorzuliegen, wobei der Exportprozess eventuell über Aquaporine erleichtert wird. Eine Rückabsorption (Kontrolle) über aktiven Transport ist aber sehr wahrscheinlich (Govindarajulu et al. 2005, Bücking & Kafle 2015). Wenn, was aber noch nicht endgültig geklärt ist (Courty et al. 2016), tatsächlich Ammonium die vom Pilz transferierte Form des Stickstoffs sein sollte, so könnte ein erst kürzlich nachgewiesener Transporter (LjAMT2;2) in der PAM Ammonium binden und nach Abspaltung eines Protons als Ammoniak (NH_3) in die Wirtszelle überführen (Guether et al. 2009). Für eine

detaillierte Behandlung der Thematik wird auf den Review von Bücking & Kafle (2015) verwiesen. Die Aufnahme von Stickstoff über die AM kann unter Laborbedingungen substantiell sein (20 - 74 % des aufgenommenen Stickstoffs können von der Mykorrhiza stammen; Corrêa et al. 2015). Ähnlich wie im Phosphattransfer existiert aber auch hier eine starke Abhängigkeit der N-Transferrate von der jeweiligen Wirts-Pilz-Kombination (Mensah et al. 2015). Im Vergleich zum Phosphat ist die Signifikanz der AM für die Stickstoffaufnahme des Wirtes bisher noch schwer einschätzbar. Neben den bereits genannten Aspekten beruht dies darauf, dass ein erhöhter Stickstoffgehalt in mykorrhizierten Pflanzen ebenfalls das Resultat der verbesserten P-Aufnahme oder ein anderweitig gearteter, nicht direkt auf die erhöhte N-Aufnahme rückführbarer synergistischer Effekt sein kann und vor allem auf den nach wie vor widersprüchlichen Ergebnisse der vorhandenen Studien (siehe Corrêa et al. 2015 für eine umfassende Bearbeitung dieser immer noch strittigen Fragen). Dennoch, speziell unter Bedingungen geringer Verfügbarkeit asymbiotisch zugänglichen Stickstoffs (z. B. in trockenen Böden) bei gleichzeitiger N-Limitierung des Wirtswachstums, sollte die im Vergleich zu den Wurzeln nachweislich deutlich höhere N-Aufnahmeeffizienz der Hyphen bedeutsam für die ökologische Fitness der Pflanze sein. Dies wird über die Studien von Nouri et al. (2014) und Mensa et al. (2015) nahegelegt, welche die positiven Wachstumseffekte der untersuchten Wirtspflanzen nach Inokulation mit AMF-Isolaten nicht mehr nur auf die erhöhte Phosphat-, sondern ebenfalls auf die verbesserte Stickstoffversorgung zurückführen (vgl. Fig. 18 für eine detaillierte Darstellung der P- und N-Aufnahme in der AM).

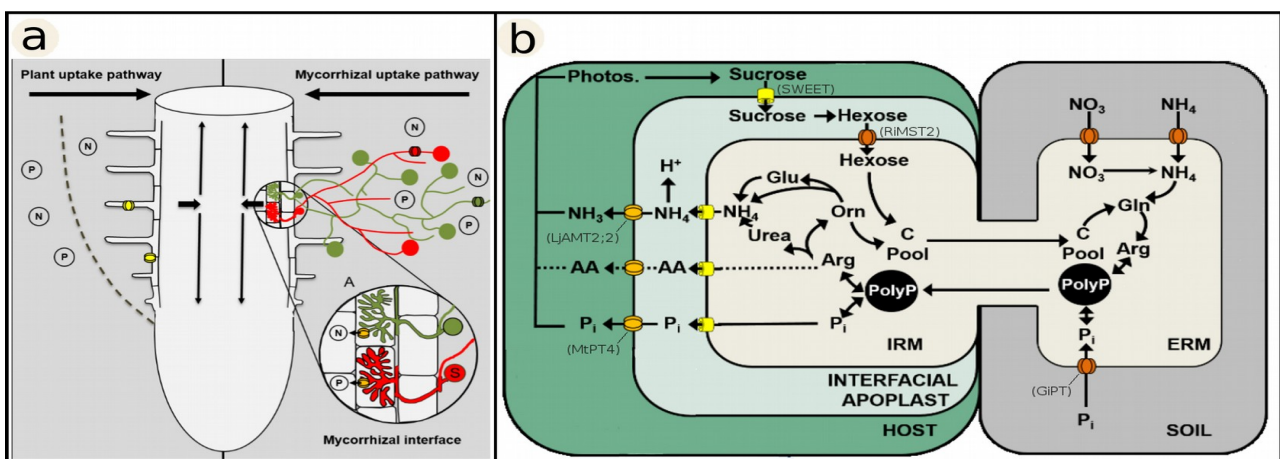


Fig. 18: a) Vergleich der rein pflanzlichen (links) vs. symbiotischen Aufnahmewege (rechts) für Phosphat (P) und Stickstoff (N). b) Detailliertes Schema der Aufnahme von anorganischem Phosphat (Pi), Nitrat (NO₃) und Ammonium (NH₄) aus dem Boden über den Pilzsymbionten und Transfer in die Wirtszelle im Austausch mit Kohlenhydraten (Sucrose/Hexose, vgl. auch Fig. 19) mit Darstellung der beteiligten Transporter. (nach Bücking & Kafle 2015)

Zucker

Im Gegenzug zu den mineralischen Nährstoffen stellt die Wirtswurzel dem pilzlichen Symbiosepartner Assimilate zur Verfügung [bis zu 20 % des fixierten Kohlenstoffs (C) wird an den pilzlichen Symbionten überführt], welche der Pilz über sein intraradikales Hyphensystem aufnimmt und damit seinen Kohlenhydratbedarf vollständig deckt (Ho & Trappe 1973, Jakobsen & Rosendahl 1990, Wright et al. 1998a,b; Smith & Read 2008, Boldt et al. 2011). Zuckertransporter wurden zuerst in *Geosiphon pyriformis* [*Geosiphon pyriformis Mycorrhizal Sugar Transporter 1* (GpMST1); Schüßler et al. 2006], dem einzigen bekannten Glomeromycet, welcher keine Mykorrhiza ausbildet, aber wenig später auch in *Glomus* sp. [*Rhizophagus irregularis Mycorrhizal Sugar Transporter 2* (RiMST2); Helber et al. 2011] und damit in einem dezidiert mykorrhizaspezifischen Kontext nachgewiesen. Vor allem die Entdeckung von (Ri)MST2 hat hierbei geholfen, die Diskussion über den Ort der Kohlenhydrataufnahme durch den Symbionten aufzulösen. So konkurrierten seit den frühen neunziger Jahren zwei unterschiedliche Theorien über den vornehmlichen Ort der Zuckeraufnahme durch den Symbionten. Lange Zeit wurde die große Oberfläche des Arbuskels als prädestiniert für die Aufnahme der wirtsstämmigen Assimilate angesehen und auch deren häufig beobachtbare, histologische Position in direkter Nähe des saccharoseführenden Phloems im Zentralzylinder dahingehend interpretiert (z. B. Blee & Anderson 1998, Appelhans et al. 2008). Demgegenüber deutete der Befund deutlicher H⁺-ATPase-Aktivität entlang der interzellulären Hyphen (und nicht wie nach dem klassischen Modell erwartet an den feinen Arbuskelendhyphen) auf eine räumliche Entkopplung von Phosphatabgabe und Zuckeraufnahme durch den Pilz hin (Gianinazzi-Pearson et al. 1991). Auch zeigen arbuskeldefiziente Wirtsmutanten weiterhin intrazelluläres Hyphenwachstum (Gianinazzi et al. 1991), welches ebenfalls auf die Fähigkeit interzellulärer Hyphen Kohlenhydrate aufzunehmen verweist. Trotz überzeugender physiologischer und evolutionsbiologischer Argumente, die geeignet sind, diesen Befunden ihren Wert als Ausschlusskriterium für das Arbuskel als Ort der Zuckeraufnahme zu nehmen (siehe Bago 2000 für eine kritische Analyse) und späteren, molekularbiologischen Untersuchungen, welche eine starke Expression von H⁺-ATPasen in der PAM auch entlang des gesamten Arbuskels beobachteten (Gianinazzi-Pearson et al. 2000), erfreute sich die Idee von der räumlichen Entkopplung von Phosphat- und Zucker-Aufnahme anhaltender Beliebtheit (Gianinazzi-Pearson et al. 1995, Smith et al. 1994, Smith & Smith 1996, Harrison 1999, Smith & Read 2008). Erst der Nachweis von MST2 im Arbuskel, rehabilitierten dieses als wichtigen Ort der pilzlichen Kohlenhydrataufnahme, ohne hiermit aber eine Funktion der interzellulären Hyphen für die Kohlenhydrataufnahme auszuschließen (Helber et al. 2011) - ein

Aspekt, der vor allem für die Bewertung der pilzliche Zuckeraufnahme in den Pflanzen mit einem *Paris*-Typ wichtig ist. Durch Affinitätsstudien an MST2 durch Helber und Mitarbeiter (2011) wissen wir nun auch, dass vor allem Glukose, im geringeren Umfang auch Fruktose, die vom Pilz letztlich aufgenommene Form von Kohlenhydraten zu sein scheint - ein Befund, der frühere Vermutungen bestätigt (u. a. Blee & Anderson 1998; Bago 2000) und offenbar auch für andere Mykorrhizaformen zutrifft (Nehls et al. 2016). Neben diesen Zuckerformen werden aber auch Mannose und Xylose in geringerem Umfang von dem MST2 transloziert und vergleichbare Affinitäten wurden auch für (Gp)MST1 beschrieben (Schüßler et al. 2006, Helber et al. 2011). Hemicellulosen wie Xyloglucan (mit Xyloseresten als Substituenten) sind wichtige Bestandteile der pflanzlichen Primärwand und liegen als Oligomere auch in der interfascikulären Matrix vor. Dies ist wiederum mit größter Wahrscheinlichkeit ausschließlich auf die enzymatische Aktivität der Wirtspflanze zurückzuführen (Maldonado-Mendoza et al. 2005, Tisserant et al. 2012, 2013). Diese vergleichsweise neue Erkenntnis spricht stark für die Fähigkeit des Wirtes, neben Glukose auch niedermolekulare Zellwandbestandteile als zusätzliche C-Quelle für den Symbionten bereitzustellen (Bitterlich et al. 2016) - eine Hypothese, welche auch durch die Arbeit von Garcia-Garrido et al. (1999) unterstützt wird, in der eine grundsätzliche Fähigkeit von AM-Pilzen Xylose als Energiequelle zu nutzen nachgewiesen wurde.

Auf der Seite des Pflanzenwirts wiederum existieren eine Reihe bereits seit längerer Zeit bekannter Zuckertransporter, die als Kandidaten für den spezifischen Export von Kohlenhydraten über die PAM in die interfascikuläre Matrix gelten. Harrison (1996) identifiziert einen wirtsseitigen Monosaccharid-Transporter (*Medicago truncatula Sugar transporter 1*; MtSt1) mit hoher Affinität zu Glukose und Fruktose und in arbuskulär mykorrhizierten Wurzelzellen von *Medicago truncatula*. Ein weiterer Hexosetransporter wurde Jahre später wiederum in *M. truncatula* spezifisch im mykorrhizierten Wurzelgewebe nachgewiesen (MtHext1; vgl. Courty et al. 2016). Neben dem effektiven Export von Hexosen scheint diese Transporterklasse auch die Reabsorption derartiger Kohlenhydrate aus dem Matrixraum zu ermöglichen und ist daher vermutlich von besonderer Bedeutung für die Kontrolle des Stoffflusses an der symbiotischen Schnittstelle (Manck-Götzenberger & Requena 2016; vgl. S. 66, Fig. 19). In den letzten Jahren wurden aber auch eine weitere Gruppe pflanzlicher Zuckertransporter entdeckt, die von mindestens ebenso großer Bedeutung für die Symbiose ist. Diese zur Klasse der SWEET (*Sugar Will Eventually be Exported Transporter*) gehörigen Transporterproteine sind effiziente Transporter von Hexosen wie z. B. Glukose (Chen et al. 2010). SWEET-Transporter sind damit auch wichtige Kandidaten für den Export pflanzlicher Assimilate entlang der PAM in die Matrix des interfascikulären Zwischenraums.

Für letztere Hypothese sprechen auch die modifizierten Transkriptionsprofile einiger SWEET-Transporter in den Wurzeln AMF-besiedelter Pflanzen (Manck-Götzenberger & Requena 2016). Da SWEET-Transporter aber auch Sucrose transportieren, könnte auch die Transportform pflanzlicher Assimilate direkt in den interfascikulären Zwischenraum exportiert werden und an der Kohlenhydratversorgung des Mikrosymbionten teilhaben. Dies würde allerdings die Spaltung von Sucrose in Glucose und Fructose sehr wahrscheinlich über wirtsstämmige Invertasen im interfascikulären Zwischenraum bedingen (Courty et al. 2016, Manck-Götzenberger & Requena 2016; S. 66, Fig. 19). Ein Szenario, welches sowohl mit Transkriptomanalysen der Pilzsymbionten (diese exprimieren offenbar keine eigenen Invertasen) wie auch früheren Analysen konform geht (Blee & Anderson 2002; Schaarschmidt et al. 2006, Tisserant et al. 2012) und daher als besonders realistisches Modell betrachtet werden kann (z. B. Manck-Götzenberger & Requena 2016). Weitere Sucrosetransporter (SUTs) wie z. B. MtSUT1-1, 2 & 4, OsSUT4 und SISUT2 aus *M. truncatula*, *Oryza sativa* und *Solanum lycopersicum*, werden in ihrer Expression in Blättern und Wurzeln ebenfalls deutlich von einer Mykorrhizierung beeinflusst und dienen vermutlich der Anpassung an den erhöhten Assimilatbedarf in den besiedelten Wurzeln und dem Rücktransport von Assimilaten aus dem symbiotischen Apoplasten, d. h. auch hier wieder der Regulation und Kontrolle der Kohlenhydratversorgung des pilzlichen Symbionten (Courty et al. 2016).

Der Mikrosymbiont wandelt die vom Wirt aufgenommenen Hexosen vor allem in Trehalose, Glykogen und Lipide um, letztere stellen neben Glykogen die wichtigste Transportform des Kohlenstoffs innerhalb des extraradikalen Hyphensystems dar (Pfeffer et al. 1999, Bago et al. 2002, Bitterlich et al. 2016). Anabolisch aufwendige Prozesse wie die Chitinbiosynthese oder die Sporenproduktion erzeugen eine ausgeprägte C-Senke im Außenhyphensystem des Pilzes (Wright et al. 1998a,b). Um den resultierenden Konzentrationsgradienten auszugleichen, werden auf der intraradikalen Seite des Hyphensystems die vom Wirt aufgenommenen Hexosen sehr schnell in Trehalose, Glykogen und Mannitol umgewandelt und in die Außenhyphen transportiert. Hierbei wird besonders die schnelle enzymatische Umwandlung des Transportzuckers Saccharose in Hexosen (über apoplastische Invertaseaktivität) und auf der Pilzseite deren schneller Umbau in die bereits genannten, pilzeigenen Kohlenstoffträger als wichtiger Faktor bei der Aufrechterhaltung eines ausgeprägten Source-Sink-Gradienten entlang der symbiotischen Schnittstelle diskutiert (Smith et al. 1994, Shachar-Hill et al. 1995). Dieses Sink-Source-Verhältnis scheint offenbar auch direkt Einfluss auf die Photosyntheserate in der Wirtspflanze zu nehmen und stimuliert den Nachfluss von Assimilaten in die besiedelten Wurzelabschnitte (Wright et al. 1998a,b). [Alternativ wird hier aber auch eine verbesserte Wasser- und Nährstoffversorgung als indirekte Auslöser für die erhöhte Assi-

milation und damit Translokationsrate in die Wurzeln diskutiert (Boldt et al. 2011)]. Doch auch vor der eigentlichen Besiedlung der Wurzel regt der AM-Pilz bereits die Translokation von Assimilaten in die Wurzeln und deren Speicherung in Form von Stärke an und „sichert“ dadurch die Assimilatversorgung des Endosymbionten in dem potentiellen Wirt (Gutjahr et al. 2009). Für eine detaillierte Übersicht der Thematik des mykorrhizaassoziierten Transportoms wird hier auf Courty et al. (2016) und Garcia et al. (2016) verwiesen.

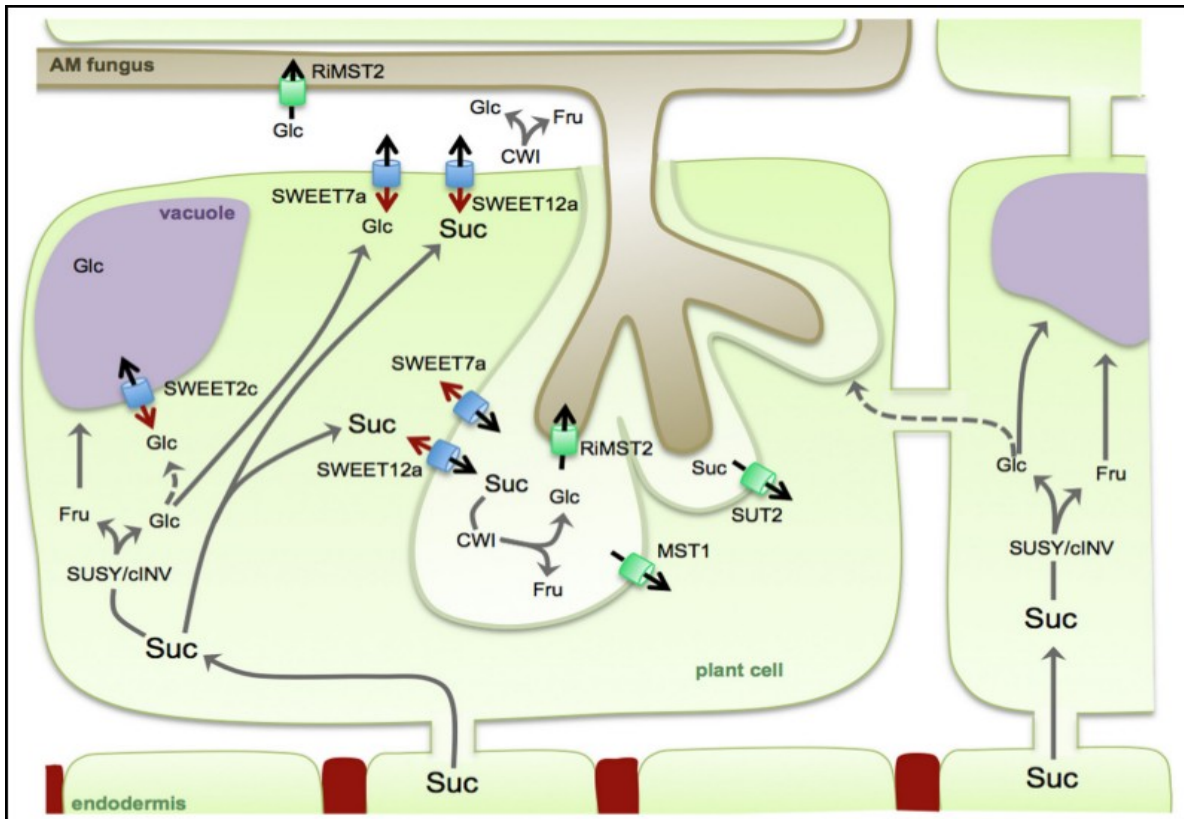


Fig. 19: Assimilattransport in den Wurzeln einer AM. Sucrose gelangt auf symplastischem Weg aus dem Zentralzylinder in die vom Pilz besiedelten „Sink“-Zellen des Cortexparenchymys. SWEET-Transporter transportieren die Sucrose entlang der PAM in den interfascikulären Zwischenraum, wo Invertasen Sucrose in Glucose und Fructose spalten und die Glucose vom pilzlichen Hexosetransporter (RiMST2) aufgenommen wird. Dies kann aber auch an den interzellulären Hyphen stattfinden. Reguliert wird die Hexose- und Sucrosekonzentration in der Matrix über Reabsorption durch den Wirt (MST1 und SUT2). Auch unbesiedelte Nachbarzellen des Cortexparenchymys zeigen erhöhte Invertaseaktivität und tragen so zur Glukoseversorgung der arbuskelbesiedelten Zellen bei. (nach Manck-Götzenberger & Requena 2016)

Die bisher ausgeführten Erkenntnisse wurden fast ausschließlich an Wirtspflanzen gewonnen, die einen *Arum*-Typ ausbilden. Wie verhält sich dies aber im *Paris*-Typ? Aufgrund der bereits angesprochenen Ähnlichkeit im Aufbau der PAM entlang der lateralen Arbuskel bzw. Hyphen der

Paris-Typ Knäuel (vgl. Kapitel III.6.1) und der Berichte über positive Wachstumseffekte in den Wirtspflanzen mit *Paris*-Typ (Cavagnaro et al. 2003, Smith et al. 2004), weist dies stark auf eine grundsätzliche Ähnlichkeit der physiologischer Mechanismen in beiden Morphotypen hin (Fedderman et al. 2010). Hierdurch wird der Eindruck gestützt, dass mögliche funktionelle Unterschiede der beiden Strukturtypen vermutlich eher vor ihrem spezifischen, evolutionären und ökophysiologischen Kontext zu bewerten sind.

III.6.3 Kontrolle der Stoffflüsse an der symbiotischen Schnittstelle (Interface)

Die obligat biotrophe Natur des pilzlichen Symbionten sowie die Fähigkeit der Wirtspflanzen zur autonomen Nährstoffversorgung stützen prinzipiell die Einschätzung, primär der Pflanzenwirt kontrolliere den Nährstofftransfer am symbiotischen Interface. Fitter (2006) schlägt hingegen eine Selbstregulation der Stoffflüsse vor, bei der eine lokale, pilzinduzierte Erhöhung der Phosphataufnahme im Wurzelsystem zu einer präferentiellen Allokation von Assimilaten in den betroffenen Wurzelbereich führt und der Pilz von der zwangsläufigen Erhöhung der apoplastischen Kohlenhydratkonzentration profitiert (in der Tat ist die gerichtete Allokation von Assimilaten in Bereiche des Wurzelsystems, welche Kontakt zu einer ergiebigen Phosphat-Quelle haben belegt; siehe auch Helgason & Fitter 2009). Dementgegen existieren aber schon seit längerem Hinweise auf einen antiproportionalen Zusammenhang zwischen Phosphat-Konzentration im Boden und der Besiedlungsdichte bzw. der Kohlenstoff-Allokation in Richtung Pilzsymbiont (Miller et al. 1995, Olsson et al. 2002). Darüber hinaus ist die Wirtspflanze offenbar tatsächlich in der Lage eine Verringerung des Phosphat- und wie es scheint auch des Stickstofftransfers durch geringere Assimilatversorgung des AM-Pilzes zu „sanktionieren“ bzw. eine ausreichende Versorgung mit einem erhöhtem Assimilattransfer in die besiedelten Regionen zu „belohnen“ (Olsson et al. 2002, Javot 2007, Bever et al. 2009, Kiers et al. 2011). So werden, wenn die Wirtspflanze einen physiologisch adäquaten Phosphatstatus erreicht hat, die mykorrhizainduzierten Phosphat-Transporter in der PAM herabreguliert und es kommt zu einer deutlichen Verringerung der Vesikelausbildung und der allgemeinen Besiedlungsdichte inklusive der Arbuskelzahl (Abbott & Robson 1979, Nagy et al. 2009). Diese Ergebnisse wurden in den letzten Jahren über *loss-of-function*-Mutanten eines wirtsseitigen Phosphat-Transporters in der PAM (MtPT4) erweitert, welche zusätzlich zu den bereits genannten Reaktionen eine deutlich verkürzte Lebensdauer der Arbuskel aufweisen (Javot et al. 2007, Yang et al. 2012, Willmann et al. 2013). Die Expression eines weiteren Transporters in der PAM (MtAMT2;3) kann unter N-Mangel den Effekt der MtPT4-Mutation aufheben (Javot et al. 2011) - ein Beleg für die genaue Evaluation der Menge und des

physiologischen Wertes des transferierten Nährstoffs am physiologischen Interface (Bücking & Kafle 2015, Courty et al. 2016, Gutjahr & Parniske 2017). Die Ansicht einer alleinigen oder zumindest präferentiellen pflanzlichen Steuerung des Nährstofftransfers aber muss auf Basis aktuellerer Untersuchungen mittlerweile als überholt angesehen werden. So legt die Expression spezifischer Transporter in den besiedelten Zellen die Fähigkeit beider Symbiosepartner nahe, über diese Systeme eine Reabsorption der jeweiligen Nährstoffe (speziell P aber auch N auf Pilzseite und Assimilate auf Seiten des Pflanzenwirts) aus dem interfascikulären Zwischenraum und damit ein gewisses Maß von Kontrolle über die Stofftranslokation auszuüben (Benedetto et al. 2005, Bücking & Kafle 2015, Courty et al. 2016; vgl. Kapitel III.6.2). Ebenso wichtig ist die Erkenntnis, dass eine (in ihrem Ausmaß je nach Pilztaxon variable) Suppression des wirtseigenen (endogenen) P- und N-Aufnahmesystems durch den Pilz parallel zu dessen Etablierung im Wurzelsystem erfolgt. Dies wird begleitet von einer Induktion der Expression symbiosespezifischer P- und N-Transporter in der PAM (Bücking & Kafle 2015, Mensah et al. 2015), so dass der Wirt für die Deckung seines Phosphat- und sehr wahrscheinlich auch Stickstoff-Bedarfs verstärkt auf den pilzlichen Symbionten angewiesen ist (Smith et al. 2003, 2004; Li et al. 2006). Mit am interessantesten erscheinen aber Hinweise auf die Fähigkeit des Pilzes, eine erhöhte Kohlenhydratversorgung entlang der symbiotischen Schnittstelle direkt mit einer verbesserten Phosphat- und Stickstoff-Versorgung gutieren zu können (Bücking et al. 2005, Hammer et al. 2011, Fellbaum et al. 2012a; vgl. S. 69, Fig. 20). In der Natur, wo i. d. R. ein Pilzindividuum mit vielen Wirtspflanzen gleichzeitig interagiert, können daher offenbar auch die pilzlichen Symbionten gute von weniger guten Wirten anhand deren Fähigkeit Assimilate zu transferieren unterscheiden und allozieren ihre Nährstoffe präferentiell in den besseren Wirt bzw. halten im Falle einer weniger ergiebigen Assimilatquelle Nährstoffe in ihren Hyphen und Sporen zurück (Hammer et al. 2011, Fellbaum et al. 2014, Mensah 2016). Viele dieser Daten stützen am Ende ein Modell von *tit for tat* (Hammer et al. 2011), bzw. erweitert auf die spezielle Natur der Mykorrhiza, in der i. d. R. Viele mit Vielen gleichzeitig interagieren, das eines *biologischen Marktes*. Ein Stofftransfer, dessen Dynamik einem solchen Modell unterliegt, zeichnet sich durch eine bidirektionale Kontrolle der Stoffflüsse an der symbiotischen Schnittstelle aus. Keiner der beiden Partner besitzt absolute Kontrolle und die Transferraten unterliegen einer permanenten Reevaluierung des jeweiligen Wertes der transferierten Nährstoffe bzw. Assimilate vor dem Hintergrund des endogenen Nährstoffstatus der an der Interaktion beteiligten Symbionten. Das biologische Marktmodell hat sich erst in den letzten Jahren im Bereich der Mykorrhizaforschung etabliert. Sein theoretischer Unterbau wurde aber bereits deutlich früher formuliert (Noë & Hammerstein 1994, 1995) und schon einige Jahre später spezifisch auf die Mykorrhizasymbiose der

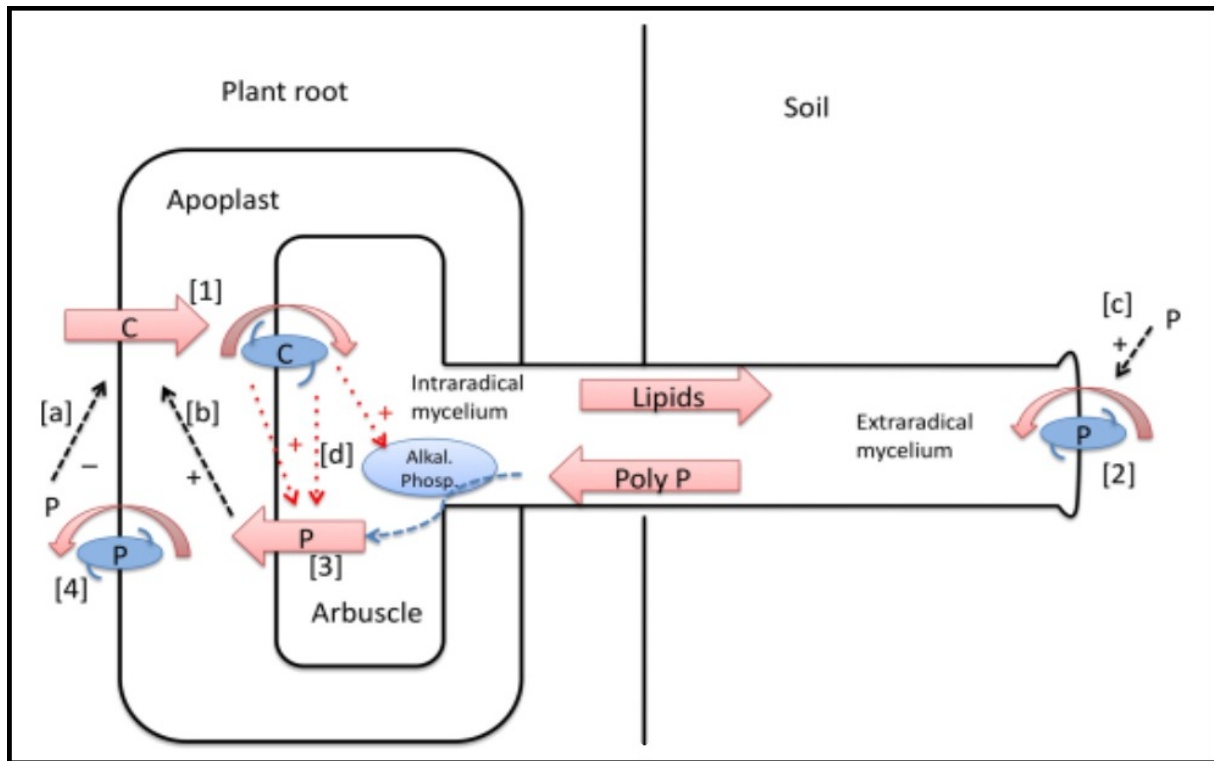


Fig. 20: Modell der reziproken Regulation des Assimilat- und Phosphattransfers entlang des symbiotischen Interface. [1] Import von assimilatstammigen Kohlenhydraten (C) in den symbiotischen Zwischenraum (Apoplast) am Arbuskel, stimuliert die Depolymerisierung von Poly-Phosphat zu Orthophosphat (P) und dessen Export in den symbiotischen Zwischenraum [d, 3]. Erhöhung der P-Konzentration im Apoplast stimuliert den C-Export in den symbiotischen Zwischenraum [b]. Verringerung des P-Exports in den Apoplast (entspr. hier dem interfascikulären Zwischenraum bzw. Matrix) führt zu vorzeitiger Seneszenz der Arbuskel. Aufnahme von P aus dem Apoplast [4] und Erhöhung der cytoplasmatischen P-Konzentration der Wirtszelle reduziert den Export von C in den symbiotischen Zwischenraum und die Expression von P-Importern in der PAM [a]. Die P-Konzentration, nicht aber C-Transfer in das extraradikale Myzel (in Form von Lipiden) beeinflusst die Aufnahme von Phosphat aus dem Boden über die Regulation der Expression von P-Importern [c, 2]. (nach Hammer et al. 2011)

AM angewandt (Schwartz & Hoeksema 1998, Kiers et al. 2006). Bezieht das biologische Marktmodell nur Assimilate (Wirt) und Phosphat (Pilz) als austauschbare Ressourcen in die Bilanz des symbiotischen „Handels“ ein, so beachtet das *trade balance modell* (Johnson 2010) als Erweiterung des Marktmodells auch Stickstoff bzw. ist offen für die Integration weiterer Nährelemente wie z. B. Kalium (Gomes et al. 2019b). Vor allem aber trägt das *trade balance modell* auch der Erkenntnis Rechnung, dass Nährstoffe bzw. Kohlenstoff nicht isoliert, sondern vor dem Hintergrund ihres stöchiometrischen Verhältnisses zueinander im Boden beziehungsweise, im Falle des Kohlenstoffs, im Wirt betrachtet werden sollten (C : N : P). So vergrößert eine hohe Stickstoffkonzentration im Boden die C-Verfügbarkeit (über den positiven Effekt von N auf die

Photosynthese), erhöht den C-Bedarf der Pilze (über erhöhte Protein- bzw. Biomasseproduktion), und dies wiederum entscheidet maßgeblich über das Resultat der symbiotischen Assoziation (*symbiotic outcome*) unter verschiedenen Phosphatregimen im Boden. Ist die Phosphatverfügbarkeit z. B. gering (N : P - Verhältnis sehr hoch), steigt der „Wert“ von P für den Wirt, der erhöhte C-Bedarf des Pilzes kann über einen physiologisch „gleichwertigen“ Austausch von P für C gedeckt werden und das *outcome* ist für beide Seiten daher positiv - es stellt sich eine mutualistische Beziehung zwischen den Symbionten ein. Ein hoher Phosphatgehalt im Boden vermindert hingegen dessen Wert als Handelsgut für den Pilz (N : P - Verhältnis = sehr klein), da dieser aber weiterhin Kohlenstoff vom Wirt erhält (wenn auch nun in verringerter Menge), kann der Mutualismus in eine eher parasitische Assoziation umschlagen. Dazwischen existieren N : P - Verhältnisse, in denen die Symbiose immer noch mutualistisch, aber C-limitiert ist (N : P - Verhältnis = ausgeglichen, aber beide limitierend) oder kommensalisch (N : P - Verhältnis = klein; N limitierend, P ist im Überschuss vorhanden) (Johnson 2010). Beide Modelle, also das biologische Marktmodell wie auch das *trade balance modell*, sind aber nicht nur für unser theoretisches Wissen über die mögliche Regulation des beidseitig regulierten Nährstofftransfers wichtig, sondern auch von fundamentaler Bedeutung für unser Verständnis der Evolution der arbuskulären Mykorrhiza, indem sie eine Erklärung bieten für die kritische Frage, wie eine Symbiose, besonders unter der erschwerenden Bedingung einer simultanen Interaktion zwischen vielen unterschiedlichen Taxa, evolutionär stabil sein kann (Trivers 1971, Frean & Abraham 2004, West et al. 2007).

III.6.4 Wasserstatus, Schwermetall- und Pathogenresistenz

Seit langem wird die signifikante Vergrößerung der Absorptionsfläche durch das feine Hyphengeflecht als grundsätzliche Erklärung für die erhöhte Trockenheitsresistenz arbuskulär mykorrhizierter Pflanzen herangezogen (Ruiz-Lozano et al. 2012). Im Detail sind die zugrundeliegenden Mechanismen allerdings immer noch nicht vollständig verstanden. So werden wirtseigene, symbioseregulierte Aquaporine ebenso wie die spezifische Expression pilzlicher Aquaporine an der symbiotischen Schnittstelle des Arbuskels als Erklärung für den erleichterten Wassereinstrom die Wirtswurzeln diskutiert (Aroca et al. 2007, 2009). Andere Modelle führen die erhöhte Trockenheitstoleranz der Pflanzen zurück auf die Ausbildung kontinuierlicher Wasserbrücken entlang der Hyphenoberfläche sowie den pilzvermittelten, engen Wurzel-Bodenkontakt (Allen 2007, Smith et al. 2010). Welches Modell sich am Ende auch durchsetzen wird, Augé et al. (2015) weisen eine bis zu 20 % erhöhte stomatare Wasserdampfleitfähigkeit in mykorrhizierten Pflanzen nach. Dies ist ein augenscheinlicher Beleg für den starken (positiven)

Einfluss der Symbiose auf den Wasserstatus des Wirtes und damit von großer Bedeutung speziell vor dem Hintergrund zunehmender globaler Durchschnittstemperaturen sowie die Notwendigkeit speziell in Agrarsystemen eine möglichst effiziente Wassernutzung zu gewährleisten.

Die erhöhte Resistenz gegenüber Schwermetallen ergibt sich vor allem aus der Schwermetallbindung an den Zellwänden der Pilzhyphen, der effizienten cytosolischen Komplexierung und dem schnellen Export der Metallionen aus dem Cytosol der Außenhyphen. (González-Guerrero et al. 2009). Bezüglich der erhöhten Pathogenresistenz wird ein Modell vorgeschlagen, das von der Modulation pflanzlicher Signalwege der Pathogenabwehr (u. a. über Salicylsäure & Jasmonat) durch den Mykorrhizapilz ausgeht. Hierdurch erfolgt die erhöhte Abwehrbereitschaft gegenüber einem eventuell nachfolgenden Pathogenbefall. Darüber hinaus scheint auch die Besetzung des Wurzelraums durch den Mykorrhizapilz ein Mechanismus zu sein, pilzliche Parasiten aus dem Wurzelraum auszuschließen (Newsham et al. 1995, Pozo & Azcón-Aguilar 2007, Smith & Read 2008).

III.7 Ist jede Pflanze-Pilzkombination mutualistisch?

Die Annahme, jede Mykorrhizierung führe zu einer Steigerung der Biomasse und damit verbunden der Fitness der Wirtspflanze, beruht auf der bereits durch Frank (1888) beobachteten Wachstumsverbesserung mykorrhizierter Wirtspflanzen im Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Kontrollen. Die positiven Effekte wurden daher sogar lange als zentrales Kriterium für den mutualistischen Charakter der Mykorrhizasymbiose herangezogen und diese Sichtweise hat sich seitdem, gestützt durch zahlreiche Wachstumsexperimente, in der Forschung etabliert (Jones & Smith 2004). Verständlicherweise wurde diese Einschätzung ebenfalls auf die AM übertragen und tatsächlich findet sich auch bei der AM i. d. R. eine signifikante Zunahme der Biomasse, welche als (positive) *mycorrhizal growth response (MGR)* bezeichnet wird und die Gewichtszunahme (Trockengewicht) von mykorrhizierten Pflanzen verglichen mit nicht-mykorrhizierten Kontrollpflanzen beschreibt. Eine positive MGR wird allerdings nicht in allen Wirtspilzkombinationen deutlich (viele Poaceae z. B. gelten als wenig responsiv bezüglich ihrer MGR; Smith & Read 2008) und ist selbst in responsiven Kombinationen stark von Außenfaktoren wie Wirtsdiversität und Phosphat-Verfügbarkeit abhängig. In Extremfällen kann es sogar zu Wachstumsdepressionen im Vergleich zur nicht-mykorrhizierten Kontrollgruppe kommen (Schubert & Hayman 1986, Francis & Read 1995, Hetrick et al. 1996, Johnson et al. 1997). Vor allem letztere Ergebnisse führten zu der Auffassung, dass die AM unter spezifischen Bedingungen auch negative Effekte auf die Wirtspflanzen haben kann und die Pilzsymbionten dann eher als Antagonisten denn

als Mutualisten agieren (d. h. es kommt zur Aufnahme von Assimilaten ohne eine Gegenleistung in Form von Phosphat, Stickstoff, etc.; siehe u. a. Smith et al. 2010). Klironomos (2003) testet eine Reihe lokaler und standortfremder AMF auf ihre Effekte in zahlreichen einheimischen wie auch nicht-heimischen Wirtspflanzen und beobachtet in beiden Ansätzen starke Unterschiede in der MGR je nach Kombination der Symbionten (vgl. S. 73, Fig. 21a,b). Die Daten stützen die Ansicht eines Kontinuums zwischen Parasitismus und Mutualismus in der AM (Johnson et al. 1997, Fig. 21c). Zusätzlich verkompliziert wird die Thematik durch die offensichtliche Kontextabhängigkeit der Auswirkungen einer AM. Wie bereits angedeutet kann so z. B. eine sehr hohe Bodenverfügbarkeit von Phosphat oder Stickstoff bzw. ein ungünstiges stöchiometrisches Verhältnis dieser Mineralstoffe zueinander den symbiotischen Effekt auf den Wirt (bezogen auf die MGR) deutlich reduzieren oder gar dessen Wachstum hemmen (z. B. Crush 1976, Kiernan et al. 1983, Francis & Read 1995, Johnson 2010, Veiga et al. 2013). Ebenso ist es mit Sicherheit gefährlich, Daten aus einem 1:1-System im Wachstumsexperiment auf die Zustände in der Natur, in der i. d. R. viele Taxa oder zumindest Individuen gleichzeitig miteinander interagieren und die Wirtspflanzen somit in komplexe, über das Außenhyphensystem der Pilze etablierte Netzwerke eingebunden sind zu übertragen, da in diesen die Kosten und Gewinne der Symbiose zwischen den zahlreichen Symbioseteilnehmern geteilt werden (Bever et al. 2009, Helgason & Fitter 2009; vgl. auch Kapitel III.6.3 & VII). Nichtsdestotrotz, Hinweise auf die funktionelle Unterschiedlichkeit in den Fähigkeiten einiger Pilzarten bzw. Isolate in unterschiedlichen Wirten verstärkt mutualistisch oder eher antagonistisch bzw. parasitär zu interagieren existieren (Kiernan et al. 1983, Modjo & Hendricks 1986, Sylvia et al. 1993, Ravnskov & Jakobson 1995, Helgason et al. 2002; Moora et al. 2004, Bever et al. 2009). Endgültige Klarheit in dieser Frage wird es vermutlich noch längere Zeit nicht geben. Ein wichtiger Grund hierfür ist, dass es äußerst schwierig ist, den Fitnessgewinn des Pilzes anhand der MGR einzuschätzen. So könnte auch bei einer negativen MGR die Fitness des Pilzes abnehmen. Auch wissen wir nicht, welche weiteren Vorteile die Mykorrhiza neben dem Parameter Wachstumssteigerung für den Wirt hat. Einige Pilze fördern vielleicht nicht den Pflanzenwuchs, könnten aber z. B. eine besonders ausgeprägte Pathogenresistenz vermitteln (z. B. Smith et al. 2010). Darüber hinaus wird das Kriterium MGR zunehmend kritisch bewertet seit bekannt ist, dass die Phosphat-Aufnahme über die Symbiose nicht additiv sondern komplementär ist und daher auch bei geringer oder fehlender MGR ein großer Teile des aufgenommenen Phosphats von dem pilzlichen Symbionten stammt (Smith et al. 2004, 2011). Abschließend kann also gesagt werden, dass sehr wahrscheinlich Unterschiede in den symbiotischen Fähigkeiten der AMF existieren. Deren Ausprägung und der Einfluß des Wirtsgenoms bzw. der abiotischen und

biotischen Habitatfaktoren auf die Gesamtbilanz der Symbiose ist aber bei weitem noch nicht endgültig geklärt. Sollte sich allerdings herausstellen, dass die Unterschiede in der Funktion der Glomeromycota verbreiteter sind als bisher angenommen und daher „gute“ und „schlechte“ Symbionten unter den Pilzen existieren, wäre dies sowohl von großer Bedeutung für die Frage nach den Ursachen von Spezifität in der AM (es handelt sich dann mit großer Wahrscheinlichkeit um die Auswahl funktionell kompatibler Symbionten) als auch Ursache für die Evolution reziproker Kontrollmechanismen (vgl. Kapitel III.6.3), welche dann vornehmlich dem Schutz der Symbiose vor möglichen „Trittbrettfahrern“ dienen könnten (Kiers & Van der Heijden 2006, Helgason & Fitter 2009).

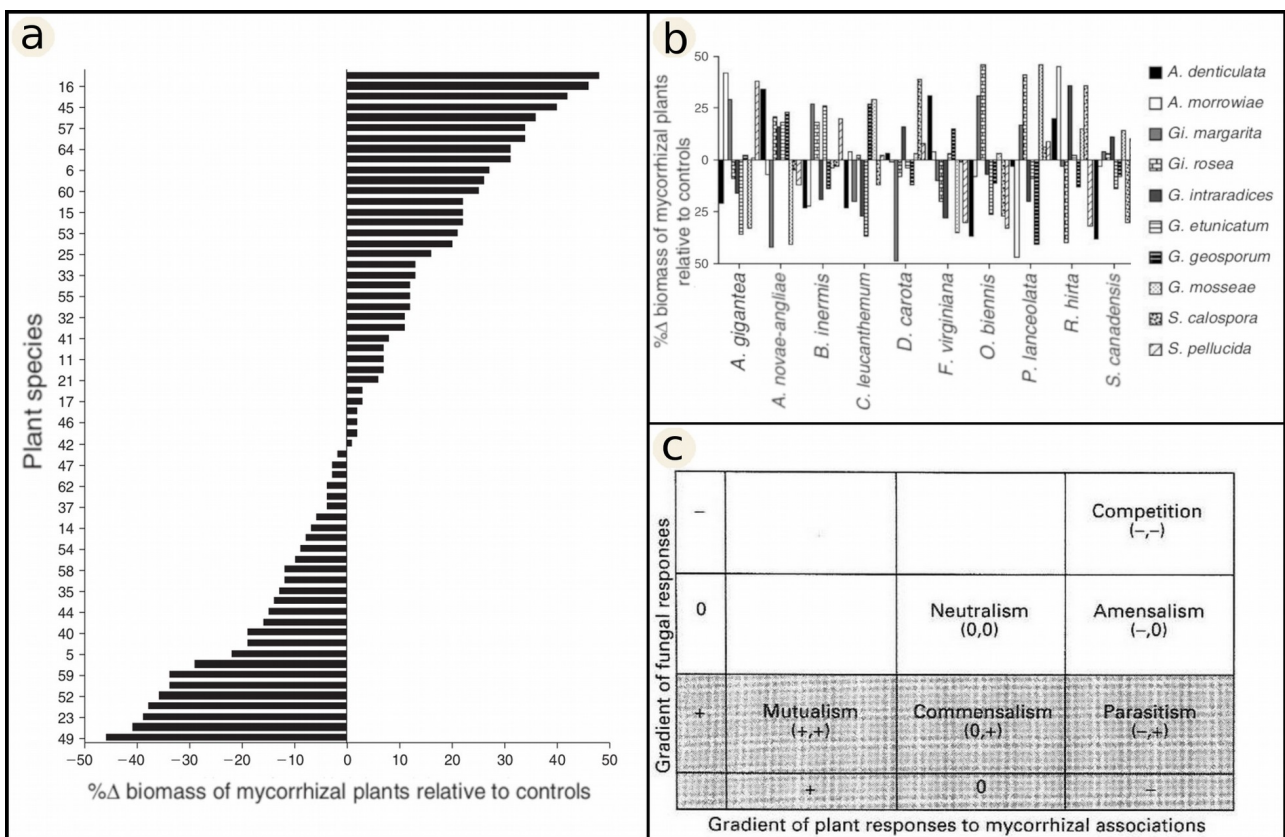


Fig. 21: a) Einfluss von *Glomus* (heute *Claroideoglomus*) *etunicatum* auf das Wachstum von 64 Wirtsarten; Pilz und Wirte stammen vom selben Standort b) Einfluss unterschiedlicher AMF auf das Wachstum unterschiedlicher Wirte; Pilze und Wirte stammen vom selben Standort. c) Kontinuum der Wirts- bzw. Symbiontenantwort auf die Etablierung einer AM. Die „response“ reicht von Mutualismus (beide Partner profitieren; ++) bis zum Parasitismus des Pilzes (nur der Pilz profitiert; -+) auf der Pflanzenseite und Mutualismus bis Konkurrenz auf der Pilzseite (Pilz und Pflanze werden gleichermaßen in ihrer Fitness beeinträchtigt; --). [nach Klironomos 2003 (a, b) und Johnson et al. 1997 (c)]

IV Etablierung der arbuskulären Mykorrhiza auf molekularer Ebene

IV.1.1 Der Pflanzenwirt

Die Nutzung molekularer Techniken hat auch im Feld der AM in vielfältiger Hinsicht zu einer tiefgreifenden Verbesserung unseres Verständnisses über die genauen Abläufe bei der Initiierung und Etablierung der Symbiose geführt. So weiß man erst seit kurzer Zeit, dass Pflanzen unter Nährstoff- (P & N) oder Wassermangel ein spezifisches Stress-Transkriptom initiieren, welches die Abwehrreaktionen des Wirtes gegenüber einer exogenen Besiedlung durch den Symbionten unterdrückt und die Einlagerung von Stärke sowie die Expression von Genen für die Strigolacton- und Abscisinsäure-Synthese in den Wurzeln induziert (Gutjahr et al. 2009, Yoneyama et al. 2012, Bonneau et al. 2013, Ruiz-Lozano et al. 2016). Pflanzen „rufen“ also in gewisser Weise ihren pilzlichen Symbiosepartner, wenn Sie die „Unterstützung“ durch den Symbionten in physiologischen Extremsituationen benötigen und garantieren z. T. bereits vor der eigentlichen Besiedlung die zelluläre Kommodität für den Symbionten. Als Antwort auf die Strigolactonfraktion der pflanzlichen Signalmoleküle unter den Wurzelexsudaten verzweigen sich die extraradikalen Hyphen verstärkt und der pilzliche Symbiont sondert bereits vor dem ersten physischen Kontakt mit dem Wirt Chitinderivate in Form von kurzkettigen Chitooligosacchariden (COs) und Lipo-Chitooligosacchariden (LCOs) bestehend aus 4 - 5 N-Acetylglucosaminen ab (sog. *myc factors*; Maillet et al. 2011, Genre et al. 2013, Gough & Becard 2016). Myc-Faktoren wurden trotz bereits länger vorliegender experimenteller Belege für deren Existenz (Kosuta et al. 2003, Kuhn et al. 2010) erst vor wenigen Jahren eingehender funktionell charakterisiert (Maillet et al. 2011, Genre et al. 2013) und ähneln chemisch stark den bereits länger bekannten Nod-Faktoren der Knöllchensymbiose - ein erster Hinweis auf die enge evolutive Verwandtschaft beider Symbioseformen (Parniske 2008). In der Wirtspflanze induzieren Myc-Faktoren die vermehrte Ausbildung von Seitenwurzeln in der Wirtspflanze und sind noch vor der Ausbildung eines Appressoriums (in der sog. präsymbiotischen Phase) für die Initiierung des sog. *common symbiosis signaling pathway* (CSSP; z. B. Catoira et al. 2000, Hirsch et al. 2001, Gutjahr & Parniske 2013, Barker et al. 2017) verantwortlich, in dem sich auf molekularer Ebene eine beträchtliche Schnittmenge zwischen der Etablierung einer AM und der *Rhizobium/Frankia*-Knöllchensymbiose nachweisen lassen, bevor sich die Programme spezifisch differenzieren (Parniske et al. 2008, Barker et al. 2017). Der CSSP als frühester Teil des molekularen Programms der Mykorrhizaontogenese beginnt mit der Perzeption der Myc-Faktoren durch einen spezifischen, bisher noch nicht eindeutig identifizierten Rezeptor aus der Gruppe der Lysin-Motif-Rezeptor

Kinasen (*LysM-Receptor Like Kinase*, LysM-RLK; ein guter Kandidat scheint aber in *Oryza sativa* mit der LysM-RLK CERK1 gefunden; Miyata et al. 2014, Zhang et al. 2015, Carotenuto et al. 2017) im Plasmalemma der Rhizodermiszellen (Antolín-Llovera et al. 2014). Nach erfolgter Perzeption der Myc-Faktoren über die Rezeptorkinase, setzt im Wirt eine Transduktionskaskade mit Aktivierung einer Reihe CSSP-Gene [DMI2 (Doesn't Make Infection 2)/SYMRK (Symbiosis Receptor-like Kinase), DMI1/CASTOR & POLLUX, DMI3, NSP1 (Nod Signaling Pathway 1), NSP2] ein, an deren Ende die Penetration der Rhizodermiszelle durch die Hyphe des AM-Pilzes steht. Durch *loss-of-function*-Mutationslinien wurde nachgewiesen, dass die Glieder des CSSP unabdingbar für die erfolgreiche Ausbildung einer AM sind (Kistner et al. 2005).

Die molekularen Ereignisse während des CSSP, an dessen Ende die Penetration der Hyphen in die Rhizodermis steht, stellt man sich folgendermaßen vor: Kurz vor bzw. parallel zur Appressoriumsbildung lösen die von der LysM-RLK perzeptierten Myc-Faktoren unter Einbeziehung des Corezeptors DMI2/SYMRK und vermutlich weiteren noch unbekanntem Transduktionsgliedern die Aktivierung zweier spannungsabhängiger Kaliumkanäle in der Nucleushülle aus (DMI1/Pollux und Castor) - Kalium-Ionen strömen aus dem Nucleus ins Cytoplasma. Die resultierende Ladungsverteilung entlang der Nucleushülle löst die Öffnung eines bisher noch nicht identifizierten, aber mit großer Sicherheit vorhandenen, spannungsabhängigen Calcium-Kanals aus, über dessen Aktivierung schlagartig Calcium-Ionen aus dem Lumen des kernassoziierten endoplasmatischen Reticulums und der Kernhülle in den Innenraum des Nucleus freigesetzt werden. Über MCA8, eine Calcium-ATPase, wird kurz nach seiner Freisetzung Calcium in das Lumen der Kernhülle zurück transportiert und der beschriebene Mechanismus der Calcium-Freisetzung beginnt von neuem. Dies rhythmische Abfolge von Calcium-Freisetzung und Sequestrierung erzeugt ein messbares Pulsieren des Calciumsignals in der Kernregion. Neben den Transduktionsgliedern sind drei Mitglieder des Kernporenkomplexes (NUCLEOPORIN85, NUCLEOPORIN133, NENA), deren genaue Funktionsweise noch nicht ermittelt wurde, unabdingbar für die Calciumoszillation (Luginbuehl & Olroyd 2016). Die Calciumoszillation im Kern, das sog. *calcium spiking*, ist offenbar spezifisch für die symbiotische Assoziation der AM und unterscheidet sich in seiner Periodik klar von asymbiotisch induzierten Calcium-Signalen parasitärer Organismen, aber auch von dem deutlich regelmäßiger strukturierten Spikingmuster, welches durch die Nod-Faktoren der Rhizobien-Symbionten ausgelöst wird. Interessanterweise zeigen auch die noch unbesiedelten Zellen in direkter Nähe zu einem Penetrationsereignis ein niederfrequentes Calciumsignal, parallel zur cytologischen Akkomodation der Zelle (Kosuta et al. 2008, Chabaud et al. 2011, Sieberer et al. 2012, Russo et al.

2013, Sun et al. 2015; vgl. S. 78, Fig. 22). Für seine Dekodierung benötigt das symbiotische Calciumspiking allerdings ein spezifisches Protein, das in Form einer kernlokalisierten Calcium- (und) Calmodulin abhängigen Proteinkinase (CCaMK/DMI3) vorliegt, welche von niedrigen Calcium-Konzentrationen gehemmt, durch hohe Konzentrationen von Calcium jedoch aktiviert wird (Miller et al. 2013). Autoaktive (*gain-of-function*) Mutationen von DMI3 sind in der Lage, den AM-Phänotyp trotz fehlenden Calciumspikings vollständig wiederherzustellen (Takeda et al. 2012) - ein starker Hinweis, dass das Calciumspiking wohl ausschließlich der Aktivierung der CCaMK dient (Hayashi et al. 2010). Im Kern phosphoryliert die aktive Form von DMI3 ihr Zielprotein IPD3 (*Interacting Protein of DMI3*)/Cyclops) einen Transkriptionsfaktor, der offenbar für die Expression von Genen, welche für die erfolgreiche Hyphenausbreitung in den Wurzelzelle und die korrekte Arbuskel- (und Knöllchen-) entwicklung notwendig ist (Yano et al. 2008, Singh et al. 2014; Fig. 22). Als letztes bekanntes Glied des CSSP sind die zur GRAS-Familie (*Gibberellic Acid-insensitive Repressor of GAI and Scarecrow*) zählenden Transkriptionsfaktoren NSP1 und NSP2 (*Nodulation Signaling Pathway 1 bzw. 2*) zu nennen. Vor allem NSP2 scheint eine wesentliche Funktionen in der Regulation der Besiedlungsdichte und Besiedlungszonierung einzunehmen (Liu et al. 2011, Delaux et al. 2013). Beide Elemente agieren *downstream* des Calciumspikings und nehmen in der AM eine Funktion als Aktivatoren und Regulatoren der Strigolactonsynthese wahr, können damit offenbar sowohl an negativen wie positiven Rückkopplungsmechanismen teilhaben, aber auch direktere Funktionen in Antwort auf die Myc-Faktoren wahrnehmen (d. h. eine Förderung der Seitenwurzelbildung und die spezifische Induktion von Mykorrhizagenen; z. B. Liu et al. 2011, Maillet et al. 2011, Delaux et al. 2013). Ein Problem bezüglich des CSSP ist die Frage, wie verallgemeinerbar die Information über dessen Funktion und Regulation ist, wo doch die allermeisten Pflanzen keine duale Symbiose von Rhizobien und AM ausbilden, das bisherige Wissen über die Elemente des CSSP aber hauptsächlich aus einigen wenigen Modell-Fabaceen stammt. Auch stellt sich die grundlegende Frage, auf welchem Weg letztlich die Unterscheidung beider Symbioseformen auf molekulare Ebene abläuft, wenn der Transduktionsweg zu Beginn identisch ist. Genre & Russo (2016) befassen sich eingehender mit dieser Problematik und skizzieren ein Bild, welches deutlich komplexer als die derzeitige Lehrbuchmeinung ist. So sind zahlreiche Elemente der frühesten Phase der AM noch unbekannt oder in ihrer differenzierten Aktivierung unterschätzt. Es scheint also noch viele offene Fragen auf diesem Gebiet zu geben.

Der erste, für die AM spezifische molekulare Baustein ist nach derzeitigen Wissenstand RAM1 (*Reduced Arbuscular Mycorrhization 1*). Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen Vertreter der GRAS-Transkriptionsfaktoren und seine Funktion wurde auf die korrekte Arbuskelentwicklung, die

Myc-Faktor induzierte Seitenwurzelbildung (vgl. NSP2) und die Regulation von RAM2, einer für die Cutinsynthese wichtige Glycerol-3-Phosphat-Acyl-Transferase, eingegrenzt. Schaltet man RAM2 aus wird die Ausbildung der Appressorien stark reduziert und damit die Besiedlung der Wurzel deutlich gehemmt (Gobbato et al. 2012). Interessanterweise stützt dieser Befund ältere Daten, die spezifische Bestandteile der epidermalen Zellwand als maßgeblich für die Auslösung der Appressorienbildung indentifizierten (z. B. Giovannetti et al. 1993, Nagahashi and Douuds 1997). Vermutlich interagiert RAM1 auch eng mit NSP2 bei der Regulation mykorrhizaspezifischer Gene und auch der GRAS-Transkriptionsfaktor RAD1 (*reduced arbuscule development 1*) beeinflusst in spezifischer Interaktion mit RAM1 und NSP2 die Besiedlung und Arbuskelausbildung (Xue et al. 2015). DELLA Transkriptionsfaktoren (ebenfalls zur GRAS-Gruppe der Transkriptionsfaktoren gehörend und nach einer charakteristischen Abfolge von fünf Aminosäuren im N-terminalen Region benannt) sind in der Lage, auf multiplen Ebenen die Besiedlung der AM zu kontrollieren (z. B. Besiedlungsdichte und Arbuskelentwicklung; Floss et al. 2013, Yu et al. 2014). In tracheophytischen Pflanzen werden DELLA-Faktoren negativ über Gibberillinsäure (GA) reguliert (Brionis-Moreno et al. 2017). Dieses Phytohormon kann einen pleiotropen Einfluss auf die Regulation der AM ausüben (Takeda et al. 2015) und wird offenbar selber auch vom Phosphatstatus der Pflanze beeinflusst [P-Mangel reprimiert über ein weiteres Phytohormon (Jasmonsäure, JA) die GA-abhängigen Signalwege und fördert damit offenbar die AM-Ausbildung, Gutjahr & Parniske 2013]. DELLA-Transkriptionsfaktoren sind in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus als molekulare Regulatoren der AM gerückt (z. B. Gutjahr & Parniske 2013, 2017; Floss et al. 2013, Gutjahr 2014, Bucher et al. 2014, Yu et al. 2014). Der GRAS-Faktor DIP1 (*DELLA interacting protein 1*) bildet, wie der Name andeutet, einen Komplex mit DELLA und DIP1. *Loss-of-function*-Mutanten von DIP1 zeigen eine reduzierte AMF-Besiedlung der Wurzel. DIP1 könnte aufgrund seiner Fähigkeit, mit RAM1 zu interagieren, DELLA und die anderen GRAS-Faktoren funktionell miteinander verknüpfen (Yu et al. 2014). Auch neuere Daten von Pimprikar et al. (2016), die auf die Ausbildung eines CCaMK-RAM1-DELLA-Komplexes hindeuten, sprechen für eine direkte Verbindung zwischen CSSP (über CCaMK+CYCLOPS) und der Induktion mykorrhiza-spezifischer (Marker-) Gene für die Initiierung und normale Entwicklung „typischer“ hochverzweigter Arbuskel des *Arum*-Typs, wie *RAM2* (s. o.), *SbtM1* (*arbuscular mycorrhiza induced subtilisin-like serine protease 1*), *Str* (*stunted arbuscule*), *Vapyrin1* (ein offenbar für die molekulare Ontogenese der PAM zentrales, versikeltransportiertes Protein, Harrison 2012, Gutjahr & Parniske 2013) oder *Pt4* (*phosphate transporter 4*). Transkriptionsfaktoren wie DELLA und NSP1 agieren aber auch direkt im Zuge der physiologischen Regulation der Symbiose. So beschreibt Floss et al. (2017) MYB1

(*myb-like transcription factor 1*) einen Transkriptionsfaktor, der zusammen mit DELLA und NSP1 bei Verringerung des Phosphat-Transfers über die Arbuskel die Expression hydrolytischer Enzyme in arbuskelbesiedelten Zellen induziert und somit die Abortierung ineffizienter Arbuskel vermittelt (vgl. hierzu auch Gutjahr & Parniske 2017).

Neben den bereits erwähnten Phytohormonen (GA, JA & SL) spielen allerdings auch andere Hormone wie Abscisinsäure (ABA), Auxin, Ethylen und Salicylsäure eine wichtige Rolle für die Ontogenese und Regulation der Mykorrhizastrukturen in der AM (vgl. Bucher et al. 2014, Gutjahr et al. 2014). So konnte ein starker Einfluss von Auxin (IAA/IBA) auf die Strigolactonsynthese beobachtet werden (Foo 2013) und dies eröffnet auch die Möglichkeit einer exogenen Einflussnahme des Symbionten auf die Besiedlungsfähigkeit des Wirtes (AM Pilze sind vermutlich über die Sezernierung von ABA in der Lage, die Auxinsynthese des Wirtes zu beeinflussen; Kaldorf & Ludwig-Müller 2000, Ludwig-Müller & Güther 2007). Auxin ist darüber hinaus bedeutsam für die korrekte Entwicklung der hochverzweigten Arbuskel. Vermutlich spielt hier der zentrale Einfluss von Auxin auf die Zellpolarität und Modifikation des Cytoskelettes während der intrazellulären Pilzentwicklung eine wichtige Rolle (Etemadi et al. 2014; vgl. Kapitel. IV.1.2). ABA hat ebenfalls ausgeprägten Einfluss auf die intrazellulären Strukturen des Pilzes. Unvollständige Ausbildung der Arbuskel in ABA-defizienten Mutationslinien spricht eventuell für eine wichtige Funktion des Hormons als Gegenspieler von GA bei der Stabilisierung von DELLA als zentralem Regulationselement des mykorrhizaspezifischen Transkriptoms (Gutjahr 2014).

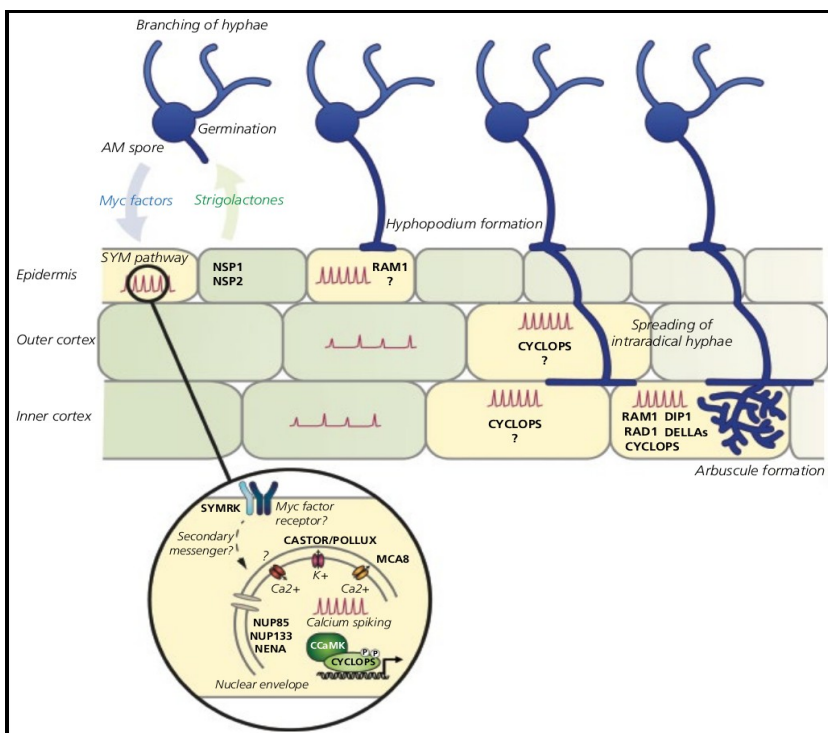


Fig. 22: Molekulare Prozesse vor und parallel zur Etablierung der arbuskulären Mykorrhiza. Man beachte die unterschiedliche Frequenz des Calciumspikings vor (blaue Zellen, niederfrequent) und während des Kontaktes mit den Signalmolekülen des Pilzsymbionten (rosa Zellen, hochfrequent). Zur genauen Erläuterung der Prozesse vgl. Kapitel IV.1.1. (nach Luginbuehl & Oldroyd 2016)

IV.1.2 Verknüpfung von molekularem Signaling und cytologischer Akkomodation

Wir kennen nun die Perzeption der Myc-Faktoren, die Induktion des CSSP, das symbiosespezifische Calciumspiking und die Dekodierung dieses Signals durch die CCaMK mit anschließender Initiierung der mykorrhizaspezifischen Gene. Als Resultat dieses Prozesses etabliert sich eine komplexe, cytoplasmatische Struktur direkt vor und parallel zur eigentlichen Besiedlung der Wurzelzellen durch den Pilzsymbionten. Dieses als Präpenetrationsapparat (*prepenetration apparatus, PPA*) bezeichnete Gebilde setzt sich aus Elementen des Cytosols und des Cytoskelettes sowie Organellen [endoplasmatisches Retikulum (E)R, Golgi-Vesikel, Plastiden & Mitochondrien] der Wirtszelle zusammen und formt eine brückenähnliche Struktur, die den intrazellulären Weg der Hyphe durch die Zelle vorzeichnet. Vor der eigentlichen Penetration der Rhizodermiszelle befindet sich deren Kern als erste, cytologisch erkennbare Antwort auf die Aktivierung des CSSP bereits direkt unterhalb des Appressoriums und damit in direkter Nähe zur zukünftigen Eintrittsstelle der Hyphe (Genre et al. 2005, Genre et al. 2008). Der Verlauf des PPA und damit der intrazelluläre Weg der Hyphen wird durch die bereits vor der eigentlichen Penetration einsetzende Migration des Wirtskerns durch die Wirtszelle vorgezeichnet. Das proliferierende Membransystem, welches im Zuge der PPA-Formierung ausgebildet wird, dient letztlich der Formierung der periarbuskulären Membran (PAM, vgl. Kapitel III.6.1). In seiner Etablierung weist der PPA Ähnlichkeiten mit den cytologischen Prozessen während der Zellteilung und Wandneubildung auf, ein Befund, der die Adoption zahlreicher Gene dieses elementaren Prozesses für die intrazelluläre Akkomodation der AM impliziert (Bonfante & Genre 2008). So es sich um eine rein intrazelluläre Besiedlung (*Paris-Typ*) handelt, wiederholt sich dieser Prozess von Calciumspiking, Kernmigration und PPA-Formierung vor jeder weiteren Zellpenetration in die tieferliegenden Zellen des Cortexparenchyms (vgl. S. 80, Fig. 23 b,c). Beim *Arum*-Typ hingegen erfolgt nach der initialen, intrazellulären Passage der Rhizo- bzw. Hypodermis eine ultracytologische Akkomodation unter Ausbildung eines PPA-ähnlichen Gebildes erst wieder im Zuge der Arbuskelbildung. Das sich hierbei formierende PPA-ähnliche cytoplasmatische Gebilde ist räumlich ausgesprochen komplex, Cytoskelettelemente, ER und Mitochondrien generieren ein Membransystem, dessen Form und Verzweigungsgrad ein im Endstadium hochverzweigtes Arbuskel und dadurch bedingt ebenfalls hochfragmentiertes Wirtsvakuolensystem vorzeichnet (Fig. 23a; Genre et al. 2008). Die Entdeckung des PPA stellt eine bedeutende Zäsur im Verständnis der wirtsseitigen, cytologischen Modifikationen während der Besiedlung durch den arbuskulären Mykorrhizapilz dar. Ohne die Ausbildung dieses komplexen Gebildes unterbleibt die Besiedlung der Zelle durch den Mikrosymbionten. Auch auf die Ausbreitung, hyphale Feinstruktur und Ausprägung der Arbuskel hat dieses Gebilde einen derart

zentralen Einfluss, dass die seit langem verbreitete Annahme, die Genese der charakteristischen Morphotypen der AM stehe primär unter Einfluss des Wirtspflanzengenoms (vgl. Van der Pijl 1934, Smith & Smith 1997), nun auch auf molekularer und ultracytologischer Ebene gestützt wird.

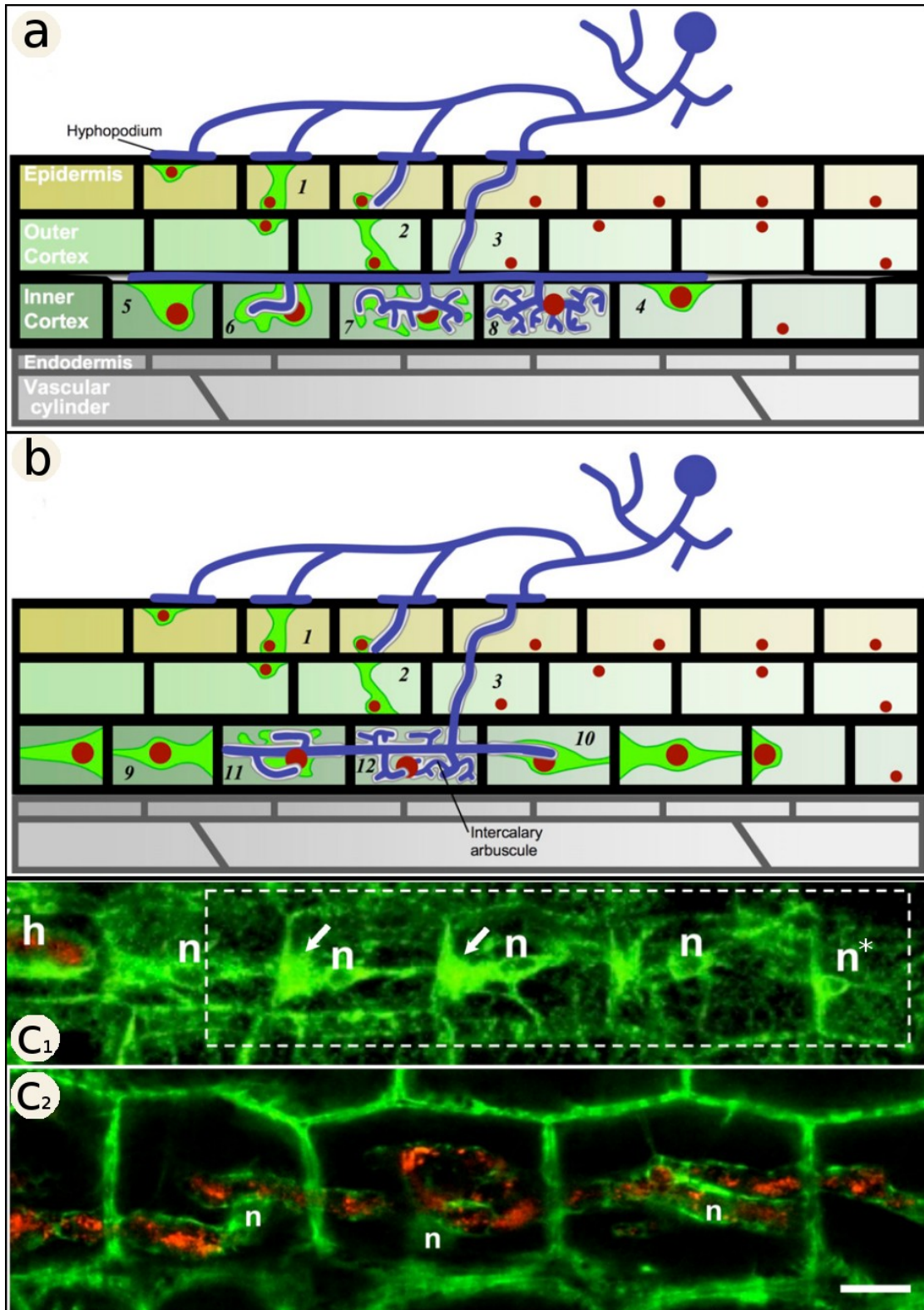


Fig. 23 (S. 80): Cytologische Akkomodation der Wirtswurzel während der Entwicklung einer arbuskulären Mykorrhiza. a) Im *Arum*-Typ: Beginn der Entwicklung des PPA unterhalb des Appressoriums (Hyphopodium) in der Epidermis (1) und äußeren Cortex (2) mit sukzessiver intrazellulärer Besiedlung (3) vor dem Wechsel in die interzelluläre Phase. Etablierung eines komplex strukturierten PPA während der Arbuskelbildung (4 – 8) b) Im Paris-Typ: Entwicklung einer rein intrazellulären Besiedlung in *Daucus carota* unter kontinuierlicher Ausbildung des PPA (1 - 10). c1) Formierung mehrerer PPA in benachbarten Zellen bereits vor der eigentlichen Penetration durch die Hyphe (h) in *D. carota*. Zentrale Position der vergrößerten Zellkerne (n) in ausgebildeten PPA vs. seitliche Position des Zellkerns an der zukünftigen Eintrittsstelle der Hyphe (*). Die PPA weisen eine deutliche Akkumulation von endoplasmatischen Retikulum (ER) auf der penetrationszugewandten Seite auf (Pfeile). c2) dieselbe Zellreihe wie in c1 durch Rahmen markiert, aber 16 h später aufgenommen, Hyphen (rot) umgeben von dünner Lage ER (grün) besiedeln die Zellen wie durch den PPA vorgezeichnet. Maßstab = 10 µm. (verändert nach Genre et al. 2008)

IV.2 Der pilzliche Symbiont

Vornehmlich aufgrund seiner obligat biotrophen Lebensweise und der Vielzahl von Kernen in jeder einzelnen Pilzspore, entzieht sich der pilzliche Symbiont bisher weitestgehend einer stabilen Transformation und damit einem wichtigen Werkzeug zur Aufklärung der molekularen Abläufe auf dieser Seite der Symbiose (Forbs et al. 1998, Requena et al. 2007). Durch die Auswertung transkriptomischer Daten aus verschiedenen Ontogenese- und Besiedlungsstadien des AM-Pilzes und die Charakterisierung der Proteinfunktion über subtraktives cDNA-Screening (SSH-library, *suppressive subtractive hybridization*), heterologe Expression sowie HIGS (*host induced gene silencing*, Nowara et al. 2010), konnten Gene wie *GmGin1* (*Glomus mosseae* Gin1), *GintSTE* [*Glomus intraradices* STE, ein zentraler Transkriptionsregulator des „mitogen activated protein pathways“ (MAP-Pathway)], *PEI1* (*Rhizophagus irregularis* „preferentially expressed in planta“, ein Transmembran-Protein mit bisher unbekannter genauer molekularer Funktionsweise) und *SIS1* [*strigolacton(sl)-induced putative secreted proteine 1*, ein vermutlich sekretiertes Protein von bisher unbekannter Funktion] beschrieben werden, welche offenbar bei der Terminierung der präsymbiotischen Phase bzw. der Appressoriuminduktion und der Regulation der intraradikalen Phase inklusive der natürlichen Entwicklung der Arbuskel eine wichtige Rolle spielen (Requena et al. 2002, 2007; Tollot et al. 2009, Fiorilli et al. 2016, Tsuzuki et al. 2016). Weiterhin scheint auch der pilzliche Symbiont die Perzeption wirtsstämmiger Signalstoffe (u. a. Strigolactone) mit einer transienten Erhöhung des cytoplasmatischen Calcium-Gehalts (Calcium-Puls) zu beantworten (Moscatiello et al. 2014), - ein Befund, der bereits 10 Jahre früher aufgrund der Aktivierung von Genen des *calcium-signaling* (u. a. einer P-Typ-Ca²⁺-ATPase und Calmodulin) in dem cDNA-Profil von AMF-Hyphen parallel zur Appressoriumsausbildung am Ende der präsymbiotischen Phase

vermutet wurde (Breuninger & Requena 2004). Neben diesen ersten vielversprechenden Ansätzen, die molekularen Abläufe im Pilz während der Etablierung der Symbiose aufzuklären, konnten in den letzten Jahren molekulare Komponenten der Stoffwechselphysiologie wie die bereits erwähnten Monosaccharidtransporter MST1 und MST2 in physiologischen Schnittstellen gefunden und weitere funktionelle Träger des Stofftransfers in die Richtung Wirtspflanze (Stickstoff- & Phosphattransporter, Aquaporine) in den extraradikalen Hyphen des Pilzes identifiziert werden (Harrison & Van Buuren 1995, Maldonado-Mendoza et al. 2001, López-Pedrosa et al. 2006, Schüßler et al. 2006; Aroca et al. 2009, Tian et al. 2010, Helber et al. 2011). In diesem Zusammenhang sind ebenfalls die unterschiedlichen Bestandteile des Mineralstoffaufnahme- und Transferapparates im Pilz, wie z. B. sekretierte Phosphatasen (ACP), (Hoch Affinitäts-) Phosphat- und Stickstoffimporter in den Außenhyphen und Ex- bzw. Importer an den intraradikalen Hyphen, Knäueln und Arbuskeln des Pilzes zu nennen, auf deren Funktion z. T. bereits in dem vorherigen Kapitel eingegangen wurde (für eine grundlegende Zusammenfassung dieser Thematik siehe Saito & Ezawa 2016). Abschließend zu nennen sind die zentralen Arbeiten von Tisserant et al. 2013 und Lin et al. 2014, welche in einer umfassenden Analyse des Genoms des AMF *Rhizophagus irregularis* (vormals *Rhizophagus intraradices*, Stockinger et al. 2009) zahlreiche Hinweise auf den Verlust pathogentypischer Elemente wie z. B. pflanzenzellwand-degradierende Enzyme (PCWs) beschreiben. Gleichzeitig sind in *R. irregularis* eine hohe Zahl symbiosespezifischer Gene kodierend für Aufnahme und Weitergabe mineralischer Nährstoffe, aber auch für die Expression mykorrhizainduzierter kleiner sekretierter Proteine (MiSSPs, *micorrhiza induced small secreted proteins*) vorhanden, letztere wirken vermutlich als Effektor-Proteine, die Wirtszellsignalwege manipulieren und so das spezifische Pathogen-Abwehrprogramm des Wirtes unterdrücken können (SP7, *Glomus intraradices secreted proteine 7*; Klopffholz et al. 2011). Trotz der Schwierigkeiten bei der molekularen Charakterisierung der AMF weckt die bereits angesprochene Sequenzierung des AMF-Modellgenoms von *R. irregularis* (Martin et al. 2008, Tisserant et al. 2013, Lin et al. 2014), die Anwendung von Systemen wie der *Partikelgun* (Helber & Requena 2008), der RNA-Interferenz (RNAi über HIGS, Tsuzuki et al. 2016)], von Heterologen-Expressionssysteme in Mykorrhiza-Modellpilzen (*Oidiodendron maius* aus *Vaccinium myrtillus*; Fiorilli et al. 2016) sowie TAT-Protein basierten „*nano-carrier*“ [TAT-protein, *HIV-1 transactivator of transcription protein*; ein zellwandgängiges Peptid (CCPs, *cell penetrating peptides*; Moscattiello et al. 2014)] die Hoffnung, unsere große Wissenslücke über die molekularen Abläufe während der Etablierung der AM von Seiten des Pilzes weiter zu schließen.

Die bisherigen Ausführungen über die molekularen Zusammenhänge der AM können vor dem

Hintergrund der Arbeit nur sehr oberflächlich dargestellt werden und auch nur, insofern diese in direkterem Zusammenhang mit den morphologischen Phänomenen, welche in dieser Arbeit thematisiert werden, stehen. Für weitergehende Informationen zu dieser interessanten Thematik wird u. a. auf Gutjahr & Parniske (2013), Schmitz & Harrison (2014), Bucher et al. (2014), Luginbuehl & Oldroyd (2016) und Pimprikar & Gutjahr (2018) verwiesen.

V Glomeromycota - genetische Organisation, Artbegriff, Systematik und Phylogenie

V.1 Genetische Organisation

Die stammesgeschichtlich sehr alten Glomeromycota sind vielkernige (je nach Art können sich 5000 bis 35.000 Kerne in einer Spore befinden, Burggraaf & Beringer 1989; Viera & Glenn 1990) coenocytisch organisierte Organismen. Bereits in einer einzelnen Spore wurden in den Glomeromycota eine außergewöhnliche genetische Varianz in einigen Bereichen der ribosomalen DNA (rDNA) wie der *ITS*-Region (*internal transcribed spacer*) und den konservierteren 18S (*small subunit, SSU*) sowie den ebenfalls variableren 28S (*large subunit, LSU*) Abschnitten, aber auch in proteinogenen Genen wie z. B. POL1 (katalytische Untereinheit der DNA-Polymerase- α), P-Typ IID ATPase, Kupfer-Zink Superoxid Dismutase und BiP (*binding immunoglobulin protein*, ein Chaperon) nachgewiesen (Sanders et al. 1995, Rosendahl & Taylor 1997, Clapp et al. 1999, Pringle 2000, Kuhn et al. 2001, Rosendahl & Stuckenbrock 2004, Pawlowska & Talor 2004, Corradi & Sanders 2006, Corradi et al. 2007, 2009, Thiéry et al. 2012, 2016). Neueste Daten auf Basis des Gesamtgenoms des Modellorganismus *Rhizophagus irregularis* Isolat DAOM 197198 stützen grundsätzlich die Befunde polymorpher rDNA, hinterfragen allerdings zunehmend die genetische Variabilität der proteinogenen Gene (vgl. Rodriguez et al. 2004, Young 2015 und Riley et al. 2016 für eine detaillierte Bearbeitung der Thematik über den Verlauf der Zeit). Im Laufe der letzten Jahre wurden diese Befunde durch Belege erstaunlicher Metavarianz in den Transkriptomprofilen selbst sehr nah verwandter AMF-Isolate erweitert (Boon et al. 2010, Tisserant et al. 2012). Diese Situation führte zur Hinterfragung der genetischen Organisation in den Glomeromycota und der Einführung zweier alternativer Modelle. Das heterokaryotische Modell geht von genetisch unterschiedlichen Zellkernen innerhalb des Myzels aus (Sanders 1999; Kuhn et al. 2001, Hijri & Sanders 2005, Lee et al. 2013). Das alternative, homokaryotische Modell betrachtet alle Kerne des Coenoblasten als genetisch identisch und fordert demnach die Existenz aller Sequenzvarianten eines Gens innerhalb eines einzelnen Kern-Genoms (vgl. S. 84, Fig. 24). Die homokaryotische Organisation des Pilzes

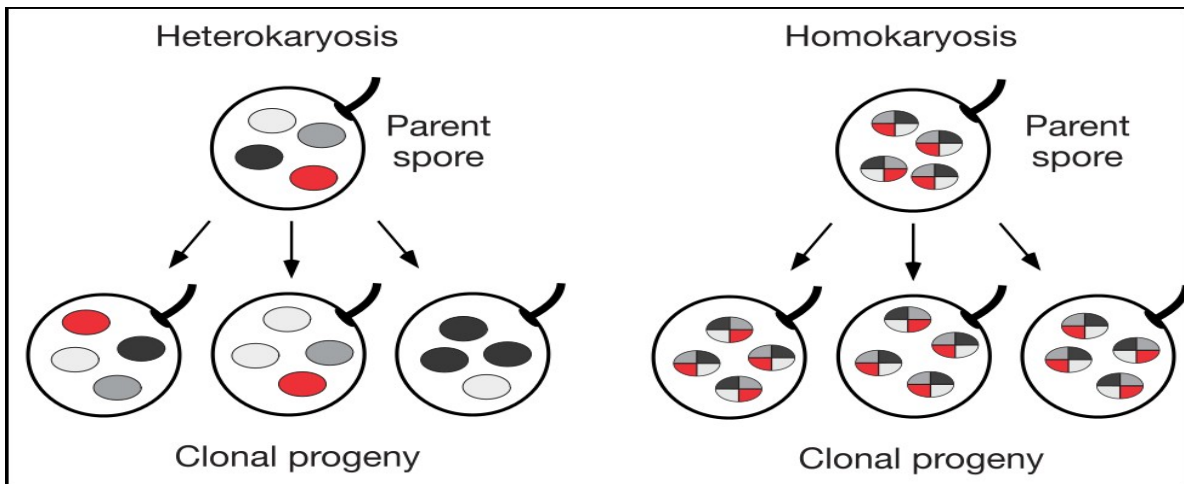


Fig. 24: Alternative Modelle genetischer Organisation und Vererbung in den Glomeromycota. Heterokaryotische Organisation des Genoms mit Vererbung genetisch unterschiedlicher Kerne vs. homokaryotische Organisation mit Vererbung genetisch identischer Kerne. (nach Pawlowska & Taylor 2005)

wurde von Pawlowska & Taylor (2004) vor allem deshalb propagiert, da man von der asymmetrischen Weitergabe der Erbinformation bei der Migration von genetisch unterschiedlichen Kernen während der (Mito-)Sporenbildung ausging und die Glomeromycota damit speziell im Fall einer heterokaryotischen Organisation extrem anfällig für eine Verarmung des Genoms über genetische Drift wären – ein Problem, welches bei einer homokaryotischen Genom-Organisation nicht auftritt (Pawlowska & Taylor 2004, Pawlowska 2005; Fig. 24). Diese Ansicht wurde sehr bald von Bever & Wang (2005) kritisiert. In ihren Modellen war schon ein gelegentlicher Austausch von Kernen ausreichend, um den Verlust von Genvarianten über genetische Drift zu kompensieren. Darüber hinaus konnten empirische Daten von Hijri und Sanders (2005) keine Polyploidie des Kerngenoms in *Glomus* (heute *Claroideoglomus*) *etunicatum* nachweisen. Sie fanden lediglich zwei Kopien des auch von Pawlowska & Taylor (2004) untersuchten Gens POL1 (s. o.), dieses allerdings in 13 Varianten. Somit stützte auch diese Analyse das heterokaryotische Modell (vgl. Rosendahl 2008 sowie Sanders & Croll 2010 für eine umfangliche Darstellung der Debatte). Eine weitere Problematik des homokaryotischen Modells leitet sich direkt aus der Sporenontogenese in den Glomeromycota ab. Diese erhalten ihre Kernpopulation über Migration einer Vielzahl von Kernen aus den Mutterhyphen (Jany & Pawlowska 2010). Geht man bei einer anhaltenden klonalen Vermehrungsstrategie von der zwangsläufigen Entstehung genetisch unterschiedlicher Kerne aus (vgl. S. 86, Fig. 25), so spricht dieser rein stochastische Migrationsprozess stark gegen die Akkumulation genetisch identischer Kerne innerhalb einer Spore. Selbst wenn dies zufällig doch passieren sollte, auch aus dieser anfänglich homokaryotischen Spore sollte sich, fehlende

Rekombination wiederum vorausgesetzt, nach vielen Generationen ebenfalls wieder eine heterokaryotisch zusammengesetzte Kernpopulation entwickeln. Weitere Indizien für ein heterokaryotisch organisiertes Genom stammen von Belegen für eine deutliche Änderung des Genotyps innerhalb eines Isolats in Abhängigkeit von der Wirtspflanzenart (Angelard et al. 2014). Diese Änderung im Profil der genetischen Marker lässt sich schwer mit einem Modell erklären, in dem jeder Kern ein identisches Set genetischer Varianten trägt, sehr wohl aber mit einem heterokaryotischen Modell, bei dem der Wirt genetisch und damit auch funktionell distinkte Kerne selektiert (Sanders & Croll 2010, Young 2015). Wie man aus diesen Ausführungen erkennt, sprachen bis vor kurzem mehr Indizien für eine heterokaryotische Organisation der Glomeromycota. Ernsthaftige Zweifel an dieser Hypothese kamen aber mit der gezielten Analyse einzelner Kerngenome aus einer Spore des Modellorganismus *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198 durch Tisserant et al. (2013) und Lin et al. (2014) auf. Diese Arbeiten bestätigen zwar die Varianz innerhalb der rDNA, weisen aber eine ansonsten erstaunliche Homogenität zwischen den verglichenen Kerngenomen nach. Vor dem Hintergrund dieser neuen Datenlage argumentiert Young (2015) mit der langen Kulturgeschichte von *R. irregularis* Isolat DAOM 197198 als mögliche Ursache für die widersprüchlichen Ergebnisse zur Genomorganisation in den Glomeromycota. Diese, so seine Interpretation, könnten zu einer genetischen Verarmung des in der Analyse von Tisserant et al. und Lin et al. genutzten Isolats geführt haben (für eine kritische Auseinandersetzung mit dieser Position siehe Ropars & Corradi 2015). Wie sich diese Datenlage nun vor dem Hintergrund der zentralen Frage nach der sexuellen Fortpflanzung und dem biologischen Artbegriff in den Glomeromycota interpretieren lässt, wird im folgenden Kapitel vertieft.

V.2 Sex, ja oder nein?

Lange Zeit betrachtete man die Glomeromycota als vermutlich älteste Gruppe unter den wenigen bekannten asexuellen Eukaryoten [*ancient asexuals*, (für die AMF wären dies dann mindestens 460 mya ohne sexuelle Rekombination; Gerdeman & Trappe 1974, Sanders 1999, Butlin 2002, Gandolfi et al. 2003, Pawlowska & Taylor 2004, Schüßler & Walker 2011)]. Vor diesem Hintergrund wurde die erstaunliche genetische Varianz in zahlreichen der untersuchten Loci als Indiz für eine asexuelle Lebensweise betrachtet, da offenbar keine, im Wesentlichen auf sexueller Rekombination basierende Homogenisierung des Erbguts stattfände und Gene wie die rDNA in jedem Kern der Population autonom evolvierten (Sanders 1999, Kuhn et al. 2001, Rosendahl 2008; S. 86, Fig. 25). Dennoch, das große evolutive Alter der Glomeromycota stellte bereits früh die Vorstellung einer

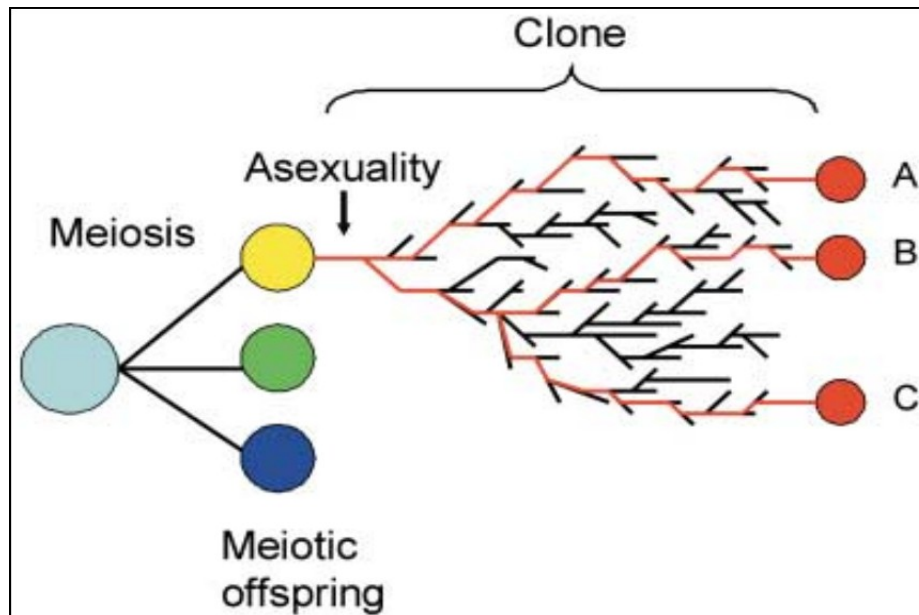


Fig. 25: Modell der Entstehung genetisch variabler Kerne bei anhaltender klonaler Vermehrung. (nach Rosendahl 2008)

rein asexuellen Lebensweise in Frage (z. B. Sanders 1999, Gandolfi et al. 2003). Hierbei spielen vor allem evolutionstheoretische Einwände eine Rolle – so hätte bei dauerhaftem Ausbleiben von Rekombination die Zahl potentiell schädlicher Mutationen in der Pilzgruppe ein letales Maß bereits lange überschreiten und zu ihrem Aussterben führen müssen (vgl. *Mullers ratchet*; Muller 1964). Als Gegenargument wird häufig die coenocytische Organisation der AMF angeführt, welche den mutationsbedingten Ausfall einzelner Gene durch funktionelle Kopien derselben in anderen Kernen kompensieren könne. Über sehr lange evolutive Zeiträume hinweg, erfordert diese Vorstellung aber selbst bei Vererbung ganzer Kernpopulationen einen gelegentlich stattfindenden Kernaustausch über Hyphenbrücken (Anastomosen) zwischen den Individuen (Croll et al. 2009, Bever & Wang 2005, Hijri & Sanders 2005). Eine solche Auffrischung der Erbinformation findet man tatsächlich in einigen (nicht allen!) Gruppen der AMF, aber nur in extrem nah verwandten, genetisch nahezu identischen Individuen [d. h. eine Anastomosenbildung ist nur zwischen Hyphen, welche aus einzelnen Sporen oder aus Sporen desselben Isolats stammen beobachtet worden; Giovannetti et al. 1999, 2001, 2003)]². Auch hat man Asexualität vor dem Hintergrund der scheinbar unveränderlichen ökologischen Nische der Wirtswurzel als Vorteil betrachtet, da für dieses spezielle Habitat nützliche Merkmalskombinationen nicht durch Rekombination zerstört würden (Law 1985, Croll & Sanders 2009). Doch bleibt der Pilz über sein Außenhyphensystem der Umwelt direkt ausgesetzt und der Teleomorph (Sexualstadium) vieler anderer Mykorrhizapilze ist bekannt (Smith

² Nur einmal finden Croll et al. (2009) in *Glomus intraradices* (heute *Rhizophagus*) Hinweise auf einen anastomosenbedingten Austausch von Erbmaterial zwischen Isolaten derselben Population.

& Read 2008). Meiotische Rekombination als Hauptfaktor genomischer Variabilität (Burt 2000) ist damit offenbar auch für Mykorrhizapilze wesentlich. Auf Basis der vorhandenen Daten konnte die Existenz eines Sexualstadiums³ in den AMF also weder gänzlich ausgeschlossen werden noch als gesichert gelten. Erste konkretere Hinweise auf eine geschlechtliche Fortpflanzung der AMF wurden vor 15 Jahren publiziert, als ein Teil der genetischen Varianz innerhalb der rDNA als Indiz für Rekombination gedeutet wurde (Gandolfi et al. 2003, Pawlowska & Taylor 2004). Es folgten weitere Hinweise auf diesen Prozess (Croll et al. 2009, Den Bakker et al. 2010), dabei blieb allerdings unklar, ob es sich um meiotische oder mitotische Rekombination handelt und auch die Möglichkeit von transponierbaren Elementen (TEs) wurde als Ursache des Befundes diskutiert (Gandolfi et al. 2003). Deutliche Spuren einer tatsächlich erfolgten sexuellen Reproduktion (und damit einhergehend meiotische Rekombination) erbrachten die Arbeiten von Halary et al. (2011, 2013), Riley et al. (2014) und die ersten vollständigen Dekodierungen eines AMF-Genoms in den Arbeiten von Tisserant et al. (2012, 2013). Diese finden undegradierete Sequenzen sexspezifischer Gene [*pheromon-sensing mitogen-activated protein (MAP)-kinasen*, *mating type related high mobility group domain (MATA-HMG)*, Transkriptionsfaktoren (*SexM* & *SexP*) und zentrale Gene für den meiotischen Rekombinationsapparat] im Genom von *Rhizophagus irregularis*. Auch wurde ein Teil der meiosespezifischen Gene im Transkriptom des Pilzes nachgewiesen, so dass diese Gene offenbar häufig noch funktionell sind. Ropars et al. (2016) lieferten dann den bisher letzten Beleg für die Fähigkeit der AMF zum sexuellen Austausch ihrer Erbinformation. Seine Analyse erbrachte den ersten Nachweis eines MAT-Locus (*mating type locus*) in den Glomeromycota. MAT-Loci umfassen essentielle Gene für die Festlegung genetischer Kompatibilität, Syngamie und Proliferation der Meiosporen in Pilzen (Ashton & Dyer 2016). In heterothallischen Pilzen [d. h. Pilzgruppen wie den Mucoromycotina oder Ascomycota, deren morphologisch gleichgestalteten Myzelien nur einem einzelnen Kreuzungs(Mating-)typ zuzuordnen sind (+ oder -), welcher sich genetisch über den MAT-Locus definiert; identische MAT-Loci sind inkompatibel], liegt dieser Locus in mehreren genetisch äußerst variablen (sog. idiomorphen) Allelen vor, welche sich daher sehr gut voneinander unterscheiden lassen. Nach der Identifizierung des MAT-Locus nutzt die Studie von Ropars diese Eigenschaften des MAT-Locus, um dessen Variabilität innerhalb und zwischen den einzelnen Isolaten zu bestimmen (untersucht wurde jeweils eine definierte Zahl einzelner Kerne pro Isolat). Sie finden mehrere unterschiedliche Allele des MAT-Locus in den Isolaten, wobei einige Isolate nur eine Allelvariante aufweisen, andere jedoch zwei im Verhältnis

³Nur einmal wurde das Sexualstadium eines AM-Pilzes beschrieben (Tommerup & Sivasithamparam 1990). Dieser Befund wurde aber bisher nicht ausreichend validiert.

von ca. 1:1 (Allelfrequenz = 50%). Aus diesen Daten schließen sie auf ein paralleles Auftreten homokaryotischer (alle Kerne enthalten dasselbe MAT-Allel, jeder Kern enthält den haploiden Gensatz) und heterokaryotischer Genomorganisation (50 % der Kerne enthalten eine Allelversion, 50 % der Kerne eine andere Version, alle Kerne sind haploid) in einer Population. In ihrer Gesamtheit deuten die Daten stark auf die Existenz sexueller Rekombination in den AMF hin. Die Glomeromycota wechseln also offenbar zwischen einer homokaryotischen (haploiden) und, nach Hyphenfusion und Kernaustausch zweier kompatibler Isolate, dikaryotischen Phase in ihrem Lebenszyklus. Nachgewiesen wurden derzeit aber nur das haploide und das dikaryotische Stadium. Das diploide Stadium, nach Karyogamie der haploiden Kerne des Dikaryons mit darauffolgender meiotischer Rekombination, wurde aber bisher noch nicht beobachtet (Fig. 26). Mit diesen neuen Daten wird eine rein klonale Lebensweise der AMF sehr unwahrscheinlich und die Frage nach dem

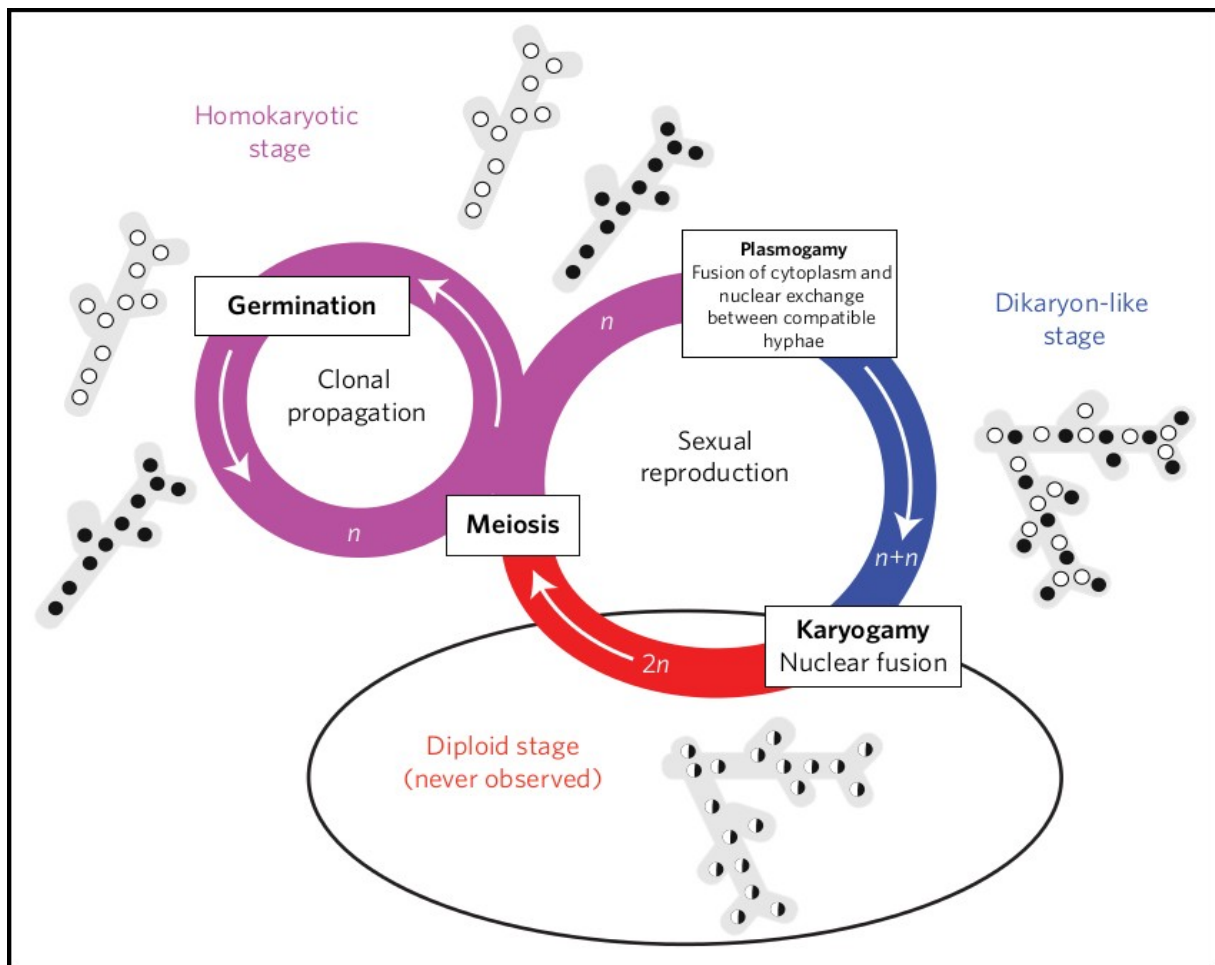


Fig. 26: Modell des Reproduktionszyklus in den AMF. Homokaryotische (haploide, klonale) Phase wechselt nach Fusion und Kernaustausch kompatibler Hyphen mit einem dikaryotischen Stadium ab. Der diploide Abschnitt (Teleomorph) umfasst Kernfusion und Meiose, wurde aber bisher noch nicht beobachtet. (nach Ropars et al. 2016)

sexuellen Zyklus der Glomeromycota scheint nach langer Zeit endlich beantwortet. Die Studie um Ropars versöhnt mit ihrer Arbeit aber auch die widersprüchlichen Befunde vorangegangener Studien bezüglich der genomischen Organisation in den Glomeromycota. Beide, die homokaryotische wie auch die heterokaryotische Organisation existieren in der Natur, allerdings nur phasenweise im Verlauf eines vollständigen Lebenszyklus. Die Ursache für die genetische Varianz der rDNA in den AMF bleibt nach den deutlichen Indizien für Rekombination allerdings immer noch ungeklärt. In den meisten Organismen wird die rDNA über den Prozess der meiotischen Rekombination homogenisiert (*concerted evolution*, vgl. Dover 1982 & Dover 1989). Eventuell findet dieser Prozess nur selten in den Glomeromycota statt und ein gewisses Maß genetischer Varianz der rDNA ist auch aus einigen anderen rekombinierenden Pilzen bekannt, womit die arbuskulären Mykorrhizapilze einen Extremfall in dieser Gruppe repräsentierten. (Lin et al. 2014). Aus welchen Gründen auch immer die rDNA-Varianz der AMF erhalten sein mag, ihre Existenz kann ein erhebliches Problem für die Nutzung dieser Genregion als phylogenetischer Marker darstellen (z. B. Clapp et al. 1999, Rosendahl 2008).

Wie die obigen Ausführungen unterstreichen, haben die letzten Jahre also einen Paradigmenwechsel zur genetischen Struktur der AMF mit sich gebracht und als Resultat scheinen die Mitglieder der Glomeromycota nun auch als biologische Art ansprechbar. Die Zeit, in der Vertreter dieser Pilzgruppe lediglich als Morpho- bzw. Form-Spezies (*phenetic species*, vgl. Morton 1990 & Walker 1992) ansprechbar waren, geht offenbar ihrem Ende entgegen. Nichtsdestotrotz, auf praktischer Ebene bleibt die Erfassung der Artenvielfalt arbuskulärer Mykorrhizapilze immer noch eine Herausforderung. Die Gründe hierfür sollen im Folgenden näher erleutert werden.

V.3 Problematik der Artbestimmung in den AMF

Trotz der Fortschritte in der Aufklärung des generativen Lebenszyklus der AMF, der Nachweis ihres Teleomorphs steht weiterhin aus. Historisch erklärt sich dadurch die lange Zeit gültige systematische Einteilung der Glomeromycota vor allem auf Basis ihrer (Mito-)Sporen und hier vor allem deren Färbung, Wandstruktur und histochemischen Färbeverhalten, dem Übergang von Spore und Mutterhyphie sowie der Ausprägung einer Keimscheibe, dem sog. *Scutellum* (eine Wandperforierung, welche in einigen Gruppen das Auswachsen der Keimhyphie erleichtert) und der Sporenontogenese. Daneben existieren systematisch weniger hoch auflösende Merkmale, wie die Ausbildung bzw. das Fehlen von Sporenclustern, Sporokarpnien, Auxiliarzellen (dies sind vesikelähnliche Speicherorgane, gebildet am Außenhyphensystem einiger Pilzgruppen), *Sacculi* (charakteristische, lokale Ausbuchtungen der Hyphe, die sich später zur Spore ausdifferenzieren

und als Ausbuchtung der Spore erhalten bleiben) und Vesikel (Gerdemann & Trappe 1974, 1975; Walker 1983, Morton 1988, Morton & Benny 1990, Franke & Morton 1994, Morton 1995, Morton & Bentivenga 1995, Stürmer & Morton 1997, 1999; Redecker & Raab 2006, Oehl et al. 2011b, Redecker & Schüßler 2014). Diese Merkmale erlaubten zwar die systematische Beschreibung von derzeit ca. 315 Morphospezies (Schüßler & Walker 2010 onwards: <http://www.amf-phylogeny.com>), sind in ihrer Anwendung allerdings nicht unproblematisch. Zum Einen sind die Sporen der AMF häufig sehr arm an klar differenzierbaren Merkmalen bzw. die für die Artunterscheidung wichtigen feineren Details sind nur schwer zu unterscheiden. Zum Anderen können scheinbar eindeutige Einzelmerkmale ohne Einbezug weiterer Kriterien in einer falschen Artbeschreibungen resultieren, wenn solche Merkmale konvergent entstanden sind (so z. B. im Falle von glomoiden Sporen und Sacculi; Morton & Redecker 2001, Rosendahl 2008, Schüßler & Walker 2011). Das kritischste Problem ist aber das offensichtliche Fehlen von Sporen in einer Reihe von AMF, welche sich daher zwar molekular nachweisen lassen, aber keine Spuren in der Sporenbank eines Habitats hinterlassen und damit einer sporenbasierten Klassifizierung und Identifizierung im Feld gänzlich entgehen (Clapp et al. 1995, Merryweather & Fitter 1998a, Rosendahl & Stuckenbrock 2004). Trotzdem bleibt die Morphotypisierung neuer AMF-Taxa essentiell - nur über die Verfügbarkeit systematisch eindeutig charakterisierter Reinkulturen (nicht alle Isolate aus der Natur sind indes kultivierbar) konnten und können auch in Zukunft Morphologie und molekulare Daten gegenübergestellt und Klarheit geschaffen werden, was eine Art in den AMF auf Ebene dieser beiden Parameter eigentlich ausmacht bzw. wieviel genetische Varianz eine morphologische Art letztlich umfasst und umgekehrt, welche morphologische Plastizität in molekularsystematisch definierten Spezies noch zulässig ist, um diese glaubwürdig einer Art zuzuordnen (vgl. Rodriguez et al. 2004, Schüßler & Walker 2011, Thiéry et al. 2012, 2016; Rosendahl 2008 & Redecker et al. 2013 für eine grundlegende Bearbeitung dieser Thematik). Darüber hinaus waren die morphologischen Merkmale den molekularen bei der Quantifizierung einer AMF-Population lange Zeit überlegen (vgl. Öpik & Davison 2016 für eine umfassende Darstellung der Problematik). Trotz des also weiterhin wichtigen, morphologisch basierten Ansatzes, ist die molekularbasierte Phylogenie und Klassifizierung aber ein unverzichtbares Instrument für die aktuelle Erforschung der arbuskulären Mykorrhiza. Allerdings ist auch diese Methodik nicht ohne spezifische Probleme. So kann es zu Komplikationen bei der Entwicklung von Primern kommen, die möglichst alle potentiellen Mykorrhizasymbionten im Habitat erfassen, dabei aber andere, z. B. kommensalische oder pathogene Pilze und natürlich den Wirt selbst ausschließen (Lee et al. 2008). Letzteres ist besonders für die Glomeromycota wichtig, da diese nicht axenisch

kultiviert und als Einzelorganismus charakterisiert werden können (z.B. Simon et al. 1992, Helgason et al. 1998, Husband et al. 2002a, Öpik et al. 2006). Auch müssen molekulare Marker, sollen sie verlässlich bis zur Artebene auflösen, eine geringe intra- und hohe interspezifische Sequenzvariabilität aufweisen (*barcode gap*, vgl. z. B. Meyer & Paulay 2005, Thiéry et al. 2016). Für die Glomeromycota sind Regionen, die solchen Ansprüchen genügen, unterschiedliche Abschnitte der kernkodierte ribosomalen DNA (rDNA) d. h. der 28S bzw. 5,8S Teil der LSU, der 18S Bereich der SSU und ITS (*ITS1* und *ITS2*) (z. B. Simon et al. 1992, Simon 1996, Gehrig et al. 1996, Clapp et al. 1999, Schüßler et al. 2001, Schwarzott et al. 2001, Rosendahl & Stuckenbrock 2004, Gollock et al. 2004, Hempel et al. 2007, Börstler et al. 2010). Wie in den meisten pilzlichen Organismen kann auch in den Glomeromycota die rDNA wie folgt nach abnehmender intraspezifischer Variabilität geordnet werden: ITS > LSU > SSU (Schoch et al. 2012). Hierbei ist die SSU ein besonders häufig genutzter Bereich für die systematische Einordnung der arbuskulären Mykorrhizapilze (Öpik et al. 2013b, Krishnamoorthy et al. 2017). Dies liegt vor allem an der günstigen Kombination von gering evolvierenden (invariablen) und sich häufiger ändernden (variablen) Sequenzabschnitten. Erstere erlauben die Entwicklung AMF-selektiver Primer, Letztere liefern die notwendige Varianz für eine ausreichend scharfe phylogenetische Auftrennung. Somit konnte diese Region als genetischer Marker sowohl für die Identifizierung tieferliegender phylogenetischer Knoten (Ordnungen, Familien) als auch für die Aufschlüsselung intrafamiliärer Verwandtschaftsverhältnisse (Gattungen und Artencluster) in den Glomeromycota herangezogen werden (z. B. Schwarzott et al. 2001, Schüßler et al. 2001, Walker et al. 2007, Lee et al. 2008, Schüßler & Walker 2011). Neue Evaluierungen der intra- und interspezifischen Variabilität der rDNA stützen den Wert der SSU für die phylogenetische Analyse, weisen allerdings darauf hin, dass die Varianz in den untersuchten rDNA Abschnitten art- und sogar isolatabhängig variieren kann (Thiéry et al. 2012, 2016). Diese Studien zeigen aber auch, dass die SSU, welche wie in anderen Pilzphyla (z. B. Basidio- und Ascomycota) auch in den Glomeromycota immer wieder als wenig brauchbar für die Auflösung bis zur Art betrachtet wird (vgl. z. B. Rosendahl 2008; Schüßler & Walker 2011, Krüger et al. 2012, Krishnamoorthy et al. 2017), in ihrem zentralen Abschnitt eine vergleichbar hohe interspezifische Variabilität wie die ITS- und LSU-Region aufweisen kann und daher das Potential besitzt, in vielen Fällen zumindest bis zu Artengruppen oder sogar zur Artgrenze aufzutrennen. Hierbei ist ihre weniger stark ausgeprägte intraspezifische Varianz im Vergleich zur intraspezifisch hochvariablen ITS-Region [Stockinger et al. 2010 findet bis 15 % Sequenzvariabilität in nur fünf untersuchten ITS-Sequenzen von *Glomus* (heute *Redeckera*) *fulvum*] weniger anfällig für die Überbewertung der Artenzahl in ökologischen Ansätzen (Thiéry et al.

2016). Es ist daher nicht verwunderlich, dass die SSU neben ihrer Verwendung als verlässlicher Marker für die phylogenetische Einordnung der höheren taxonomischen Rangstufen auch der meist genutzte Marker für die Erfassung der Artzusammensetzung der AMF-Community im natürlichen Habitat ist (Schüßler 1999, Schüßler & Walker 2011, Öpik et al. 2014, Thiéry et al. 2016, Öpik & Davison 2016).

Die für die Analyse der SSU häufig genutzten Primerpaare NS31 (Simon et al. 1992, spezifisch für eukaryotische 18S rDNA) und AM1 (Helgason et al. 1998, spezifisch für AMF 18S rDNA) bzw. AML1 und AML2 (Lee et al. 2008) amplifizieren einen ca. 550 bzw. 800 bp langen Abschnitt im Zentrum der 18S rDNA der AMF (vgl. S. 93, Fig. 27). Durch die relativ geringe Größe lässt sich der Abschnitt gut amplifizieren und klonieren, erlaubt aber auch die Anwendung moderner Sequenzverfahren (*next generation sequencing*). Trotz der geringen Länge des Fragments ist dank der in diesem Bereich der SSU besonders ausgeprägten Sequenzvariabilität in den meisten Fällen eine phylogenetische Auflösung mindestens bis zur Gattung realistisch (Lee et al. 2008, Thiéry et al. 2016, Öpik & Davison 2016). Neben dieser positiven Einschätzung des taxonomischen Auflösungsvermögens der SSU dürfen Studien, welche in einigen Kladen eine mangelhafte Trennung nah verwandter Arten bei ausschließlicher Nutzung dieser Markerregion beschreiben, nicht unerwähnt bleiben (Walker et al. 2007, Gamper et al. 2009, Rosendahl 2008). Darüber hinaus existiert bei Nutzung des Primersatzes NS31/AM1 das Problem schwacher oder fehlender Erfassung einiger ursprünglicher Familien in den Glomeromycota (Archaeosporaceae, Ambisporaceae und Paraglomeraceae) sowie die nicht immer 100%ige Diskriminierung gegenüber nicht AMF-rDNA (Redecker et al. 2000a, Daniell et al. 2001, Clapp et al. 2003, Douhan et al. 2005; siehe Dumbrell et al. 2011 für eine Reevaluierung dieser Problematik). Durch die Nutzung von Nested-PCR-Ansätzen, bei der anhand relativ unspezifischer Primer die Templateregion vorvermehrt wird und daher auch geringste DNA-Mengen in den Proben nachgewiesen werden, kann dem Problem schwacher Amplifizierung einzelner phylogenetischer Gruppen bis zu einem gewissen Grad begegnet werden (natürlich müssen die spezifischen Primer bei diesem Verfahren zumindest schwach an das Template binden) - ein Ansatz, der über die Nutzung des universellen (Eukaryoten) Primersatzes GeoA1/ART4 (Schwarzott et al. 2001) u. a. auch in dieser Arbeit Anwendung fand (Fig. 27). Dennoch, die genannten Einschränkungen führten u. a. zur Suche nach verbesserten Primersätzen, welche eine eindeutige Artbeschreibung ohne primerbedingte selektive Amplifizierung der AMF-Gesellschaft in den beprobten Habitaten garantiert (Lee et al. 2008, Stockinger et al. 2009, Krüger et al. 2009). Diese neueren Primer zielen auf Bindestellen außerhalb von NS31 und AM1 (Lee et al. 2008), oder kombinieren etablierte Primer (Morgan & Egerton-

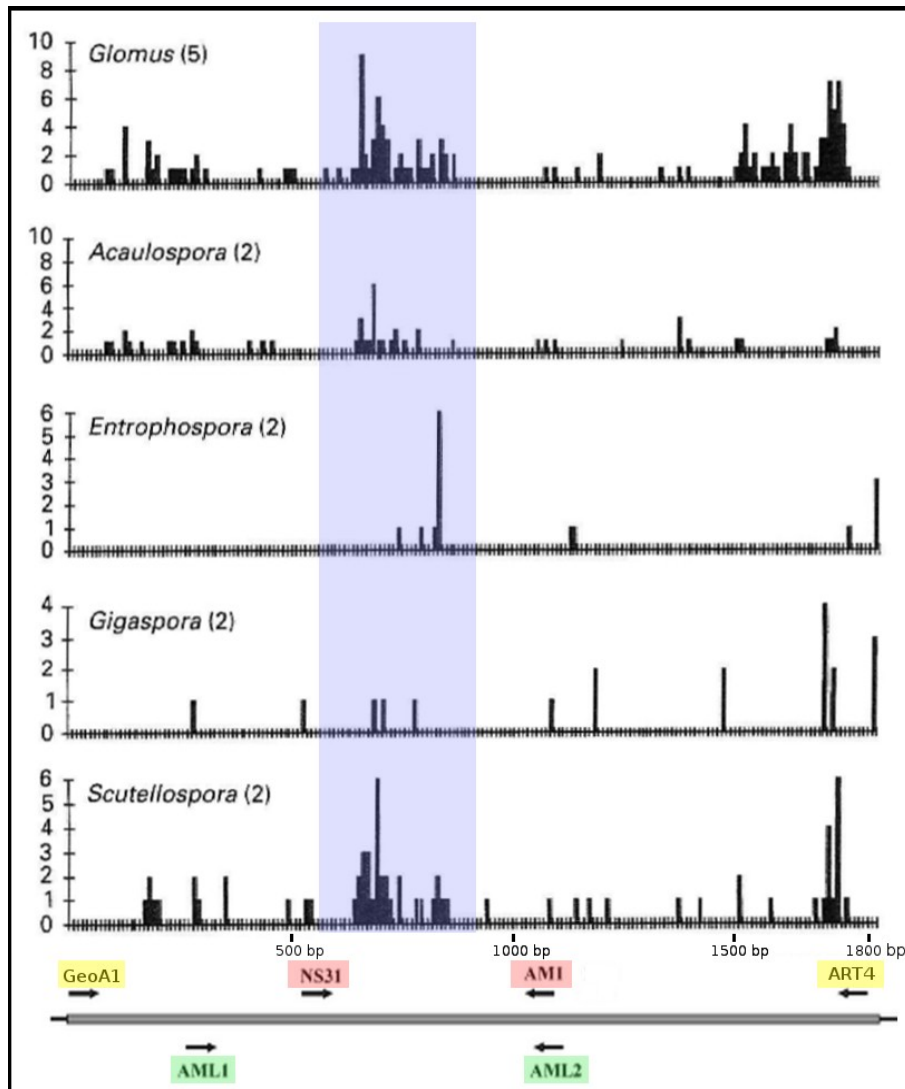


Fig. 27: Sequenzvariabilität der SSU in den Glomeromycota. Blau hinterlegt die besonders variable Region zwischen 500 und 1000 bp (Ordinate = Anzahl der variablen Positionen). Angegeben sind die Bindestellen der in dieser Arbeit genutzten Primer. (verändert nach Simon et al. 1996 & Lee et al. 2008)

Warburton 2017), bzw. überspannen einen größeren Bereich der rDNA mit Teilen der LSU-, SSU- und ITS-Region. Letzteres führte zur Veröffentlichung des sog. Krüger-Fragmentes, dem derzeitigen „Goldstandard“ in der molekularen AMF-Systematik, welches sowohl bis zur Art auflösen und gleichzeitig alle AMF-Familien erfassen kann und auch deshalb als besonders aussichtsreicher Kandidat für die Etablierung als Barcode-Region in den Glomeromycota erachtet wird (Stockinger et al. 2009, Krüger et al. 2010). Darüber hinaus werden auch proteinogene Sequenzen wie z. B. Elongationsfaktoren (1- α), H⁺-ATPasen (VHA5) und ATPase (F0F1-ATPase β -Untereinheit, Sokolski et al. 2010), Aktin (Helgason et al. 2003), α sowie β -Tubulin (Corradi et al. 2004, Msiska & Morton 2009) und die RNA Polymerase Untereinheit II (James et al. 2006, Redecker & Raab 2006) genutzt. Letztere besitzt ebenfalls ein hohes Potential für die verlässliche Artaufklärung in den AMF und wird daher ebenfalls als guter Barcode-Kandidat gehandelt

(Stockinger et al. 2014). Spezifische Regionen der mtDNA [z. B. Cytochrom-c-Oxidase (COI); Borriello et al. 2014] sollen hier ebenfalls nicht unerwähnt bleiben. Diese rücken aufgrund ihrer hohen inter- und sehr geringen intraspezifischen Varianz seit einiger Zeit vermehrt in den Fokus der Forschung – es liegen hier aber bisher nur wenige Daten für die AMF vor (Krishnamoorthy et al. 2017). Weiterhin werden Restriktions Fragment Längen Polimorphismen (RFLP; und ähnliche Verfahren) sowie Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) für die Identifizierung auf Artebene genutzt (Kowalchuk et al. 2002, Rosendahl & Taylor 1997, Dicki & FitzJohn 2007; vgl. Krishnamoorthy et al. 2017 für eine Übersicht). Innerhalb der rDNA wiederum eignen sich die hochvariablen ITS-Abschnitte prinzipiell besonders gut zur Artbeschreibung und werden daher in den letzten Jahre immer mehr als universaler Barcode auch für die Glomeromycota propagiert (Schoch et al. 2012). Problematisch bleibt hierbei allerdings das häufige Auftreten multipler Sequenzvarianten innerhalb eines Pilz-Isolats (Stockinger et al. 2010, Schoch et al. 2012). Darüber hinaus erlaubt die ausgeprägte Variabilität der ITS-Region nicht immer eine korrekte Alignierung der Sequenzen in Vorbereitung phylogenetischer Berechnungen (vgl. u. a. Thiéry et al. 2016). Gut geeignet ist die ITS natürlich für die gezielte Erfassung von intraspezifischer Varianz (Avio et al. 2009). All diese alternativen Konstrukte sind entweder nur für einzelne Isolate einsetzbar, lösen nicht verlässlich zwischen Arten auf oder fanden trotz ihrer überlegenden phylogenetischen Aussagekraft und weiten systematischen Anwendbarkeit aufgrund ihrer teils komplizierten Handhabung bisher erst relativ wenig praktische Verbreitung (Stockinger et al. 2009, Krüger et al. 2009, 2012). Am robustesten einsetzbar in der Praxis ist daher immer noch die u. a. von NS31 und AM1 umfasste Region der SSU. Die Nutzung dieses Abschnitts der SSU erlaubt aufgrund seiner weiten Verbreitung im Bereich ökologischer Untersuchungen der AMF-Community (z. B. Öpik et al. 2003, 2008, 2009, 2013b; Dumbrell et al. 2011, Hiiesalu et al. 2014) den Rückgriff auf sehr viele, für systematische und phylogenetische Ansätze essentiell wichtige Vergleichssequenzen. Aus diesen Gründen wurde vor allem dieses Primerpaar für die Fragestellung bezüglich einer möglichen spezifischen Assoziation zwischen pilzlichen Symbionten und den hier untersuchten Vertretern der Polygalaceae genutzt. Das Primerpaar AML1/AML2 von Lee et al. (2008) umfasst die von NS31/AM1 amplifizierte Region der SSU und selektiert weniger stark gegen einige Gruppen der AMF als NS31/AM1 (s. o.). Im Verlauf der Analysen wurde allerdings offensichtlich, dass dieses Primerpaar eine unzureichende Diskriminierung gegen die Wirts-SSU aufweist und daher nur unter erheblichem Aufwand für eine breite Anwendung in dieser Arbeit geeignet gewesen wäre. Auch ähnelten sich die Amplifikationsprodukte von AML1/AML2 und NS31/AM1 bezüglich ihrer phylogenetischen Topologie, weswegen auch bei Anwendung von NS31/AM1 vermutlich nicht von

einer primerbedingten Verfälschung der erfassten AMF-Community in den Wurzeln der Polygalaceae auszugehen ist.

Auch wenn die von uns genutzten Primerpaare NS31/AM1 bzw. AML1/AML2 in einigen Fällen tatsächlich eine Einordnung der isolierten AMF bis zur Artebene erlauben, es ist ausdrücklich nicht beabsichtigt, die isolierten Sequenzen auf dieser taxonomischen Ebene anzusprechen. In diese Arbeit wird daher mit sog. *operational taxonomic units* (OTUs) gearbeitet, dies sind molekularbasierte Phylotypen, deren Verwandtschaftsgrad von den genutzten Markern und damit von der Forschungsintention der Studie abhängen, aber nicht zwingend einer distinkten taxonomischen Ebene wie Gattung oder Art zugeordnet werden. Trotzdem wird in dieser Analyse ein Standard von mindestens 97%iger Sequenzähnlichkeit als ein Maß für die phylogenetische Nähe der Sequenzen innerhalb der entsprechenden OTUs genutzt. Dieses Kriterium orientiert sich am Diversitätsmaßstabs in anderen Mikroorganismen (Öpik et al. 2013b, Selosse et al. 2016b) und wird u. a. gestützt durch die Daten von Helgason et al. (2002), welche eine intraspezifische Varianz des betroffenen Abschnitts der SSU (AM1/NS31) in *Scutellospora dipupurescens* von weniger als 3 % nachweisen. Öpik und Mitarbeiter greifen dieses Kriterium in ihrem Konzept des *virtual taxon* (VT) auf. Hierbei handelt es sich um ein System der molekularbasierten Artbeschreibung, beruhend auf einem Mindeststandard für die Sequenzähnlichkeit ($\geq 97\%$) und hohem Bootstrapsupport, welches das Ansprechen einer phylogenetischen Einheit (Phylotyp) auch ohne morphologische Referenz ermöglichen soll (Öpik et al. 2010, 2013b). In Krüger et al. (2012) wird am VT-Systems berechtigterweise Kritik formuliert, wenn die von Öpik und Mitarbeitern genutzte SSU aufgrund artabhängig inhomogener Sequenzvariabilität nicht sicher bis zur Artebene auflöst und dann mehrere Phylotypen in Wirklichkeit nur eine „echte“ taxonomische Art repräsentieren oder umgekehrt, ein einzelner Phylotyp mehrere taxonomische Arten umfasst. In solchen Fällen kann der Begriff „Virtuelles Taxon“ das Vorliegen einer kohärenten taxonomischen Ebenen in den Analysen vortäuschen. Die Autoren schlagen daher stattdessen den neutraleren Begriff *moleculare operational taxonomic unit* (MOTU) vor - ein Vorschlag, der auch in dieser Arbeit mit der Einbindung des Begriffs OTU entsprochen wurde. Selosse et al. (2016b) begrüßen zwar die Etablierung taxon-spezifischer Datenbanken wie MaarjAM oder UNITE (Kõljalg et al. 2013) zur Erfassung pilzlicher „Arten“ anhand einheitlicher molekularer Standards, plädieren vor dem Hintergrund der hohen intraspezifischen Variabilität der ribosomalen DNA in den AMF aber dafür, Konzepte wie das VT, die (M)OTU oder SH (*species hypothesis*; auf Basis des ITS-Bereichs; Kõljalg et al. 2013) dahingehend zu erweitern, Variabilität nicht durch Verfahren wie die Auswahl von Referenz-, Konsensus oder Komposit-Sequenzen zu maskieren; ein Vorschlag, der in dieser

Arbeit in dem Maße Anwendung findet, als dass außer bei 100%ig identischen Sequenzen stets alle Sequenzvarianten innerhalb einer Wurzelprobe Eingang in die phylogenetische Datenauswertung erhielten. Trotz des weiterhin also nicht endgültig gelösten Problems, einen verbindlichen Ähnlichkeitsstandard für die sequenzbasierte Artbestimmung in den AMF festzulegen, erscheint aber zumindest das bereits innerhalb des hier bearbeiteten Forschungsgebietes adaptierte Ähnlichkeits-Kriterium des VT-Systems gut geeignet, eine Vergleichbarkeit zwischen dieser und anderen Studien zu gewährleisten – besonders solchen, welche sich ebenfalls mit der molekularen Identifizierung der Mykorrhizapilze in den Polygalaceae befassen (vgl. Mennes et al. 2015).

VI Spezifität in der arbuskulären Mykorrhiza

Die aktuelle Systematik der Glomeromycota nennt 10 Familien mit insgesamt 18 Gattungen und ca. 315 morphologisch beschriebenen Arten (Schüßler & Walker 2010 onwards: <http://www.amf-phylogeny.com/>; Redecker et al. 2013, Öpik & Davison 2016). Selbst unter Einbezug aller molekularsystematischen Analysen wird, je nach genutzter Markerregion und Ähnlichkeitskriterium (*similarity cut off level*) der genetischen Variabilität, die Gesamtzahl der Glomeromycota nur auf 348 bis 1321 Arten geschätzt (in einigen weniger konservativen Studien wird allerdings von bis zu 2600 Arten ausgegangen; Kivlin et al. 2011, Öpik et al. 2013b, Davison et al. 2015, Öpik & Davison 2016). Dieser vergleichsweise geringen systematischen Diversität der Glomeromycota stehen ca. 295.000 Angiospermen, einige Gymnospermen sowie zahlreiche Pteridophyten und Moose als potentielle Wirtspflanzen gegenüber (Brundrett 2009, Christenhusz and Byng 2016). Dieses Missverhältnis wird immer wieder als Argument gegen eine ausgeprägte Spezifität in der AM herangezogen (z. B. Sanders 2002, Helgason et al. 2007). Auch vor dem Hintergrund einer Vielzahl erfolgreich inokulierter Wirts-Pilz-Kombinationen, der Annahme funktioneller Gleichwertigkeit aller AMF, einer teils großen Diversität der wirtsassoziierten AMF-Sporenbank im natürlichen Habitat und letztlich dem molekularsystematischen Nachweis unspezifischer Assoziationen gab es lange Zeit keinen Grund, eine ausgeprägte taxonomische Spezifität in der arbuskulären Mykorrhiza zu vermuten (z. B. Douds & Millner 1999, Eom et al. 2000, Klironomos 2000, Hoeksema 1999, Klironomos & Hart 2002, Hart & Klironomos 2003, Helgason & Fitter 2005, Gomes et al. 2017). Ein weiterer wichtiger Befund, der gegen eine Spezifität in der AMF spricht, ist die offensichtliche Unfähigkeit des Wirtes eine Besiedlung durch AMF zu vermeiden (selbst wenn die entsprechenden Symbionten das Wachstum des Wirtes im Experiment nicht förderten; Sanders 2002). Bislang existiert auch kein Beleg für eine vertikale Weitergabe des

pilzlichen Symbionten zwischen den Wirtsgenerationen und auch dies wurde als Erklärungsansatz für die Seltenheit spezifischer Assoziationen in Mykorrhizasymbiosen herangezogen (Bruns et al. 2002, Kiers & Van der Heijden 2006). Erste Zweifel am „Paradigma“ einer unspezifischen AM existieren aber schon seit längerem. So lagen bereits seit den 80er Jahren Analysen vor, welche anhand morphologischer Merkmale (i. d. R. Sporen, in Ausnahmefällen auch intraradikale Hyphenmorphologie) einzelne AMF vermehrt bzw. als Teile distinkter AMF-Gesellschaften in bestimmten Wirtsarten vorfinden (Giovannetti & Hepper 1985, McGonigle & Fitter 1990, Bever 1996, Merryweather & Fitter 1998a,b; Eom et al. 2000, Lovelock & Ewel 2005). Doch erst mit dem Aufkommen molekularsystematischer Methoden zur Identifizierung der pilzlichen Symbionten im natürlichen Habitat mehrten sich die Kenntnisse über die globale Verbreitung und tatsächliche Bandbreite der in einzelnen Wirtspflanzen nachweisbaren AMF-Arten (z. B. Helgason et al. 1998, 2002; Husband et al. 2002a,b; Wubet et al. 2009; Olsson et al. 2004, Öpik et al. 2003, 2006, 2008, 2009, 2013a; Saks et al. 2013, Kivlin et al. 2011, Davison et al. 2011, 2012, 2015). So belegen viele dieser neueren Studien die präferentielle Assoziation pflanzlicher Taxa (Überordnung) zu bestimmten AMF-Gruppen (Öpik et al. 2010) und finden wirtstypische Pilzgesellschaften in Pflanzen desselben Habitats (sog. *specific communities*). Bei den *specific communities* handelt es sich um Gruppen von Pilzen, die sich durch distinkte Zusammensetzung, nicht notwendigerweise aber über enge phylogenetische Verwandtschaft der konstituierenden Pilze auszeichnen (Vandenkoornhuyse et al. 2002, 2003; Husband et al. 2002a,b; Scheublin et al. 2004, Fitter et al. 2005, Sýkorová et al. 2007a; Santos-Gonzalez et al., 2007, Wubet et al. 2009, Torrecillas et al. 2012). Beschrieben wurden aber auch auffällige, teils engere Präferenzen für pilzliche Phylogruppen (*phylogenetic clustering*) in diesbezüglich untersuchten Wirtsarten aus den Lebermoosen, Farnen, Enzianen, Rutaceen oder Bignoniaceae (Russel & Bullman 2005, Sýkorová 2007a, Appelhans et al. 2008, Field et al. 2015b, Gomes et al. 2017). Doch selbst absolute taxonomische Spezifitäten, wie die von *Acer pseudoplatanus* (Spitzahorn) zu *Glomus hoi*, wurden schon nachgewiesen (Helgason et al. 2002). In einigen der aufwendigsten dieser Untersuchungen stellte sich allerdings heraus, dass vermutlich nicht nur die Wirtsidentität (Artzugehörigkeit) ausschlaggebend für die spezifische Zusammensetzung der AMF-Gesellschaft zu sein scheint, sondern auch der ökologische Kontext der Wirte (z. B. Habitatspezialisten vs. Generalisten, Öpik et al. 2003, 2009; Davison et al. 2011, Saks et al. 2013), der anthropogene Einfluss (z. B. intensive Landwirtschaft vs. naturbelassene Flächen, Li et al. 2007, 2010) und der Nährstoffgehalt des Bodens (Santos et al. 2006). Auch kann die Community-Zusammensetzung der AMF sukzessionsabhängiger Variation unterworfen sein (Sýkorová et al. 2007b). Darüber hinaus

existieren unter Umständen quantitative Spezifitäten, welche aber erst nach Anwendung spezieller molekularer Verfahren erkennbar werden (z. B. qPCR und Klon-Quantifizierung; Pivato et al. 2007, Torrecillas et al. 2012; S. 99, Fig. 28b). Letztlich scheinen Spezifitäten und Präferenzen in den untersuchten Wirtsarten nicht konstant, sondern im Zuge der Wirtsindividualentwicklung sowie über den Verlauf der Vegetationsperiode variabel (Van der Heijden et al. 1998b, Husband et al. 2002a,b; Wubet et al. 2009, Dumbrell et al. 2011, Davison et al. 2011, 2012). Sind viele der genannten Beispiele meist Belege für charakteristische Pilzgesellschaften in den Wirtspflanzen, so können die zahlreichen Befunde einer engen Coassoziierung verschiedener mykoheterotropher Pflanzen mit einzelnen, phylogenetisch engen Kladen arbuskulärer Mykorrhizapilze als deutlichster Beleg für echte taxonomische Spezifität in der AM angesehen werden (z. B. Bidartondo et al. 2002, Franke et al. 2006, Merckx & Bidartondo 2008, Winther & Friedman 2007, 2008, 2009; Merckx et al. 2010, Merckx et al. 2017).

Spezifische Pilzgesellschaften in den Pflanzenwirten bzw. Präferenzen sowie enge taxonomische Spezifitäten zwischen den beiden Symbiosepartnern sind also auch für die AM belegt und speziell für die Ökologie von großer Bedeutung, versprechen sie doch ein besseres Verständnis für die Ursachen der distinkten Artzusammensetzung von Pilz- und Wirtscommunity in einem Habitat (Clapp et al. 2003, Sanders 2002; vgl. Fig. 28a). Der evolutionäre Ursprung von Spezifität und die Fragen, welcher der beiden Symbiosepartner bei ihrer Realisierung tonangebend ist, bleibt bisher allerdings noch offen. So kann diese ursächlich aufgrund der Auswahl einer Wirtspflanze durch den Symbionten [man spricht dann von Wirtsspezifität (*host specificity*)] oder durch die Bevorzugung einzelner Pilztaxa vonseiten der Wirtspflanze entstehen (Pilzspezifität, *fungus specificity*). Zwischen beiden Formen kann klar unterschieden werden, so die Assoziation am natürlichen Standort erfasst wird (*ecological specificity*, vgl. McGonigle & Fitter 1990) und man distinkte Pilztaxa stets nur in einer Wirtsart findet (*host specificity*) oder umgekehrt, ein Wirtstaxon nur mit einer einzigen Pilzart vorkommt (*fungus specificity*). Solange derartige Untersuchungen nicht vorliegen, sollte man wie in dieser Arbeit, neutral von Spezifitäten sprechen und vorsichtig mit der Frage nach dem Einfluss der Symbiosepartner bei der Ausbildung spezifischer Assoziationen umgehen. Trotz dieses Einwandes können Informationen über die Ernährungsstrategie des Wirtes bereits sehr hilfreich für die Beantwortung der Frage sein, welcher der beiden Symbionten (d. h. Pflanze oder Pilz) vermutlich essentiell für die Realisierung einer spezifischen Vergesellschaftung ist. Je spezieller die ökophysiologischen Anforderungen einer Wirtspflanze, desto kleiner sollte auch die Gruppe derjenigen Pilze sein, welche diesen genüge leistet. So sind mykoheterotrophe Pflanzen mit sehr großer Wahrscheinlichkeit weniger frei in der Wahl ihrer Pilzsymbionten als solche mit einer

fakultativen Mykorrhiza. Hier „erwartet“ man geradezu eine besonders ausgeprägte Spezifität der Symbiose und viele Daten der letzten Jahre bestätigen diese Einschätzung (vgl. Kapitel IX.4 & XI). Vermutlich nimmt die Spezialisierung mykoheterotropher Pflanzen ihren Ausgang aber bereits in ihren extinkten, autotrophen Vorfahren. Spuren dieser Entwicklung könnten daher auch in den rezenten chlorophyllhaltigen Verwandten der heterotrophen Arten nachweisbar sein. Vor diesem Hintergrund sind die Assoziationsmuster in den „grünen“ Polygalaceae dieser Studie von hohem Interesse für das Verständnis der Evolution spezifischer Assoziationen in mykoheterotrophen Verwandtschaftsgruppen (siehe Rath et al. Manuskript B).

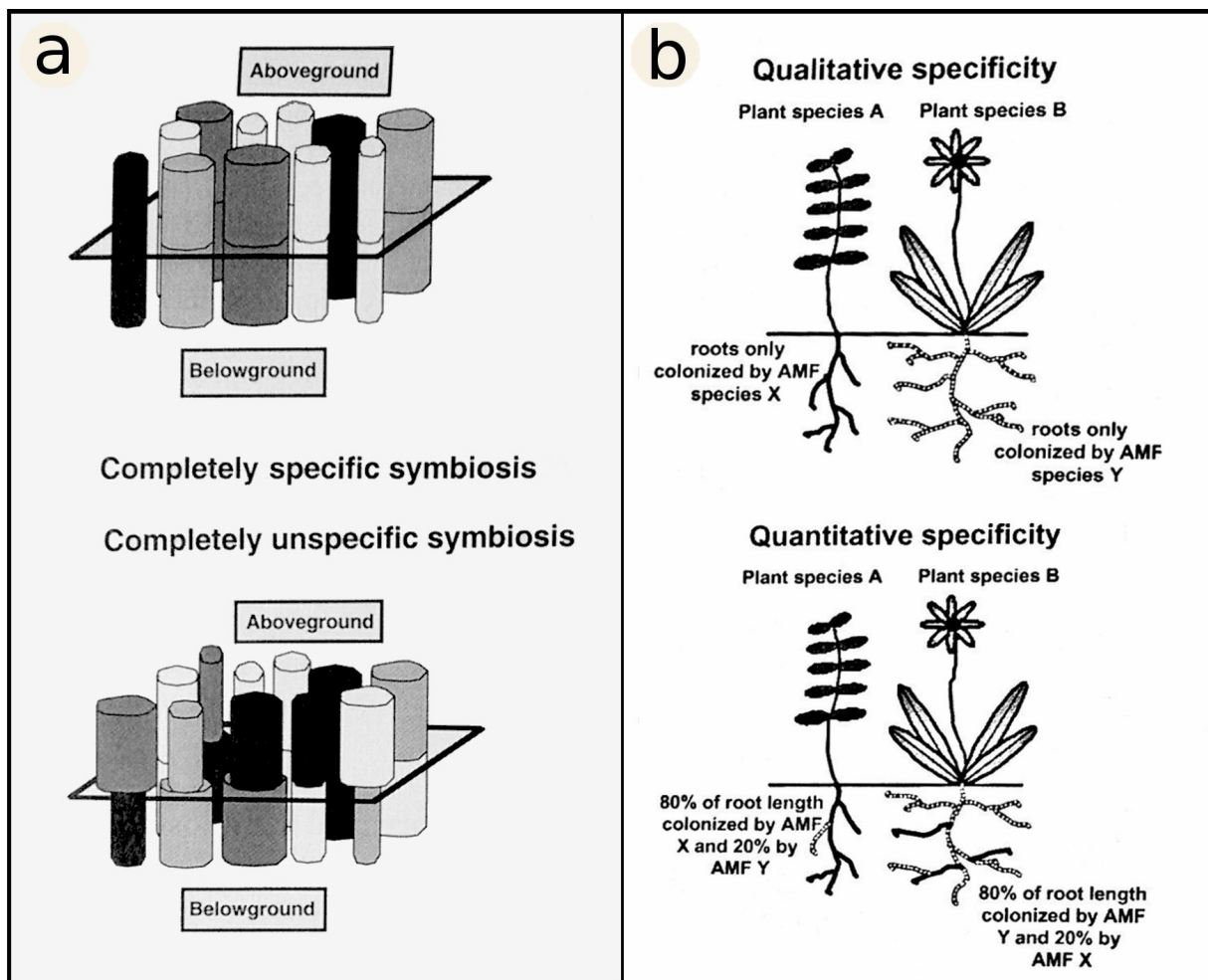


Fig. 28: Assoziationsformen in der Mykorrhiza. a) Absolute Spezifität (*completely specific symbiosis*): die Wirtsdiversität bestimmt die Pilzdiversität und umgekehrt. Keine Spezifität (*completely unspecific symbiosis*), Wirtsdiversität und Symbionten-Diversität sind unabhängig voneinander. b) Qualitative (taxonomische) Spezifität vs. quantitative Spezifität. Beide Formen können in Präferenzen auslaufen wenn *i*) eine begrenzte Anzahl von Pilztaxa stets mit demselben Wirt assoziiert sind (taxonomische Präferenz) oder *ii*) mehrere Taxa in einem Wurzelsystem dominieren. (nach Sanders 2002)

VII Verbreitung und ökologische Bedeutung der arbuskulären Mykorrhiza

Aufgrund ihrer sehr großen Verbreitung in terrestrischen Pflanzen handelt es sich bei der AM mit großer Wahrscheinlichkeit um die ökologisch bedeutendste Symbiose an Land. Nahezu alle Pflanzenfamilien in den Angiospermen, zahlreiche Vertreter der Gymnospermen sowie viele niedere Pflanzen in den Farnen, Bärlapp- und Schachtelhalmgewächsen, Leber- und Hornmoosen zeigen zumindest fakultativ eine Besiedlung durch Vertreter der Glomeromycota (Wang & Qiu 2006, Brundrett 2009). Nur wenige Gruppen, wie z. B. die Cyperaceae, Amaranthaceae, Caryophyllaceae und Brassicaceae umfassen Arten, die nicht oder nur sehr selten arbuskulär mykorrhiziert sind (Brundrett 1991, Smith & Read 2008). Entsprechend ihrer weiten Verbreitung im Pflanzenreich findet man die AM sowohl in Trockengebieten und Wüsten als auch in Feuchtgebieten, Gebirgslagen und selbst in arktischen Regionen (z. B. Olsson et al. 2004, Treseder & Cross 2006; Chaurasia et al. 2005, Öpik et al. 2006). Betrachtet man die pilzliche Seite der Symbiose, so gibt es erst seit den letzten zwei Jahrzehnten robuste Datensätze über die tatsächliche lokale und großräumige Verbreitung der arbuskulären Mykorrhizapilze sowie ihrer zeitlichen und räumlichen Diversität in spezifischen Ökosystemen (z. B. Merryweather & Fitter 1989a,b; Helgason et al. 1998, 1999, 2002; Husband et al. 2002a,b; Vandenkoornhuyse et al. 2002, 2003; Öpik et al. 2003, 2006; Dumbrell et al. 2011). Lange Zeit ging man aufgrund ihrer weiten Verbreitung und unter der Annahme geringer Wirtsspezifität davon aus, dass vergleichbar zu anderen bodenbewohnenden Mikroorganismen die Artzusammensetzung der Glomeromycota auf globaler Skala sehr ähnlich ausfallen sollte („*everything is everywhere, ...*“; Baas Becking 1934 zitiert in Rosendahl 2008). Vor allem durch eine Reihe großangelegter Publikationen um die Arbeitsgruppe von Öpik änderte sich diese Auffassung. Auf Basis molekularsystematischer Methoden stellte sich zunächst heraus, dass distinkte Verbreitungsmuster auch bei den AM-Pilzen existieren und speziell Wälder sowie Graslandsysteme eine besonders hohe AMF-Diversität aufweisen (Öpik et al. 2003, 2006; Kivlin et al. 2011), während anthropogen beeinflusste Flächen (z. B. intensiv bewirtschaftete Ackerflächen) i. d. R. eine vergleichsweise geringe Artenvielfalt zeigen (z. B. Helgason et al. 1998, Öpik et al. 2006, Moora et al. 2014). Diese „lokalen“ Unterschiede des AMF-Speziespools sind mittlerweile recht gut abgesichert. Auf sehr großer geographischer, ökologischer und klimatischer Skala (Kontinente, Biome, Klimazonen) findet man aber tatsächlich eine relativ homogene Artzusammensetzung (Davison et al. 2015). Hierbei wird sowohl eine paläogeographische Komponente als auch ein anthropogener Einfluss als Grund für die weite Verbreitung vieler AMF-Taxa diskutiert (Morton et al. 1995, Rosendahl 2008, Davison et al. 2015). Als Ursache für die distinkteren AMF-Gesellschaften (*communities*) werden Umweltfaktoren, wie z. B. Temperatur und Niederschlag auf

größerer Skala, auf kleinerer Skala abiotische Komponenten wie Lichtmenge, Boden-pH, Bodenstruktur (z. B. Streudicke) sowie lokale Nährstoffverfügbarkeit und biotische Faktoren wie die Wirtspflanzendiversität herangezogen (Öpik et al. 2006, 2013a; Kivlin et al. 2011, Oehl et al. 2011a; Davison et al. 2016, Zobel & Öpik 2014, Vályi et al. 2016, Sheldrake et al. 2017a, Koorem et al. 2017, Horn et al. 2017; S. 102, Fig. 29). Endgültige Klarheit über den Zusammenhang von Wirtspflanzendiversität und Zusammensetzung der Pilzgesellschaft existiert aber noch nicht. So gibt es Analysen, die stark für eine gegenseitige Abhängigkeit der Wirtsdiversität und Zusammensetzung der AMF-Community sprechen (*passenger/driver*-Hypothese; Walker 1992) (Hart et al. 2001, Moora et al. 2004, Van der Heijden et al. 2006; Oehl et al. 2011a, Zobel & Öpik 2014, Hiiesalu et al. 2014, Martínez-García et al. 2015, Vályi et al., 2015, García de León et al. 2016) und andere, welche einen solchen Zusammenhang nicht nachweisen können (Horn et al. 2017).

AMF tragen über ihre ausgeprägte Fähigkeit zur Mineralstoffaufnahme und deren Transfer in die Wirtspflanzen maßgeblich zur Erhöhung der pflanzlichen Produktivität bei (Smith & Read 2008). Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Aufnahme und Speicherung speziell von Phosphat und Stickstoff sind AM-Pilze neben anderen Mykorrhizapilzen maßgeblich für die Reduktion von Nährstoffverarmungen durch niederschlagsbedingte Auswaschung verantwortlich (z. B. Read & Perez-Moreno 2003, Van der Heijden et al. 2015; Martínez-García et al. 2017). Neben dem angesprochenen positiven Einfluss auf die Wirtspflanze (vgl. Kapitel III.6.2), wird die AM als bedeutendes regulatives Element bei der Zwischenspeicherung wichtiger Treibhausgase wie CO₂ und N₂O betrachtet (geschätzt wird, das weltweit ca. fünf Milliarden Tonnen Kohlenstoff pro Jahr in das Hyphensystem der AM transferiert und dort temporär fixiert werden; Schüssler et al. 2007). Die AM scheint allerdings sehr sensitiv auf eine Erhöhung des CO₂ und der globalen Durchschnittstemperatur zu reagieren und könnte in diesen Fall auch wieder verstärkt gebundenes CO₂ freisetzen (Rillig et al. 2002, Rillig 2004a, Cheng et al. 2012). Das extraradikale Myzel der AMF ist darüber hinaus maßgeblich an der Aggregation von Bodenpartikeln und Bindung von Ionen beteiligt (u. a. über die Freisetzung des Glykoproteins Glomalin; Rillig et al. 2004b, Gonzales-Chavez et al. 2004, Purin & Rillig 2007) und reduziert somit das Abtragen und Auswaschen der Bodenkrume mit den darin gebundenen Nährstoffen (Wilson et al. 2009, Zhu & Miller 2003, Giri & Saxena 2017).

Die lokale AMF-Zusammensetzung beeinflusst aufgrund der differentiellen, wirtsabhängigen Funktion einzelner Symbionten auch die intraspezifische Konkurrenzfähigkeit und somit Diversität der Wirtspflanzen in deren Habitat (Van der Heijden et al. 1989a,b; 2003 ; Hartnett & Wilson 1999,

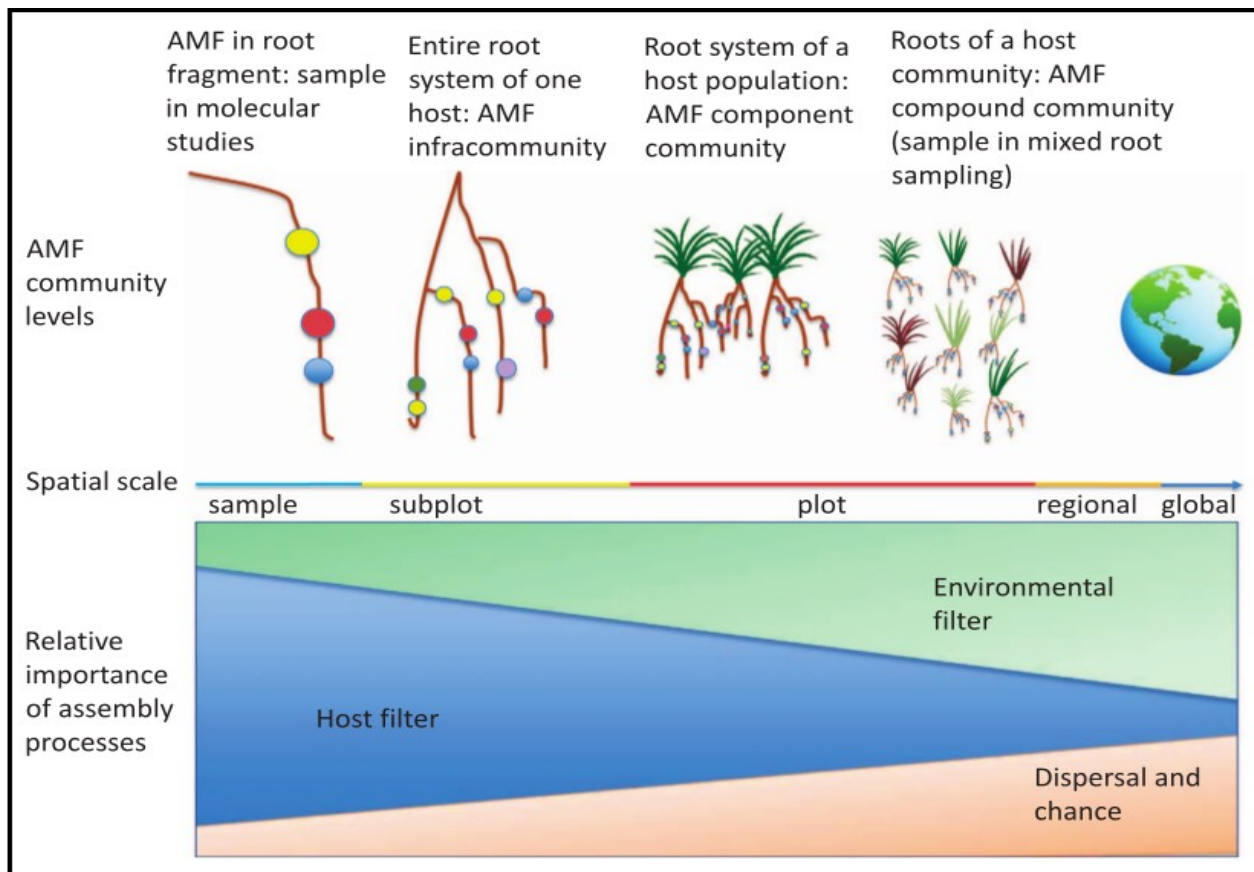


Fig. 29: Welche Faktoren bestimmen die Verbreitung der AMF? Hierarchisches Modell zum Einfluss der abiotischen und biotischen Umwelt (*environmental filter*), der Wirtspflanzen (*host filter*) und des Ausbreitungsvermögens der AMF (*dispersal and chance*) auf die klein- bis großräumige Diversität der AMF. Ersichtlich wird der unterschiedliche Relevanz der diversitätsbestimmenden Faktoren in Abhängigkeit von der angelegten geographischen Dimension. Auf großräumlicher Skala (*global, regional*) dominieren Umweltfaktoren wie großklimatische Rahmenbedingungen, Vegetationstypen (Biome) und physische Verbreitungsbarrieren, während auf kleinerer Skala (*plot, subplot, sample*) zunehmend lokale, abiotische und biotische Faktoren wie z. B. Bodentyp und die Wirtspflanzendiversität die *Community*-Struktur der AMF beeinflussen. (nach Vályi et al. 2016)

Smith et al. 1999, O'Connor et al. 2002, Klironomos 2003, Vogelsang et al. 2006). AMF scheinen demnach ein wichtiger Faktor für die Stabilisierung, aber auch die Dynamik der Artzusammensetzung eines Habitats zu sein und sind vor diesem Hintergrund sowohl für die Verbreitung als auch für die Eindämmung invasiver Pflanzenarten von Bedeutung (z. B. Vogelsang & Bever 2009). Cameron (2010) weist in diesem Zusammenhang auf die Möglichkeit hin, die pflanzliche Diversität eines Ökosystems über die Kontrolle des AMF-Pools gezielt zu manipulieren um so z. B. in Agrarsystemen nicht mykorrhizierte Ruderalarten ohne Herbizideinsatz zu verdrängen.

Ein bedeutender ökologischer Faktor sind auch die gemeinsamen Hyphennetzwerke (*common mycorrhizal networks, CMN*), in denen viele unterschiedliche Wirtsarten miteinander verbunden sein können (Van der Heijden & Horton 2009, Horton 2015; vgl. S. 104, Fig. 30). Viel Forschung wurde betrieben, um die Hypothese zu untersuchen, ob Wirtspflanzen untereinander photosynthetisch fixierten Kohlenstoff über das gemeinsame Hyphennetzwerk austauschen (u. a. Francis & Read 1984). Trotz deutlicher Hinweise auf einen solchen Transfer zwischen ektomykorrhizierten Pflanzen (Simard et al. 1997), konnte dies jedoch bisher für die AM in keinem Fall bestätigt werden. Selbst wenn z. B. durch gezielte Beschattung einzelner Pflanzen im Netzwerk künstlich eine C-Senke generiert und als Folge ein erhöhtes ^{14}C Signal in deren Wurzeln nachgewiesen wurde, verblieb der markierte Kohlenstoff dennoch stets innerhalb der intraradikalen Hyphen des pilzlichen Endosymbionten und konnte nicht im Gewebe der „Sink-Pflanze“ nachgewiesen werden (Robinson & Fitter 1999). Aber auch ohne einen direkten Kohlenstofftransfer könnten Pflanzen von dem gemeinsamen Hyphensystem profitieren. So würde die Einbindung von Jungpflanzen in etablierte Hyphennetzwerke deren „Kosten“ für die Symbiose deutlich reduzieren und diese dadurch im Verhältnis zu ihrer Eigeninvestition überproportional von dem mineralischen Nährstoffstrom im Netzwerk profitieren (Read et al. 1976, Grime et al. 1987, Van der Heijden & Horton 2009). Hierdurch könnte die Etablierung vieler Jungpflanzen unter Bedingungen geringer Licht und Nährstoffversorgung in sehr konkurrenzstarken Habitaten (Wälder, Graslandvegetation) vermutlich deutlich erleichtert sein (Van der Heijden 2004, Van der Heijden & Horton 2009). Auch für viele mykoheterotrophe Pflanzen ist die Einbindung in ein Hyphennetzwerk essentiell und in diesen Spezialfällen könnte auch die Ausbildung eines *Sink-source*-Gradienten von realer ökophysiologischer Bedeutung für den Nachfluss von Assimilaten in die heterotrophe Pflanze sein (Imhof & Weber 1997). Weiterhin deuten aktuelle Daten stark in Richtung einer zentralen Bedeutung der Hyphennetzwerke für die Kommunikation zwischen den im Netzwerk eingebundenen Pflanzen. So kann über den Austausch von Botenstoffen über das Hyphennetzwerk offenbar auch die Pathogenabwehr zwischen den untereinander verbundenen Wirtspflanzen koordiniert werden (Song et al. 2010, Barto et al. 2012, Babikovka et al. 2013, Gilbert & Johnson 2017). Letztlich wird auch die Möglichkeit einer ökophysiologischen Verbindung gänzlich unterschiedlicher Mykorrhizatypen, wie z. B. ECM und AM über Wirtspflanzen, die duale Mykorrhizatypen aufweisen (wie z. B. *Populus spec.*), diskutiert. In diesen Fällen würde das CMN sogar einen noch weiteren Teile einer Pflanzengesellschaft miteinander verknüpfen.

Für weitere Informationen zu den zahlreiche Ökosystemleistungen der AM sei u. a. auf den Artikel von Van der Heijden et al. (2015) verwiesen.

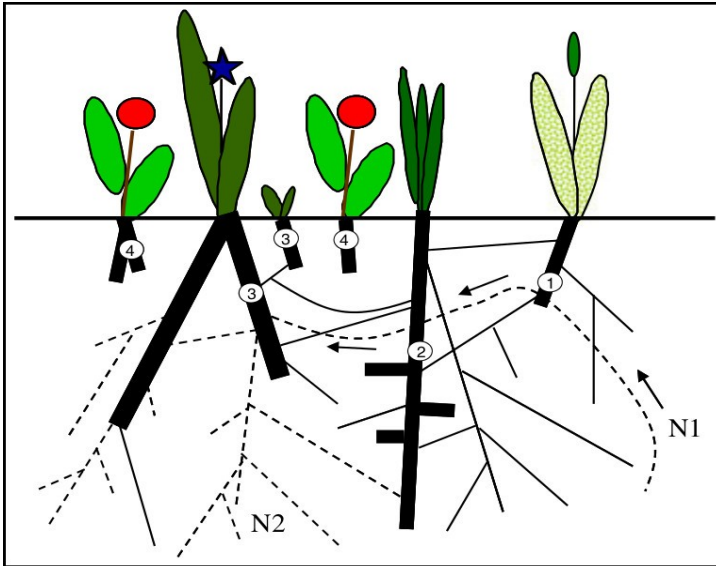


Fig. 30: *Common hyphal network (CMN)* in der AM. Unterschiedliche Wirtspflanzenarten (1 – 3) sind über Hyphen miteinander verbunden sein. Pflanze 1, 2 & 3 werden über Pilz A (gestrichelte Linie) und parallel auch über Pilz B (durchgezogene Linie) miteinander verknüpft. Pflanze 4 ist nicht mykorrhiziert. Jungpflanze von Art 3 ist auch in das Hyphennetzwerk eingebunden und kann so ebenfalls von den darin translozierten Nährstoffen (N1 & N2, siehe Pfeile) profitieren. (nach Van der Heiden & Horton 2009).

IIX Mykoheterotrophie - eine Einführung

IIX.1 Einleitung

Die überwältigende Mehrheit aller Pflanzen fixiert die Energie des Sonnenlichtes in einem Prozess, welcher die Lichtenergie zur Fixierung von Kohlendioxid in Form komplexer, hochreduzierter Kohlenstoffverbindungen (Assimilate) nutzt. Dieser Prozess autotropher Energiegewinnung wird als Photosynthese bezeichnet. Er dient allerdings nicht nur dem Katabolismus, sondern versorgt die Pflanze ebenfalls mit den kohlenstoffhaltigen Grundbausteinen ihres Anabolismus. Einige wenige Landpflanzen allerdings sind gänzlich unfähig oder zumindest stark eingeschränkt, diesen lichtabhängigen Prozess zur Energie- und Kohlenstoffgewinnung zu nutzen. Sie wachsen auch nicht über spezielle Kontaktorgane in andere Pflanzen ein, um als Parasiten ihre Nährstoff- und Kohlenstoff(C)-Bedürfnisse zu decken (Kuijt 1969, Weber & Forstreuter 1993) oder fangen und verdauen Insekten und andere Kleinlebewesen (Karnivorie; Juniper et al. 1989). Alternativ deckt diese Gruppe chlorophyllloser oder chlorophyllarmer Pflanzen ihren Energie- und Kohlenstoffbedarf vollständig oder zumindest zu einem signifikanten Teil über eine spezielle Form der Vergesellschaftung mit symbiotischen Pilzen in ihren Wurzeln oder Rhizomen (Furman & Trappe 1971). Diese, als Mykoheterotrophie (Leake 1994) bezeichnete Lebensweise, kann als Extremform der gemeinhin als mutualistisch betrachteten Mykorrhiza-Symbiose angesehen werden (Fig. 31).

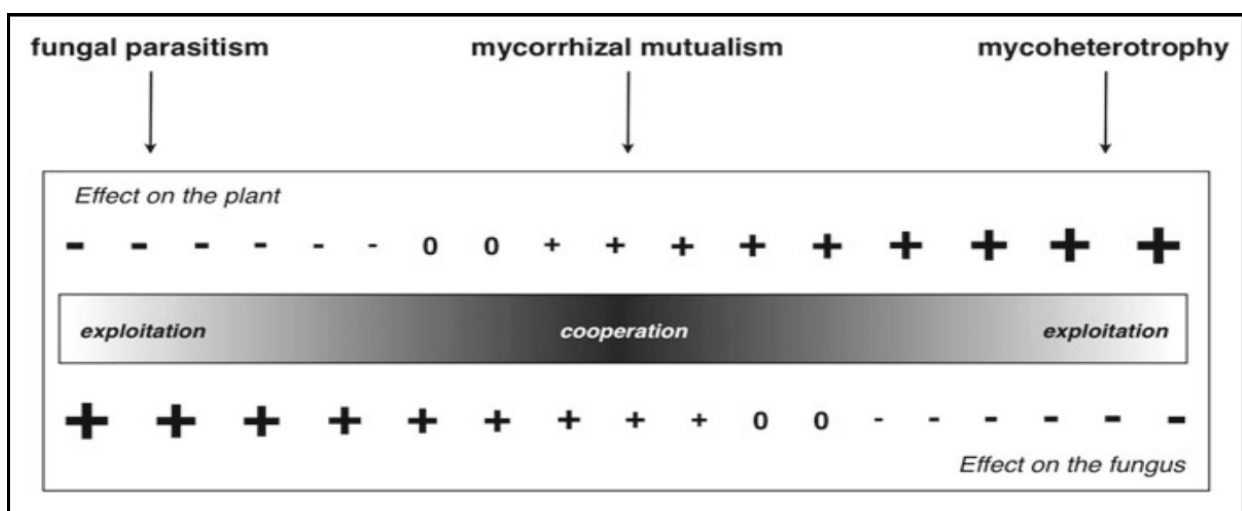


Fig. 31: Kontinuum der symbiotischen Interaktion in der Mykorrhiza vom Parasitismus durch den Pilz über ausbalancierte Symbiose (Mutualismus) bis zum Parasitismus der Pflanze am Pilz (Mykoheterotrophie). (nach Merckx 2013)

Es erscheint uns heute naheliegend, die Mykoheterotrophie als Sonderform der Mykorrhiza zu betrachten, doch setzte sich die Erkenntnis, dass chlorophylllose Pflanzen Pilze als Kohlenstoffquelle nutzen, nur langsam in der Botanik durch. Über viele Jahre sprach man daher mykoheterotrophe Arten auch als sog. „Saprophyten“ an, also Pflanzen, die ähnlich wie zahlreiche Pilze in der Lage seien, abgestorbenes organisches Substrat (Streu und Humus) direkt als Kohlenstoffquelle zu nutzen, und betrachtete mit wenigen Ausnahmen (s. u.) die assoziierten Pilze entweder als Kommensalen oder als Mutualisten, allerdings nur für die Versorgung der Wirtspflanze mit mineralischen und organischen Verbindungen sowie Stickstoff (Stickstoff wurde in der frühen Phase der Mykorrhizaforschung häufig als eigenständige Nährstofffraktion betrachtet), aber nicht als Quelle von Kohlenstoff (z. B. Groom 1895a,b; Johow 1885, Janse 1897; Magnus 1900, Penzig 1901, Van der Pijl 1934). Ebenfalls weit verbreitet in der Frühphase ihrer Erforschung war die Vorstellung von einer parasitären Lebensweise mykoheterotropher Pflanzen (z. B. Unger 1840, Druse 1873). So wurde im Falle von *Hypopitys monotropa* wiederholt von der Existenz parasitärer Kontaktorgane (*Haustorien*) gesprochen, mit denen die chlorophylllose Pflanze in die Wurzeln der Begleitpflanzen eindringe, um ihren Bedarf an organischen und anorganischen Nährelemente direkt aus den autotrophen Wirten zu decken (vgl. hierzu z. B. Franke 1934 für einen Überblick in die frühe Forschungsgeschichte von *H. monotropa*). Der Gedanke von Pflanzen, die ausschließlich den Pilz für ihre Kohlenstoffversorgung nutzen, schien hingegen nur schwer akzeptierbar (vgl. z. B. Kerner 1887).

Die Erkenntnis, dass alle mykoheterotrophen Pflanzen Vertreter hochspezialisierter Mykorrhizapflanzen sind, die ihre trophische Abhängigkeit über das normale Maß mykotropher Arten, d. h. der Versorgung mit mineralischen Nährstoffen wie Phosphat und Stickstoff auf Kohlenstoff ausgeweitet haben, setzte sich also erst verhältnismäßig spät in der Wissenschaft durch. Dies erscheint um so erstaunlicher, als dass die Geschichte der Mykorrhizaforschung in vielerlei Hinsicht auch die Geschichte der Erforschung der Mykoheterotrophie ist. So sind die frühen, teils wegweisenden Arbeiten im Feld der Mykorrhizaforschung, auch an mykoheterotrophen Arten erfolgt. Pfeffer (1877) stellt die Hypothese auf, dass der Pilz in Orchideen u. a. organische Verbindungen aus dem Boden aufnimmt und an den Pflanzenwirt weiterleitet. Kamienski (1881, 1882) und wenig später auch Frank (1885b) beschreiben eingehend die enge morphologische Verbindung zwischen Wurzeln von *Hypopitys monotropa* und Pilzhyphen. Hierbei interpretiert Kamienski als erster Forscher diese Verbindung in einem dezidiert symbiotischen Kontext. Kamienskis Interpretation der symbiotischen Verhältnisse zwischen *H. monotropa* und dem assoziierten Pilz (er betrachtet diese Verbindung als mutualistisch) wird daher neben der Arbeit von

Frank zurecht als eigentlicher Beginn der Mykorrhizaforschung betrachtet (Trappe & Berch 1985). Kamienski (1881, 1882) und Frank (1885b, 1888) sprechen bereits konkret die Möglichkeit an, dass die chlorophylllose Pflanze organische Verbindungen vom Pilz erhält, welche dieser wiederum aus dem Humus (Frank, Kamienski) oder aus den umliegenden Nachbarbäumen bezieht (Kamienski). Beide Hypothesen stehen damit in deutlichem Kontrast zu zeitgenössischen Interpretationen von Forschern wie Groom (1895a), welche den Auslegungen von Drude (1873) folgend, den Pilz in *H. monotropa* und *Neottia nidus-avis* nicht in einem symbiotischen Kontext, sondern als Parasiten bzw. Nutznießer der Stoffflüsse in den Wurzeln der chlorophylllosen Pflanzen betrachten. Kamienski, Frank, aber auch spätere Autoren wie MacDougal (1899), Magnus (1900) und Marcuce (1902) bezeichnen trotz der von ihnen postulierten Rolle des Pilzes beim Kohlenstofftransfer die untersuchten chlorophylllosen Arten aber weiterhin als „Saprophyten“. Diese aus heutiger Sicht widersprüchliche Ansicht erklärt sich über die damalige Bewertung des Humus als eigentliche Quelle der organischen Stoffe für die „saprophytische Pflanze“ - die Art des Transfers in die Pflanze wurde hingegen nicht als Widerspruch zum Terminus „Saprophyt“ erachtet (vgl. Frank 1885b, 1888). Auch existierten bereits konkrete Vorstellungen, auf welche Art und Weise der Übergang organischer Verbindungen in den „Saprophyten“ erfolgen könnte. So betrachtet Kamienski (1881, 1882) den Pilz als Mittler bei dem Übertritt des Kohlenstoffs in die chlorophylllose Pflanze. Dieser, so die Interpretation, besitze die Fähigkeit, organische Verbindungen aus dem Substrat aufzunehmen - eine Eigenschaft, die der Pflanze selbst fehle und für deren Bereitstellung sie dem Pilz Lebensraum in den Wurzeln biete. Diese Ansicht vertritt auch MacDougal (1899) und belegt sie mit dem Terminus „symbiotischer Saprophytismus“ (*symbiotic saprophytism*). Somit wurde dem Pilz eine zentrale Rolle bei der Aufspaltung komplexer organischer Verbindungen des Humus für die „saprophytisch“ lebende Wirtspflanze zugestanden. Die Pflanzen, so die verbreitete Vorstellung, nehmen die niedermolekularen Produkte dieses Prozesses dann direkt aus dem Boden oder indirekt über den „Verdau“ des Pilzes auf (siehe auch Burgeff 1909, 1932). In einem weiteren Modell werden die von der Pflanze direkt aufgenommenen, höhermolekularen Bestandteile des Humus innerhalb der Wurzel vom Pilz in für den Wirt verwertbare Zwischenstufen verwandelt und wieder an die Pflanzenzelle abgegeben („Umwandlungstheorie“ vgl. Magnus 1900 zitiert in Burgeff 1909). Auch hier wird der Pflanze also weiterhin die Fähigkeit zur direkten Aufnahme der organischen Verbindungen zugesprochen. Kusano (1911) spricht zur selben Zeit hingegen bereits konkret von einem direkten Parasitismus der chlorophylllosen Orchidee *Gastrodia* an ihrem Pilz und greift hiermit eine sehr ähnliche Vermutung von Kerner (1887) auf, welche dieser so bereits für *H. monotropa* formuliert hatte, die aber auch in den Arbeiten von Kamienski (1881, 1882, auch *H.*

monotropa) und Frank (1892, *Corallorhiza spec.*, *Neottia nidus-avis*) fassbar wird. Auch Bernard (1899 zitiert in Burgeff 1909 und Selosse et al. 2011) formuliert in dieser Periode sehr klar die Ansicht, dass chlorophylllose Keimlinge der Orchideen unter natürlichen Bedingungen zwingend auf ihren pilzlichen Endosymbionten für eine erfolgreiche Keimlingsentwicklung angewiesen sind. Fuchs & Ziegenspeck (1924) messen die lytischen Fähigkeiten der „Verdauungszellen“ partiell mykoheterotropher und mykoheterotropher Orchideen und belegen auf Basis detaillierter Trockengewichtsanalysen die Bedeutung der pilzstämmigen kohlenstoff- und stickstoffhaltigen Verbindungen für die Entwicklung der Pflanzen. Franke (1934) untersucht erneut *H. monotropa* und geht wie Burgeff (1909, 1932) von der Übertragung pilzstämmiger organischer Verbindungen in den chlorophylllosen Wirt aus. Spätestens ab diesem Zeitpunkt wird deutlich, wie nah die Autoren bereits an der modernen Interpretation der mykoheterotrophen Ökophysiologie waren, selbst wenn der Begriff „Saprophyt“ noch sehr lange Verwendung finden sollte (vgl. Leake 2005). Rommel (1939) betrachtet *H. monotropa* als Epiparasiten an den benachbarten Gehölzen⁴. Die chlorophylllose Pflanze ist nach seiner Ansicht über einen gemeinsamen Mykorrhizapilz mit der autotrophen Pflanzen verbunden und nutzt daher dezidiert diese und nicht die organischen Bestandteile des Bodens als ultimative Quelle organischer Verbindungen. Neben Kamienski bereitet damit vor allem Rommel das theoretische Fundament für den Jahre später durch Björkmann (1960) erfolgenden, ersten physiologischen Nachweis eines pilzvermittelten Stofftransfers aus autotrophen, ECM-assoziierten Begleitpflanzen in den Kormus von *H. monotropa*. Der Autor erbrachte diesen Nachweis durch das Einbringen hyphenundurchlässiger Barrieren zwischen *H. monotropa* und den ECM-ausbildenden Nachbarbäumen sowie kurze Zeit später auch über den Beleg eines Transfers von radioaktiv markiertem Kohlenstoff und Phosphat (¹⁴C, ³²P) aus den Nachbarbäumen in die chlorophylllose Pflanze. Kurze Zeit später beschreibt Smith (1966, 1967) den Transport von Kohlenhydraten aus einem Nährmedium in das mykoheterotrophe Keimstadium einer Orchidee über die Hyphen des assoziierten Mykorrhizapilzes - ein Befund den Hadley (1969) weiter substantivieren konnte und damit die Jahrzehnte vorher auf morphologischen und keimphysiologischen Daten fußenden Erkenntnisse Bernards untermauert (Bernard 1899, zitiert in Selosse et al. 2011). Zusammen lieferten diese Ergebnisse den ersten eindeutigen Beweis für den Mykorrhizapilz als einzige Quelle der Kohlenstoffs in mykoheterotrophen Pflanzen. Weitere Studien zum pilzvermittelten Transfer von Kohlenhydraten von einer autotrophen „Donor-“ in eine mykoheterotrophe „Akzeptorpflanze“, erfolgten erst Jahre später - so z. B. durch McKendrick et al. (2000) für die chlorophyllverarmte Orchidee *Corallorhiza trifida*. Diese Form der

⁴ Wie erwähnt denkt auch Kamienski (1881, 1882) bereits sehr ähnlich, ohne allerdings diesen Ansatz gegenüber der Idee von einer saprophytischen Lebensweise von *Hypopitys monotropa* zu bevorzugen.

Kohlenstoffaquierung, bei der nicht der Pilz, sondern eine autotrophe Donorpflanze die ultimative C-Quelle darstellt, wird bis heute immer wieder auch mit dem Begriff „Epiparasitismus“ belegt (Björkmann 1960, Cullings 1996, Bidartondo & Bruns 2002) - diese Bezeichnung, genau wie der Terminus „Parasit“, wird aber aufgrund ihrer Vorprägung für die Beschreibung parasitärer Blütenpflanzen (Kuijt 1969) und der Tatsache, dass vereinzelt chlorophylllose Orchideen tatsächlich mit saprophytischen Mycobionten vergesellschaftet sind (somit keine autotrophe Pflanze als ultimative C-Quelle nutzen; vgl. Kapitel II.2.2) und letztlich wegen des bisher fehlenden Nachweises der Schädigung des Primärwirts (also der autotrophen Donorpflanze) meist vermieden (Merckx 2013).

Von Anfang an äußerte sich das Interesse an dieser außergewöhnlichen Lebensform aber nicht nur in den Versuchen ihre einzigartigen Ökophysiologie zu entschlüsseln, sondern auch in der detaillierten Beschreibung ihrer morphologischen und anatomischen Charakteristika. Johow (1885) beschreibt mehrere neuweltliche mykoheterotrophe Pflanzen aus den Gattungen *Burmannia*, *Apteria*, *Voyria* und *Wulfschlaegelia*. Groom (1895a,b) untersucht zahlreiche mykoheterotrophe Monokotyledonen und Janse wiederum mehrere chlorophylllose Arten auf Java (Janse 1897). Zum Teil beschreiben diese Autoren neben der oberirdischen Morphologie auch bereits detailliert den pilzlichen Symbionten in den Wurzeln und Rhizomen der von ihnen untersuchten Arten. So unterziehen auch Penzig (1901) und Van der Pijl (1934) die Mykorrhiza der von ihnen untersuchten chlorophylllosen Gattung *Epirixanthes* einer genauen Betrachtung - hier also erfolgt die erste Beschreibung der Mykorrhiza eines mykoheterotrophen Vertreters der Polygalaceae.

IIX.2 Anatomische und physiologische Aspekte des Stofftransfers zwischen Pilz und mykoheterotropher Pflanze

Wie in dem Vorgängerkapitel bereits anklung, wurden wichtige Gedanken über die Ernährung mykoheterotropher Pflanzen bereits frühzeitig anhand anatomischer Befunde formuliert. Arbeiten von Bernard (1899, zitiert in Selosse et al. 2011), Jennings & Hanna (1898, zitiert in Marcuse 1902), Kusano 1911, Burgeff (1909, 1932), Burges (1939) und Fuchs & Ziegenspeck (1924) gehen in den Orchideen von einer Lysis des Pilzes durch die Wirtszelle als Mechanismus der Stoffmobilisierung aus. Ein Gedanke, der bereits bei Frank (1891) in seiner Beschreibung der Orchideen als „pilzverdauende“ bzw. „pilzfressende“ Pflanzen anklingt. Ähnlich nutzt Bernard (1911, zitiert in Selosse et al. 2011) in seinen Arbeiten über die Mykorrhiza der Orchideen den Begriff „Phagocytosis“, impliziert diese allerdings als Mechanismus der Pflanze zur Kontrolle über den „aggressiven“ Endosymbionten. Selbst wenn letztere Interpretation auch in der aktuelleren

Literatur noch erwähnt wird (Rasmussen 2003), so ist sie aber auf Basis aktueller transkriptomischer Daten kaum mehr haltbar (Shimura et al. 2007, Perotto et al. 2014). Hingegen wird die Idee eines enzymatisch basierten Abbaus der pilzlichen Biomasse zum Zweck der Kohlenstoffgewinnung bis heute untersucht (z. B. Jonsson & Nylund 1979, Hynson et al. 2013, Kuga et al. 2014, Bougoure et al. 2014). Für diese Form der C-Mobilisierung spricht die Beobachtung einer verstärkten Expression von hyphenwand-degradierenden Chitinasen (N-Acetylglucosaminidase & Endochitinase) und β -1,3-Glucanasen in besiedelten Wurzelabschnitten von mykorrhizierten, grünen Orchideen und autotrophen AM-Wirtspflanzen (Zhao et al., 2013, 2014) sowie die grundsätzliche Fähigkeit von Pflanzen, weitere zentrale Enzyme wie Lipasen, Trehalasen, Amylasen und Proteasen zu exprimieren (Müller et al. 1995, Taiz et al. 2015), mit deren Hilfe der pilzliche Zellinhalt (z. B. Speicherlipide, Trehalose & Glykogen, Proteine) für den Wirt verwertbar wird (*mycophagy*, nach Rasmussen & Rasmussen 2009). Speziell Chitinasen und Glucanasen sind hierbei von großer Bedeutung für den enzymatischen Aufschluss der Hyphen, auch wenn deren evolutionärer Ursprung sehr wahrscheinlich in der Abwehr parasitärer Pilze und vermutlich auch im Abbau pilzlicher Elicitoren (Chitin) in der Mykorrhiza und damit der Dämpfung der pflanzlichen Abwehrreaktion liegen dürfte (Smith & Read 2008, Zhao et al. 2013, Rasmussen & Rasmussen 2014). Darüber hinaus wird der lytische Abbau des pilzlichen Symbionten auch als Mechanismus zur Regeneration besiedlungsfähiger Gewebeabschnitte diskutiert (Brundrett 2004) - ein Punkt, der für alle intrazellulär mykorrhizierten Pflanzen gilt, aber besonders in den häufig kleindimensionierten Wurzelsystemen der MHPs wichtig sein sollte. Ein weiteres Indiz für die Bedeutung lytischer Prozesse bei der Ernährung mykoheterotropher Pflanzen ist die große Menge amorph verklumpter pilzlicher Hyphen in den Zellen ihrer Wurzeln und Rhizome. Auch dies deutet auf einen besonders intensiven und schnellen Abbau der pilzlichen Biomasse in diesen Arten hin (vgl. Imhof et al. 2013). Diese Interpretation wird auch gestützt in einer der seltenen morphologischen Studien, in denen neben den chlorophylllosen auch nah verwandte, autotrophe Arten untersucht und in Letzteren eine langsamere Degeneration des intrazellulären Pilzmaterials beobachtet wurde (Yamato et al. 2014). Ebenso kann der (vermutete) Übertritt pilzlichen Cytoplasmas in die Epidermiszellen von *Hypopitys monotropa* und verwandten Arten (Ptyophagie s. o.) bzw. von pilzlichen Speicherlipiden in die Gametophyten von *Psilotum nudum* (Tolypophagie s. o.) ohne den Einfluss pflanzlicher Enzyme nur schwer erklärt werden (Lutz & Sjolund 1973, Duddridge & Read 1982a, Peterson et al. 1981; Schmid & Oberwinkler 1994). Die genauen physiologischen Vorgänge sind in all diesen Arten aber noch ein Feld intensiver Forschung und längst nicht vollständig verstanden. Ein indirekter Beleg für die Verdauungshypothese kommt aber

auch von Seiten vieler Studien an mykoheterotrophen Pflanzen, die nach bisheriger Datenlage stets intrazelluläre Besiedlungsmuster aufweisen (Imhof et al. 2013) - eine zwingende Voraussetzung für einen einseitigen, auf Verdauungsprozessen beruhenden C-Erwerb, wohingegen ein reziproker Nährstofftransfer über aktive Prozesse (Transporter/Importer) sehr wohl über eine extrazelluläre Schnittstelle zwischen den Symbionten erfolgen kann (vgl. ECM). Trotz dieser deutlichen anatomisch-histologischen Hinweise wurde die Beteiligung lytischer Prozesse an dem Stofftransfer vom Pilz in die Pflanze selbst in mykoheterotrophen Arten lange angezweifelt (Dearnaley et al. 2012). Ursache hierfür waren vor allem Berechnungen, welche zumindest für die arbuskuläre Mykorrhiza autotropher Pflanzen eine signifikante Aufnahme von Phosphat über den Abbau pilzlicher Biomasse ausschloss (Cox & Tinker 1976). Auch sprach der Befund messbarer Wachstumsimpulse in mykoheterotrophen Orchideenkeimlingen zeitlich vor dem Einsetzen der Lysis intrazellulärer pilzlicher Strukturen sowie die sehr schnelle Übertragung von ¹⁴C-Isotopen aus dem markierten Pilz in die Zellen der Keimlinge für die Beteiligung vitaler Biomembranen des Pilzes und der Pflanze am Kohlenstofftransfer (Hadley et al. 1971, Hadley & Williamson 1971, Cameron et al. 2008). Rehabilitiert wurde das Konzept des Hyphenverdaus dann aber durch die Untersuchungen von Bougoure et al. (2014) und Kuga et al. (2014). In der von ihnen untersuchten Mykorrhiza von Orchideenkeimlingen unterschiedlicher trophischer Strategien (autotroph vs. mykoheterotroph) beziehen beide Arten (*Spiranthes sinensis*, *Rhizanthella gardneri*) Kohlenstoff, sehr wahrscheinlich in Form von Kohlenhydraten und organisch gebundenem Stickstoff, über den Abbau der Hyphenknäuel (vgl. S. 112, Fig. 33). Die Studie von Kuga et al. zeigt allerdings gleichermaßen, dass zumindest in den mykoheterotrophen Keimstadien adult autotropher Orchideen ein nicht unerheblicher Teil des Kohlenstoffs und Stickstoffs auch über aktive Transportprozesse entlang der vitalen pilzlichen Plasmamembran aus den Hyphen in die umgebende Pflanzenzelle transloziert wird; eine Beobachtung, die so auch in partiell mykoheterotrophen Ericaceae der Gattung *Pyrola* gemacht wurde (Hynson et al. 2013). Interessanterweise konnten derartige aktive Transportprozesse nicht in der mykoheterotrophen Art *R. gardneri* gemacht werden (Bougoure et al. 2014; S. 112, Fig. 33b1, b2) - ein möglicher Hinweis auf die besondere Abhängigkeit von digestiven Prozessen für eine ausreichend potente C-Versorgung, speziell in mykoheterotrophen Pflanzen. Ein lytisch basierter Kohlenstofftransfer würde dann in der Tat die Notwendigkeit einer physiologisch aktiven Schnittstelle auf Seiten des Pilzes erübrigen. Hierfür sprechen auch die Daten von Suetsugu et al. (2017), die in chlorophylllosen Varianten von *Epipactis helleborine* Hinweise auf erhöhten oxidativen Stress (im Vergleich zu grünen Individuen) finden und als Erklärung die verstärkte Verdauung pilzlicher Biomasse in den Wurzeln anführen.

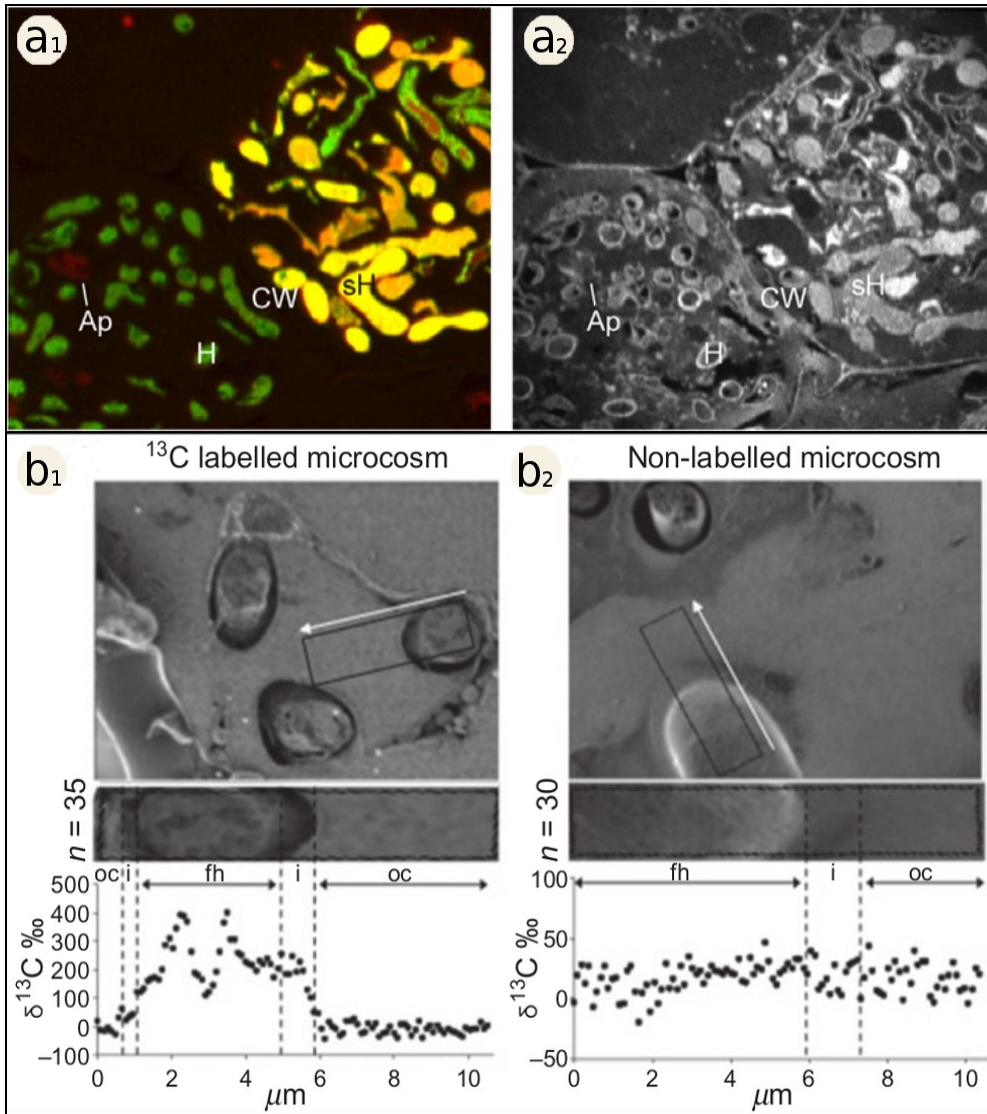


Fig. 33: a1) Isotopenmikroskopisches Bild zweier Cortezellen in den Protokormen von *Spiranthes sinensis*, besiedelt durch *Ceratobasidium* sp.. Der Pilz wurde auf isotopen-markiertem Nährmedium (^{13}C -Glucose, $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}$) kultiviert und wuchs in den Keimling ein (Diffusion der Marker in den Keimling direkt aus dem Medium wurde ausgeschlossen). Seneszenz (d. h. im Verdau begriffene) Hyphenknäuel (sH, rechte Zelle) zeigen eine deutlich intensivere Akkumulation von markiertem

^{13}C und ^{15}N [Hyphen erscheinen gelb bis orange, siehe z. B. Hyphe (sH) in Wirtszelle rechts oben) als die vitalen Knäuel (Hyphen erscheinen grün, siehe z. B. Hyphe (H) in Wirtszelle links unten)]. a2) TEM-Vergleichsbild des Ausschnitts in a1). Gut zu erkennen sind die vorangeschrittene Denaturierung der Hyphen in der rechten Zelle (sH) im Vergleich zu den vitalen Hyphen in der linken Zelle (H). Ap = Amyloplast (nur in den vitalen Zellen beobachtbar). b1) Ausschnitt pilzlich besiedelter Cortezellen im Rhizom von *Rhizanthella gardneri*. Im Querschnitt sichtbar sind drei ^{13}C -gelabelte Hyphen des Pilzes. Nano-SIMS Detektion von ^{13}C entlang eines Transekts durch eine vitale Hyphe (fh) bis in das pflanzliche Cytoplasma (oc). Entlang des Transekts findet ein starker Abfall der ^{13}C -Konzentration (dargestellt als $\delta^{13}\text{C} \text{ ‰}$; vgl. Kapitel IIX.4 & IIX.4.1) zwischen Hyphe und Cytoplasma statt, was auf einen Verbleib des Kohlenstoffs in den vitalen Hyphen hindeutet. b2) wie b1, aber ohne künstliches ^{13}C -Label (daher geht nur natürliches ^{13}C in die Messung ein), die Kontrolle zu b1 zeigt eine gleichbleibende ^{13}C -Konzentration entlang des Transekts. Beide Ansätze (a & b) legen nahe, dass ein C-Transfer vornehmlich über den Verdau pilzlicher Biomasse erfolgt. [Bougoure et al. 2013 (b1, b2) & Kuga et al. 2014 (a1, a2)]

Burgeff (1932, 1943) unterscheidet drei Formen der Degeneration pilzlicher Strukturen im Zuge des Stofftransfers in den Wirt. Neben Tolytophagie, der Lysis von Hyphenknäueln (Knäuelverdau), und Thamniscophagie, dem Abbau von Arbuskeln (Arbuskelverdau), beschreibt Burgeff die Ptyophagie, den Übertritt pilzlichen Cytoplasmas aus (lysierten) Hyphenspitzen in die Pflanzenzelle (vgl. S. 114, Fig. 32). In mykoheterotrophen Pflanzen geht der Stofftransfer nahezu immer mit dem Verdau von Hyphenknäueln (Tolytophagie) oder, deutlich seltener, dem Transfer von Pilzplasma über die Hyphenspitze (Ptyophagie) einher (Brundrett 2002). Nur in sehr wenigen Fällen scheint der Stoffübertritt über den Abbau feinverzweigter, arbuskelähnlicher Strukturen zu erfolgen (Thamniscophagie). In letzteren ist aber nicht endgültig klar, ob es sich bei den beobachteten Strukturen um echte Arbuskel oder hochverzweigte Knäuel handelt (Imhof et al. 2013). Sehr augenfällig wird dieses Phänomen in einigen Pteridophyten, welche ebenfalls keine Arbuskel sondern Hyphenknäuel bzw. Sonderstrukturen (s. u.) in ihren mykoheterotrophen Gametophyten ausbilden, in der autotrophen Sporophytengeneration hingegen echte Arbuskel aufweisen (Read et al. 2000, Winther & Friedman 2007, 2008, 2009). Thamniscophagie scheint also ein, wenn überhaupt, nur selten beschrittener Weg in der Evolution mykoheterotropher Pflanzen gewesen zu sein. Mehrere Gründe können hierfür angeführt werden. Zum einen ist es möglich, dass hochverzweigte Arbuskel als sehr effizient strukturierte Zucker-Absorptionsorgane (vgl. Kapitel III.6.1 & III.6.2) mit den Zellen des mykoheterotrophen Pflanzenwirts um die Aufnahme von Kohlenhydraten konkurrieren könnten - ein solcher Prozess würde der Ernährungsstrategie einer mykoheterotrophen Pflanze eindeutig entgegenlaufen (Imhof & Weber 1997). Zum anderen besitzen Arbuskel aber ein vergleichsweise kleines Volumen/Oberfläche-Verhältnis (Dickson & Kolesik 1999), ein Befund, der als sinnvolle Adaptation an einen aktiven, transportergetragenen, bidirektionalen Stofftransfer betrachtet werden kann, aber unter Maßgabe lytischer Stoffgewinnung, bei der ein möglichst großes Hyphenvolumen mehr nutzbare Biomasse bedeutet, für den mykoheterotrophen Wirt eher ungünstig erscheint (Rath 2005, Rasmussen & Rasmussen 2009). Aus den genannten Gründen, könnte es daher im Verlauf der Evolution in Richtung Mykoheterotrophie immer wieder zur Reduktion von Arbuskeln zugunsten von voluminösen Hyphen in arbuskulär mykorrhizierten Pflanzen gekommen sein.

Abschließend sei noch auf die Existenz von Sonderformen hingewiesen, die sich weder einer Ptyo- noch Tolyto- oder Thamniscophagie eindeutig zuordnen lassen. Hierbei scheint es sich z. T. um sehr außergewöhnliche Strukturen zu handeln. So im Falle der chlorophylllosen *Arachnitis uniflora* und der mykoheterotrophen Gametophyten des eusporangiaten Farnes *Botrychium lunularia*, deren Aufbau in ihrer basalen Verzweigung an Arbuskel erinnern, anders als diese jedoch keine stetig

feinere Verzweigung aufweisen, sondern in blasenförmigen Auftreibungen enden, welche ihren lipidhaltigen Inhalt offenbar erst durch aktive und später über lytische Prozesse in die Wirtszelle abgeben (Schmid & Oberwinkler 1994, Domínguez & Sérsic 2004, Domínguez et al. 2009).

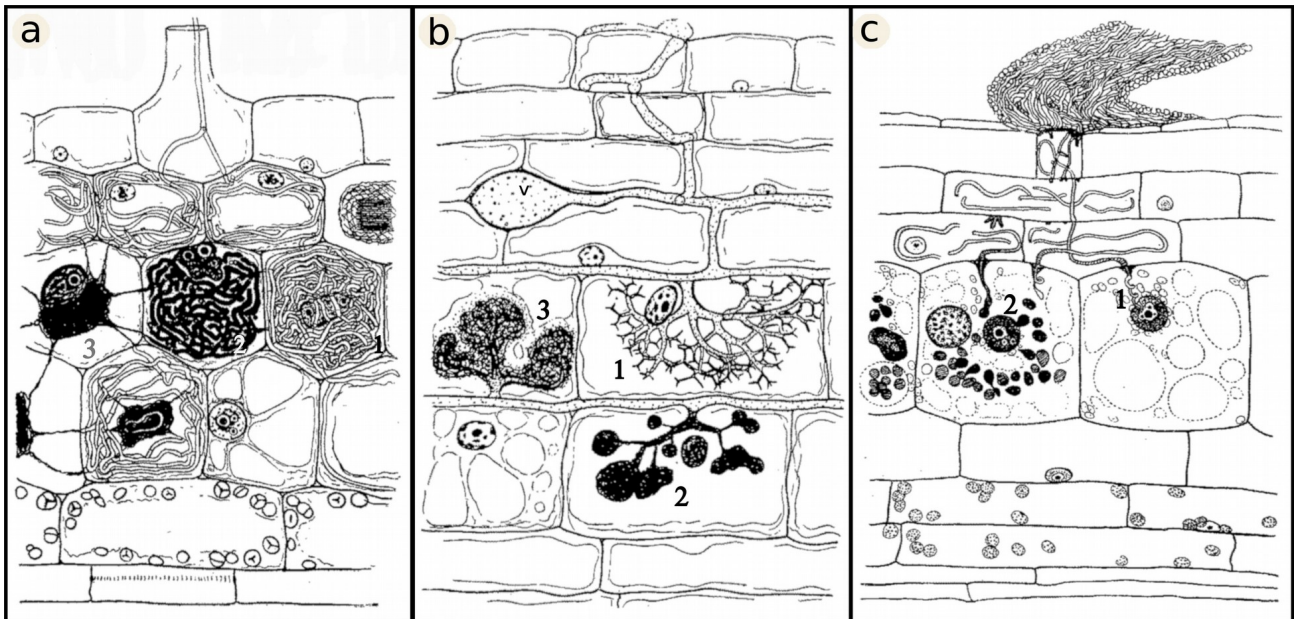


Fig. 32: Formen lytisch bedingter hyphaler Degeneration (Verdau) in den Zellen der Pflanze. a) **Tolypophagie** in *Plantanthera chlorantha* (in OM, Paris-Typ-AM und arbutoider Mykorrhiza): Hyphenknäuel (1) kollabieren (2) und verklumpen letztlich amorph (3). b) **Thamnicophagie** in *Allium sphaerocephalum* (nur in AM): Endhyphen eines Arbuskels (1) kondensieren akropetal (2), bevor es zur amorphem Verklumpung der basalen Arbuskeläste kommt (3). c) **Ptyophagie** in *Gastrodia callosa* (nur in einigen Orchideen und Ericaceen): Hyphen dringen eine kurze Strecke in die Zelle ein und der Inhalt der Hyphen tritt aus deren Spitze in die Wirtszelle aus (1), welcher daraufhin in speziellen Vesikeln, den sog. Ptyosomen, verdaut wird (2). (nach Burgeff 1943)

IIX.3 Formen der Mykoheterotrophie

Bezüglich der Quelle physiologisch verwertbaren Kohlenstoffes kann man grundsätzlich zwischen zwei Extremen unterscheiden. Zum einem spricht man von vollständiger Autotrophie, wenn Kohlendioxid über Nutzung des Sonnenlichtes über den Prozess der Photosynthese fixiert wird. Auch in diesen Fällen kann allerdings bereits eine sehr ausgeprägte Abhängigkeit von der Mykorrhizasymbiose im Sinne eines verstärkten Transfers mineralischer Nährstoffe, d. h. eines hohen Grades der Mykotrophie existieren (Smith & Read 2008). Zum anderen spricht man von Mykoheterotrophie, wenn Pflanzen ohne oder mit reduziertem Chlorophyllgehalt ausschließlich pilzstämmigen Kohlenstoff nutzen (Leake 1994). Zwischen diesen Extremen existiert ein

Kontinuum unterschiedlichster Abstufungen partiell (myko)heterotropher Kohlenstoffgewinnung über den pilzlichen Symbionten (*partial mycoheterotrophy*, Fig. 34). In diesem Schema wird die häufig ebenfalls signifikante, heterotrophe Aufnahme von Stickstoff in vielen MHPs nicht dargestellt. In der Literatur wird trotz der Verwechslungsgefahr mit der seit langem etablierten Bezeichnung für die parallele Nutzung photo- bzw. chemosynthetischer Assimilation und organischer Stoffe als Energiequelle in verschiedenen Einzellern immer noch der Begriff „Mixotrophie“ für partiell mykoheterotrophe Pflanzen verwendet. Des Weiteren findet sich diesbezüglich auch der Begriff „Hemiautotrophie“ in der Forschung (Selosse & Roy 2009, Selosse et al. 2016a). Die einander äquivalenten Begriffe *initiale Mykoheterotrophie* und *Keimmykoheterotrophie* beschreiben eine vollständige bzw. essentielle mykoheterotrophe Ernährungsstrategie, welche allerdings explizit nur in den ontogenetisch sehr jungen Pflanzenstadien, d. h. während der Keimung und je nach Art über eine unterschiedlich lange Zeit der Keimlingsentwicklung, realisiert wird. Man findet diese zeitlich begrenzte Variante der Mykoheterotrophie wie bereits in Kapitel II.2.2 erwähnt vor allem in den Orchidaceae, aber auch in den Pyroleae (Ericaceae) und in einigen ursprünglichen Pflanzen (z. B. in den Gattungen *Lycopodium*, *Ophioglossum*, *Botrychium* und *Psilotum*), die eine mykoheterotrophe Gametophytenphase aufweisen (Merckx 2013).

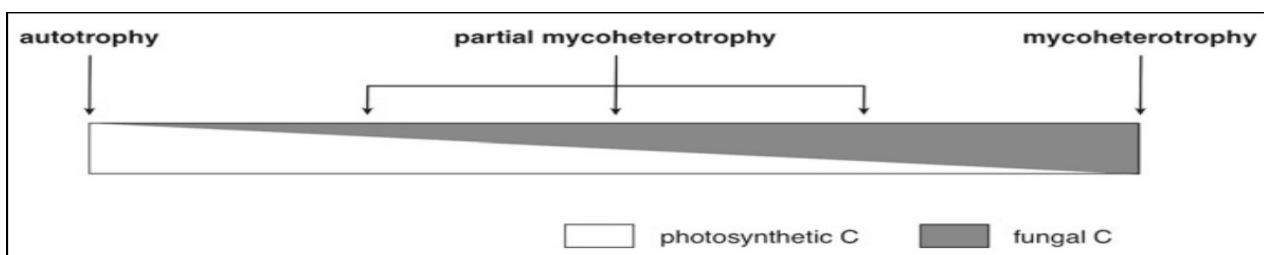


Fig. 34: Kontinuum pflanzlicher Nutzung pilzstämmigen Kohlenstoffs, beginnend bei Autotrophie (keine Nutzung von pilzstämmigem Kohlenstoff) über partielle Mykoheterotrophie (gleichzeitige Nutzung von photosynthetisch fixiertem und pilzstämmigem Kohlenstoff) bis zur Mykoheterotrophie (ausschließliche Nutzung pilzstämmigen Kohlenstoffs). (nach Merckx 2013)

IIX.4 Verfahren zur Identifizierung mykoheterotropher Pflanzen

Wie identifiziert man mykoheterotrophe Pflanzen? Auf den ersten Blick erscheint dies einfach. Drei Kriterien müssen erfüllt sein: *i*) Das Fehlen von Chlorophyll. *ii*) Die Ausbildung einer Mykorrhiza und es dürfen *iii*) keine alternativen Strukturen zur Kohlenstoffaufnahme existieren wie z. B. parasitentypische Haustorien oder Vorrichtungen zum Fang tierischer Organismen (Karnivorie).

Dieser einfache Dreisatz trifft allerdings nur auf mykoheterotrophe Pflanzen zu. Pflanzen, welche noch in unterschiedlichem Maße zur Photosynthese fähig sind, fallen aus diesem Schema. Solche partiell mykoheterotrophen Arten sind häufig weiterhin mit grünen Blättern und Sprossen ausgestattet und ihre anteilig mykoheterotrophe Lebensweise daher auf den ersten Blick nicht erkennbar. Doch auch vollständig chlorophylllose Arten zeigen uns auf den ersten Blick nur, dass sie ihren Kohlenstoff heterotroph akquirieren, aber nicht in welcher Form und über welche physiologischen Prozesse dies vonstatten geht. In der Forschung kennt man mehrere Verfahren, um diesen Problemen zu begegnen. Die ersten erfolgreich angewandten Methoden nutzten schwere Isotope des Kohlenstoffs (^{14}C & ^{13}C) und reicherten mit diesen das Substrat des pilzlichen Symbionten an (Orchideenkeimlinge; Smith 1966, 1967; Cameron et al. 2006, 2008) bzw. injizierten die Isotope in photosynthetisch aktive Pflanzen der direkten Nachbarschaft (sog. „Donorpflanzen“) zu mykoheterotrophen „Akzeptorpflanzen“ (Björkmann 1960 in seiner Arbeit zur Ernährung von *Hypopitys monotropa*) oder gaben es als Gas ($^{14}\text{CO}_2$, bzw. $^{13}\text{CO}_2$) zu den oberirdischen Organen der Pflanzen (*heavy isotope pulse labeling*; McKendrick et al. 2000, Bidartondo et al. 2003, Cameron et al. 2006, 2008; Bougure et al. 2010, Sommer et al. 2012). Diese und abgeleitete Verfahren sind zum einen sehr effektiv darin, die Menge des Kohlenstofftransfers in die mykoheterotrophe Pflanze zu quantifizieren, zum anderen werden sie genutzt, um die physiologischen Umstände des Transfers vom Pilz in die mykoheterotrophe Pflanze zu untersuchen (z. B. Kuga et al. 2014, Bougoure et al. 2014). Des Weiteren eignet sich das Verfahren, um die Richtung und Dynamik des Flusses wichtiger Nährstoffe wie Stickstoff und Phosphat in der Symbiose zu analysieren (Cameron et al. 2006, 2007) sowie zur Quantifizierung der Restassimilationsrate in chlorophyllarmen, partiell mykoheterotrophen Arten (Cameron et al. 2009). Neben dieser Technik existiert seit der ersten Hälfte der 2000er Jahre ein Verfahren, welches die natürliche Häufigkeit stabiler Isotopen als Maß für die ökophysiologische Abhängigkeit einer Pflanze von ihrem Pilzsymbionten nutzt (*stable isotope natural abundance*; Trudell et al. 2003, Gebauer & Meyer 2003). Dieses Verfahren bedient sich des Phänomens, dass in den aufeinanderfolgenden Trophiestufen eine katabolische Diskriminierung gegenüber den natürlich vorkommenden stabilen Isotopen ^{13}C und ^{15}N stattfindet und sich die schweren Isotope daher in den höheren Stufen anreichern (z. B. Dawson et al. 2002, Dijkstra et al. 2006). So veratmen bzw. exportieren viele Mykorrhizapilze präferentiell ^{12}C bzw. exportieren (Hobbie et al. 1999) vermehrt ^{14}N in ihre autotrophen Wirte und reichern daher die schwereren Isotopen ^{13}C und ^{15}N in ihrem Organismus an (z. B. Taylor et al. 2003, Hobbie & Högberg 2012). Aber bereits vorher findet im Zuge der Photosynthese, eine je nach Belichtungsregime bzw. Photosyntheserate unterschiedlich

starke Diskriminierung zugunsten von ^{13}C in den autotrophen Wirten der Mykorrhizapilze statt (Hynson et al. 2013). Mykoheterotrophe Pflanzen, welche wiederum von diesen Pilzen Kohlenstoff und Stickstoff beziehen, reichern diese Isotope daher ebenfalls an und ähneln in ihrer ^{13}C - ^{15}N Signatur daher eher den assoziierten Pilzen als den autotrophen Vergleichspflanzen. Aus diesem Grund ist der durchschnittliche Anreicherungsfaktor ϵ_{MH} für die schwereren Isotope ^{13}C und ^{15}N in mykoheterotrophen Pflanzen in der Regel für beide Isotope signifikant höher als der Durchschnittswert ϵ_{Ref} für autotropher Referenzpflanzen aus demselben Habitat (vgl. S. 120, Fig. 36).

IIX.4.1 Das Isotopenverhältnis Sigma und der Anreicherungsfaktor Epsilon

Isotopenverhältnisse werden als Sigmawerte für ein spezifisches Isotop angegeben. Die hierbei genutzte Formel ist:

Formel 1:
$$\delta x = \left(\frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1,000 [\text{‰}]$$

δx steht hierbei für den Sigmawert des entsprechenden Isotops (z. B. ^{13}C oder ^{15}N), R_{sample} ist das über Massenspektrometrie gemessene Isotopenverhältnis von $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (bzw. $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) in der Pflanzenprobe (eine Kontamination des beprobten Gewebes mit Pilzhyphen muss hierbei natürlich ausgeschlossen sein), und R_{standard} ist eine für das jeweilige Isotop definierte Standardreferenz. Für $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ist dies die sog. PDB Referenz, bei der es sich um das Verhältnis von ^{13}C zu ^{12}C (= 0,0112372) im PeeDee-Belemniten-Kalkstein in South Carolina handelt. Subtrahiert man 1 vom Quotient $R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}}$ und multipliziert dies mit 1000, erhält man den Wert Sigma, welcher die Abweichung im Isotopenverhältnis zwischen Probe und Standard in Promille angibt.

Die Sigmawerte für die untersuchten Pflanzen sind für sich schon aussagekräftig (vgl. S. 119, Fig. 35), wenn man darauf achtet, nur Pflanzen von einem Standort zu vergleichen, da nur dann Unterschiede in den Sigmawerten auf Unterschiede in der individuellen Physiologie schließen lassen (und nicht etwa auf habitatabhängige Unterschiede im Isotopenverhältnis). Um aber auch Studien unterschiedlicher Standorte vergleichen zu können, wird der Anreicherungsfaktor ϵ für die mykoheterotrophe Pflanze und die autotrophen Vergleichspflanzen berechnet. Epsilon für die mykoheterotrophe Pflanze ergibt sich dann aus dem Zusammenhang:

Formel II:
$$\epsilon_{\text{MH}} = \delta_{\text{MH}} - \delta_{\text{Ref}} \quad [\text{‰}]$$

Hierbei ist δ_{Ref} der Mittelwert für unterschiedliche Begleitpflanzenarten an einem Standort und wird als Referenz von dem Sigmawert δ_{MH} der mykoheterotrophen Pflanze (siehe Formel I) abgezogen⁵. Durch dieses Vorgehen kompensiert man die normalerweise nicht direkt vergleichbaren Isotopen-Verhältnisse unterschiedlicher Standorte und über den Einbezug unterschiedlicher Referenzarten und Mykorrhizaformen ebenfalls die ökophysiologischen Unterschiede in der C- und N-Aufnahme der Begleitpflanzen selbst. Über diesen Normalisierungsschritt können nun Pflanzen aus unterschiedlichen Habitaten (z. B. Wald- oder Grasland) miteinander verglichen werden. Für die partiell mykoheterotrophe oder mykoheterotrophe Pflanze ist der individuelle Wert für ϵ_{MH} ein Maß für deren Fähigkeit zur Aufnahme pilzstämmigen Kohlenstoffs und Stickstoffs (S. 119, Fig. 35). Sind für eine partiell mykoheterotrophe Pflanze der individuelle Wert δ_{PMH} , der Mittelwert für δ_{Ref} am Standort erfasst und ein Mittelwert ϵ_{MH} für den Anreicherungsfaktor aus unterschiedlichen mykoheterotrophen Pflanzen (derselben Familie) ermittelt, kann in partiell mykoheterotrophen Pflanzen über das sog. *linear two source isotope mixing model* auf die genaue Menge heterotroph akquirierten Kohlenstoffs und Stickstoffs vor dem Hintergrund ihrer individuellen Habitatbedingungen, wie z. B. unterschiedlichen Belichtungsregimen, geschlossen werden (vgl. z. B. Zimmer et al. 2008 sowie Preiss & Gebauer 2010).

Formel III:

$$\%X_{df} = \frac{(\delta_{PMH} - \delta_{Ref})}{\epsilon_{MH}} 100$$

Hierbei ist X_{df} der Prozentsatz heterotroph akquirierten C's bzw. N's.

Das Modell geht davon aus, dass nur zwei unterschiedliche Quellen für Kohlenstoff bzw. Stickstoff in einer partiell mykoheterotrophen Pflanze existieren [also der „normale“ Weg über Assimilation bzw. Aufnahme von N über die Wurzeln (ohne Symbiont) und alternativ den Weg der C- und N-Akquirierung über den Pilzsymbionten] und sich C und N aus beiden Quellen gleichmäßig (linear) im Gewebe der Pflanze „mischen“. Weiterhin wird angenommen, dass in der partiell mykoheterotrophen Pflanze die Isotopenzusammensetzung der autotrophen C-Quelle (Photosynthese) über δ_{Ref} (vgl. Formel II) und die der heterotrophen C-Quelle (Pilzverdau) über ϵ_{MH} (vgl. Formel III) repräsentiert wird. Besonders aufgrund seines Potentials partiell mykoheterotrophe Arten zu identifizieren und deren heterotrophe Kohlenstoffaufnahme auch zu quantifizieren, wurde

⁵[für die Berechnung des Epsilonwertes (ϵ_{Ref}) einer Begleitpflanze, geht man genauso vor wie für die Berechnung von ϵ_{MH} , nur dass in diesem Falle der Mittelwert δ_{Ref} vom individuellen Sigmawert einer Referenzpflanze subtrahiert wird. Der ϵ -Durchschnittswert aller Referenzpflanzen eines Standortes ist stets 0 ‰]

diese Methode in den letzten Jahren immer wieder eingesetzt (vgl. Hynson et al. 2013 und Selosse et al. 2016a für eine detaillierte Bearbeitung der Thematik). Die spezifische Anreicherung natürlicher Isotopen als Indikator mykoheterotropher Lebensweise zu nutzen, spielt ihre Stärke gegenüber anderen Nachweisverfahren aber auch darin aus, dass selbst eine zeitlich begrenzte my-

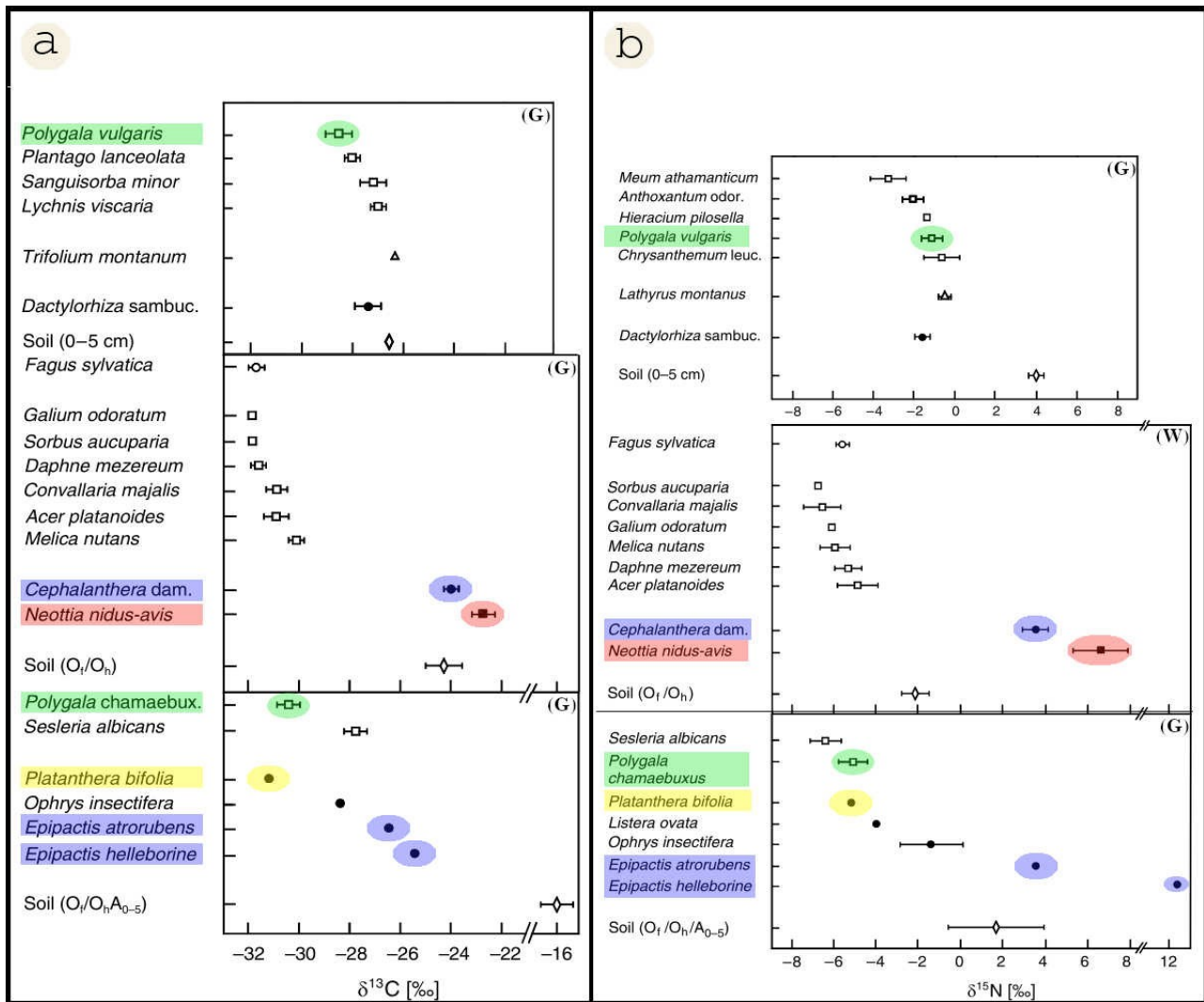


Fig. 35: Vergleich des $\delta^{13}\text{C}$ - (a) bzw. $\delta^{15}\text{N}$ -Wertes (b) von mykoheterotrophen Pflanzen (rot), partiell mykoheterotrophen Pflanzen (blau) und autotrophen Referenzpflanzen (farblich nicht hinterlegt). Grün hinterlegt sind die in der Publikation von Gebauer et al. als Referenzarten einbezogenen Polygalaceae *Polygala vulgaris* und *Polygaloides* (*Polygala*) *chamaebuxus*, welche auch in dieser Arbeit untersucht wurden. Deutlich ist der erhöhte $\delta^{13}\text{C}$ - und $\delta^{15}\text{N}$ -Wert der mykoheterotrophen Orchidee *Neottia nidus-avis* und die ebenfalls signifikant erhöhten δ -Werte der partiell mykoheterotrophen Orchideen *Epipactis atrorubens*, *E. helleborine* und *Cephalanthera damasonium*. Die gelb unterlegte Orchidee *Platanthera bifolia* wie auch die beiden arbuskulär mykorrhizierten Polygalaceae sind, verglichen mit den Referenzarten, unauffällig in ihrem $\delta^{13}\text{C}$ - bzw. $\delta^{15}\text{N}$ -Werten. Jedes Einzeldiagramm stellt einen distinkten Standort dar (G = Graslandhabitat; W = Waldhabitat). (verändert nach Gebauer et al. 2003).

koheterotrophe Kohlenstoffakquirierung im Lebenszyklus eines Wirts nachweisbar ist (z. B. Ercole et al. 2015) und dieses Verfahren damit sensitiver ist als andere isotopebasierte Verfahren, wie das *pulse labeling* und *gas exchange measuring*, bei denen die photosynthetisch bedingte Abnahme einer definierten Menge Kohlendioxids (in der modernen Variante des Verfahrens wird isotope markiertes CO₂ genutzt) in einer Testkammer mit der partiell mykoheterotrophen Pflanze quantifiziert wird (z. B. Montfort & Küsters 1940, Cameron et al. 2009). Derartige Unterschiede in der Nachweisgenauigkeit der verschiedenen Verfahren könnten auch für die offensichtlich widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich des Heterotrophiestatus einzelner Pflanzen, wie der morphologisch stark reduzierten, aber noch (geringfügig) chlorophyllhaltigen Orchidee *Corallorhi-*

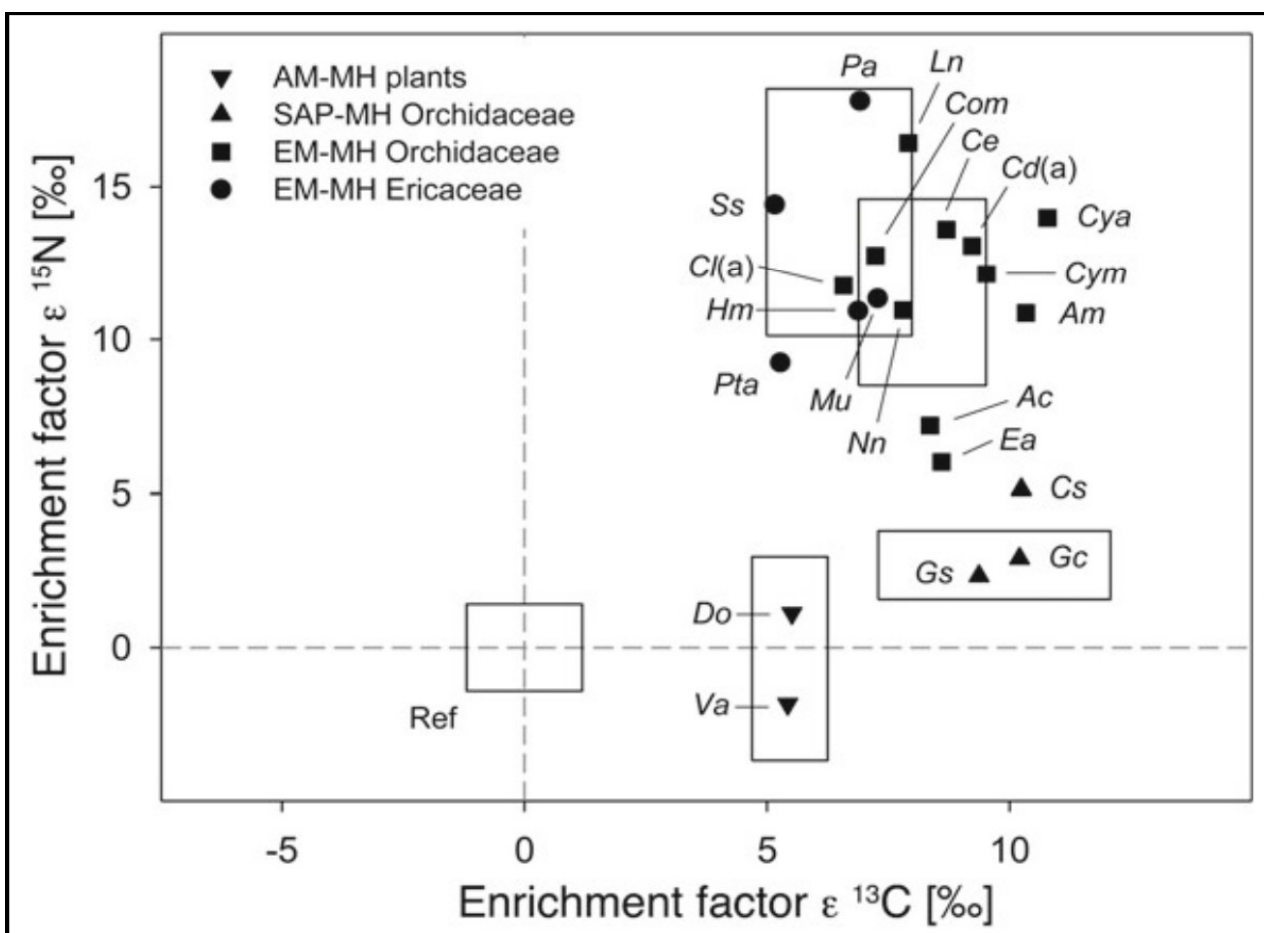


Fig. 36: Plot des Anreicherungs-faktors ϵ für ¹³C und ¹⁵N in mykoheterotrophen Pflanzen (MH) und autotrophen Vergleichspflanzen (Ref). Die mykoheterotrophen Pflanzen sind nach Art ihrer Mykorrhizen aufgeschlüsselt: arbuskuläre Mykorrhiza (AM-MH), Mykorrhiza mit saprophytischen Pilzen (SAP-MH Orchideen), Ektomyorrhiza (EM-MH Orchideen) bzw. EM-MH Ericaceae. Gut erkennbar ist die starke Anreicherung der Isotope in den MHPs. arbuskulär mykorrhizierte MHPs sind unauffälliger bezüglich ¹⁵N. (nach Hynson et al. 2013)

iza trifida, geführt haben. Diese wird über das Pulse-Labeling-Verfahren ($^{13}\text{CO}_2$) in der Analyse von Cameron et al. (2009) als nahezu vollständig mykoheterotroph beschrieben, auf Basis der natürlichen Abundanz des stabilen Isotops ^{13}C aber bezieht die Art bis zu 23 % ihres Kohlenstoffs photosynthetisch und muss daher als partiell mykoheterotrophe Art betrachtet werden (Zimmer et al. 2008). Eine Schwäche des *stable isotope natural abundance* Verfahrens ist aber, dass nicht alle Mykorrhizaformen in gleicher Weise für diese Technik zugänglich sind. Während ECM- und saprophytische (SAP) Symbionten mykoheterotropher Orchideen und Ericaceen eine deutliche, das heißt im Vergleich zu autotrophen Vergleichspflanzen signifikant erhöhte ^{13}C -Signatur in den assoziierten MHP-Arten hinterlassen, und dies im Falle der ECM-Symbionten auch für die ^{15}N -Signatur gilt, ist die Isotopen-Spur in den *Rhizoctonia*-assoziierten mykoheterotrophen Orchideen sowie den partiell mykoheterotrophen und mykoheterotrophen Wirtspflanzen mit einer arbuskulären Mykorrhiza deutlich unauffälliger (vgl. S. 120, Fig. 36). Diese Pflanzen ähneln in ihrer ^{13}C -, besonders aber in ihrer ^{15}N -Signatur häufig stärker den autotrophen Vergleichspflanzen, als dies in den ECM- bzw SAP-assoziierten MHPs der Fall ist. Dieser Befund ist vermutlich auf die ebenfalls ^{13}C -armen krautigen Donorpflanzen (AM) und eine offenbar sehr ähnliche Form der Stickstoffaufnahme über den AM-Pilz in den autotrophen und den mykoheterotrophen Wirten rückführbar (d. h. für N, eher ein aktive Transferprozess über vitale pilzliche Biomembranen und weniger eine Stickstoffaufnahme über den Verdau des Pilzes). Darüber hinaus wird auch die Eigenschaft der obligat biotrophen AMF, die Isotopensignatur ihrer Wirtspflanzen deutlicher wiederzuspiegeln als die stärker saprophytischen Pilzgruppen in den ECM-assoziierten MHPs als Erklärung für dieses Phänomen herangezogen (Nakano et al. 1999, Leake & Cameron 2010, Cameron & Bolin 2010, Merckx et al. 2010, Courty et al. 2011, Hynson et al. 2013, Stöckel et al. 2014, Bolin et al. 2015). Erst kürzlich wurden weitere stabile Isotope wie ^{18}O und ^2H genutzt, welche partielle Mykoheterotrophie auch in einer Reihe von bisher im Adultstadium als autotroph geltenden *Rhizoctonia*-assoziierten Orchideen (s. o.) belegen (Gebauer et al. 2016). Bei dieser Methode geht es letztlich zwar auch um die Aufnahme von pilzstämmigem Kohlenstoff, aber die Nutzung des Wasserstoffisotops hat den Vorteil eines stöchiometrisch bedingt, sensitiveren Nachweises, da jede transferierte Einheit eines potentiellen Kohlenstoffträgers (Kohlenhydrate, Proteine) ein große Zahl von Wasserstoffatomen in den MHP-Wirt überträgt.

IIX.5 Mykoheterotrophie - Vorkommen im Pflanzenreich und globale Verbreitung

In der aktuellsten Bearbeitung mykoheterotropher Pflanzen durch Merckx et al. (2013a) wird von ca. 880 mykoheterotrophen Arten in 17 Familien und 101 Ordnungen ausgegangen. Hiervon sind

der überwiegende Teil Angiospermen (514 Spezies) und nur eine einzige Art, die neukaledonische *Parasitaxus ustus*, deren trophischer Status (Parasit, MHP eine Kombination beider Ernährungsstrategien) allerdings noch nicht endgültig geklärt ist, zählt zu den Gymnospermen (Feild & Brodribb 2005, de Vega et al. 2010, Merckx et al. 2013b). Bei den restlichen Arten handelt es sich vornehmlich um hypogäische Gametophyten von Gefäßsporenpflanzen, vornehmlich Lycopodiaceae (Bärlappgewächse) der Gattungen *Huperzia* und *Lycopodium*, aber auch von Vertretern der Farne (Monilophyta) wie der Gattungen *Ophioglossum*, *Botrychium*, *Psilotum*, *Stromatopteris* oder *Actinostachys*. Mindestens eine, eventuell zwei mykoheterotrophe Lebermoosarten [*Aneura mirabilis*, (*A. crumii*, Trophiestatus ungesichert); Aneuraceae] und der mutmaßlich ebenfalls mykoheterotrophe Sporophyt einer Laubmoosart (*Buxbaumia aphylla*, Buxbaumiaceae) sind bekannt (S. 123, Fig. 37). Das Gros aller mykoheterotrophen Pflanzen findet man mit ca. 235 Arten in den Orchidaceae. In dieser Aufzählung wurden die initiale Mykoheterotrophie (u. a. alle Orchideen) sowie die diesbezüglich genauer untersuchten Fälle partieller Mykoheterotrophie (viele Orchideen, einige Enziangewächse wie *Bartolonia* spp. und *Obolaria* spp. und Vertreter des Tribus Pyroleae (Ericaceae) wie *Pyrolla aphylla* und *Orthilia secunda*) nicht eingebunden. Betrachtet man die Liste mykoheterotropher Angiospermen in Merckx et al. (2013a), so fällt der überproportional hohe Anteil monokotyle Familien, Gattungen und Arten auf (die hohe Artenzahl der Orchideen wurde hierbei bereits berücksichtigt). Imhof (2008) verweist auf dieses Missverhältnis von ca. 88 % monokotyle mykoheterotropher Arten bei einem nur etwa 23%igen Anteil monokotyle Spezies an der Gesamtzahl der Angiospermen und formuliert auf Basis einer Reihe morphologischer Charakteristika Gründe für diesen evolutionären Überhang des MHP-Syndroms in den Monokotylen. So führt der Autor diese Entwicklung u. a. auf das Fehlen des sekundären Dickenwachstums, der damit verbundenen Tendenz zur geringeren Biomasse der Monokotylen und der Ausbildung eines homorhizen Wurzelsystems zurück - Aspekte, auf die im Einzelnen noch an anderer Stelle eingegangen wird (vgl. Kapitel IX.1.2).

Die größte Diversität mykoheterotropher Pflanzen existiert in den feuchtwarmen, tropischen bis subtropischen Regionen der Erde. Vor allem die arbuskulär-mykorrhizierten Arten sind bis auf sehr wenige Ausnahmen in diesen Klimazonen beheimatet. Hier sind die südamerikanischen und südostasiatischen Tropen besonders artenreich, gefolgt von tropischen Regionen Australasiens und Afrikas (Merckx et al. 2013b). Die ektomykorrhiza-assoziierten mykoheterotrophen Vertreter der Ericaceae und Orchidaceae sind hingegen stärker in den gemäßigten bis subarktischen Klimazonen verbreitet (Leake 1994, Merckx et al. 2013b, Gomes et al. 2019a). Dies ist besonders interessant vor dem Hintergrund, dass in den letzten Jahrzehnten auch in den AM-dominierten Tropen immer mehr

Mykorrhizen zwischen ECM-Pilzen und baumförmigen Angiospermen nachgewiesen wurden und daher grundsätzlich auch dort die Bedingung für eine tripartide Symbiose zwischen mykoheterotro-

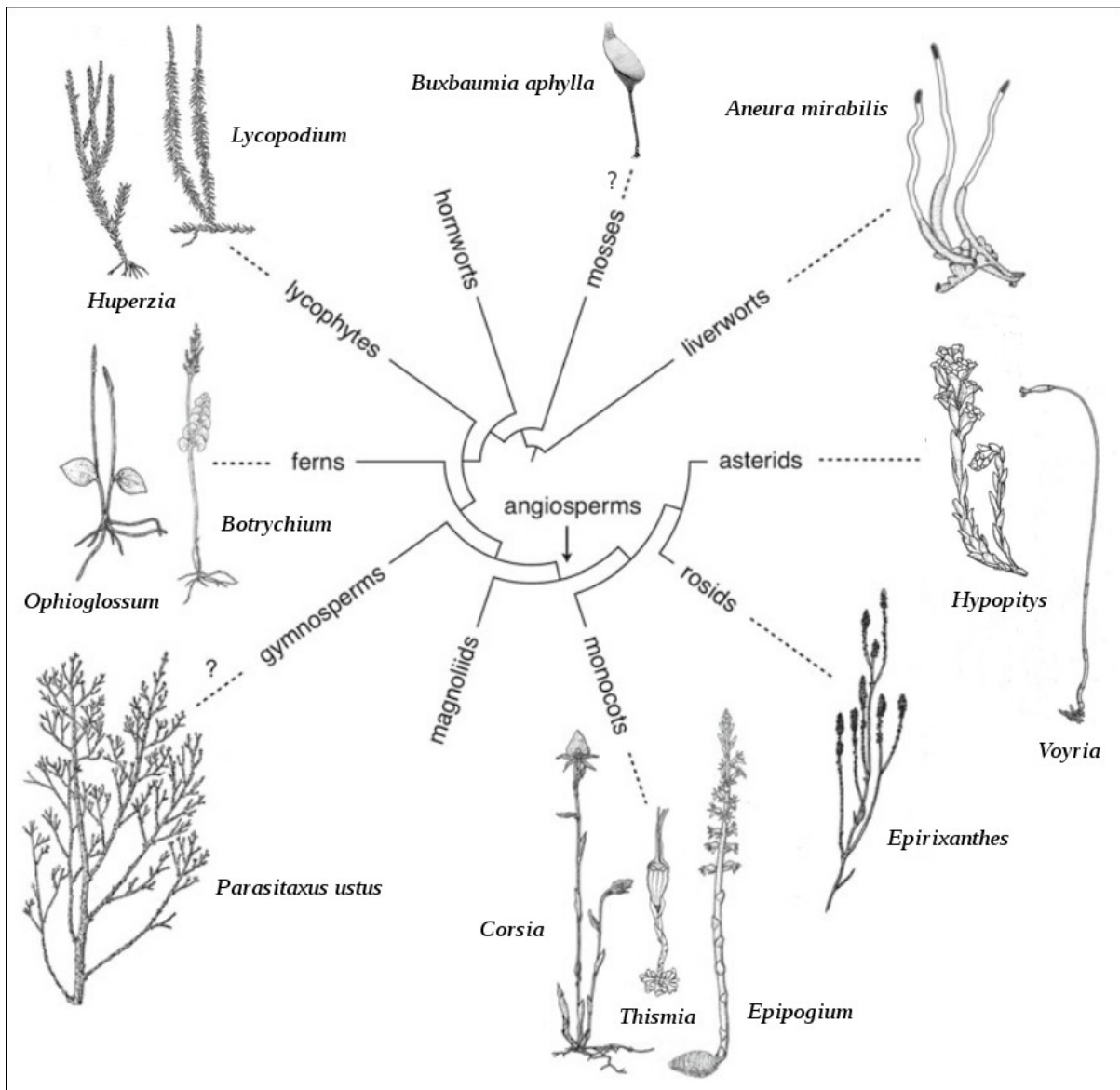


Fig. 37: Verbreitung der mykoheterotrophen Lebensweise im Pflanzenreich. Für *Buxbaumia aphylla* wurde die Bildquelle digital nachgezeichnet; Quellenangabe: siehe Kapitel XIII. (verändert nach Merckx 2013)

phen („Akzeptor-“)Pflanzen, autotrophen „Donorpflanzen“ und ECM-Pilzen zu existieren scheint (Gomes et al. 2019a). Die mit saprophytischen (SAP) Pilzen assoziierten chlorophylllosen Orchideen sind ebenfalls in den feuchtwarmen Tropen besonders stark verbreitet, da vermutlich nur unter diesen klimatischen Bedingungen ein ausreichender Kohlenstofftransfer über den Pilz realisierbar ist (Rasmussen & Rasmussen 2009, Hynson et al. 2013).

Trotz ihrer offensichtlichen Seltenheit, gibt es mehrere Berichte von Fundstellen an denen

unterschiedliche, häufig nur entfernt verwandte mykoheterotrophe Arten gleichzeitig auftreten (z. B. Van der Pijl 1934, Wallace 1975, Maas & Rübsamen 1986). Neben abiotischen Faktoren kann ein naheliegender Grund hierfür die Anpassung an ähnliche Pilzgruppen und ein komplexes Geflecht ökophysiologischer Bedingungen zwischen den entsprechenden Pilzen und den mit diesen co-assoziierten autotrophen „Donorpflanzen“ sein. Erst wenn diese am jeweiligen Standort erfüllt werden, ist es den mykoheterotrophen Arten offenbar möglich, sich erfolgreich innerhalb des gemeinsamen Hyphennetzwerkes zu etablieren und am Kohlenstofffluss zwischen Pilz und „Donorpflanzen“ zu partizipieren (vgl. Rath et al. Manuskript B). Das Auftreten potentiell geeigneter „Donorpflanzen“ alleine scheint hingegen kein hinreichender Prädiktor für das Auftreten mykoheterotropher Arten zu sein. Allerdings nehmen lokale abiotische Faktoren wie Temperatur, Niederschlag und edaphische Bedingungen (z. B. Nährstoffregime im Boden, Streudicke, Humidität) nachweislich Einfluss auf die Etablierung der chlorophylllosen Pflanzen (Gomes et al. 2019a,b). Vor diesem Hintergrund von besonderem Interesse sind daher neue Erkenntnisse zu spezifischen „*local environmental drivers*“ (vgl. z. B. Johnson 2010) als wichtiges Element für die lokale Etablierung mykoheterotropher Pflanzen (Sheldrake et al. 2017b & Gomes et al. 2019b). Auf Basis des *trade balance models* (Johnson 2010; vgl. Kapitel III.6.3) argumentieren die Autoren, dass MHPs nur dort vorkommen, wo ein spezielles Verhältnis von Stickstoff zu Phosphat bzw. Kalium (genauer: wenig N, wenig P bzw. K) die Rahmenbedingung für eine schwachen Mutualismus zwischen den Pilzsymbionten und den autotrophen Begleitpflanzen der mykoheterotrophen Arten erzeugt. Fördern hingegen die Nährstoffregime im Habitat nur stark mutualistische, kommensalische oder gar parasitäre Assoziationen zwischen Pilz und autotropher Pflanze, erhält Kohlenstoff einen so hohen „Wert“ als Tauschware, dass sich dessen Fluss in den Pilz verringert und damit letztlich auch der Transfer von Kohlenstoff in die mykoheterotrophen Pflanzen de facto nicht mehr stattfindet. Zu diesem Ansatz ist folgendes anzumerken: Beide Arbeiten beschreiben in ihren Ausführungen einen aktiven, vom Pilz kontrollierbaren Transfer von Kohlenstoff in den mykoheterotrophen Pflanzenwirt. Auf Basis der hier bereits aufgeführten Argumente für eine zentrale Rolle eines lytisch vermittelten Kohlenstofftransfers (vgl. Kapitel IIX.2) und speziell vor dem Hintergrund unseres Wissens über die Richtung und Kontrolle des Kohlenstoffflusses in der arbuskulären Mykorrhiza (vgl. Kapitel III.6.2 - III.6.3 & Kapitel VII), erscheint speziell dieser Aspekt in beiden Studien nicht ohne weiteres nachvollziehbar. Dennoch ist die Datenlage und grundlegende Logik beider Studien bestechend. Zwanglos könnte man sich auf Basis ihres Modells daher vorstellen, dass die postulierte Reduktion des Kohlenstofftransfers in die pilzlichen Symbionten der „Donorpflanzen“, am Ende auch zu einer Verringerung der intraradikalen

pilzlichen Biomasse in den mykoheterotrophen Pflanzen führt. Dies würde dann unabhängig von der Frage, auf welche Art der Kohlenstofftransfer in die mykoheterotrophe Art letztlich erfolgt, zu einer Reduktion der für die chlorophylllose Pflanze zur Verfügung stehenden Gesamtkohlenstoffmenge führen. Somit wären diese abiotischen Faktoren tatsächlich ein entscheidender Faktor für die Etablierung mykoheterotropher Pflanzen auf kleinräumiger Skala.

IX Evolutionsbiologische Aspekte mykoheterotropher Pflanzen

IX.1 Konvergenz - analoge Merkmale in Morphologie und Anatomie

IX.1.1 Allgemeine Modifikationen des Kormus

Über die Evolution der mykoheterotrophen Angiospermen wurde erst in den letzten fünfzehn Jahren intensiver geforscht. Dies lag zum einen an deren realer Seltenheit bzw. Unscheinbarkeit in ihren häufig schwer zugänglichen Verbreitungsgebieten und den damit verbundenen Schwierigkeiten der Materialbeschaffung (Merckx et al. 2013b). Zum anderen wurden erst durch die molekulare Methodik phylogenetische Beziehungen und Entwicklungstendenzen in den morphologisch meist stark reduzierten mykoheterotrophen Arten nachvollziehbar (Merckx 2013c). Trotzdem gibt es auf rein morphologischer Ebene einige Arbeiten zur Evolutionsbiologie mykoheterotropher Pflanzen. So beschreiben und vergleichen Johow (1885, 1889), MacDougal (1899), Burgeff (1936), Montfort & Küsters (1940), MacDougal & Doufrenoy (1944), später Maas et al. (1986; S. 127, Fig. 38), Maas & Rübsamen (1986) und Imhof (zusammengefasst in Imhof 2008 und Imhof et al. 2013) die charakteristischen Reduktionen in den ober- und unterirdischen Abschnitten des Kormus mykoheterotropher Arten aus den Gentianaceae, Burmanniaceae, Triuridaceae, Corsiaceae, Iridaceae, Polygalaceae und Orchidaceae. Ähnlich detailliert wurden autotrophe, semi-chlorophyllhaltige und chlorophylllose, mykoheterotrophe Vertreter der Ericaceae (MacDougal 1899, Henderson 1919, Furman & Trappe 1971) bearbeitet. In allen Fällen wird die schrittweise Reduktion der ober- und unterirdischen Kormusbestandteile in den autotrophen Vertretern zu chlorophylllosen bzw. -armen, meist unterirdisch wachsenden vegetativen Sprosssystemen (Rhizomen) mit sehr kleinen, häufig schuppenförmigen Blättern, wenigen und/oder funktionslosen Stomata und die Entwicklung kaum verzweigter, vereinfachter Wurzel- bzw. Rhizomsysteme ohne oder nur mit wenigen Wurzelhaaren bzw. Trichomen, als charakteristisch für die Endstufen der Evolution mykoheterotropher Pflanzen beschrieben (Furman & Trappe 1971, Leake 1994, Imhof

2010, Imhof et al. 2013). Die einzelnen Wurzeln bzw. Rhizome dieser Systeme sind häufig gleichgestaltet, relativ kurz, nestartig aggregiert und nicht selten fleischig bzw. parenchymatisch verdickt (z. B. *Hypopytis* spp., *Neottia nidus-avis*), oder es handelt sich um einem kurzen bei den unterirdischen Teil des Kormus um ein sehr kurzen Abschnitt aus Spross- bzw. Rhizom, von dem die inserierenden Wurzeln sternförmig ausgehen - auch hier sind die Teilorgane zumeist kürzer und weisen ein vielzelllagiges Cortexparenchm auf (viele Arten in *Voyria* spp.). Die Wurzeln können aber auch länglich bis filiform sein (so z. B. in *Triuris hyalina*, *Sciaphila ledermannii*; Imhof 1998, Imhof 2003). Auch Kombinationen dieser Fälle wurden beschrieben, so in der Gattung *Afrothisma*, welche ein Wurzelsystem mit einer Vielzahl dicht gedrängter kleiner Wurzelknollen ausbildet, welche apikal in peitschenähnlich filiforme Wurzeln auslaufen (Imhof et al. 2013). Viele Varianten dieser Kormusmodifikationen findet man exemplarisch und mit intermediären Formen in den Orchidaceae (Kusano 1911; vgl. S. 128, Fig. 39) und Gentianaceae (Imhof et al. 2013). Imhof (2008) versucht in einem Übersichtsartikel mögliche Ursachen für diese Vielfalt der Wurzelreduktionen zu formulieren. Er skizziert ein Spannungsfeld („mycoheterotroph's dilemma“), in dem mykoheterotrophe Pflanzen eine möglichst große Oberfläche im Wurzelraum für die initiale Besiedlung durch den essentiellen Pilzsymbionten (= längere, filiforme Wurzeln) mit einem großen Wurzelvolumen zur intraradikalen „Pilzkultivierung“ (= kurze verdickte Wurzeln) vereinbaren müssen. Nur über die Vereinbarung dieser gegensätzlichen morpho-anatomischen Anforderungen sollte es den mykoheterotrophen Pflanzen möglich sein, ausreichend pilzliche Biomasse für ihren Energiegewinn zu realisieren. Als weitere Erschwernis für die Ausbildung räumlich ausgedehnter Wurzelsysteme in mykoheterotrophen Pflanzen argumentiert Imhof (2008) mit dem erhöhten Risiko der mechanischen Durchtrennung der Wurzel-Sprossverbindung, welche die essentielle, wurzelvermittelte Kohlenstoffzufuhr in den Spross gefährden würde. Vor dem Hintergrund solchgearteter, ökophysiologisch basierter Überlegungen, wäre die Entwicklung cortexparenchymreicher (dicker) Wurzeln auch als wichtige Anpassung an die Evolution komplexer pilzlicher Ausbreitungsmuster (Morphotypen) in mykoheterotrophen Pflanzen zu verstehen, denn nur in solchen existiert die anatomische Voraussetzung für die komplexe funktionelle Zonierung des Cortexgewebes und der damit einhergehenden nachhaltigen „Nutzung“ des Pilzsymbionten (vgl. Kapitel IX.1.2). Auch sollten kurze, verdickte Wurzeln im Verlauf der Evolution vieler mykoheterotropher Arten gefördert worden sein, da diese schneller durch den intraradikalen Pilz besiedelt sein sollten als lange, filiforme Wurzeln. Letztlich könnte in mykoheterotrophen Arten, die Entwicklung räumlich „zusammengezogener“, kompakter Wurzelsysteme (bestehend aus vielen, eher verkürzten Wurzeln) die homogene Explorierung des Wurzelsystems durch den Pilz deutlich

erleichtern. Dies wäre speziell in dikotylen mykoheterotrophen Entwicklungslinien mit ihrer, im Zuge des sekundären Dickenwachses, zwangsläufig erfolgenden Fragmentierung der besiedelbaren Bereiche des Wurzelsystems von Bedeutung gewesen.

Vergleichbar zu den morphologischen Verhältnissen, werden auch die anatomischen Verhältnisse in den Sprossen und Wurzeln der MHPs im Verlauf der Evolution deutlich modifiziert. So findet man die Anzahl der Leitelemente und Verholzungen des Stützgewebes im Xylem i. d. R. nur stark reduziert vor (Brundrett 2002) und auch das Phloem ist meist sehr schwach ausgebildet oder fehlt gänzlich (Leake 1994, Imhof et al. 2013). Hingegen sind ausgeprägte Sekundärwandauflagerungen und Verholzungen der Zellen spezialisierter Gewebe der Peripherie des Zentralzylinders bekannt (so z. B. in Vertretern der Gattungen *Petrosavia*, *Dictyostega* und auch in *Epirixanthes*). Diese werden in den Arten mit filiformen bzw. länglichen Wurzeln als Schutz vor einer Unterbrechung des Stoffflusses aus der Peripherie in das Vegetationszentrum der Pflanzen betrachtet (Imhof 2008). Auch die häufige Ausbildung cortexparenchymreicher Wurzeln und Rhizome als Ort intensiver, intrazellulärer Pilzkultivierung wurde in dem obigen Abschnitt bereits angesprochen. Trotz der teils deutlichen morphologischen (nicht funktionellen!) Reduktionen in den mykoheterotrophen Angio-

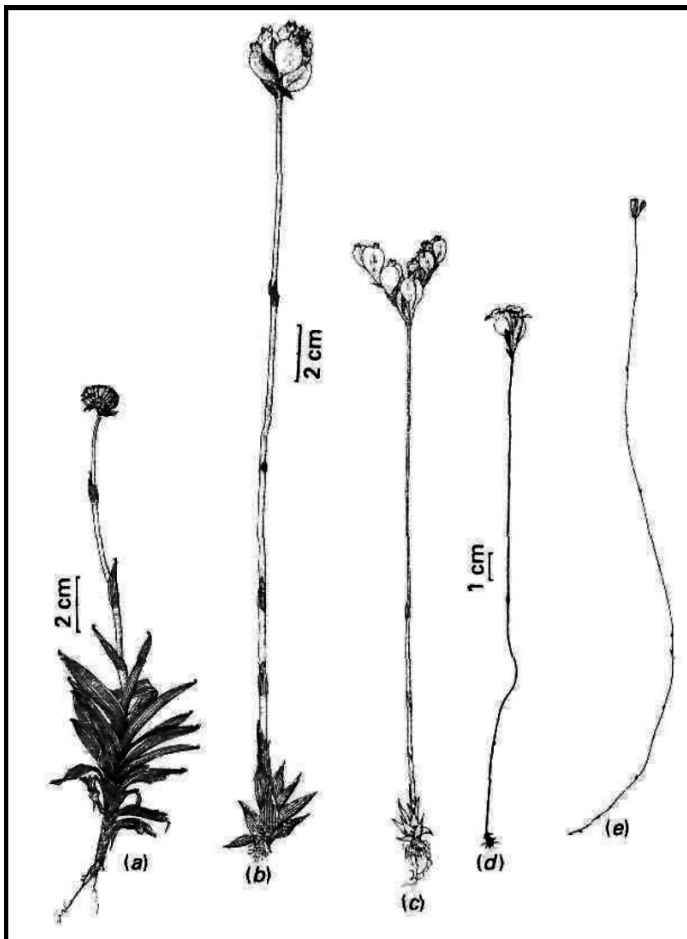


Fig. 38: Reihe oberiridischer morphologischer Reduktionen in der Gattung *Burmannia*. Von links nach rechts, schrittweise Reduktion der Photosyntheseorgane und des Chlorophyllgehaltes. a) *Burmannia foliosa* (autotroph), b) *B. stuebelii*, c) *B. bicolor*, d) *B. jonkeri* e) *B. tenella* (mykoheterotroph). (nach Maas et al. 1986)

spermen, werden die generativen Sprossanteile weiterhin ausgebildet und zeigen bis auf den geringen Chlorophyllgehalt i. d. R. keine Anzeichen einer morphologischen Vereinfachung der Blüten bzw. des Blütenstandes. Auch sind nicht alle mykoheterotrophen Pflanzen ausgesprochen kleinwüchsig. *Erythrorchis altissima* (Orchidaceae), aber ebenso Vertreter von *Sarcodes* (Ericaceae) können stattliche Ausmaße annehmen - ein Hinweis auf das Potential mykoheterotropher Physiologie in diesen Arten. Vermutlich spiegelt sich hier die besonders effiziente Stickstoff- und Kohlenstoffversorgung der ECM- und SAP-assoziierten mykoheterotrophen Pflanzen auch in der deutlichen Tendenz zur Ausbildung eines vergleichsweise großen Kormus wider. Dies steht in deutlichen Kontrast zu den wesentlich kleineren AM-assoziierten MHPs (Furman & Trappe 1971, Merckx 2013). Bezüglich der evolutiven Abfolge in der Entwicklung der aufgeführten Kormusmodifikationen, formuliert Henderson unter Einbezug autotropher Vertreter bereits früh ein dem damaligen Kenntnisstand entsprechendes, evolutives Modell der schrittweisen Entwicklung mykoheterotropher Lebensformen in den Ericaceae. Die Ericaceae bilden damit seit längerer Zeit ein morpho-anatomisches Vorzeigemodell schrittweiser Evolution von mykotropher zu mykoheterotropher Lebensweise und sind bis heute Objekt intensiver Forschung in diesem Feld (Furman & Trappe 1971, Bidartondo 2005, Merckx et al. 2013c). Vergleichbare Reduktionsreihen können allerdings auch in den Orchidaceae sowie den arbuskulär mykorrhizierten Burmanniaceae und Gentianales beschrieben werden (Montfort & Küsters 1940, Furman & Trappe 1971, Maas et al. 1986, Weber et al. 1995, Imhof 1999, Imhof 2009, Ogura-Tsujita et al. 2012).

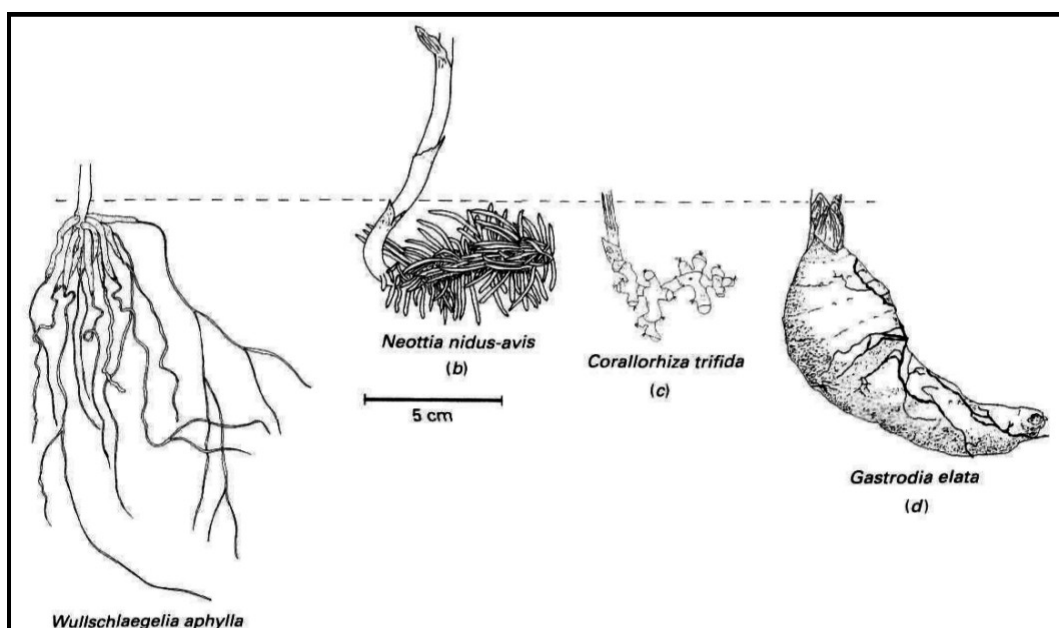


Fig. 39: Verschiedene Reduktionsformen in den Wurzel- bzw. Rhizomsystemen mykoheterotropher Orchideen. (nach Leake 1994)

IX.1.2 Modifikationen des Wurzelsystems im Detail

Imhof beschreibt detailliert die Morphologie, Anatomie und intraradikalen Ausbreitungsmuster (Morphotypen) des Pilzes in den Wurzel- und Rhizomsystemen einer Vielzahl von Glomeromycota-assoziierten mykoheterotrophen Pflanzen und interpretiert dies vor einem ökophysiologischen und evolutionsbiologischen Kontext (siehe Imhof et al. 2013 in Merckx 2013 für eine Zusammenfassung). Hierbei betont er den Trend zur Entwicklung komplex strukturierter Morphotypen (Spezielle *Paris*-Typen, vgl. Kapitel III.2). Diese lassen auf morphologischer Ebene die Unterscheidung mehrerer funktionell distinkter Gewebelagen in dem Cortexparenchym der untersuchten Arten zu. So können Zonen designiert für die initiale, radiale Ausbreitung der Hyphen nach Eintritt in den Wirt und solche spezialisiert für die häufig lineare (und daher schnelle) Ausbreitung der Hyphen entlang der Längsachse des Wirtsorgans beschrieben werden. Diese grenzen sich charakteristisch ab von Gewebeabschnitten, in denen die hyphalen Strukturen stark verknäueln, aufgetrieben und von deutlich verkürzter Vitalität sind als die langlebigeren Ausbreitungshyphen. Der rasche Abbau des Pilzes speziell in diesem Gewebeabschnitt legt einen starken physiologischen Einfluss des Wirtes auf die Vitalität der Pilzstrukturen nahe und wird als Verdauungsprozess mit impliziertem Transfer von organischen Verbindungen in den mykoheterotrophen Wirt gedeutet (vgl. Kapitel IIX.2). Darüber hinaus bilden die meisten der von Imhof untersuchten Arten keine AM-typischen hochverzweigten Arbuskel, weshalb der Terminus arbuskuläre Mykorrhiza mit seinen strukturellen Implikationen in diesen spezifischen Fällen nicht ohne weiteres anwendbar ist. Die nachhaltige „Pilzkultivierung“ über die Aufteilung des Wurzelgewebes in Zonen anhaltender pilzlicher Proliferation und in solche, die spezialisiert auf Kohlenstoffakquirierung über den Verdau der pilzlichen Biomasse sind, häufig begleitet von einer charakteristischen Modifikation der beteiligten Parenchymzellen in Form und Größe, wurde von Imhof (1997) zuerst in *Voyria tenella* beobachtet und in Anlehnung an die Pilzgärten der Blattschneiderameisen als „intraradikaler Pilzgarten“ bezeichnet. In den von Imhof untersuchten Gentianaceae der Gattung *Voyria* und mehreren Vertretern der Thismiaceae (*Afrothismia* spp.) kann der Autor eine kontinuierliche Progression in der strukturellen Komplexität der intraradikalen Mykorrhizastrukturen beschreiben. Parallel hierzu findet er in vielen Arten eine strukturelle Vereinfachung der Wurzelmorphologie (in *Voyria* stellen kleine, sternförmige Wurzelsysteme aus kurzen, relativ dicken Wurzeln mit geringer oder fehlender Trichomausbildung die vorläufige Endstufe dieser Entwicklung dar; vgl. Kapitel IX.1.1). Diese morpho-anatomischen Progressionen der Wurzeln können in *Voyria* spp. und *Afrothismia* spp. auch phylogenetisch korreliert werden (Imhof 1999, Imhof & Weber 2000, Imhof 2006). Darüber hinaus setzen die Autoren diese

Evolutionsschritte in den chlorophylllosen Vertretern der Enziangewächse in Bezug zu den Mykorrhizastrukturen der Ordnung Gentianales (mit Vertretern aus den vielfach holzigen Apocynaceae, Rubiaceae und Loganiaceae sowie den krautigen Gentianaceae; Rath 1993, Tiemann et al. 1994a, 1994b; Untch & Weber 1995; Weber et al. 1995, Franke 2002) und formulieren einen Trend von einem durch interzelluläre Hyphenausbreitung geprägten *Arum*-Typ in Vertretern der Apocynaceae über intermediäre Typen (ebenfalls Apocynaceae) zu einfach strukturierten *Paris*-Typen in Arten der Apocynaceae, den Loganiaceae, Rubiaceae, den autotrophen Enzianen sowie *Voryia truncata* (in *V. truncata* bereits ohne Arbuskelbildung), ein Übergangstyp in *V. aphylla*, bis zu den morphologisch abgeleiteten Arten *V. obconica* und *V. tenella* (Imhof 2009, Imhof et al. 2013). Diese Progressionsreihe ist bisher die einzige vergleichende Analyse einer natürlichen, arbuskulär mykorrhizierten Verwandtschaftsgruppe, die mykoheterotrophe Vertreter neben autotrophen Arten umfasst und daher von besonderem Wert in diesem Forschungsfeld. Die Gentianaceae selbst umfassen allerdings nur vergleichsweise wenige Hauptlebensformen und weisen nach bisherigen Erkenntnissen nur eine sehr geringe morphologische Varianz in ihren intraradikalen Mykorrhizastrukturen auf (vgl. z. B. Neumann 1934, Jacquelinet-Jeanmougin & Gianinazzi-Pearson 1983, McGee 1985, Burkhart 1985, Kühn & Weber 1986 Heymons 1985, 1989; Knöbel & Weber 1988, Demuth et al. 1991, Rath 2005, Sýkorová 2014). Der Einbezug von Sträuchern und Bäumen aus den Apocynaceae, Loganiaceae und Rubiaceae aber dehnt die systematischen Beziehungen so weit aus, dass bei der Interpretation dieser Daten vor einem stringenten, phylogenetisch basierten evolutiven Szenario Vorsicht angebracht ist (vgl. APG IV, in: Stevens 2001 onwards). Dennoch, vergleicht man die Entwicklungstendenzen in den Gentianales mit den morphologischen Entwicklungstendenzen in den Ericaceae, Orchidaceae und Burmanniaceae (Kusano 1911, Furman & Trappe 1971, Imhof 2008, Imhof 2009, Imhof et al. 2013), so werden zahlreiche analoge Entwicklungen in all diesen Linien deutlich. Im oberirdischen Abschnitt des Kormus sind hier die Reduktion des Sprosses, der Blattoberfläche und die schrittweise Reduzierung des Chlorophyllgehaltes anzuführen. Im unterirdischen Bereich die strukturelle Vereinfachung des Wurzel- bzw. Rhizomsystems und die meist sehr komplexe, funktionelle Zonierung der Wirtsgewebe in (häufig auch anatomisch distinkte) Bereiche, in denen der Pilz längerfristig vital bleibt (Wirtsschichten) und andere, in denen der Pilz einer zügigen Degeneration unterliegt (Verdauungsschichten) (Furman & Trappe 1971, Leake 1994, Imhof 2008, 2009; Imhof et al. 2013). Die vorliegende Arbeit erweitert die Zahl konvergenter Entwicklungen um eine weitere Familie, denn auch in den hier untersuchten grünen Arten lässt sich eine morphologische Entwicklungsreihe nachvollziehen. Beginnend bei den Bäumen in *Xanthophyllum*, den Sträuchern und verholzten

Lianen mit stark verzweigten allorhizen Wurzelsystemen in *Securidaca*, *Moutabea*, *Monnina* über geringer verzweigte, aber weiterhin allorhize Wurzelsysteme in der Mehrheit der untersuchten Kräuter (*Asemeia*, *Polygala*, *Polygaloides*) bis zu den wenig verzweigten und teils sekundär homorhizen Wurzelsystemen in einigen Arten von *Polygala* (*P. setacea*, *P. ramosa*, *P. baldunii*), *Salomonina* spp. und letztlich *Epirixanthes* spp. finden wir zahlreiche Stufen morphologischer Reduktion in den Polygalaceae (vgl. S. 133-135, Fig. 40 - 42). Bezeichnenderweise finden wir auch in den Kreuzblumengewächsen parallel zu den Reduktionen des Kormus eine ansteigende strukturelle und damit einhergehend auch funktionelle Komplexität der Mykorrhiza (vgl. Imhof 2007 & Rath et al. Manuskript A).

Fig. 40 (S. 133): Reihe unterschiedlicher Lebensformen in den Polygalaceae (wie bearbeitet in dieser Arbeit) in aufsteigender Nummerierung von Gehölzen (Bäume, Lianen, kleine Bäume bzw. größere Sträucher 1-5) über Halb- und Zwergsträucher (6, 7), kleinen Kräutern mit sattgrünen, voll ausgebildeten (8-12) oder relativ wenigen bzw. blassgrünen Blättern (13), Kräutern mit zierlichen, satt- bis blassgrünen Sprossen und sehr kleinen Blättern (14) zu stark reduzierten, grünen Sprossen mit sehr kleiner Blattrosette und winzigen Schuppenblättern (15) bzw. chlorophylllosen, schuppenblatttragenden Sprossen (16). 1 = *Xanthophyllum* cf. *flavescens* (8-35 m); 2 = *Securidaca diversifolia* (= blühend, hier als Liane in Trägerbaum; bis 4 m als Strauch, als Liane auch größer), 3 = *Moutabea longifolia* (= Liane am Stamm des Trägerbaums; Größe: mehrere Meter), 4 = *Monnina xalapensis* (bis 6 m), 5 = *Polygala myrtifolia* (1-3 m), 6 = *Polygaloides chamaebuxus* (10-25 cm), 7 = *Polygala rupestris* (bis 20 cm), 8 = *Polygala amara* ssp. *brachyptera* (5-15 cm), 9 = *Polygala nana* (10-15 cm), 10 = *Polygala vulgaris* ssp. *vulgaris* (5-20 cm), 11 = *Polygala amarella* (5-20 cm), 12 = *Salomonina cantoniensis** (30-40. cm), 13 = *Polygala ramosa* (30-46 cm), 14 = *Salomonina ciliata** (bis 25 cm), 15 = *Polygala setacea* (bis 30 cm), 16 = *Epirixanthes elongata** (bis 15 cm). * = Bildmaterial digital nachgezeichnet; Quellenangabe: siehe Kapitel XIII.

Fig. 41 (S. 134): a) Habitus von *Polygala setacea*, der bezüglich des Sprosses und der Blätter am stärksten reduzierten Art aller in dieser Arbeit untersuchten Polygalaceae. Maßstab = 2,5 cm b) Ausschnittsvergrößerung der extrem reduzierten, schuppenförmigen Blätter (Pfeilspitzen). Anm.: *P. setacea* bildet vor der Blütezeit eine winzige grundständige Blattrosette aus (siehe Teilbild c*, Maßstab = 3 mm, S = Spross, R = Rosettenblatt). Diese Blattrosette ist aber offenbar sehr vergänglich, da auch nach ausgiebiger Recherche nur sehr wenige der zugänglichen Herbarbelege Hinweise auf diese basalen Blätter zeigten. Interessanterweise bleibt *P. setacea* trotz dieser Blattrosette vermutlich eine der am weitesten reduzierten Polygalaceae, welche bezüglich der Spross- und Blattreduktion nur noch von *Epirixanthes* spp. übertroffen wird. * = Bildmaterial digital nachgezeichnet; Quellenangabe: siehe Kapitel XIII.

Fig. 42 (S. 135): Reihe morphologischer Reduktionen in den Wurzelsystemen der Polygalaceae. 1) Allorhizes, stark verzweigtes Wurzelsystem mit ausgeprägter Hauptwurzel und sekundärem Dickenwachstum (sek. Dw.), Seitenwurzeln im primären Zustand zart, mit ausgeprägtem Cortexparenchym. 2-4) Sek. Dw. und Allorhizie weiterhin vorhanden, Wurzeln zart, mit ausgeprägtem Cortexparenchym 3) Allorhizie Sonderform mit stark sekundär verdickten Speicherwurzeln niederer Ordnung und zarten, mykorrhizierten Wurzeln höherer Ordnung. 5) Allorhizes Wurzelsystem, Verzweigungen zahlenmäßig bereits verringert, Wurzeln zunehmend gleichrangig und mit beginnender Reduktion des sek Dw.. 6) Sekundär homorhizes Wurzelsystem mit geringer Seitenwurzelbildung und reduziertem sek. Dw.. 7) Kleines, sekundär homorhizes Wurzelsystem mit noch weniger Seitenwurzeln, ebenfalls mit reduziertem sek. Dw.. 8) Finale Stufe der Reduktion mit wenigen, gleichrangigen, kaum verzweigten Wurzeln (abgeleitet von einem sekundär homorhizen WS) ohne sek. Dw. und mit ausgeprägtem Cortexparenchym (s = Spross). [1 = *Monnina xalapensis*, 2 = *Polygala vulgaris* spp. *vulgaris*, 3 = *Asemeisa grandiflora*, 4 = *Polygala nana*, 5 = *Polygala setacea*, 6 = *Polygala ramosa*, 7 = *Salomonina ciliata*, 8 = *Epirixanthes papuana*]. Maßstäbe in allen Bildern = 1 cm

Fig. 40

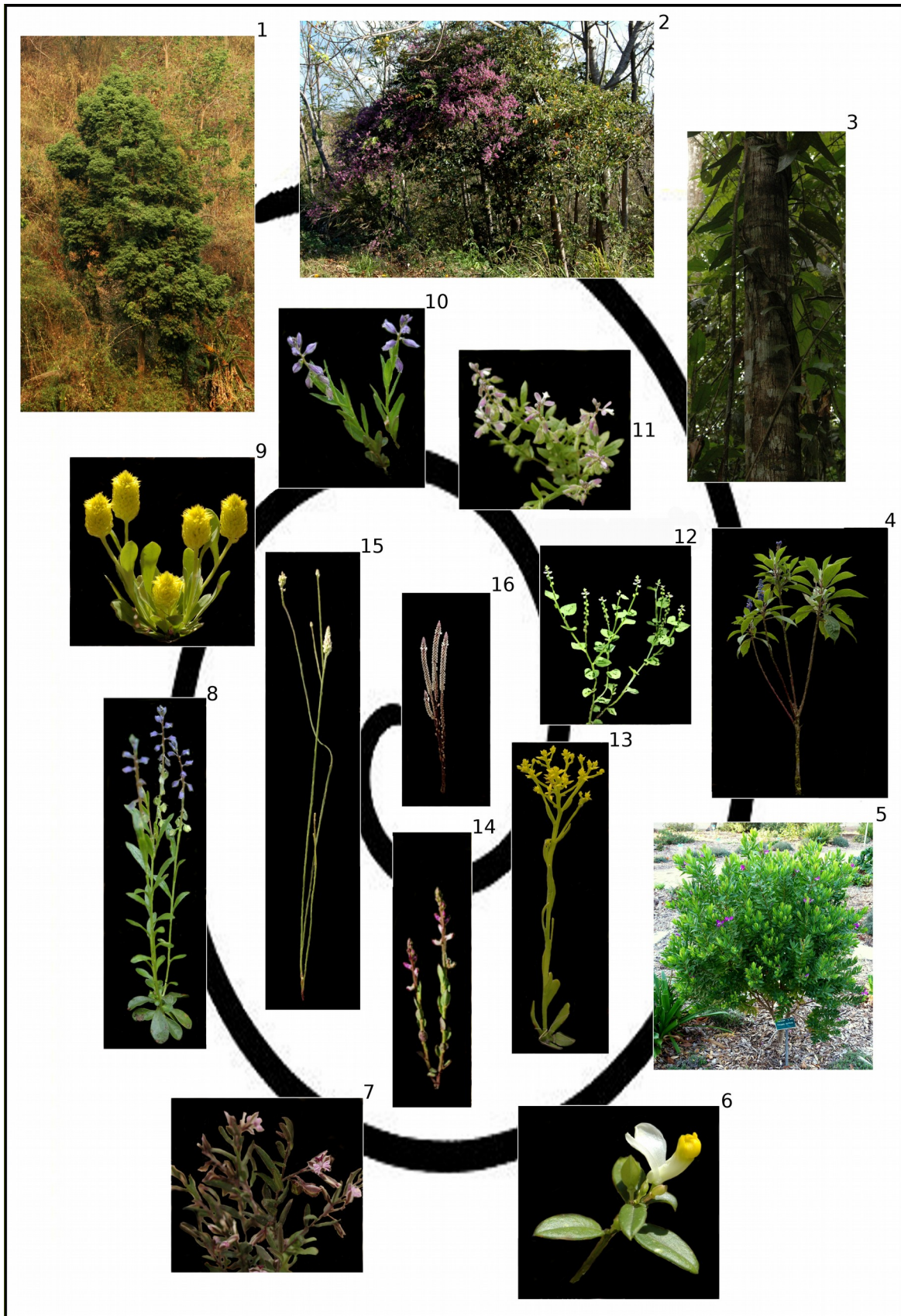


Fig. 41

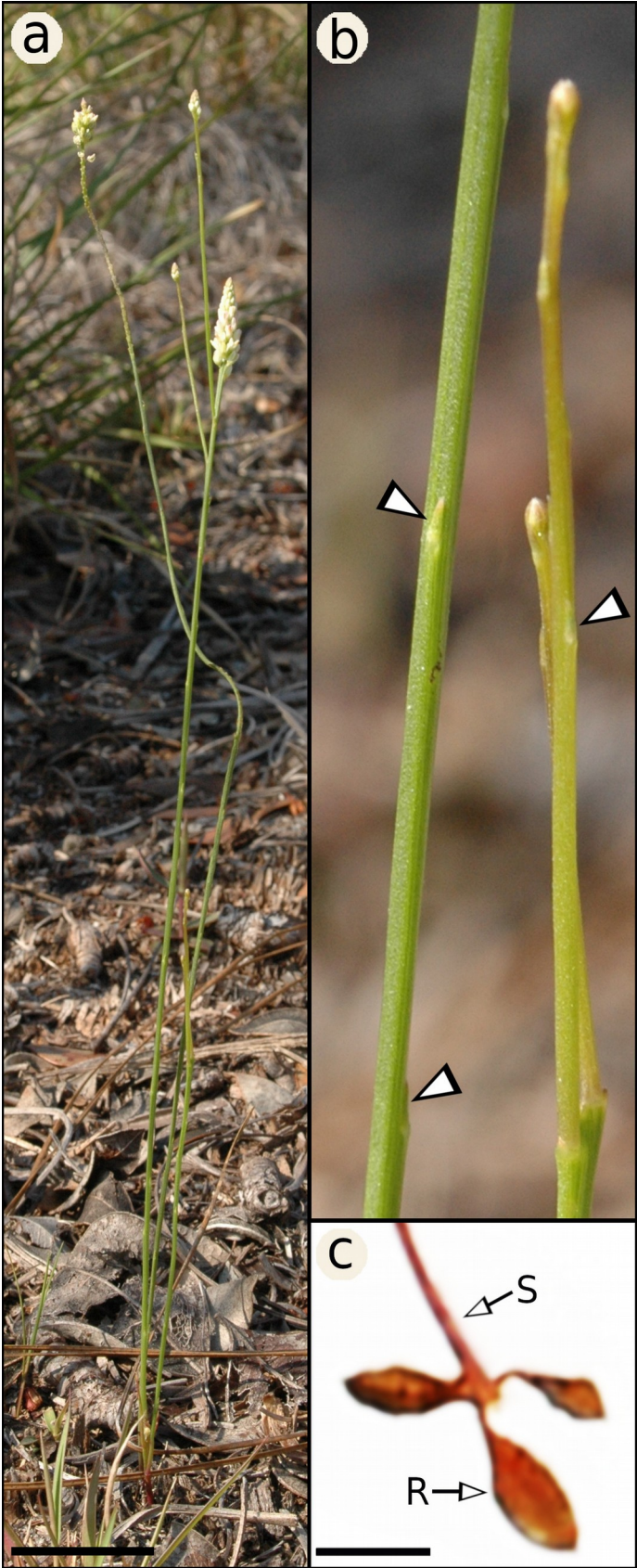
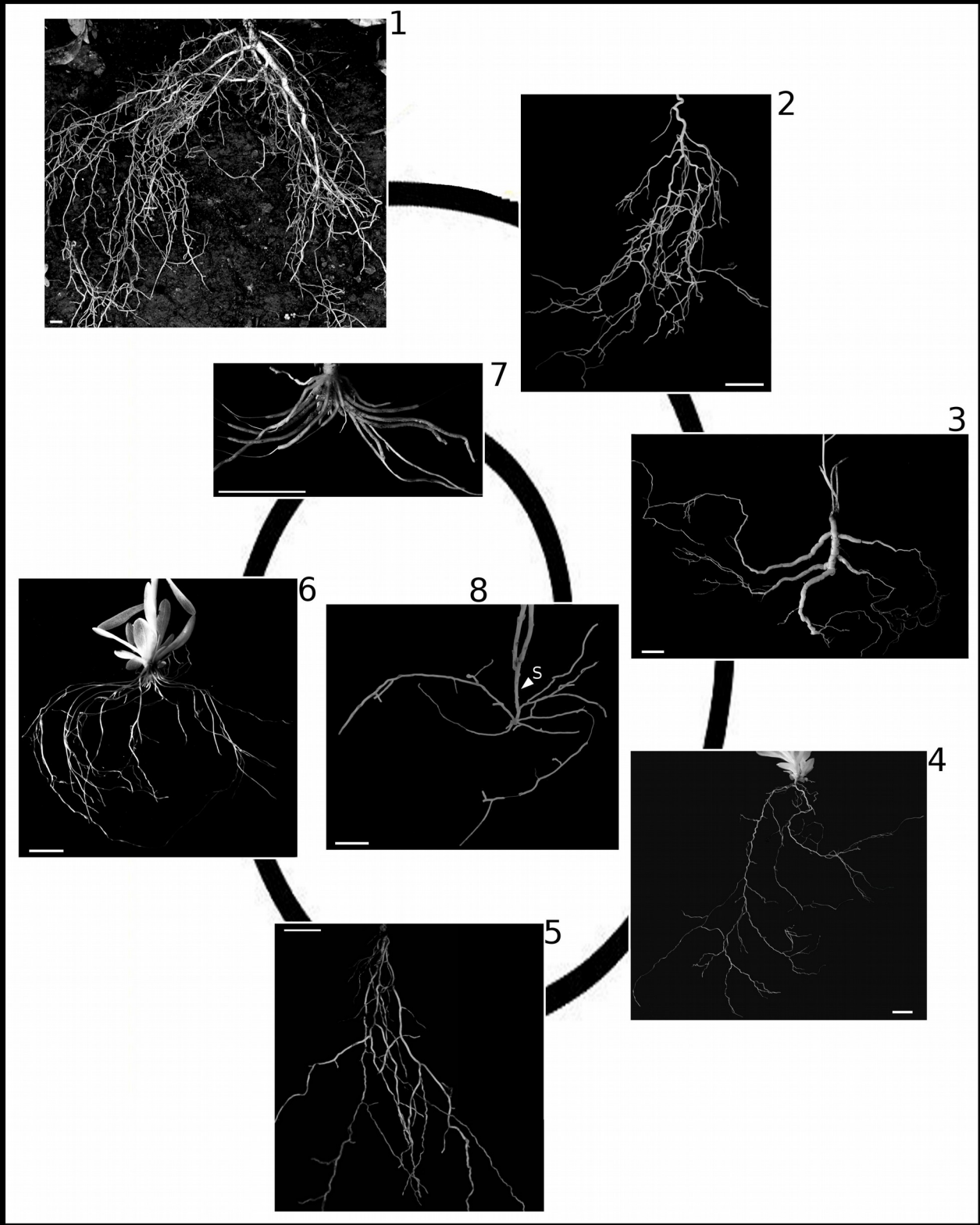


Fig. 42



IX.1.3 Mikrospermie

Eine weitere gemeinsame Entwicklungstendenz in initial, partiell und vollständig mykoheterotrophen Linien sind die häufig in sehr großer Zahl ausgebildeten, extrem kleinen sog. Staubsamen (Leake 1994, Eriksson & Kainulainen 2011). Diese besitzen oft eine verlängerte und auf ihrer Oberfläche stark skulpturierte Samenschale (Testa). Entsprechend ihrer geringen Größe weisen die Samen i. d. R. ein reduziertes Endosperm sowie einen häufig stark reduzierten Embryo auf, der im Falle einiger Arten (*Monotropa uniflora*) nur noch aus 2 Zellen besteht (Olson 1991). Mit nur ca. 50 µm in einigen Orchidaceae und Gentianaceae (*Voyria tenella*) stellen mykoheterotrophe Pflanzen auch mit die kleinsten derzeit bekannten Samen im Pflanzenreich (Leake 1994, Eriksson & Kainulainen 2011). Solchermaßen reduzierte Samen sind unfähig die Reifung, Keimung und frühe Etablierung des Keimlings zu gewährleisten. Für die Entwicklung des Embryos und vielfach auch während der Keimlingsphase sind diese Pflanzen daher auf eine exogene Versorgung mit Kohlenhydraten und Stickstoffverbindungen über den pilzlichen Symbionten bereits vor oder spätestens direkt nach der Keimung angewiesen (vgl. Kapitel II.2.2 & IIX.3). Diese Auffassung wurde für Vertreter der Orchidaceae und später auch für die Monotropaceae experimentell bestätigt (Bernard 1899 zitiert in Selosse et al. 2011, Franke 1934).

IX.2 Die phylogenetische Perspektive - Identifizierung evolutiver Schritte auf dem Weg zur Mykoheterotrophie

Die Interpretation morphologischer und physiologischer Entwicklungstendenzen in der Evolution mykoheterotropher Pflanzengruppen ist ohne Einbezug valider Phylogenien der beteiligten Arten nicht realisierbar. Das Auftreten mykoheterotropher Lebensformen an verschiedensten Stellen im Stammbaum der Landpflanzen sprechen klar für die wiederholte, unabhängige Entstehung dieses Phänomens im Pflanzenreich. Auch die sehr unterschiedlichen Pilzgruppen die an der Ausbildung der mykoheterotrophen Assoziationen beteiligt sind sprechen für diese Einschätzung. So sind bisher 46 autonome Entwicklungslinien mykoheterotropher Lebensweise in den Landpflanzen belegt (Mercks et al. 2013c). Bereits in den Orchidaceae sind mindestens 23 konvergente Entwicklung von Mykoheterotrophie im Adultstadium nachweisbar, alleine in dem Tribus Neotieae erfolgte dies zweimal (Selosse & Roy 2009, Merckx et al. 2013c). Mykoheterotrophie im Adultstadium entstand auch in den Burmanniaceae mindestens acht-, in den Gentianaceae mindestens vier- und in den Ericaceae sehr wahrscheinlich zumindest zweimal unabhängig (Merckx et al. 2013c; Lallemand et al. 2016). Merckx et al. (2013c) betonen allerdings, dass diese Angaben vermutlich sehr konservativ sind, da für einigen Verwandtschaftsgruppen noch keine verlässlichen Phylogenien vorliegen.

Über die evolutive Abfolge der einzelnen Stadien bis zum Erwerb von Mykoheterotrophie besteht in der Literatur noch keine endgültige Klarheit. Allerdings stützen logische Argumentation und phylogenetische Daten in den Orchidaceae wie auch den Ericaceae die Einschätzung partieller Mykoheterotrophie als letzten Schritt vor dem Erwerb mykoheterotropher Lebensweise (Abadie et al. 2006, Motomura et al. 2010, Lallemand et al. 2016). Was wiederum die Vorstufen zur partiellen Mykoheterotrophie angeht, wird für die Orchideen die Abfolge „initiale Mykoheterotrophie > partielle Mykoheterotrophie > Mykoheterotrophie“ als plausible Variante betrachtet (S. 138, Fig. 43) - ein Szenario, welches die Anzahl konvergenter Entstehungen der Mykoheterotrophie zumindest in den Orchideen drastisch reduzieren würde, da alle Orchideen im frühen Keimlingsstadium mykoheterotroph sind und daher eine starke Prädisposition für die Persistenz partieller Mykoheterotrophie und Mykoheterotrophie bis ins Adultstadium aufweisen dürften (Merckx et al. 2013c). Es ist nachvollziehbar, dieselbe evolutive Reihenfolge auch für die mykoheterotrophen Vertreter der Ericaceae zu favorisieren. Auch hier weist die mykoheterotrophe Arten umfassende Klade Pyroleae initiale Mykoheterotrophie auf und wird phylogenetisch seit langem an die Basis der Entwicklungslinie zu den mykoheterotrophen Triben Monotropeae und Pterospermae gestellt (z. B. Franke 1934, Lihnell 1942, Hynson et al. 2009b, Hashimoto et al. 2012, Johansson et al. 2015). Neuere phylogenetische Daten lassen aber die partielle Mykoheterotrophie als zwingend notwendigen Schritt vor der Entstehung von Mykoheterotrophie zumindest für die Monotropeae zweifelhaft erscheinen (Lallemand et al. 2016). Die Autoren hinterfragen allerdings nicht das Konzept der Keim-Mykoheterotrophie als ersten Schritt für die Evolution der Mykoheterotrophie in den Ericaceae. Dies ist ein wichtiger Punkt, denn weder das Modell von Merckx et al. (2013c) noch jenes von Lallemand et al. (2016) beantworten damit die essentielle Frage, wie es zur Entwicklung der mykoheterotrophen Physiologie selbst kam. Vor dem Hintergrund dieser Problematik schlägt Bidartondo (2005) ein evolutives Szenario vor, in dem es bereits in den autotrophen Stammlinien der mykoheterotrophen Arten zur Entwicklung initialer Mykoheterotrophie gekommen sein könnte und diese zeitlich begrenzte, einseitige Abhängigkeit des Keimlings durch die „Rückerstattung“ in Form von Assimilaten im autotrophen Adultstadium des Pflanzenwirts kompensiert wurde (*delayed carbon payback*, vgl. auch Cameron et al. 2006, 2008; Hynson et al. 2009a, Field et al. 2015b). Diese Fähigkeit könnte daher die zentrale Präadaptation in den mykoheterotrophen Kladen gewesen sein, welche letztlich zur partiellen bzw. vollständigen Mykoheterotrophie in den Adultpflanzen geführt habe, ein Gedanke, der auch in den Ausführungen anderer Autoren anklingt und speziell in den Orchidaceae zu der hohen Zahl konvergenter Entwicklungen von Mykoheterotrophie geführt hätte (Benzing & Atwood 1984, Ras-

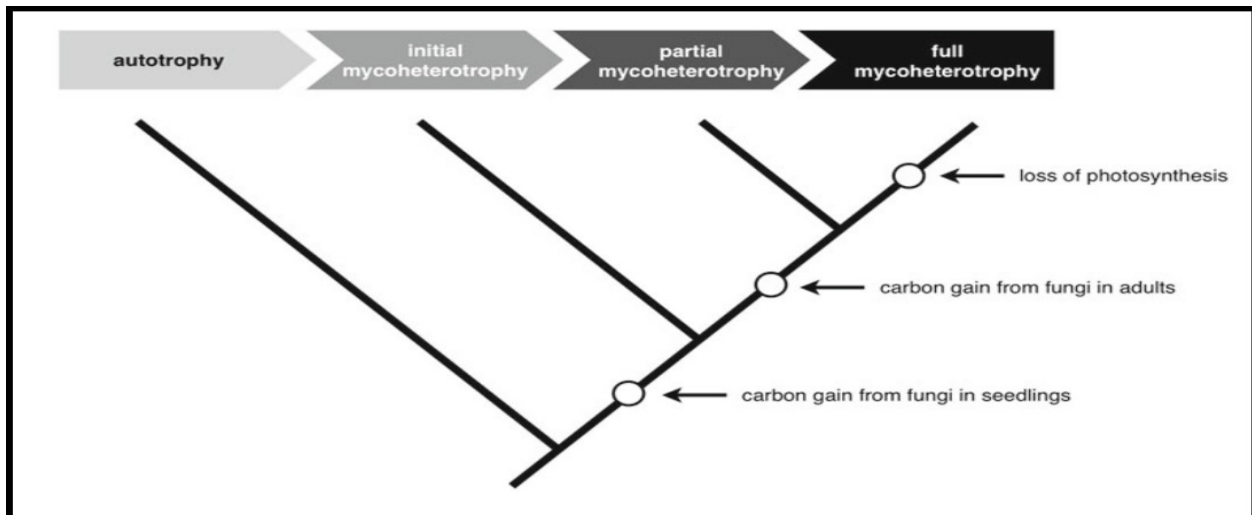


Fig. 43: Vorgeschlagenes Modell der Abfolge zentraler evolutionärer Schritte auf dem Weg zur Mykoheterotrophie am Beispiel der Orchidaceae. (nach Merckx et al. 2013c)

mussen & Rasmussen 2007, Merckx et al. 2013c, Selosse et al. 2016a). Tatsächlich liefert diese Argumentation einen soliden Erklärungsansatz für die evolutive Stabilität einer bereits etablierten, initialen Mykoheterotrophie. Dennoch bleibt die initiale Mykoheterotrophie als primärer Schritt in Richtung Mykoheterotrophie schwer nachvollziehbar. Zum Ersten basiert das Modell von Bidartondo (2005) zwingend auf der Annahme hoher Spezifität der Wirtspflanzen zu einzelnen Symbiontenlinien und auf individueller Ebene auf deren kontinuierlicher Etablierung im Wurzelsystem. Nur dann kann sich die initiale Investition später für denselben Symbionten oder zumindest dieselbe Symbiontenpopulation auszahlen. Eine derartig kontinuierliche Assoziation zu einzelnen Pilzen über den gesamten Lebenszyklus der Pflanzen hinweg ist aber gerade am Beginn der Evolution mykoheterotropher Physiologie nur schwer vorstellbar und findet sich nach bisherigen Erkenntnissen selbst in rezenten mykoheterotrophen Vertretern nicht immer (vgl. Kapitel IX.4). Mehr noch, in einigen der diesbezüglich untersuchten, im Adultstadium partiell mykoheterotrophen Orchideen (*Epipactis helleborine*, *Epipactis atrorubens*) und Vertretern des Tribus Pyroleae (*Pyrola asarifolia*, Ericaceae) findet man an den untersuchten Standorten einen Wechsel der pilzlichen Symbiontenlinien beim Übergang vom Keimlings- in das Adultstadium (Těšitelová et al. 2012, Hashimoto et al. 2012). Nun existieren hier auch zahlreiche Gegenbeispiele. In den mykoheterotrophen Gametophyten (*Lycopodium*, *Botrychium*, *Ophioglossum*, *Psilotum*) oder Protokormen (Orchidaceae) findet man tatsächlich dieselben Pilzarten wie in deren autotrophen Adultformen; es existiert sogar ein verbindendes Gewebe zwischen mykoheterotrophen Gametophyt und autotrophen Sporophyt (Pteridophyta). Rein „technisch“ ist in diesen Gruppen

daher eine Form des „*parental nurturing*“ (Leake et al. 2008) durchaus möglich. Physiologische Belege für diese Form des *delayed carbon payback* fehlen aber bisher und es sprechen nur die bereits genannten indirekten Indizien für ein solches Szenario (Winther & Friedman 2007, 2008, 2009; Bidartondo & Read 2008, Leake et al. 2008, Field et al. 2015b). Neben diesen Problemen bleiben zahlreiche theoretische Fragen zu dem Konzept bestehen. So z. B., auf welcher Ebene der beteiligte Pilz die Information, dass er mittel- bis langfristig wieder mit Kohlenstoff versorgt wird, verarbeitet? So kann im Falle von *Lycopodium* die heterotrophe Gametophytenphase mehrere Jahre andauern. Und wenn die „Rückzahlung der Kohlenstoffschuld“ einsetzt, wie unterscheidet der Pilz zwischen diesen Assimilaten und solchen von anderen autotrophen Wirtspflanzen, mit denen er unter Umständen simultan interagiert. Vor allem aber kann das Modell des *delayed carbon payback* keine Erklärung für die evolutionäre Stabilität initialer Mykoheterotrophie in mykoheterotrophen Arten liefern. Diese Pflanzen können vermutlich* keine Kohlenhydrate „zurückzahlen“ und man müsste sehr hypothetische Annahmen über die mögliche Ersatzleistung der Pflanzen für ihren pilzlichen Symbionten formulieren [* „vermutlich“, da im Falle einer diffusen Symbiose theoretisch eine Weitergabe von Assimilaten von seiten der MHP an ihre Pilzsymbionten denkbar ist (vergl. Rath et al. Manuskript B) und dies offenbar auch in chlorophylllosen, mykoheterotrophen Varianten von *Epipactis helleborine* nachgewiesen wurde (Suetsugu et al. 2017)]. Selbst wenn man all diese Einwände auflösen könnte, letztlich verlagern die Verfechter dieser Hypothese das Problem nur und setzen die grundsätzliche ökophysiologische Fähigkeit zur mykoheterotrophen Ernährung auch hier einfach voraus ohne deren eigentliche Entstehung zu thematisieren. Das alternative evolutive Szenario mit der evolutiven Reihenfolge: „beginnende partielle Mykoheterotrophie (*reversal of carbon flow*) > initiale Mykoheterotrophie > verstärkte partielle Mykoheterotrophie > Mykoheterotrophie“ erklärt den Erwerb der Mykoheterotrophie auf Basis einer sich schrittweise entwickelnden partiellen Mykoheterotrophie während der gesamten Individualentwicklung, die ab einem gewissen Grad ausreichend potent für die Kohlenstoffversorgung eines Keimlings wäre und somit die Etablierung der initialen Mykoheterotrophie erlauben würde (z. B. Bernard 1905 zitiert in Fuchs & Ziegenspeck 1925; Eriksson & Kainulainen 2011, Rasmussen & Rasmussen 2014). Dieses Modell beantwortet aber auch nicht die Frage, welche Schritte vor dem dem Erwerb der frühen partiell mykoheterotrophen Fähigkeiten, also des ersten Nettotransfers von Kohlenstoff in die bis dahin noch autotrophe Wirtspflanze, geführt haben mag. Lallemand et al. (2016) zielen auf diese Problematik ab, wenn sie von einer „.. *elusive predisposition* ..“ als Grundvoraussetzung für die Entwicklung eines mykoheterotrophen Metabolismus in den Ericaceae und Orchidaceae sprechen und vorschlagen vertiefte Analysen des C-Metabolismus und Plastidengenoms in den partiell

mykoheterotrophen Arten zur Beantwortung dieser Fragen vorzunehmen. Man kann also festhalten, dass die initiale Mykoheterotrophie mit Sicherheit eine wichtige Triebfeder in der Evolution der Mykoheterotrophie darstellt. Ihre tatsächliche Bedeutung für den Erwerb partiell mykoheterotropher Fähigkeiten wird aber erst dann geklärt werden können, wenn weitere Untersuchungen in diesem Feld erfolgen. Speziell der Nachweis von Arten, die im Adultstadium partiell mykoheterotroph sind, hierbei aber keine initiale Mykoheterotrophie aufweisen, wäre von äußerstem Interesse, um die Frage zu klären, ob die initiale Mykoheterotrophie vor der partiellen Mykoheterotrophie evolvierte oder dies in umgekehrter Reihenfolge stattgefunden hat. Auch hier könnten die Polygalaceae ein besonders wertvolles Modell darstellen, da selbst *Salomonina* spp. als sehr nahe Verwandte der mykoheterotrophen Gattung *Epirixanthes*, genauso wie auch einige phylogenetisch und morphologisch abgeleitete Vertreter von *Polygala* spp., bereits deutliche morphologische und anatomische Hinweise zumindest auf eine sehr fortgeschritten mykotrophe Lebensweise aufweisen - eine Lebensweise, welche in einigen Arten eventuell auch schon die Schwelle zur partiellen Mykoheterotrophie überschritten haben könnte (Rath et al. Manuskript A). Die Vertreter dieser chlorophyllhaltigen Gattungen bilden aber immer noch Samen mit gut ausgeprägtem Endosperm, welches Kohlenhydrate für die autonome Keimung und frühe Keimlingsentwicklung bereitstellt. Hier ist demnach also nicht vom Vorliegen initialer Mykoheterotrophie im Sinne einer zwingend notwendigen Kohlenstoffzufuhr über den Pilz für die eigentliche Keimung auszugehen (Eriksen & Persson 2007, Forest et al. 2007).

Die Verringerung der Photosyntheseaktivität und der verringerte photooxidative Stress in ihren zumeist sehr schattigen Habitaten führt bereits in den partiell mykoheterotrophen Arten zu einer relaxierten Selektion des Photosyntheseapparates. In den diesbezüglich untersuchten Arten resultiert dies offenbar häufig in einer stark ausgeprägten Degradation zahlreicher plastidärer und kernlokalisierter photosyntheserelevanter Gene wie des plastidären NADH Dehydrogenase Komplexes (*ndh*), des Cytochrom-b6f-Komplexes (*cytb6f*) sowie der häufig für phylogenetische Analysen herangezogenen Gene RuBisCo (*rbcL*) und MaturaseK (*matK*) (vgl. S. 142, Fig. 44). Der Verlust der Photosynthesegene lässt eine Rückkehr zur Autotrophie nach Erreichen eines Zustandes vollständiger Abhängigkeit von der pilzlichen Versorgung mit Kohlenhydraten sehr unwahrscheinlich erscheinen (Selosse & Roy 2009, Meckx et al. 2013c). Auf der einen Seite stellt dies ein wichtiges Hilfsmittel für die Interpretation möglicher Evolutionsszenarien in Kladen wie den Neottieae (Orchidaceae) dar, die sowohl autotrophe, partiell mykoheterotrophe und mykoheterotrophe Adultformen umfassen (Selosse & Roy 2009). Auf der anderen Seite erschwert

das Fehlen bzw. die extreme Degeneration der in der Pflanzenphylogenie besonders informativen Photosynthese-Gene in hohem Maße die eindeutige, molekularbasierte Stammbaumrekonstruktion mykoheterotropher Entwicklungslinien. Dieses Problem wird noch erschwert, da auch alternative, mitochondriale und nukleäre Markerregionen (z. B. 18S rDNA) in diesen Taxa häufig eine außergewöhnlich hohe Sequenzvariabilität aufweisen und dies oftmals zur Überbewertung phylogenetischer Distanzen führt (Wickett et al. 2008, Barret & Freudenstein 2008, Barret & Davis 2012, Merckx & Freudenstein 2010, Ravin et al. 2016, Graham et al. 2017) - ein Artefakt, das speziell in Parsimonie-Analysen auftreten kann (*long branch attraction*, Felsenstein 1978; vgl. Merckx et al. 2009a für eine Fallstudie in der Familie Thismiaceae). Dies ist um so gravierender, als dass in vielen, speziell den monokotylen Verwandtschaftskreisen, häufig auch real eine größere evolutive Lücke zwischen den mykoheterotrophen Arten und ihren nächsten autotrophen Verwandten existiert (so z. B. in den Thismiaceae, Merckx et al. 2013c). Diese Tatsache macht die wenigen Fälle, in denen neben den chlorophylllosen Formen auch noch „grüne“ Arten in der näheren Verwandtschaft existieren, besonders wertvoll. Nur in solchen Gruppen, wie den Ericaceae (Lallemand et al. 2016), Gentianaceae (Merckx et al. 2013d), Burmanniaceae (Gattung *Burmannia*; Merckx et al. 2006, 2008; Bolin et al. 2015) und Polygalaceae (Mennes et al. 2015), können im Prinzip ökophysiologisch sinnvolle Interpretationen der morpho-anatomischen Veränderungen der Mykorrhiza in einem evolutionsbiologischen Kontext erfolgen⁶.

Beim Vergleich vieler Verwandtschaftskreise mit mykoheterotrophen Arten wird deutlich, dass zumindest auf Ebene der Familie keine klar ersichtliche Korrelation zwischen der Evolution der Mykoheterotrophie und der phylogenetischen Progression innerhalb dieser Pflanzengruppen existiert. So entstand in den Burmanniaceae und Gentianaceae Mykoheterotrophie bereits früh in einigen der phylogenetisch ursprünglichen Kladen wie der Gattungen *Campylosiphon* und *Geosiphon* (Burmanniaceae) bzw. *Voyriella*, *Cotylanthera*, *Sebaea* und *Voyria* (Gentianaceae), später aber ebenfalls in abgeleiteteren Kladen von *Burmannia* (Burmanniaceae), in *Obolaria* und *Bartonia* (Gentianaceae) (Struwe et al. 2002, Merckx et al. 2006, 2008; Merckx et al. 2013c). Die Iridaceae sind ebenfalls ein gutes Beispiel für diese frühe Evolution der Mykoheterotrophie (Goldblatt et al. 2008) und selbst in dem zahlenmäßig erfolgreichsten mykoheterotrophen Verwandtschaftskreis, den Orchidaceae, ist kein derartiger Trend erkennbar (APG IV, in: Stevens 2001 onwards). Dies ist auch nachvollziehbar, wenn man die extreme Spezialisierung dieser Ernährungsform in Betracht zieht,

⁶Die Orchidaceae werden aufgrund der in allen bekannten Arten vorliegenden initialen Mykoheterotrophie hier bewusst nicht aufgezählt.

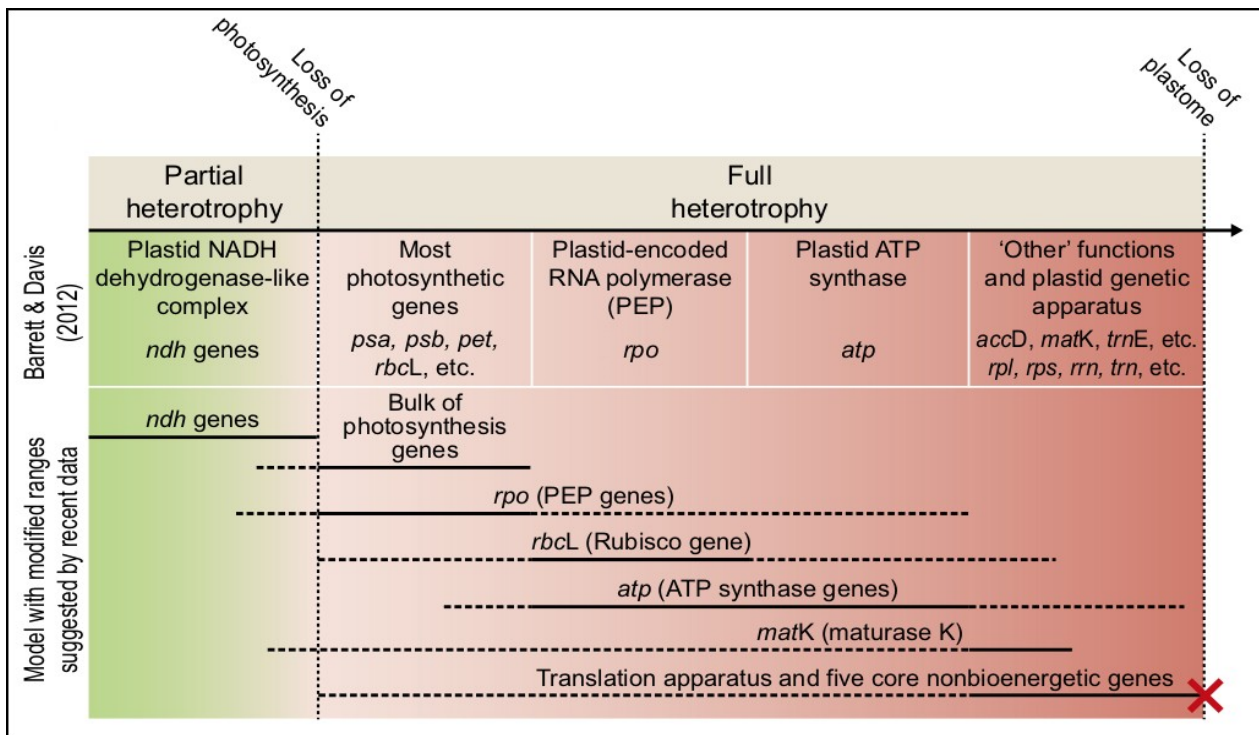


Fig. 44: Abfolge des Verlustes photosyntheserelevanter Gene als Resultat der relaxierten Evolution im Photosyntheseapparat partiell mykoheterotropher und mykoheterotropher Arten. (nach Graham et al. 2017)

welche nur unter sehr speziellen Bedingungen einen evolutiven Vorteil gegenüber einer autotrophen Lebensweise mit sich bringt (Benzing & Atwood 1984). Diese Ansicht wird ebenfalls durch die Beobachtung einer vergleichsweise geringen Artenzahl in den allermeisten mykoheterotrophen Kladen gestützt, welche entweder auf eine geringe Diversifizierungs- und/oder eine hohe Extinktionsrate rückführbar ist (Merckx et al. 2013c). Ausser in den Ericaceae (Lallemand et al. 2016) findet man in den diesbezüglich untersuchten Familien mit chlorophyllhaltigen und mykoheterotrophen Vertretern daher bislang nur in den Polygalaceae auf Familienebene eine klare Parallelität zwischen phylogenetischer und morphologischer Progression. So belegt die vorliegende Arbeit ein gehäuftes Auftreten der Modifikationen in den Mykorrhizastrukturen in den phylogenetisch progressiven Kladen *Polygala*, *Salomonina* und *Epirixanthes* (Imhof et al. 2007, Forest et al. 2007, Mennes et al. 2015, Lallemand et al. 2016, Rath et al. Manuskript A). Zwar ist bisher nur in der Gattung *Epirixanthes* die vollständige Ausprägung mykoheterotropher Lebensweise evolviert, aber auch in Vertretern der Gattung *Salomonina* und *Polygala* finden sich Arten, in denen viele der von uns als zentral für die Realisierung der chlorophylllosen Lebensweise erachteten morfo-anatomischen Anpassungen der Mykorrhiza akkumulieren. Hierbei sind die progressivsten dieser Merkmale in den Polygalaceae aber mehrfach, offenbar parallelistisch,

entstanden (vgl. Rath et al. Manuskript A). Es scheint also auch in der Familie Polygalaceae Faktoren zu geben, welche diese besonders für die Evolution einer solchen Lebensweise prädisponiert. Der einzige Unterschied zu phylogenetisch ursprünglicheren Familien wäre demnach das geringere evolutive Alter, welches bisher nur in wenigen Linien die Entstehung mykoheterotropher Arten ermöglichte. Gerade dieser Umstand erlaubt allerdings den wissenschaftlichen Zugang zu den zentralen Schritten in der Evolution der Mykoheterotrophie. Familien wie die Orchidaceae, aber auch die vermutlich in allen Kladen bereits sehr fortgeschritten mykotrophen Gentianaceae sind in diesem Sinne häufig schon zu „alt“, um uns klare Aussagen über die frühen Stadien in der Entwicklung progressiver Mykotrophie und Mykoheterotrophie zu liefern. Dies bedeutet natürlich nicht, dass in phylogenetisch älteren Verwandtschaftsgruppen nicht auch wichtige Schritte auf dem Weg zur Mykoheterotrophie konserviert sind, zumal auch in diesen Linien die Evolution vollständig chlorophyllloser Arten weiterhin möglich zu sein scheint [z. B. Motomura et al. 2010, Merckx et al. 2013c,d].

IX.3 Triebfedern der Evolution von Mykoheterotrophie

Eine Reihe von Faktoren, welche die Evolution der mykoheterotrophen Lebensweise begünstigt haben könnten, werden diskutiert. Einer der am häufigsten formulierten Ansätze ist die Vorstellung von Mykoheterotrophie als Anpassung an eine voranschreitende Beschattung der vorher lichtreicheren Lebensräume autotropher Vorfahren der mykoheterotrophen Pflanzen (u. a. Benzing & Atwood 1984, Leake 1994; Bidartondo 2005) im Zuge der Ausbreitung tropischer Regenwälder während globaler Warmphasen zwischen ausgehender Unterkreide und unterem Eozän (vor ca. 105 - 45 mya.). Innerhalb dieses großen Zeitrahmens korreliert die ausgedehnte Phase feuchtwarmen Tropenklimas während des Päläozens (ca. 62 - 56 mya.) und besonders des anschließenden Eozäns (Eozän-Temperaturoptimum vor ca. 55 - 48 mya.) mit molekular systematischen Belegen (*molekular clock*) für die Entwicklung der Mykoheterotrophie, damit offenbar einhergehend einem signifikanten Diversifizierungsschub in den Orchidaceae, Burmanniaceae, Thismiaceae, Triuridaceae, Corsiaceae und Gentianaceae (Ramírez et al. 2007, Merckx et al. 2013c,d). Für einige dieser Gruppen wie den Gattungen *Burmannia* und *Gymnosiphon* (Burmanniaceae) und *Voyria* (Gentianaceae) liefern solche Warmphasen mit ihren bis in nördliche Breiten reichenden subtropischen Wäldern auch ein Erklärungsmodell für deren erstaunliche interkontinentale Verbreitung über die für diese Phasen belegten Landverbindungen zwischen Nordamerika und Eurasien (z. B. Laurasische Migration; Merckx et al. 2008, 2013c,d). Auch für die phylogenetisch vergleichsweise junge, mykoheterotrophe Gattung *Epirixanthes* deuten molekulare Daten auf deren

Ursprünge (*stem age*) in einem ähnlichen Zeitrahmen (vor ca. 20 mya, Oligozän-Miozän Übergang) und deren Diversifizierung als mykoheterotrophe Klade (*crown age*) in einer weiteren Warmphase (Mittel-Miozän-Klimaoptimum vor ca. 15 - 17 mya), in der die tropischen Wälder in Südostasien ein nördliches Ausbreitungsmaximum erreichten. Die Entwicklung der Mykoheterotrophie wird also auch in diesen mykoheterotrophen „Teenagern“ als Anpassung an eine starke Ausdehnung extrem schattiger Standorte gedeutet (z. B. Mennes et al. 2015). Letztlich findet man in den Orchidaceae (z. B. Neottieae, *Cymbidium*) und Ericaceae (Pyroleae) Gruppen, deren rezente Vertreter alle Übergänge von Autotrophie bis zur Mykoheterotrophie aufweisen und denen man bei der Evolution dieser chlorophylllosen Lebensweise gleichsam „zusehen“ kann - auch hier spielt die Anpassung an schattige Waldhabitats (zumeist in temperaten Regionen) offensichtlich eine wichtige Rolle, findet man doch alle diese Arten als Teil der Unterwuchses zumeist schattiger Wälder (z. B. Hynson et al. 2009b, Motomura et al. 2010, Merckx et al. 2013c). Neben Lichtmangel werden aber auch andere Anpassungsdrücke diskutiert. Für die evolutiv sehr viel älteren, häufig unterirdisch wachsenden, chlorophylllosen Gametophyten einiger Lycopodiaceae und Farne (Moniliphyta) wird die Vermeidung von Wassermangel, ein kritischer Faktor für deren obligat wasserabhängige Spermatozoide, als weiterer Selektionsvorteil für eine mykoheterotrophe Lebensweise diskutiert (Leake et al. 2008). Die Entwicklung zur Mykoheterotrophie als Kohlenhydratquelle wäre in diesem Fall eine notwendige, jedoch nur indirekte Anpassung an diese Lebensweise. Vor einem rein physiologischen Hintergrund ließe sich letzteres Argument allerdings auch auf oberirdische Sporophyten der Angiospermen anwenden, denn eine geringere Assimilationsrate ermöglicht die verlängerte Verschlussdauer der Stomata und damit weniger Transpiration - ein Faktor, der in wasserlimitierenden Grenzsituationen durchaus von Bedeutung gewesen sein und z. B. die mykorrhizainduzierte, erhöhte Trockenheitstoleranz in einigen diesbezüglich untersuchten (autotrophen) Orchideen erklären könnte (Rasmussen et al. 2002).

Vor dem Hintergrund dieser Arbeit von besonderer Bedeutung ist auch die Idee, dass die Entwicklung der Mikrospemie in Verbindung mit initialer Mykoheterotrophie ein zentraler und vor allem ursächlicher Schritt in der Evolution von Mykoheterotrophie darstellt (Merckx et al. 2013c; S. 138, Fig. 43). Pflanzen, die extrem kleine Samen ausbilden, das sind häufig partiell mykoheterotrophe und mykoheterotrophe Pflanzen, aber auch angiosperme Holoparasiten wie z. B. *Orobanche* spp., investieren ihre reproduktiven Ressourcen nicht in wenige, mit reichlich Speicherstoffen ausgestattete, vergleichsweise große Samen, sondern in die massenhafte Produktion winziger reservestoffarmer „Staubsamen“. Diese Strategie erhöht die reproduktive Fitness allerdings nur unter der Annahme extrem spezifischer Standortanforderungen in der jeweiligen

Pflanzengruppe. Lediglich wenn abiotische und/oder biotische Bedingungen die Anzahl potentieller Habitate extrem einschränken, „lohnt“ es sich für die Pflanze die Samenzahl auf diese Art zu maximieren. Mykoheterotrophe Pflanzen erfüllen dieses Kriterium allerdings in bemerkenswerter Weise, denn sie sind an einen sehr speziellen Standort angepasst, welcher sich nicht nur durch abiotische Bedingungen (z. B. Schatten, humides Klima), sondern ebenfalls durch die passenden Umweltbedingungen für den pilzlichen Symbionten auszeichnen muss (z. B. McCormick et al. 2014). Um diese speziellen Habitate zu besiedeln, sind sehr kleine, in großer Zahl produzierten Samen also von Vorteil. Können sie aber wirklich als evolutive Triebfeder für die Entwicklung der Mykoheterotrophie angesehen werden (vgl. z. B. Bidartondo 2005)? Diese Interpretation lehnen Eriksson & Kaunulainen (2011) klar ab und begründen dies mit der Abhängigkeit des reservestofffreien Samens von einer sehr frühen Assoziierung mit dem pilzlichen Symbiosepartner. Diese Abhängigkeit aber impliziert die Entwicklung mykoheterotropher Fähigkeiten (im Sinne eines zumindest frühen Stadiums partieller Mykoheterotrophie) vor der Evolution initialer Mykoheterotrophie. Wie bereits im Vorgängerkapitel eingehend dargelegt, ist die Idee der initialen Mykoheterotrophie als erster Schritt in der Evolution der mykoheterotrophen Physiologie anzweifelbar. Die Entwicklung kleiner, vollständig von einer Kohlen- und Nährstoffzufuhr über den Pilz abhängiger Samen, stellt vermutlich keine Vorbedingung für die Evolution erster mykoheterotropher Fähigkeiten dar. Umgekehrt aber ist eine schrittweise ansteigende partielle Mykoheterotrophie als verstärkender Faktor für die Entwicklung initialer Mykoheterotrophie im Sinne einer positiven Rückkopplung zu bewerten. Diese Rückkopplung bedeutet, dass jeder weitere evolutive Schritt der Pflanzen in Richtung verstärkter Kohlenstoffakquirierung über den Pilz die Notwendigkeit verschärft, möglichst viele Samen, zu produzieren, da nur dies die Chance einzelner Samen, ein passendes Habitat inklusive physiologisch kompatibler Pilzsymbionten anzutreffen, gewährleistet. Solches ist allerdings nur über die Verkleinerung der Samen zu realisieren, welches wiederum die Abhängigkeit der Pflanze von einer initialen Kohlenstoff- und vermutlich auch Stickstoffversorgung über den Pilz verstärkt (Eriksson & Kaunulainen 2011, Rasmussen & Rasmussen 2014). Abschließend soll noch auf das Konzept des „fakultativen Epiparasitismus“ (*facultative epiparasitism*) verwiesen werden. Dieses beschreibt die Möglichkeit des Wirtes von den Nährstoffflüssen innerhalb eines etablierten Hyphennetzwerkes zu profitieren, ohne eine Gegenleistung (in Form von Assimilaten) für die pilzlichen Konstituenten des Netzwerkes bereitzustellen (urspr. beschrieben von Molina et al. 1992, Modell inhaltlich ausgebaut und begrifflich geprägt durch Bruns et al. 2002, vgl. auch Fig. 30 Kapitel VII). Ein Beispiel für dieses Konzept ist die Einbindung junger, photosynthetisch noch wenig leistungsfähiger bzw. beschatteter

Bäume in das bestehende ECM-Hyphennetzwerk der Altpflanzen. Hier profitieren die Jungpflanzen offenbar deutlich von der Kohlenstoffinvestition der Adultpflanzen in das gemeinsame Hyphensystem. Das Modell ist zwar ursächlich nicht für mykoheterotrophe Pflanzen ausgelegt und impliziert auch nicht zwingend einen Netto-C-Transfer in die Jungpflanzen über den assoziierten Pilz. Es ist allerdings interessant den Gedanken auf frühe Evolutionsstadien mykoheterotropher Entwicklungslinien anzuwenden. So ist es denkbar, dass autotrophe Pflanzen, welche bereits ein hohes Maß der physiologischen Abhängigkeit von einer Nährstoffversorgung über den Pilz aufweisen (also ausgeprägt mykotrophe Arten), eine weitere Steigerung des symbiotischen „Netto-Gewinns“ vornehmlich über eine Reduktion ihrer eigenen „Investition“ in den Pilz erzielen und sich hierdurch einen ökophysiologischen Vorteil gegenüber den weniger spezialisierten Wirtspflanzen innerhalb desselben Hyphennetzwerkes erschließen. Da der Pilz aber offenbar eine dauerhafte Verringerung des Assimilattransfers (in Relation zu den restlichen Wirtspflanzen des Netzwerkes) sanktionieren kann (vgl. Kapitel III.6.3), wäre die Evolution möglichst effizienter Interaktionsstrukturen in den Wurzeln, wie z. B. spezialisierten Wirtsgeweben für den bidirektionalen Stofftransfer oder auch solchen für eine schnelle Ausbreitung des Pilzes ein denkbarer Mechanismus, die energetisch vom Wirt zu unterhaltende pilzliche Biomasse in den Wurzeln auf ein „Mindestmaß“ zu reduzieren, ohne die Stoffflüsse an den symbiotischen Schnittstellen selbst zu beeinträchtigen. Dies könnte dann aber auch die Ursache für den Beginn der Evolution komplexer Mykorrhizastrukturen sein, wie man sie in vielen mykoheterotrophen Arten beobachten kann. Dieser Ansatz lässt sich zudem zwanglos auf unterschiedliche ökologische Grenzsituationen und damit Selektionsdrücken im Habitat des progressiv mykotrophen Wirtes, wie z. B. Lichtmangel oder auch Mineralstoffkonkurrenz anwenden. Ein wichtige Voraussetzung für dieses Modell ist allerdings die Existenz von Übergangsformen solch komplexer Mykorrhizastrukturen in den autotrophen Verwandten der mykoheterotrophen Arten. Genau dies jedoch finden wir in den rezenten Polygalaceae, wo zum einen Zwischenformen in phylogenetisch ursprünglicheren Gehölzen (z. B. *Securidaca* spp., *Monnina* spp.), aber auch bereits weit fortgeschrittene Stadien struktureller Komplexität in den abgeleiteteren, nach äußerlichen Kriterien autotrophen Kräutern nebeneinander existieren (z. B. *Polygala vulgaris*, *P. amarella*; Rath et al. 2013, Rath et al. Manuskript A).

IX.4 Spezifität in mykoheterotrophen Pflanzen

Verlässt man die Mykorrhiza der autotrophen Pflanzen und wendet sich der Symbiose in mykoheterotrophen Pflanzen zu, so findet man in vielen ihrer Vertreter ein erhöhtes Maß der

Spezialisierung auf wenige oder sogar nur eine einzige Gruppe nah verwandter Pilze (Hynson & Bruns 2010, Waterman et al. 2013). Ohne klaren Beleg für eine symbiotische Gegenleistung der mykoheterotrophen Pflanzen für den assoziierten Pilz wird der Zustand von Mykoheterotrophie bisher stets als direkter Parasitismus an dem assoziierten Pilzsymbionten bzw. als indirekter, d. h. Epiparasitismus, an den coassozierten autotrophen Begleitpflanzen gedeutet - der eigentlichen Quelle des Kohlenstoffs für die chlorophylllose Pflanze (z. B. Bidartondo 2005). Vor diesem Hintergrund wurden die frühen Befunde hoher Spezifität in der Mykorrhiza mykoheterotropher Pflanzen (Cullings 1996, Taylor & Bruns 1997, Taylor & Bruns 1999, Bidartondo & Bruns 2001, 2002; Bidartondo et al. 2002, 2003) auch als Resultat eines möglichen evolutionären Wettrüstens zwischen Pflanze und dem Pilzsymbionten diskutiert (z. B. Bidartondo & Bruns 2002, 2005; Bruns et al. 2002, Hynson & Bruns 2010). Gegenüber diesem Modell existieren allerdings einige Vorbehalte. So ist ein wesentliches Merkmal des coevolutiven Wettrüstens, die zeitliche Parallelität in der Kladogenese der Symbiose„partner“, in den mykoheterotrophen Entwicklungslinien häufig nicht gegeben, da die pilzlichen Linien phylogenetisch zumeist deutlich ursprünglicher als die der pflanzlichen Wirte sind. Speziell die Glomeromycota sind in den meisten Linien stammesgeschichtlich signifikant älter als die mit ihnen assoziierten mykoheterotrophen Pflanzen (James et al. 2006, Waterman et al. 2013). Daher ist eine zeitlich parallel verlaufende Artbildung auf Basis einer reziproke Adaptation von Pilzsymbiont und mykoheterotropher Pflanze ausgeschlossen. Auch erfordert ein evolutives Wettrüsten die wiederholte Konfrontation zwischen Wirt (in diesem Falle der Pilz) und Parasit (in diesem Falle die mykoheterotrophe Pflanze) im Verlauf ihrer Stammesgeschichte. Dies aber, ist bei der Seltenheit vieler mykoheterotropher Pflanzen ebenfalls kein sehr wahrscheinliches evolutives Szenario (Leake 2004, Hynson & Bruns 2010). Weiterhin bemerkt Jackson (2004) in einer breit angelegten Studie das Fehlen eines für parasitäre Verhältnisse eigentlich zu erwartenden Wechsels zu neuen pilzlichen „Wirten“ in den von ihm untersuchten mykoheterotrophen Vertretern der Ericaceae. Diesen ungeklärten Fragen gesellt sich ein weiteres, grundlegendes Problem hinzu. Jede ausgeprägte, coevolutive Anpassung der Symbionten aneinander, sollte, rein theoretisch, die Fähigkeit derselben mit anderen potentiellen Symbiosepartnern zu interagieren stark einschränken. Für die mykoheterotrophe Pflanze kann dies zum Problem werden, da sie i. d. R. auf eine Assoziierung mit autotrophen Nachbar(Donor)pflanzen angewiesen ist. Verlören nun aber die pilzlichen Symbionten über ein evolutives Wettrüsten mit ihrem mykoheterotrophen „Parasit“ die Fähigkeit zur Ausbildung einer mutualistischen Mykorrhiza mit den autotrophen „Donorpflanzen“, fallen die Pilze letztlich auch als Symbionten für die mykoheterotrophe Pflanze aus. Ähnlich, allerdings von Seite der autotrophen Begleitpflanze,

argumentiert Bidartondo (2005), wenn er feststellt, dass eine mögliche Selektion des Primärwirtes gegen eine mit diesem epiparasitär verbundenen mykoheterotrophen Pflanze nur zu Lasten des vermittelnden Pilzes möglich wäre. Ein Wechsel des pilzlichen Symbiosepartners könnte diese Probleme zwar abmildern, allerdings nur auf Kosten der bereits erfolgten ökophysiologischen Anpassungen an den Pilz.

Das bisher aufgeführte Modell basiert auf der Annahme eines direkten parasitären Verhältnisses zwischen mykoheterotrophen Pflanzen und ihren Mykorrhizapilzen bzw. eines indirekten Parasitismus an der autotrophen Begleitpflanze (Letzteres trifft natürlich nicht auf die vergleichsweise kleine Gruppe der mit saprophytischen Pilzen assoziierten mykoheterotrophen Orchideen zu). Wir wissen allerdings nicht, ob das wesentliche Kriterium des Parasitismus, eine einseitige Schädigung der eigentlichen Wirtsorganismen (Pilz bzw. autotrophe „Donorpflanze“), im Falle der Mykoheterotrophie tatsächlich vorliegt. Zwar existieren vereinzelte Berichte, in denen bei hoher lokaler Individuendichte einzelner mykoheterotropher Arten eine Schädigung des Pilzsymbionten vermutet wurde (Martin 1985 zitiert in Bidartondo 2005, Taylor & Bruns 1999). Auf evolutiver Skala würde ein Zusammenbruch der Symbiose allerdings erst dann erfolgen, wenn die reproduktive Fitness des pilzlichen Endosymbionten dauerhaft beeinträchtigt wäre. Rein theoretisch spricht einiges gegen eine solche Entwicklung. Die Forschung argumentiert hier vor allem mit der diffusen Natur der Mykorrhizasymbiose. In einer solchen Symbiose interagiert ein pilzliches Individuum gleichzeitig mit vielen autotrophen Pflanzen. Die „parasitäre Last“, welche von der mykoheterotrophen Pflanze ausgeht sollte daher für das einzelne Pilzindividuum nur relativ gering ausfallen - eine Vermutung, die ähnlich bereits früher geäußert wurde (z. B. Imhof 1997, Bidartondo & Bruns 2005). Ähnlich ist auch für die autotrophen „Donorpflanzen“ nicht von einer signifikanten Beeinträchtigung durch den mykoheterotrophen „Epiparasiten“ auszugehen. So sagen Taylor et al. (2004) *„The diffuse interactions between fungi and autotrophs combined with intermittent interactions between fungi and myco-heterotrophs suggest that any selection imposed by cheating myco-heterotrophs on the linked autotrophs is likely to be weak and diffuse.“* Beiden Hypothesen liegt also offenbar als zentrale Bedingung die weitläufige Etablierung des pilzlichen Symbionten in zahlreichen autotrophen Pflanzenindividuen am jeweiligen Standort der mykoheterotrophen Pflanze zugrunde. Nur so kann nach diesem Modell die parasitische Signatur einer MHP physiologisch maskiert werden und zwar vermutlich um so effektiver, je mehr autotrophe Konstituenten eine solche tripartite Symbiose (hier im Sinne von MHP – Pilz – autotrophe Pflanzen) umfasst - eine Annahme, die auch für die Einschätzung der ökophysiologischen Ursachen für Spezifität in diesen Pflanzen von Bedeutung ist (Rath et al.

Manuskript B). In einem solchen System würde man die mykoheterotrophe Art auch neutraler als *exploiter* (Ausbeuter) denn als Parasit oder „*cheater*“ bezeichnen, die eine symbiotische Leistung ausnutzt, für die andere Teilnehmer des symbiotischen Netzwerkes eine mutualistische Gegenleistung eingebracht haben (z. B. Bidartondo et al. 2003, Egger & Hibbet 2004). All diese Einwände sprechen zwar nicht gegen ein parasitäres Verhältnis per se, wohl aber gegen die Perzeption des Parasitismus durch den Pilzsymbionten und stellen daher ein coadaptives Verhältnis, also die zeitlich eng gekoppelte Rückkopplung zwischen Wirt und Parasit in Frage. In diese Richtung argumentiert auch Roy et al. (2009b), wenn er den Mangel an Spezifität in der mykoheterotrophen Orchidee *Aphyllorchis* spp. auf die fehlende negative Rückkopplung der autotrophen Begleitpflanze zurückführt. Diese „Donorpflanze“, so die Vermutung, produziere in ihrem tropischen Habitat in einem solchen Überschuss Kohlenhydrate, dass weder auf Ebene des Pilzes noch durch die photosynthetischen Pflanzen selbst ein Selektionsdruck gegen die mykoheterotrophe Orchidee zum tragen komme. Ähnlich erklären die Autoren für die evolutionäre Stabilität von geringer Spezifität in einigen partiell mykoheterotrophen Arten, welche nur vergleichsweise wenig Kohlenstoff vom Pilz nutzen. In beiden Fällen, so die Autoren, seien die Kosten für eine Abwehr der MHP vermutlich höher als der potentielle Nutzen der Kohlenstoffersparnis, womit der mykoheterotrophe „Parasit“ unterhalb der Reaktionsschwelle seines Pilzwirtes agieren würde und daher offenbar keine Notwendigkeit für Spezifizierungen im Rahmen eines evolutionären Wettrüstens existiere.

Trotz all dieser theoretischen Einwände beschreiben Merckx & Bidartondo (2008) eine sehr auffällige, bis dahin nur in hochspezialisierten Wirts-Parasiten-Beziehungen beschriebene, Kongruenz in den Topologien der Phylogenen von *Afrothismia* spp. und den mit dieser mykoheterotrophen Gattung assoziierten Pilzsymbionten aus den Glomeromycota (vgl. S. 150, Fig. 45). Die Autoren interpretieren das auffällige phylogenetische Signal als nachträgliche Anpassung der ca. 70 - 105 mya. jüngeren Pflanzenlinie an stammesgeschichtlich deutlich ältere Pilzgruppen und bezeichnen diesen Prozess daher als zeitlich verzögerte Coevolution („*delayed cospeciation*“). Allerdings sind die genannten Autoren nicht die ersten, die ein solches Szenario skizzieren. Sehr ähnlich erklärt Cullings et al. (1996) die Ursache für die ausgeprägte Spezifität in der mykoheterotrophen Art *Pterospora andromedea* (Ericaceae) zu einer einzelnen Artengruppe in der ECM-Gattung *Rhizopogon* (sulloide Basidiomyceten). Dennoch bleibt fraglich, ob man bei diesen Systemen überhaupt von Coevolution sprechen sollte, da es sich anders als unter den Bedingungen eines coevolutiven Wettrüstens eben „nur“ um eine einseitige Anpassung an die Physiologie eines Pilzsymbionten handelt. Nichtsdestotrotz ist das Ergebnis einer solchen einseitigen Adaption dem

eines evolutionären Wettrüstens langfristig sehr ähnlich und resultiert in einem als *phylogenetic tracking* bezeichneten Prozess, bei dem über die einseitige ökophysiologische Annäherung an einzelne Pilzlinien die Fähigkeit zum Symbiontenwechsel (*host shift* bzw. *host jump*) verloren geht und die mykoheterotrophe Art ihr eigenes evolutives Schicksal an das des Pilzes bindet (*host loyalty*). Auf diese Weise werden z. B. die teils extremen Spezifitäten einzelner, teils sympatrisch vorkommenden Linien von *Monotropa uniflora* (Ericaceae) oder *Corallorhiza* spp. (Orchidaceae) zu phylogenetisch distinkten Pilzlinien erklärt (Bidartondo & Bruns 2002, 2005; Taylor & Bruns 1999, Taylor et al. 2004, Bidartondo 2005, Merckx et al. 2009b, Barret et al. 2010). Alternativ zu diesen Szenarien wurde die Idee formuliert, die Spezifität in MHPs könnte das Resultat einer Selektion besonders „naiver“ Pilze sein, welche (noch) keine Abwehrstrategien gegenüber dem mykoheterotropen Parasiten entwickelt hätten (Bidartondo & Bruns 2002, Egger & Hibbet 2004, Merckx et al. 2009b). Dieser Ansatz würde jedoch einen wiederholten phylogenetisch signifikanten Wirtwechsel (*host jump*) implizieren oder aber wiederum in ein evolutionäres Wettrüsten auslaufen. Auch dieser Hypothese fehlt bislang eine ausreichende empirische Basis (Hynson & Bruns 2010). Selbst wenn phylogenetisch signifikante Wirtswechsel bisher nicht nachgewiesen wurden, *host shifts*, also ein Wechsel zwischen eng verwandten Pilzwirten, wurden für *Monotropa uniflora*, *Pterospora andromedea*, *Corallorhiza* spp. und in der arbuskulären Mykorrhiza für *Thismia* spp. nachgewiesen. In einigen Fällen könnte dieser Prozess auch eine sympatrische Speziation der

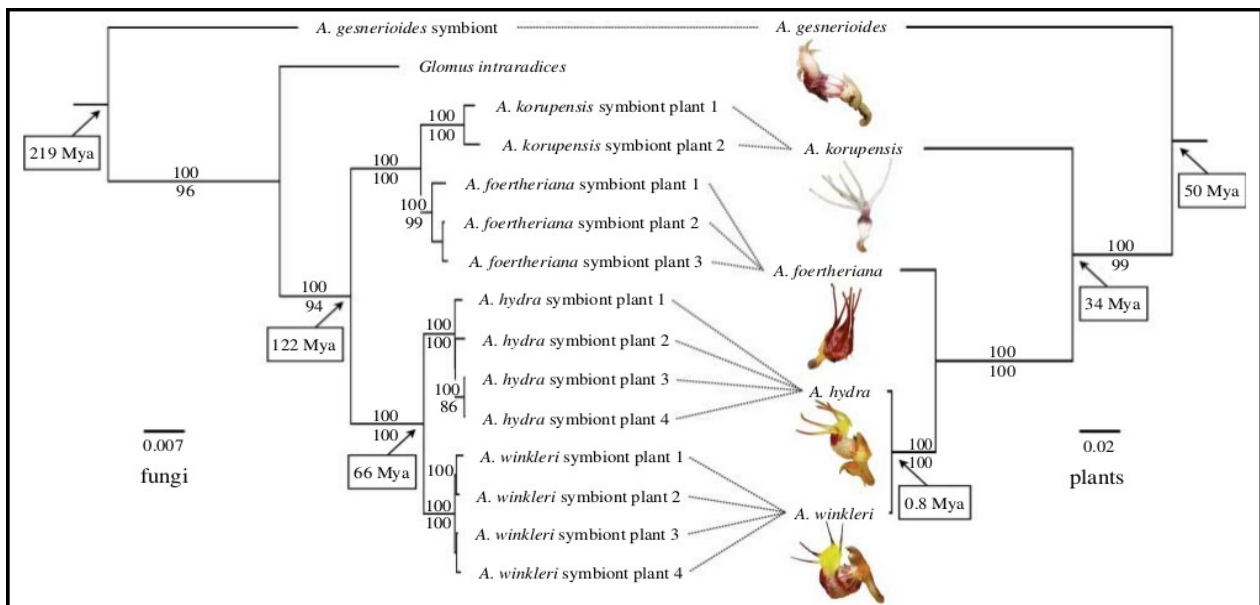


Fig. 45: Kongruente Topologien in der Evolution der pilzlichen Symbionten von *Glomus* spp. (heute *Rhizophagus*, Glomeromycota) und den Vertretern der Gattung *Afrothismia* (Thismiaceae). Die große zeitliche Lücke zwischen der Evolution in beiden Linien schließt eine Co-Kladogenese der Symbiosepartner aus. (nach Meckx & Bidartondo 2008)

Pflanzen gefördert haben (Bidartondo & Bruns 2001, 2002; Taylor & Bruns 1999, Merckx et al. 2017). Weiterhin sind Einengungen der beteiligten Pilzwirtsdiversität innerhalb des ontogenetischen Zyklus von MHPs bekannt. Die auffälligen Flaschenhalseffekte, welche sich in einer deutlichen Verringerung der Diversität in den Symbiosepartnern in mykoheterotrophen Keimlingen der Monotropeae und Orchideen nach dem Übergang in die Adultphase beobachten lassen, bzw. der höhere Spezifitätsgrad in den mykoheterotrophen Keimlingsstadien partiell mykoheterotropher Orchideen und Pyrolaceae (im Vergleich zu deren verstärkt autotrophen Adultstadien), belegen dies und könnten auf eine Selektion physiologisch besonders kompatibler Symbionten hindeuten (Bidartondo & Bruns 2005, Bidartondo & Read 2008, Hashimoto et al. 2012). Hier soll auch die Hypothese Erwähnung finden, nach der mykoheterotrophe Pflanzen nicht parasitäre oder neutralistische, sondern bislang unentdeckte, mutualistische Eigenschaften besitzen könnten (Molina et al. 1992). Spezifität ist unter dieser Bedingung das Resultat einer gegenseitigen Optimierung des Mutualismus (Hynson & Bruns 2009). Bisher sind unsere Daten zu möglichen mutualistischen Eigenschaften der mykoheterotrophen Arten aber sehr spärlich. Berichtet wird von einer höheren Mykorrhizierung und Feinwurzelausbildung der autotrophen Begleitpflanzen von *Hypopitys* und *Sarcodes*, welches sowohl für den autotrophen wie auch den pilzlichen Wirt vorteilhaft sein könnte (Björkman 1960, Bidartondo et al. 2000). Auch gibt es Berichte von verstärktem Wachstum der pilzlichen Außenhyphen nach Ausbildung einer Symbiose mit den mykoheterotrophen Protokormen von Orchideen (Purves & Hadley 1975 zitiert in Dearnaley et al. 2016). Spekuliert wird auch, dass MHPs Lebensraum und Metabolite wie z. B. Vitamine für den Pilz bereit stellen (Selosse & Roussett 2011, Dealarney et al. 2016). So lange allerdings nicht wirklich bekannt ist, welche essentielle, d. h. nicht ebenso gut von autotrophen Pflanzen zu erbringende Symbioseleistung mykoheterotrophe Pflanzen anbieten, bleibt diese Optionen äußerst spekulativ und würde wiederum unter der Einschränkung leiden, dass von pilzlicher Seite betrachtet eine mutualistische Anpassung an die mykoheterotrophe Pflanze vermutlich in einer Verschlechterung der Symbiose mit dem essentiellen, autotrophen pflanzlichen Partner resultieren könnte. Letztlich wäre die Entwicklung der Spezifität aber auch als Prozess denkbar, welcher weniger durch die direkte Interaktion zwischen mykoheterotrophen Pflanzen und ihrem Pilzsymbionten, sondern viel mehr vom Assoziierungs„verhalten“ der autotrophen „Donorpflanze“ abhängt. Ändert diese die Zusammensetzung ihrer symbiotischen Pilzgemeinschaft bzw. grenzt die Zahl der möglichen Pilzpartner ein, wäre die mykoheterotrophe Pflanze gezwungen, diese Veränderung ebenfalls zu vollziehen, um ihre Ernährung weiterhin zu gewährleisten. Durch diese Idee werden die ökologischen Ansprüche der autotrophen Donorpflanzen an ihre Symbionten als

gleichberechtigt neben denen des Pilzes und der mykoheterotrophen Pflanze betrachtet und ihr Wert für die Evaluierung der ökophysiologischen Ursachen für Spezifitäten in mykoheterotrophen Lebensgemeinschaften stärker gewichtet. Auch erlaubt ein solcher Ansatz eher, begründete Hypothesen über die funktionellen Eigenschaften der Pilze in einer solch vielgliedrigen Symbiose zu formulieren (siehe auch Kapitel XI, S. 166, Fig. 48 & Rath et al. Manuskript B).

Sicher von ebenso großem Interesse für unser Verständnis der Mykoheterotrophie wie die Ausprägung von Spezifitäten ist allerdings auch die offensichtliche Abwesenheit genau dieser in einer nicht geringen Anzahl chlorophyllloser Arten. So existiert in allen der am MHP-Syndrom beteiligten Mykorrhizaformen Belege für fehlende oder nur gering ausgeprägte Spezifität bzw. höchstens Präferenzen der heterotrophen Pflanzen für einzelne Pilzgruppen, so dass eine sehr ausgeprägte taxonomische Spezifität offenbar keine zwingende Voraussetzung für die evolutive Entwicklung und Persistenz mykoheterotropher Lebensweise ist (vgl. Franke et al. 2006, Hynson & Bruns 2009, Martos 2009, Roy et al. 2009a,b; Mercks et al. 2012, Těšitelová et al. 2012, Okayama et al. 2012, Suetsugu et al. 2014). Von einem phylogenetischen Standpunkt aus betrachtet wird ein Mangel an Spezifität häufig als Merkmal unvollständig, d. h. partiell bzw. nur initial mykoheterotropher Pflanzen oder noch relativ junger mykoheterotropher Arten gedeutet (Merckx et al. 2013d). Letzteres wird auch als eine mögliche Erklärung für die vergleichsweise geringe Spezifität in der Gattung *Epirixanthes* angenommen (Mennes et al. 2015). Die Polygalaceae sind daher auch in diesem Punkt ein gutes Modell, denn erst durch den Einbezug z. T. sehr nah verwandter, aber noch photosynthesebefähigter Vertreter aus den Gattungen *Salomonina* und *Polygala* (Rath et al. 2013) erkennt man in der Tat eine ansteigende Spezifität im Sinne einer, wenn auch moderaten, Erhöhung des Verwandtschaftsgrades innerhalb der mit *Epirixanthes* spp. assoziierten pilzlichen Phylogruppen. Soweit der eingeschränkte Artenplot in den Studien verallgemeinernde Aussagen zulässt, lässt sich dieses Phänomen ebenfalls in den Gattungen *Petrosavia* (Petrosaviaceae), *Dictyostegia* (Burmanniaceae), *Cymbidium* und *Cephalanthera* (Orchidaceae; hier gekoppelt mit einem kontinuierlich verlaufenden Wechsel von saprophytischen zu ektomykorrhizausbildenden Pilzsymbionten in den Sebacinales bzw. Thelephoraceae parallel zur Entwicklung der Mykoheterotrophie) beobachten (Merckx et al. 2010, Yamato et al. 2011b, Ogura-Tsujita et al. 2012). Die Beurteilung solcher Befunde als Zeichen eines grundlegenden Merkmals früh evolvierter Mykoheterotrophie kann allerdings nicht die einzige Interpretation sein. So finden sich auch in einigen, stammesgeschichtlich ursprünglicheren, angiospermen MHP-Kladen, z. B. *Campylosiphon congestus* (Burmanniaceae), *Sciaphilla* spp. (Triuridaceae) und ebenfalls in den mykoheterotrophen Gametophyten phylogenetisch ursprünglicher Farne [*Psilotum nudum*

onten hindeutet - eine Manipulation, die eventuell nur mit einem kleinen Teil der potentiellen Pilze im Habitat umsetzbar ist (Bidartondo 2005; Waterman et al 2013). Letztlich wird auch die Hypothese einer Vermeidung von Konkurrenz um die Nahrungsressource „Pilz“ durch den Befund hoher Spezifität in sympatrisch vorkommenden, nah verwandter mykoheterotropher Orchideen und Ericaceen gestützt (Rasmussen 2002, Bidartondo & Bruns 2002).

Das offensichtlichste Problem einer Spezialisierung hingegen ist die Etablierung der Pflanzen an neuen Standorten (Leake 1994). Vor allem für die Verbreitung der mykoheterotrophen Pflanze kann die Rekrutierung eines passenden Pilzpartners zu einem erheblichen Problem werden und eventuell die Seltenheit vieler dieser Pflanzen an scheinbar gut geeigneten Standorten erklären (Swarts et al. 2010, Waterman et al. 2013, McCormick et al. 2014). Ein Ausweg aus diesem Dilemma ist wie bereits angesprochen, die Produktion einer großen Zahl von sehr kleiner Samen (vgl. Kapitel IX.1.3, IX.2, IX.3) oder, alternativ, die Spezialisierung auf weit verbreitete Symbionten (Ogura-Tsujita & Yukawa 2008, Merckx et al. 2017). In letzterem Fall ist allerdings zu beachten, dass eine weite Verbreitung des pilzlichen Symbionten nicht zwingend mit dessen physiologischer Eignung für eine mykoheterotrophe Assoziation zusammenfallen muss. Vielleicht konnte aufgrund dieser Einschränkung selbiges bisher nur für wenige MHPs nachgewiesen werden [*Eulophia zollingerie* in den Orchidaceae und *Hypopitys monotropa* in den Ericaceae können hier genannt werden; (Bidartondo & Bruns 2001, Ogura-Tsujita & Yukawa 2008)]. Ein weiteres Problem der Spezifität ist die enge Anbindung an das ontogenetische Schicksal des Symbionten. Fällt dieser als Partner aus, so existiert kein ökophysiologisches „Backup“ und die Pflanze geht zugrunde. Letztlich kann eine Spezifizierung auf einige wenige Symbiosepartner die Option auf einen potentiell besseren Partner im selben Habitat verhindern und die Gefahr des Aussterbens einer Population unter veränderten ökologischen Rahmenbedingungen begünstigen (Waterman et al. 2013). Demgegenüber bietet eine moderate Reduktion von Spezifität den Vorteil verringerter Abhängigkeit von speziellen Pilzgruppen und damit weniger ausgeprägte Verbreitungsbarrieren. Die Beobachtung einer eher gering ausgeprägten Spezifität in vielen der verbreiteteren arbuskulär mykorrhizierten mykoheterotrophen Pflanzen stützt diese Argumentation (Suetsugu et al. 2014). Ökophysiologisch betrachtet, könnte die Nutzung unterschiedlicher Pilze auch eine effiziente Strategie zur Vermeidung einer zu starken Schädigung der einzelnen Pilzsymbionten sein, wobei sich dieses Argument prinzipiell auch auf sehr spezifische Assoziationen anwenden ließe, allerdings nur, wenn der entsprechende Symbiont dafür im Habitat eine sehr starke Verbreitung besitzt oder alternativ in sehr potenten C-Donoren, wie z. B. großen verholzten Lebensformen wie Bäumen und Sträuchern etabliert ist (vgl. hierzu auch Roy et al. 2009b). Ein Ansatz, welcher die häufig ausgeprägte

Spezifität vieler mykoheterotropher Orchideen und Ericaceae zu ektomykorrhiza-ausbildenden Pilzarten miterklären könnte. Bereits diese, aus ökologischer Sicht vermutlich extrem vereinfachte Annäherung an die realen ökophysiologischen Rahmenbedingungen mykoheterotropher Lebensweise, unterstreicht die Notwendigkeit, Spezifitäten in der Mykorrhiza mykoheterotropher Pflanzen in einem dezidiert ökophysiologischen Kontext zu evaluieren.

Hohe wie auch geringe Spezifität könnten für „heterotrophe“ Pflanzen also sowohl vor- als auch nachteilig sein. Ein möglicher Ausweg aus diesem Dilemma könnte demnach die zeitlich begrenzte Ausbildung von Spezifität innerhalb der Individualentwicklung sein. So wurde beispielsweise eine partiell mykoheterotrophe Ericaceae (*Pyrola asarifolia*) beschrieben, welche als mykoheterotropher Keimling deutlich spezifischer ist, als in ihrer partiell mykoheterotrophen Adultphase (Hashimoto et al. 2012). Diese Option steht mykoheterotrophen Arten jedoch nicht zur Verfügung. Eine weitere Alternative könnte daher auch die Assoziierung zu mehreren distinkten Pilzgruppen anstelle von sehr engen taxonomischen Spezifitäten sein. Solche mäßig ausgeprägten Spezifitäten oder Präferenzen könnten eine Antwort auf die Notwendigkeit sein, in wechselnden Habitaten erfolgreiche ökophysiologische Verbindungen zu unterschiedlichen „Donorpflanzen“ über die jeweils mit diesen assoziierten Pilzen zu etablieren, ohne hierbei gänzlich auf eine Adaption an besonders geeignete Pilzgruppen zu verzichten. Eine solche Strategie wäre demnach weniger ein Merkmal unvollkommener Anpassung an die mykoheterotrophe Lebensweise, sondern ein evolutiv stabiler Kompromiss, der Reproduktionserfolg (im Sinne weitläufiger Etablierung der Jungpflanzen) und die ökophysiologische Anpassung an den pilzlichen Symbionten vereint. Dieses Szenario, eine Assoziation mit einer begrenzten Anzahl phylogenetischer Gruppen pilzlicher Symbiosepartner, findet man auch tatsächlich in einer nicht unerheblichen Zahl partiell mykoheterotropher und mykoheterotropher Arten und interessanterweise auch in den in dieser Studie untersuchten, zur Photosynthese befähigten Vertretern der Polygalaceae, und zwar weitgehend unabhängig von ihrer Lebensform und phylogenetischen Stellung (Rath et al. 2013, Rath et al. Manuskript B). Wir wissen bisher nicht eindeutig, ob unter den in dieser Arbeit untersuchten Pflanzenarten bereits partiell mykoheterotrophe Arten sind, auch wenn dies die morphologischen Progressionen in einigen Arten von *Salomonina* spp. sowie Vertretern der nordamerikanischen Klade von *Polygala* s. str. nahelegen. Dennoch ist es interessant zu beobachten, dass die chlorophyllhaltigen Polygalaceae und einige MHP-Kladen sehr ähnliche Spezifitätsmuster aufweisen. Darüber hinaus kann eine auffällig häufige Assoziierung der autotrophen Polygalaceae mit Symbionten beobachtet werden, welche mit mykoheterotrophen Pflanzen aus anderen Verwandtschaftsgruppen vergesellschaftet sind - ebenfalls eine Gemeinsamkeit

mit einigen Entwicklungslinien mykoheterotropher Pflanzen (Merckx et al. 2012; vgl. S. 153, Fig. 46). Könnte diese Korrelation ein weiterer Indikator für die Evolution voranschreitender mykotropher Lebensweise in den Polygalaceae sein? Falls dies so ist, stellt sich die Frage, welche Eigenschaften die rekrutierten Pilztaxa besonders geeignet für die Symbiose mit den hier untersuchten Vertretern der Polygalaceae macht? Vielleicht kann uns bei der Beantwortung dieser essentiellen Frage die Tatsache helfen, dass wir mit den untersuchten Polygalaceae nun zum ersten Mal in der Mykorrhizaforschung einen konsistenten Datensatz auf morpho-anatomischer wie auch molekularsystematischer Ebene von einer großen Zahl unterschiedlicher Wirtsarten sowie Wirtslebensformen aber auch sehr verschiedenen Wirtstrophiestufen besitzen (d. h. Autotrophie + verstärkte Mykotrophie; partielle Mykoheterotrophie; Mykoheterotrophie) und vor diesem Hintergrund versuchen können, die ökophysiologischen Ansprüche, welche diese unterschiedlichen trophischen Strategien an die pilzlichen Symbionten stellen, in die Evaluation der funktionellen Ursachen für die beobachteten Assoziierungsmuster zwischen den pflanzlichen und pilzlichen Symbiosepartnern der Mykorrhiza in den Polygalaceae einzubeziehen (Rath et al. Manuskript B).

X Die Problematik der Methode - Modifikation seriendünnschnittbasierter Morphotypisierung in der Mykorrhizaforschung

Der vergleichend morpho-anatomische Ansatz dieser Arbeit erfasst die Struktur der Mykorrhiza in zahlreichen Vertretern der Polygalaceae. Das hauptsächlich genutzte Verfahren ist die Analyse von Seriendünnschnitten in Kunstharz eingebetteter Wurzelproben. Hierbei werden zahlreiche Wurzelproben aus unterschiedlichen Abschnitten des Wurzelsystems von mehreren Individuen jeder untersuchten Art präpariert, um zum einen die Mykorrhizastrukturen in all ihren ontogenetischen Stadien zu erfassen und zum anderen die Signifikanz der morphologischen Befunde abschätzen zu können. Die präparierten Wurzeln werden nach Polymerisierung des Harzes als Längs- bzw. Querschnitte in 4 µm dicke Einzelschnitte in Serie auf Objekträgern montiert, eingefärbt, mit Einschlussmedium sowie einem Deckglas versehen und als Dauerpräparate hellfeldmikroskopisch analysiert. Hierbei wird die Ausbreitung des Pilzes in der Wurzel sowie seine feinstrukturellen Charakteristika in Bezug zum pflanzlichen Wirtsgewebe und dessen Anatomie gesetzt. Da die räumliche Rekonstruktion der Mykorrhizastruktur über die sukzessive Untersuchung „zweidimensionaler“ Serienschnitte erfolgt, stellt dies eine nicht zu unterschätzende Schwierigkeit und die eigentliche Methode der Analyse dar. Der zeitliche Aufwand dieses Verfahrens ist schon bei wenigen untersuchten Arten als beträchtlich, vor dem Hintergrund einer Thematik, welche zwangsläufig eine große Zahl unterschiedlicher Arten umfasst, aber als sehr groß zu bezeichnen. Um aber die Vorteile dieser Methode (gutes Bildmaterial, hohe Replikanzahl, intensive Auseinandersetzung mit dem Material) auf alle Arten anzuwenden und die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurden von allen untersuchten Spezies in zahlreichen Replikaten (Standorte und Individuen) Seriendünnschnitte erstellt und untersucht. Insgesamt konnten so ca. 50.100 Einzelschnitte erstellt und eingehend analysiert werden. Um den Prozess der Datenaufnahme zu beschleunigen, wurde parallel zu dieser konventionellen Bearbeitung des Materials ein alternatives Verfahren etabliert. Hierbei wurde über mehrere Zwischenschritte eine Methode optimiert, dessen Grundidee die konfokalmikroskopische Analyse vollständiger, in Kunstharz eingebetteter Wurzelabschnitte ohne vorherige physische Sektion der Wurzelprobe im Zuge des Serienschnittverfahrens ist. Dieses Prinzip erlaubt eine lückenlose, tomographische Untersuchung der Mykorrhiza. Hierbei stellte sich schnell heraus, dass die Zuhilfenahme eines Mikrotoms dennoch von großem Wert ist, denn nur hiermit lässt sich zum einen eine perfekt plane Oberfläche auf der Kunstharzkapsel erzeugen, welche ein optisch verlustarmes Scannen der Probe über den Laser des konfokalen Mikroskops erlaubt und zum anderen ein in Z-Richtung genau definiertes Abtragen bereits gescannter Wurzelabschnitte erzielen. Letzteres erlaubt die Analyse von

Proben mit theoretisch unbegrenzter Tiefenausdehnung. Während diese Technik erste vielversprechende Resultate bereits mit dem nicht-selektiven Farbstoff Säurefuchsin (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany) lieferte, konnte das Verfahren aber erst nach der Entwicklung einer effizienten Permeabilisierungstechnik des Wurzelgewebe als ausgereift bezeichnet werden. Dies ermöglicht das tiefere Eindringen von höhermolekularen Farbstoffen und damit eine selektive Anfärbung des pilzlichen Endosymbionten mithilfe des chitinbindenden Fluochroms WGA-Alexa Fluor 633 (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA) bzw. der Cellulose der Wirtsgewebezellen über den Fluoreszenzmarker Propidium-Iodid oder Calcofluor White (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany). Hierdurch erzielt man eine hochaufgelöste, tomographische Darstellung der selektiv angefärbten Pilzstrukturen innerhalb des ebenfalls distinkt fluoreszierenden Wirtsgewebes. Dies stellte eine erhebliche Erleichterung der räumlichen Rekonstruktion und Analyse der Mykorrhizastrukturen dar, welche nun softwarebasiert tomographisch durchlaufen oder als 3-D Modelle rekonstruiert werden können. Im Zuge der abschließenden Literaturrecherche zur Publikation der Methodik wurde allerdings deutlich, dass Teilaspekte der Methode nicht gänzlich neu sind, sondern bereits eine Reihe von Jahren vorher von Melville et al. (1998) publiziert wurden. Das neue Verfahren umfasste allerdings so tiefgreifende Modifikationen (Anwendung der Mikrotomtechnik, das Permeabilisierungsverfahren inklusive Selektivfärbung sowie die deutlich erhöhte Scanpenetration in der kritischen Tiefen-Ausdehnung des Präparates), dass einer Publikation von Seiten der beteiligten Gutachter keine Bedenken entgegengebracht wurden. Unter Anwendung dieser Technik, konnten zahlreiche konfokal-mikroskopisch erstellte Datensätze untersucht und viele Fragestellungen deutlich schneller beantwortet werden. Das neue Verfahren wird daher als wichtige methodische Grundlage für die Bearbeitung des Materials dieser Doktorarbeit betrachtet und aus diesem Grund in die Publikationsliste integriert. Da dieses zeiteffiziente Verfahren erfolgreich im Bereich zahlreicher anderer Mykorrhizaformen und auch in hemibiotrophen Pilz-Pflanzen-Assoziationen getestet wurde, besteht die Hoffnung einer weiteren Verbreitung der Technik speziell für die Erarbeitung sehr großer morphologischer Datensätze.

XI Zusammenfassung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit untersucht die Evolution der Mykorrhiza in den Polygalaceae [HOFFMANS. & LINK; Fabales, Eurosiden I, Rosiden, Kern Eudikotyledonen, Eudikotyledonen, Angiospermen (APG IV, in: Stevens 2001 onwards)], einer Familie, die neben autotrophen auch mykoheterotrophe Arten umfasst. Als methodischer Ansatz wurde eine Kombination aus morpho-anatomischer und molekularsystematischer Charakterisierung der Mykorrhiza gewählt. Eine Vielzahl unterschiedlicher Lebensformen von Bäumen über Sträucher, verholzten Lianen bis hin zu morphologisch teils stark reduzierten, mehrjährigen und einjährigen Kräutern aus verschiedenen Gattungen und Arten wurden hierzu in Mittel- und Südeuropa (Deutschland, Spanien, Malta), Nordamerika (USA, Florida), Mittel- und Südamerika (Costa Rica, Panama, Ecuador) sowie Südostasien (Thailand) gesammelt und bearbeitet. Es wurden 118 Pflanzenindividuen aus 33 Arten, entsprechend 8 Gattungen, von insgesamt 56 Standorten in die morphologische Analyse einbezogen. Der überwiegende Teil der Arten und Vertreter aller Gattungen gingen auch in den molekularsystematischen Teil der Arbeit ein. Die morpho-anatomische Charakterisierung erfolgte über die mikroskopische Analyse von 50.100 Seriendünnschnitten und 140 konfokalen Datensätzen in Kunstharz eingebetteter Wurzeln. In Kombination ermöglicht die gewählten Methodiken die Beschreibung der Mykorrhizastruktur in den untersuchten Arten und Erstellung morpho-anatomischer Kategorien (Morphotypen), welche hinsichtlich ihrer möglichen Auswirkungen auf die intraradikale Ausbreitungseffizienz des Pilzes und den Stoffaustausch zwischen Wirtspflanze und pilzlichem Symbiont interpretiert und in Bezug gesetzt wurden zu weiteren morphologischen Aspekten, wie dem Aufbau des Wurzelsystems, der Spross- und Blattausprägung und der phylogenetischen Position der untersuchten Arten. Als Referenzarten dienten zwei, von Imhof 2007 bezüglich ihrer Mykorrhiza sowie Kormus-Morphologie und Anatomie detailliert untersuchte Arten in der mykoheterotrophen Gattung *Epirixanthes*. Auf dieser Grundlage war es möglich, ein evolutives Konzept für die Entstehung der Mykoheterotrophie in der Familie zu formulieren.

Die morpho-anatomische Analyse erlaubte die Charakterisierung zweier Grundformen pilzlicher Ausbreitung innerhalb des Wurzelcortexparenchyms. „Typ I“ kann in den Wurzeln der holzigen Vertreter (Bäume, Sträucher, große Lianen), „Typ II“ in den ein- bis mehrjährigen Kräutern beobachtet werden. Beide Typen sind durch Übergangsstadien in den Wurzeln der holzigen Vertreter miteinander verbunden. Die Daten dieser Studie legen nahe, dass es innerhalb der Polygalaceae bereits in den chlorophyllhaltigen, autotrophen Verwandtschaftskreisen zur Entwicklung sehr komplexer, struktureller Charakteristika der Mykorrhiza gekommen ist (vgl. *Typ II*), welche auf Basis ökophysiologischer Kriterien als funktionell progressiv gedeutet werden

können. Diese Merkmale leiten sich ab von strukturell diffuser ausgeprägten, funktionell vermutlich weniger progressiven Merkmalen in phylogenetisch ursprünglicheren Vertretern der Familie (vgl. *Typ I*). Progressive Mykorrhizastrukturen des *Typ II* und weitere abgeleitete Reduktionen des restlichen Kormus werden hierbei in mehreren abgeleiteten Kladen der Familie sehr ähnlich ausgebildet. Die morphologischen Daten stützen daher die Auffassung, dass grundlegende Merkmale des progressiven *Typ-II* in den phylogenetisch jüngeren Kladen gemeinsam abgeleitet wurden (Synapomorphie), die Evolution einzelner, besonders „fortschrittlicher“ Charakteristika allerdings als Parallelismus mindestens zwei- (*Polygala* s. str. & [*Salomonina/Epirixanthes*] eventuell sogar dreimal (*Polygala* s. str., *Salomonina*, *Epirixanthes*) erfolgt ist. Unterschiede des progressiven *Typ II* zum weniger fortschrittlichen *Typ I* sind wie folgt. **Merkmal I:** Ein reduziertes Wurzelsystem, welches charakteristisch für viele ausgeprägt mykotrophe Pflanzen, in seiner extremsten Ausprägung allerdings besonders typisch für mykoheterotrophe Pflanzen ist. **Merkmal II:** Die Ausbildung einer sehr klar strukturierten, initialen Radialbesiedlung des Wurzelcortex durch eine kaskadenförmigen Hyphenausbreitung im äußeren und mittleren Cortexparenchym. Die unmittelbare Ursache für dieses Phänomen ist die Vermeidung von Mehrfachbesiedlungen der Wirtszellen durch Hyphen desselben Hyphensystems. **Merkmal III:** Die Ausprägung eines vielzelllagigen äußeren Cortexparenchyms (*outer cortexparenchyma*, *OCP*; regelhaft nur in *Epirixanthes* spp.). **Merkmal IV:** Ein anatomisch distinktes, einzellagiges Gewebe (*inner cortex parenchyma*, *ICP*) aus kubischen bzw. radial verlängerten Wirtszellen direkt oberhalb der Endodermis, reserviert für die symbiotische Interaktion zwischen Wirt und Pilz im Zuge des Stoffaustauschs [je nach Wirtsart bedeutet dies: *i*) vornehmlich bidirektionaler Stofftransfer entlang vitaler Pilzstrukturen (sog. *arbuscule like structures*, *ALS*) oder *ii*) vornehmlich unidirektionaler Stofffluss in den Wirt über den Verdau der *ALS*]. **Merkmal V:** Verstärkte lineare Ausbreitung der Hyphen innerhalb einer spezialisierten Zellschicht (*transitional layer*, *TL*) direkt oberhalb der innersten Cortexparenchymzellschicht. Dies erlaubt die schnellere Besiedlung des *ICP* mit *ALS* ausgehend von den Ausbreitungshyphen und reduziert die pilzliche Biomasse, welche zur effizienten Besiedlung des *ICP* aufgewendet werden muss. **Merkmal VI:** Reduktion der interzellulären Hyphenausbreitung - erst dieses erlaubt die Einflussnahme des Wirtes auf die intraradikale Ausbreitung und Anatomie des Pilzes und reduziert die von der Wirtspflanze nur schwer kontrollierbare Aufnahme von Assimilaten durch Hyphen im Interzellularraum. **Merkmal VII:** Ausprägung einer zusätzlichen Zellschicht oberhalb der *TL* designiert für die Formierung zusätzlicher *ALS*, welche zeitlich versetzt erst nach dem *ICP* durch den Pilz besiedelt wird. **Merkmal VIII:** Sukzessive anatomische Progression der *ALS* von feinverzweigten und damit

oberflächenoptimierten Strukturen angepasst an einen bidirektionalen Stofftransfer hin zu wenig verzweigten, voluminösen Hyphenknäueln, welche speziell angepasst an einen unidirektionalen Stofffluss in die Wirtspflanze im Zuge wirtszellinitiiertes Verdauungsprozesse erscheinen. **Merkmal IX:** Reduktion des sekundären Dickenwachstums. Dies erhält das für die Mykorrhizasymbiose essentielle Cortexparenchym über einen verlängerten Zeitraum.

Im Verlauf der Arbeit wurde zudem deutlich, dass die weite Verbreitung einiger der progressiven Merkmale in verschiedenen Gattungen (*Polygala*, *Asemeia*, *Salomonina*, *Polygaloides*, *Epirixanthes*) ein Hinweis auf deren vermutlich synapomorphen Ursprung in der Familie ist (Merkmale II, III, IV, V & VII; vgl. S. 162, Fig. 47). Dieser Befund wird auch durch die Ausprägung von unvollkommenen bzw. strukturell diffusen Formen vieler dieser Charakteristika in den phylogenetisch ursprünglicheren Gruppen gestützt [vgl. *Xanthophyllum*, *Moutabea*, *Monnina* und *Securidaca* (Merkmale II, III, IV & V; Fig. 47)]. Hingegen sind die deutlichen Reduktion der ALS (Merkmal VIII) und des sekundären Dickenwachstums (Merkmal IX) Charakteristika, welche erst in den abgeleiteten Kladen und dort dann offenbar parallel entstanden sind (so in einigen Arten von *Polygala* s. str. (Amerika Klade), in *Salomonina* spp. und in *Epirixanthes* spp.). Zusammen deuten diese Befunde auf eine bereits weit vorangeschrittenen mykotrophe Lebensweise in den autotrophen Kräutern der Familie hin. Interessanterweise weist aber nur die Gattung *Epirixanthes* alle der zehn als progressiv charakterisierten Merkmale der Mykorrhiza in den Polygalaceae auf, ein Hinweis auf die große ökophysiologische Bedeutung von selbst kleinen morpho-anatomischen Unterschieden für die Evolution mykoheterotropher Fähigkeiten. Die funktionell optimierten Mykorrhizastrukturen in den abgeleiteten Krautformen könnten jedoch nicht nur einen Selektionsvorteil bei der Konkurrenz um mineralische Nährstoffe im Habitat darstellen, sondern aufgrund der effektiven Struktur dieses Morphotypus ebenfalls ein Verringerung der pflanzlichen Kohlenstoffinvestition in ihren pilzlichen Symbionten bei theoretisch gleichbleibend hohem symbiotischen „Netto“-Gewinn ermöglichen. Letzteres würde sich allerdings erst in einen evolutiven Vorteil gegenüber den Nachbarpflanzen übersetzen, wenn diese in dasselbe Hyphennetzwerk eingebunden wären (vgl. Kapitel IX.3: fakultativer Epiparasitismus). Vor einem evolutionsbiologischen Hintergrund stellt dieses Szenario einen direkten Weg von einem fakultativen- zu einem „Epiparasitismus“ im klassischen Sinn dar. Die Arbeit wertet auch deshalb die morphologischen Hinweise für verstärkte Mykotrophie in den krautigen Polygalaceae als starkes Indiz für die Bedeutung von Präadaptationen bei der Entwicklung von Mykoheterotrophie in dieser Pflanzenfamilie. Aufgrund der Akkumulation nahezu aller von als progressiv bewerteten Mykorrhizastrukturen in einigen der chlorophyllhaltigen Polygalaceae schließt diese Studie nicht

aus, dass in einigen dieser Arten bereits mehrfach die Schwelle zur partiellen Mykoheterotrophie überschritten wurde (z. B. *Polygala setacea*, *Polygala ramosa*, *Salomonina ciliata*).

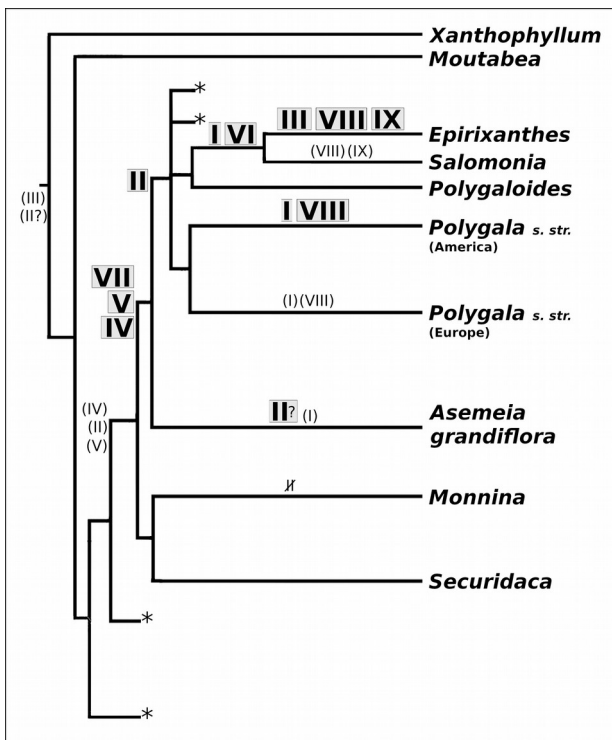


Fig. 47: Plot der mykorrhizaassoziierten, morpho-anatomischen Charakteristika der Mykorrhiza in den Stammbaum der Polygalaceae. Die progressiven Merkmale akkumulieren in den Gattungen *Polygala*, *Salomonina* und *Epirixanthes*. Den kompletten Merkmalsatz (I-IX) findet man aber nur in der mykoheterotrophen Gattung *Epirixanthes*. Grau hinterlegte, fett gedruckte Merkmale verweisen auf eine sehr distinkte Ausprägung der Merkmale. Kleingedruckte, eingeklammerte Merkmale sind inkonsistent bzw. diffus ausgeprägt. Fragezeichen weisen auf Unsicherheit über den Ausprägungszustand dieses Merkmals in den entsprechenden Linien hin. Sekundär reduzierte Merkmale sind durchgestrichen. Sternchen kennzeichnen Kladen der Polygalaceae, welche in dieser Arbeit nicht untersucht wurden (nach Rath et al. Manuskript A).

Die Ergebnisse der molekularsystematischen Analyse belegen eine Symbiose der in dieser Arbeit morphologisch untersuchten Polygalaceae (inklusive *Epirixanthes*, s. u.) mit arbuskulären Mykorrhizapilzen (Abteilung Glomeromycota). Die weitaus meisten der pilzlichen Symbionten fallen in die Familie Glomeraceae (Glomerales), eine nicht unerhebliche Zahl in die Acaulosporaceae (Diversisporales). Nur sehr wenige konnten den Gigasporaceae (Diversisporales) und Archaeosporaceae (Archaeosporales) zugeordnet werden. Insgesamt wurden 33 operationelle, taxonomische Einheiten (*operational taxonomic units*, OTUs) definiert, welche durch Monophylie und/oder einer sehr geringen, über den BLAST-Algorithmus ermittelten, genetischen Distanz ($\leq 3\%$) in den zugrundeliegenden Markerregion (partielle 18s rDNA, SSU) zu einer definierten Referenzsequenz in der jeweiligen OTU charakterisiert sind. 26 dieser OTUs umfassen jeweils Symbionten aus chlorophyllhaltigen Polygalaceae - hierbei enthalten 6 OTUs Symbionten aus mehr als einer chlorophyllhaltigen Wirtsart der Polygalaceae. In 18 OTUs finden sich neben Symbionten chlorophyllhaltiger Polygalaceae auch solche aus mykoheterotrophen Wirten von teils sehr unterschiedlicher systematischer Stellung (in diesem Kontext als *non-Polygalaceae-mykoheterotrophic plants* bezeichnet). Nahezu alle isolierten Pilzsequenzen aus den Wurzeln der

Polygalaceae zeigen somit eine engere Verwandtschaft zu Mykorrhizapilzen aus anderen Vertretern dieser Pflanzenfamilie und/oder zu Symbionten von *non-Polygalaceae-mycoheterotrophic plants*. Zusammengefasst legt die molekularsystematische Analyse nahe, dass die untersuchten Vertreter der Polygalaceae zwar in der Lage sind, mit einem breiten systematischen Spektrum von AM-Pilzen zu interagieren, hierbei aber dennoch eindeutige taxonomische Präferenzen bzw. Spezifitäten zu einer Reihe distinkter Symbiontenlinien aufweisen. Basierend auf dieser Datenlage wurde eine Analyse der phylogenetischen Distanz zwischen den Symbionten (PD, nach Faith et al. 1992) innerhalb der definierten OTUs bzw. taxonomischen Einheiten der Wirtsgattung und der Wirtsart vorgenommen. Nach Umwandlung des PD-Wertes zum SES.PD-Wert (hierbei wird ein stochastisch basierter Algorithmus angewandt, um den starken Einfluss der Taxazahl auf den PD-Wert zu kompensieren) konnten die phylogenetischen Distanzen der untersuchten Einheiten miteinander verglichen werden. Die Arten in den phylogenetisch ursprünglicheren, zumeist lianen-, strauch- oder baumförmigen Gattungen *Moutabea longifolia* und *Monnina* spp. zeigen einen mäßigen (*Moutabea longifolia*) bzw. geringen Grad (*Monnina* spp.) der Verwandtschaft ihrer Symbionten auf der Basis dieser taxonomischen Stufe. *Xanthophyllum lanceatum*, die phylogenetisch ursprünglichste Art der Analyse, konnte diesbezüglich nicht untersucht werden, da nur eine einzige SSU-Sequenz für diese Art vorlag. Die beiden in dieser Arbeit untersuchten Arten in der Gattung *Securidaca* hingegen weisen einen, relativ zu den anderen Gehölzen (*Monnina* & *Moutabea*), hohen Grad von Verwandtschaft der assoziierten pilzlichen Mykorrhizasymbionten auf - und dass trotz ihrer im Vergleich zu *Polygala* s. str. und *Epirixanthes/Salomonina* ebenfalls phylogenetisch basaleren Stellung in der Familie. Betrachten wir die phylogenetische Distanz auf Ebene der Gattung, so weist besonders *Polygala* bereits eine auffällig verringerte phylogenetische Diversität innerhalb der mit ihr assoziierten Mykorrhizapilze auf. Dies gilt, wenn auch deutlich geringer ausgeprägt, für die vergleichsweise nah verwandte Gattung *Securidaca*, nicht aber für die Gattung *Monnina*. Die Gattungen *Xanthophyllum* und *Moutabea* konnten diesbezüglich nicht untersucht werden, da jeweils nur eine Art in die molekulare Analyse einging.

Ein Teil der molekularsystematischen Daten in dieser Arbeit (namentlich Symbionten aus der südostasiatischen Gattung *Salomonina* und aus mehreren, bereits in Rath et al. 2013 veröffentlichten, europäischen *Polygala*-Arten) flossen im Zuge einer Kooperation in die Arbeit von Mennes et al. (2015) ein. Die Ergebnisse der Studie von Mennes et al. deuten stark auf einen erhöhten Grad der Spezifität (anhand des Parameters SES.PD) in drei der vier untersuchten Arten von *Epirixanthes* im Vergleich zu der Mehrzahl der chlorophyllhaltigen Vertreter der Gattung *Polygala* und *Salomonina* hin (die europäische Art *P. vulgaris* stellt diesbezüglich eine Ausnahme dar). Die Integration der

Daten aus Mennes et al. (2015) in die Berechnung der phylogenetischen Diversität im Zuge dieser Arbeit bestätigt den Befund besonders ausgeprägter Spezifität in der Mehrzahl der untersuchten Arten von *Epirixanthes*. Im Einzelfall sind Vertreter in *Polygala* spp. allerdings ähnlich (*P. vulgaris*, *P. chinensis*) bzw. nicht grundsätzlich anders (z. B. *P. calcarea* und *P. ramosa*) bezüglich ihrer Spezifität als Mitglieder der Gattung *Epirixanthes*. Aber auch auf Gattungsebene zeigen Symbionten von *Polygala* einen ähnlich hohen Verwandtschaftsgrad wie Symbionten in der mykoheterotrophen Gattung *Epirixanthes*. Dies steht in Gegensatz zu *Salomonina*, welche auch in unserem erweiterten Datensatz zwar einen erhöhten Verwandtschaftsgrad ihrer Symbionten zeigt, dies aber auf einem deutlich niedrigeren Niveau als ihre Schwestergattung *Epirixanthes* und auch als *Polygala*. Auf Ebene der OTUs ergibt sich ebenfalls ein eher unerwartetes Bild. So zeigen die Kladen, welche Symbionten der chlorophylllosen Gattung *Epirixanthes* umfassen, im Schnitt keinen höheren internen Verwandtschaftsgrad als solche OTUs, die von Symbionten chlorophyllhaltiger Arten in den Polygalaceae konstituiert werden. Hierbei macht es keinen qualitativen Unterschied, ob man nur die Symbionten aus den Polygalaceae in den jeweiligen Kladen zur Berechnung des SES.PD heranzieht, oder alle von der jeweiligen OTU umfassten Symbionten. Interessanterweise zeigen viele OTUs mit Symbionten aus den Polygalaceae (gleich welcher trophischen Strategie) auch einen höheren Verwandtschaftsgrad zwischen ihrer Symbionten, als solche OTUs, welche Symbionten aus systematisch sehr heterogenen *non-Polygalaceae-mycoheterotrophic plants* vereinen. Integriert man nun alle Parameter, so lässt sich außer auf Artebene (und hier auch nur für drei der vier chlorophylllosen Arten in *Epirixanthes*) keine klare Sonderstellung der mykoheterotrophen Vertreter in den Polygalaceae bezüglich ihrer Spezifität zu pilzlichen Symbionten nachweisen. Dieser Befund ist bemerkenswert vor dem Hintergrund der phylogenetischen und geographischen Breite der in dieser Studie bearbeiteten Pflanzenarten, aber auch aufgrund der wenigen Belege für ein höheres Maß echter taxonomischer Spezifität in autotrophen arbuskulär mykorrhizierten Pflanzen. Die Daten fügen sich allerdings gut in das evolutive Konzept voranschreitender Mykotrophie, welches im Zuge dieser Arbeit auf Basis der strukturellen Merkmale ihrer Mykorrhiza für die grünen Polygalaceae vorgeschlagen wird. Vergleichbar der morphologischen Progression scheint die spezifische Assoziation zu pilzlichen Symbiontengruppen ein Prozess zu sein, der schon in den chlorophyllhaltigen, autotrophen Polygalaceae erfolgt ist und daher ebenfalls die Entwicklung mykoheterotropher Lebensweise in der Familie begünstigt haben könnte. Der kombinierte Datensatz von Rath et al. (2013), Mennes et al. (2015) und Rath et al. (Manuskript A & B) erlaubt allerdings mehr als nur die Addressierung der Frage nach dem Vorhandensein, der Ausprägung und der grundsätzlichen evolutiven Problematik

von Spezifitäten in der Mykorrhizasymbiose der Polygalaceae. Mit diesen Studien ist es nun möglich, begründete Vermutungen über die ökophysiologischen Eigenschaften der pilzlichen Symbionten zu formulieren. Vor dem Hintergrund der morphologischen Hinweise auf eine weit fortgeschritten mykotrophe Lebensweise in den chlorophyllhaltigen, krautigen Vertretern der Polygalaceae, der offensichtlichen physiologischen Abhängigkeit der chlorophylllosen, mykoheterotrophen Vertreter der Familie von ihrem pilzlichen Symbionten und der Notwendigkeit einer Etablierung der pilzlichen Symbionten in autotrophen Begleitpflanzen („Donorpflanzen“) als der eigentlichen Quelle für die mykoheterotrophe Ernährungsweise, sollte es möglich sein, eine Vorstellung darüber zu entwickeln, welche Eigenschaften diese Pilze als bevorzugtes Ziel für die Ausbildung einer Symbiose in den Polygalaceae auszeichnen könnten (vgl. S. 166, Fig. 48). Die molekularsystematischen Daten dieser Arbeit stützen die Annahme, dass die fortschrittlich mykotrophen, aber noch chlorophyllhaltigen und daher sehr wahrscheinlich noch weitestgehend autotrophen Polygalaceae eine deutliche Präferenz für solche Pilztaxa aufweisen, die besonders mutualistische Charakteristika besitzen. Unsere Hypothese basiert auf aktuellen Studien, welche belegen, dass die Fähigkeit mit unterschiedlichen Pflanzen einen ökophysiologisch effektiven Mutualismus auszubilden, nicht in allen Arten der Glomeromycota gleichermaßen ausgeprägt ist und sowohl der Pilz wie auch der Pflanzenwirt zur gegenseitigen Sanktionierung und Belohnung befähigt ist. Die Daten der Promotion stützen die Vermutung, es handele sich bei den assoziierten Pilzen der chlorophyllhaltigen Polygalaceae um effektive Mutualisten daher wie folgt: *i)* Es erscheint nachvollziehbar, dass Pflanzen, welche bereits auf struktureller Ebene einen sehr deutlichen Trend in Richtung fortgeschrittener Mykorrhizie erkennen lassen, dies auf Ebene ihrer Symbiontenauswahl fortsetzen und sich auf besonders mutualistisch interagierende Pilze, wie z. B. möglichst effiziente Nährstofflieferanten spezialisieren. *ii)* Aus Sicht einer solchen Pflanzengruppe sind mutualistische Pilze aber auch ein lohnendes Ziel, da diese aufgrund ihrer symbiotischen Charakteristika mit höherer Wahrscheinlichkeit in einer Vielzahl der am jeweiligen Standort etablierten Pflanzenarten vorkommen sollten und dies die Diffusität der Symbiose (d. h. Viele interagieren gleichzeitig mit Vielen) verstärkt. Letzteres aber könnte sich für Mykorrhizaspezialisten wie den Polygalaceae in einen direkten Vorteil gegenüber den in das gemeinsame Hyphennetzwerk eingebundenen, bezüglich ihrer Mykorrhiza aber sehr wahrscheinlich weniger progressiven Nachbarpflanzen übersetzen (fakultativer Epiparasitismus, vgl. Kapitel IX.3). *iii)* Die Spezialisierung auf Mutualisten unter den Pilzsymbionten ist vermutlich auch eine Voraussetzung für die Evolution von Mykoheterotrophie, denn hierdurch würde die mykoheterotrophe Art die Chance, erhöhen mit solchen Pilzen zu interagieren, welche in vielen

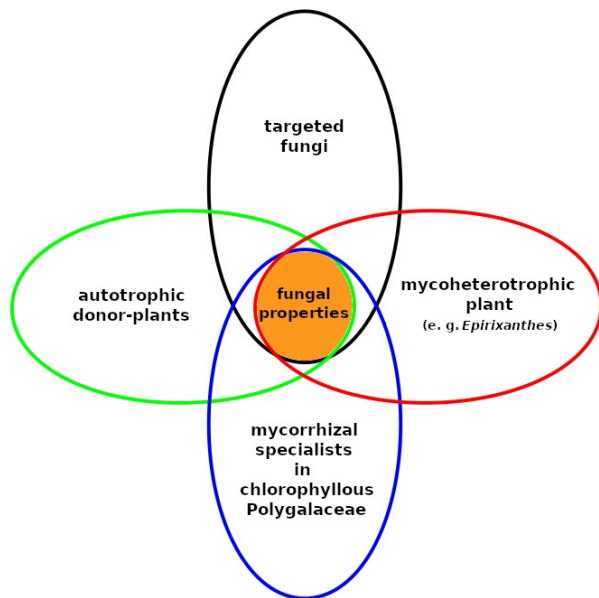


Fig. 48: Darstellung der ökophysiologischen Anforderungen in unterschiedlichen trophischen Strategien der Mykorrhizawirte an ihre pilzlichen Symbionten („normale“ Mykotrophie in autotrophen Donorpflanzen; verstärkte Mykotrophie in abgeleiteten Kladen chlorophyllhaltiger Polygalaceae, mykoheterotrophe Lebensweise). Begründete Annahmen über die funktionellen Merkmale der von chlorophyllhaltigen und chlorophylllosen Polygalaceae ausgewählten Symbiosepartner unter den Pilzen ergeben sich aus der Schnittmenge der Anforderungen all dieser trophischen Strategien unter Beachtung grundlegender ökophysiologischer Eigenschaften der AM-Pilze selbst. (nach Rath et al. Manuskript B)

Nachbarpflanzen etabliert sind, was zum einen den essentiellen Kohlenstofffluss quantitativ sicherstellen, und zum anderen eine zu starke Schädigung der beteiligten Pilze bzw. der „Donorpflanzen“ vermeiden würde. Durch diese Aufteilung der „Kohlenstofflast“ wird vermutlich auch eine direkte Sanktion der mykoheterotrophen „Akzeptorpflanze“ seitens der Pilze bzw. indirekt, von Seiten der autotrophen „Donorpflanzen“ marginalisiert oder gar gänzlich vermieden. Ebenso wäre auf Basis derselben Argumentation eine Spezialisierung auf solche Pilze nachvollziehbar, die eine besonders starke Verbreitung in der dominanten autotrophen „Donorpflanze“ oder in besonders potenten Assimilatversorgern am jeweiligen Standort der mykoheterotrophen Pflanzenart aufweisen. Geht man nun von solch spezifischen Eigenschaften der pilzlichen Symbionten aus, welche diese gleichermaßen geeignet für die Ökophysiologie in den chlorophyllhaltigen wie auch chlorophylllosen Vertretern der Polygalaceae machen, so verwundert die Ähnlichkeit in den Assoziationsmustern und Spezifitätsgraden beider der, auf den ersten Blick so unterschiedlichen Lebensformen nicht. Die morphologischen Daten ermöglichen auch eine vorsichtige Annäherung an die Frage, wann die Spezialisierungsschritte relativ zu den morphologischen Progressionsschritten im Verlauf der Evolution stattgefunden haben könnten. Geht man von unspezifischeren, weniger mykotrophen Vorfahren der Polygalaceae aus, so sollte die erste Einengung der potentiellen Symbiosepartner frühestens zu Beginn der physiologischen Evolution in Richtung einer verstärkt mykotrophen Lebensweise, spätestens aber nach der Entwicklung deutlicher morphologischer Hinweise auf dieselbe erfolgt sein. Der zweite, den Daten nach nur gering ausgeprägte Spezialisierungsschritt, ist vor dem Hintergrund der ökophysiologischen

Implikationen, d. h. der Sinnhaftigkeit einer Spezialisierung auf möglichst weit in den autotrophen „Donorpflanzen“ verbreitete Pilze speziell für bereits partiell oder gar vollständig mykoheterotrophe Pflanzen (s. o.), frühestens ab dem Zeitpunkt des ersten Netto-Kohlenstofftransfers in die Wirtspflanzen anzusetzen (vgl. S. 169, Fig. 50). Bezüglich der im Vergleich zu anderen mykoheterotrophen Gruppen gering ausgeprägten Spezifität der mykoheterotrophen Gattung *Epirixanthes* zu ihren Pilzsymbionten sprechen auch die neuen Daten aus Rath et al. (Manuskript B) nicht gegen die Realisierung noch ausgeprägterer taxonomischer Spezifität im weiteren Verlauf der Evolution dieses Taxons (vgl. Mennes et al. 2015). Die Datenlage der vorliegenden Arbeit stützt allerdings auch die Idee von einer mäßig stark ausgeprägten taxonomischen Spezialisierung bzw. Präferenz als evolutiv stabile Strategie, welche die Vor- als auch die Nachteile extremer Spezialisierung ausbalanciert und offenbar schon in den chlorophyllhaltigen Vertretern der Polygalaceae verwirklicht wurde. Weiterhin wird hier die Vorstellung von einer Spezialisierung der Wirte auf ökophysiologische, also funktionelle Eigenschaften der Pilze als der zentralen Ursache für die beobachteten Assoziierungsmuster hervorgehoben, ein Modell, welches im Gegensatz zu einem rein phylogenetisch basierten Ansatzes nicht zwangsläufig auf eine voranschreitenden Verengung der Bandbreite potentieller Pilzsymbionten basiert.

Die Ergebnisse dieser Studie erlauben die Formulierung eines Evolutionsmodelles für die Entwicklung von Mykoheterotropie in der Familie der Polygalaceae. Das erste Teilmodell (Fig. 49, S. 168) umfasst den strukturellen Teil der Datenaufnahme, das zweite Modell (S. 169, Fig. 50) integriert zusätzlich die molekularsystematischen Befunde. Beide werden abschließend in graphischer Form dargestellt.

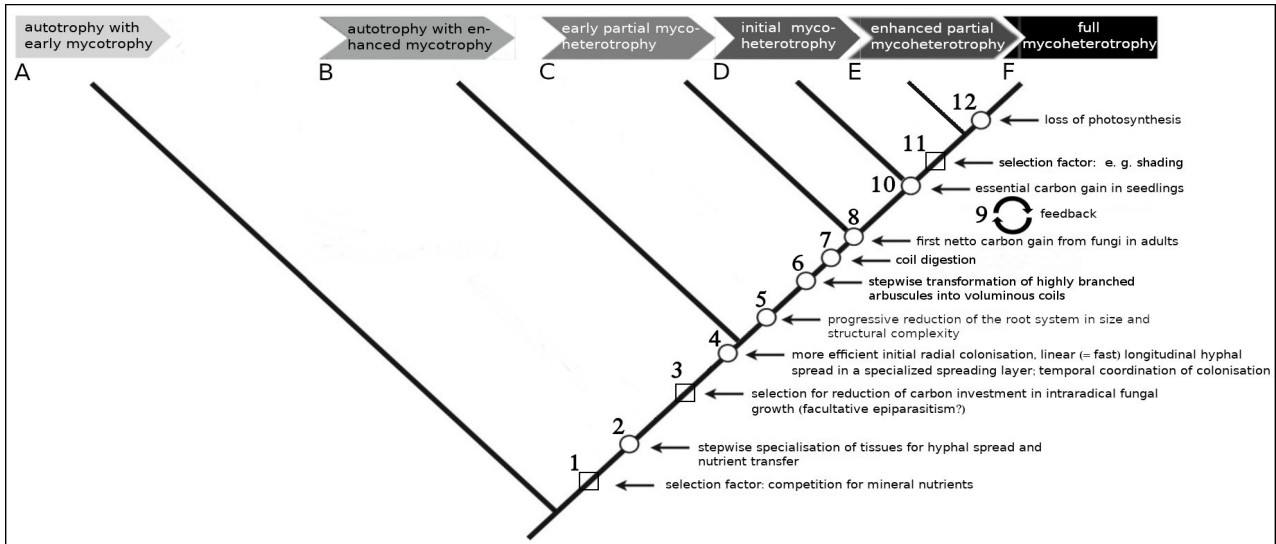


Fig. 49: Zusammenfassendes Modell der Evolution mykoheterotropher Lebensweise in den Polygalaceae, basierend auf den morpho-anatomischen Daten der hier untersuchten Arten. A-F: schrittweise Änderung der trophischen Strategie in den Polygalaceae von Autotrophie (hellgrau hinterlegt) bis zur Mykoheterotrophie (schwarz hinterlegt). Kreise kennzeichnen wichtige Schritte (2,4,5,6,7,8,10,12) in der Evolution der Mykoheterotrophie (basierend auf den morpho-anatomischen Ergebnissen dieser Arbeit) und deren vermutete evolutionäre Abfolge auf Grundlage der phylogenetischen Rekonstruktion der Familie. Quadrate kennzeichnen Selektionsfaktoren, welche die Progression der Mykorrhiza begünstigt haben könnten (1,3,11). A: autotrophy with early mycotrophy. B: autotrophy with enhanced mycotrophy. C: early partial mycoheterotrophy. D: initial mycoheterotrophy. E: enhanced partial mycoheterotrophy. F: full mycoheterotrophy. 1: selection factor: competition for mineral nutrients. 2: stepwise specialisation of tissues for hyphal spread and nutrient transfer. 3: selection for reduction of carbon investment in intraradical fungal growth (facultative epiparasitism). 4: more efficient initial radial colonisation, linear (= fast) longitudinal hyphal spread in a specialized spreading layer; temporal coordination of colonization. 5: progressive reduction of the root system in size and complexity. 6: stepwise transformation of highly branched arbuscules into voluminous coils. 7: coil digestion. 8: first netto carbon gain. 9: feedback (loop). 10: essential carbon gain in seedlings. 11: selection factor: e. g. shading. 12: loss of photosynthesis. (nach Rath et al. Manuskript A)

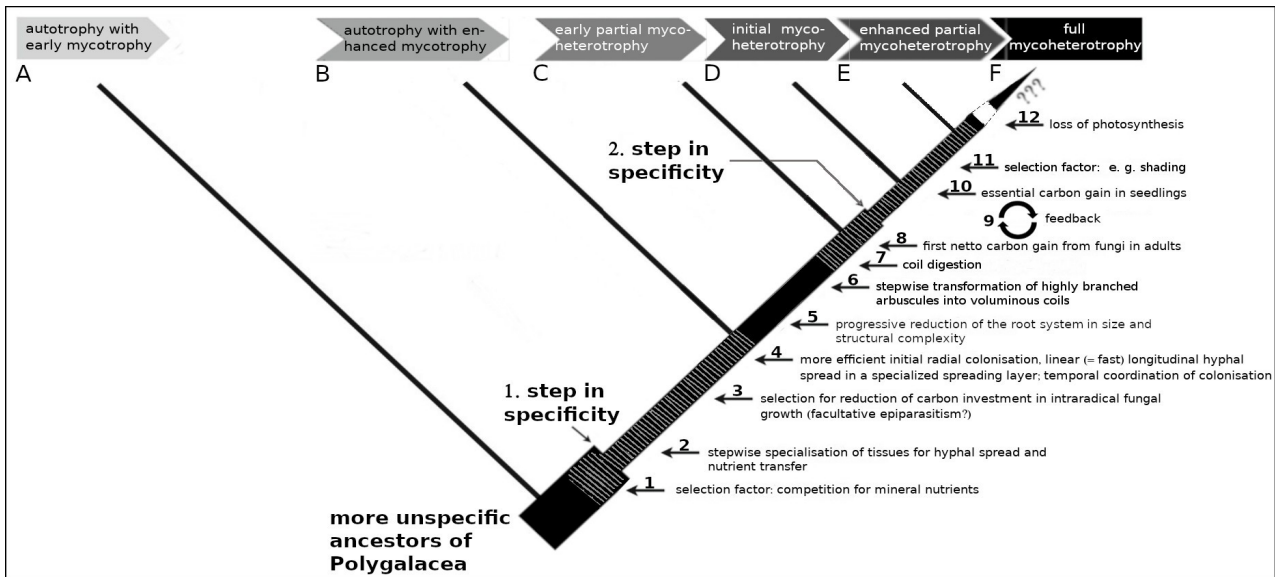


Fig. 50: Zusammenfassendes Modell der Evolution mykoheterotropher Lebensweise in den Polygalaceae unter Berücksichtigung der molekularsystematischen Hinweise auf taxonomische Präferenzen bzw. Spezifitäten in den chlorophyllhaltigen und chlorophylllosen Vertretern der Familie. Morpho-anatomische Evolutionsschritte sind ebenfalls angegeben. Grau schraffierte Bereiche des Spezifitätspfeils kennzeichnen den zeitlichen Rahmen in die eine Spezifitätserhöhung parallel zur Evolution verstärkter Mykotrophie (1. step in specificity) und Entwicklung der Mykoheterotrophie (2. step in specificity) vermutlich fällt. Fragezeichen am Ende des Spezifitätspfeils deuten auf das Potential der bereits mykoheterotrophen Arten in *Epirixanthes* zur Entwicklung verstärkter Spezifität hin. Siehe Legende von Fig. 49 für die Beschriftung der Trophiestufen A-F und die morpho-anatomischen Evolutionsschritte bzw. Selektionsfaktoren 1-12. (in das Modell gehen Daten aus Rath et al. 2013, Mennes et al. 2015 und Rath et al. Manuskript A & B ein)

XII Englischsprachige Kurzzusammenfassung der Promotion

The present work investigates the evolution of the mycorrhiza in the Polygalaceae [HOFFMANS. & LINK; Fabales, Eurosids I, Rosids, Core Eudicotyledons, Eudicotyledons, Angiosperms (APG IV, in: Stevens 2001 onwards)], a family, which besides many autotrophic members does also comprise mycoheterotrophic species. A combination of morpho-anatomical and molecular systematic characterization of the mycorrhiza was chosen as methodological approach. A multitude of different life forms from trees and shrubs, woody lianas to morphologically greatly reduced, perennial and annual herbs of various genera and species from Central and Southern Europe (Germany, Spain, Malta), North America (USA, Florida), Central and South America (Costa Rica, Panama, Ecuador) and Southeast Asia (Thailand) were investigated. 118 plant individuals of 33 species corresponding to 8 genera from a total of 56 locations were included in this analysis. The majority of species and representatives of all genera also entered the molecular-systematic part of this work. The morpho-anatomical characterization, which was carried out by light microscopic analysis of a total of 50100 thin sections of roots embedded in synthetic resin, was supplemented by 140 confocal data sets which were analysed using a new confocal microscopic procedure which was established in the course of this work. In combination, the chosen methodology allowed the detailed comparative description of mycorrhizal features in the species studied. This allowed the characterization of two basic forms of fungal spread within the root cortex parenchyma. "Type I" can be observed in the roots of woody representatives (trees, shrubs, large lianas), "Type II" in annual to perennial herbs. Both types are connected by transitional stages in the roots of the woody representatives. Two species in the mycoheterotrophic genus *Epirixanthes*, which were investigated in detail by Imhof in 2007 with regard to their mycorrhiza, cormus morphology and anatomy, served as a reference. On this basis, it was possible to formulate an evolutionary concept for the development of mycoheterotrophy in the family. The data of this study suggest that the development of very complex structural characteristics in their mycorrhiza has already occurred within the investigated chlorophyllous autotrophic herbs and are derived from structurally more diffuse traits in the phylogenetically more ancestral members in the family. Moreover, the morphological data support the view that fundamental characteristics of the progressive *Type II* are very likely derived from a common ancestor of the phylogenetic younger clades in tribe Polygaleae (synapomorphy). However, the evolution of particular functional "advanced" characteristics has obviously occurred independently at least two (*Polygala* s. str. & [*Salomonina*/*Epirixanthes*]) possibly even three times (*Polygala* s. str., *Salomonina*, *Epirixanthes*). Together, the findings indicate that the autotrophic herbs of the family have already evolved a far advanced mycotrophic way of living which is evaluated as

a strong indication of the importance of preadaptation for the evolution of mycoheterotrophy in Polygalaceae. Interestingly, only the genus *Epirixanthes* exhibits all of the aspects of mycorrhiza in the Polygalaceae which this study characterises as most progressive in terms of an ecophysiological adaptation to mycorrhiza derived carbon nutrition in Polygalaceae - an indication for the great ecophysiological importance of even relative small morpho-anatomical changes for the evolution of complete mycoheterotrophy. However, due to the accumulation of nearly all progressive mycorrhizal structures in some of the chlorophyllous Polygalaceae, this study does not exclude the possibility that some of these species have already crossed the threshold of partial mycoheterotrophy (e.g. *Polygala setacea*, *Polygala ramosa*, *Salomonina ciliata*).

The results of the molecular systematic analysis show striking preferences of all investigated species in Polygalaceae for specific clades in phylum Glomeromycota. Within this phylum, the vast majority of fungal symbionts belong to the family Glomeraceae (Glomerales) and a considerable number to the family Acaulosporaceae (Diversisporales). Only very few could be assigned to the Gigasporaceae (Diversisporales) and Archaeosporaceae (Archaeosporales). A part of the molecular systematic data in this work (namely symbionts from European representatives of the genus *Polygala* and the Southeast Asian genus *Salomonina*) had already been incorporated into the work of Mennes et al. (2015) in course of a cooperation. The results of that study strongly indicate an increased degree of specificity in three of the four species of *Epirixanthes* compared to the majority of chlorophyllous representatives of the genus *Polygala* and *Salomonina*. The integration of the data from Mennes et al. (2015) into the calculation of phylogenetic diversity in the course of this work confirms on the one hand the finding of the previous study and extends its premise to a multitude of new hosts including phylogenetic more ancestral species of genera *Xanthophyllum*, *Moutabea*, *Securidaca* and *Monnina*. On the other hand, however, some representatives in *Polygala* spp. are similar (*P. vulgaris*, *P. chinensis*) or not fundamentally different (e.g. *P. calcarea* and *P. ramosa*) in their specificity compared to the species of *Epirixanthes*. Moreover, symbionts of genus *Polygala* spp. show a similar high degree of phylogenetic relatedness as symbionts from the mycoheterotrophic genus. This is in contrast to *Salomonina* spp., which also in our extended dataset stands out due to a lower degree of phylogenetic relatedness of its symbionts compared to its sister genus *Epirixanthes* and *Polygala*.

If all parameters are now integrated, the difference of the mycoheterotrophic *Epirixanthes* regarding specificity to fungal symbionts becomes less pronounced compared to its autotrophic relatives. This finding is remarkable against the background of the phylogenetic and geographical latitude of the species plot in this study, but also due to the limited evidence for a higher degree of true taxonomic

specificity in arbuscular mycorrhizal autotrophic plants in general. However, these data fit into the evolutionary concept of progressive mycotrophy, which is propagated for the green Polygalaceae on basis of the progression in their mycorrhizal structures. Alike the morphological progression, the specific association to fungal symbionts, seems to be a process that has already occurred in the chlorophyllous autotrophic Polygalaceae and therefore may have also favored the development of mycoheterotrophy in the family. Against the background of morphological evidence for a highly advanced mycotrophic way of life in the chlorophyllous herbs in Polygalaceae, the need to establish the fungal symbionts in autotrophic donor-plants as the ultimate carbon source for the mycotrophic *Epirixanthes* and our knowledge on the very variable ecophysiological abilities of arbuscular mycorrhizal fungi, this study also aims to develop an idea which ecophysiological properties of the symbiotic fungi found in the roots of Polygalaceae might make them preferred mycorrhizal symbionts. Finally, the results of this study allow the formulation of an evolutionary model for the development of mycoheterotrophy in Polygalaceae. The first submodel comprises the structural part, the second one integrates the morpho-anatomical and molecular systematic findings of this thesis.

XIII Danksagungen

Danke sagen möchte ich

meiner ganzen Familie für ständige Unterstützung und Rückhalt in all den Jahren. Speziell aber meiner Schwester Kirstin und meinem Bruder Mathias für die sprachliche und fachliche Durchsicht der Arbeit.

Stephan Imhof für viele Jahre toller Zusammenarbeit, das Anvertrauen dieses faszinierendes Themas, finanzielle Unterstützung im Zuge der ersten Forschungsreise und der molekularen Datenaufnahme sowie Hilfe beim Verfassen der Publikationen.

Herrn Prof. Dr. Hans Christian Weber und Herrn Prof. Dr. Paul Galland für die offizielle Betreuung der Doktorarbeit und die Möglichkeit an der Uni zu arbeiten, um diese Arbeit zu finanzieren.

Herrn Prof. Dr. Lars Voll und Herrn Prof. Dr. Matthies für Ihre Bereitschaft Teil meines Prüfungskomitees zu sein.

Katharina Dörr, Johanna Knappe, Stephan Imhof, Bernd Kendzior, Florian Lemmer, Luisa Müller, Christian Gropp, Melanie Düber, Marina Lindackers, Benjamin Feller, Kristin Hinsberger, Anna Hesel, Marius Böying, Ute Winkelkötter, Chris Dlouhy, Veronika Kleer und all den anderen netten Diplom-, Bachelor-, Master- und Lehramtskandidaten für die klasse Arbeitsatmosphäre in der AG.

Franz Grolig, dessen Ratschläge mir in meiner Arbeit und speziell während des Schreibens der zweiten Publikation immer weitergeholfen haben und mit dem ich viele Jahre Spaß beim In-die-Mensa-gehen und gemeinsamen Im-Zug-nach-Hause-fahren hatte.

Herrn Prof. Dr. Christoph Forreiter für die Möglichkeit parallel zur Promotion weiter an einem spannenden Forschungsprojekt zu arbeiten und mir damit die Abschlussfinanzierung meiner Promotion sicherte.

Frank Bonacker und Sebastian Zoll - zwei echte Kumpel, mit denen ich immer wieder in den tiefsten Dschungel ziehen würde und ohne deren Hilfe so manche Kreuzblume im Busch geblieben wäre.

Neela, Jonas, Kai, Sandy, Elea, Clemens, Evelyn, Chris; Janine, Uwe, Maya & Nala; Ayse, Jan, Constance; Sylvia, Marco & Töchterchen; Zolli, Hanna & Töchterchen; Sebastian, Ronny, Kathrin, Topher, Akira, Sophia; Neill, Julia, Konrad, Karl, Franz & den Jungens vom Schmaus, Janine, Holger, Resi; Florian, Jule, Tim & Schwesterchen; Nadine, Anna, Christian, Steffen, Petra, Elmar, Michaela, Franzi & Erik, Sigi und

Agnes - für Freundschaft und hilfreiche Tipps beim molekularen Teil der Arbeit.

der AG Voll, eine sehr nette Truppe mit denen ich viel Spaß in der Mensa und im Seminar hatte.

Jack Fisher, Colin Pendry, Rainaldo Arguilar, Sawitree Sasirat, Narumol Piwpuan und Pitak Panyachan. Für wichtige Standortinformationen zu den untersuchten Polygalaceae und Unterstützung vor Ort auf den Sammelreisen in die USA, nach Costa Rica und Thailand. Ohne ihre Hilfe wären deutlich weniger Arten in diese Arbeit eingeflossen.

Neelas Papa für die MrBayes Berechnung am Cluster-Rechner.

der AG Bölker, AG Feldbrügge und AG Stukenbrock deren Pfu-Polymerase, Vektoren und kompetente *E. coli*'s den molekularen Teil der Arbeit am Laufen hielten.

Herrn Gebhardt für die Hilfe bei Linux-Fragen und die Nutzung des Cluster-Rechners des HRZ im Zuge der Parsimonie-Analyse.

allen Mitarbeitern der Elektronikwerkstatt Biologie für die Lösung so manchen Soft- und Hardwareproblems.

Lin Chia Long, Michal Hroneš und das Hong Kong Herbarium für die Erlaubnis zur Nutzung des Bildmaterials von *Salomonina ciliata*, *Epirixanthes papuana* und *Salomonina cantoniensis*.

XIV Literaturverzeichnis und Quellenverweis des Online-Bildmaterials

- Abadie J.-C., Püttsepp Ü., Gebauer G., Faccio A., Bonfante P., Selosse M.-A. 2006** *Cephalanthera longifolia* (Neottieae, Orchidaceae) is mixotrophic: a comparative study between green and nonphotosynthetic individuals. Canadian Journal of Botany 84: 1462 - 1477
- Abbott L. K., Robson A. D. 1979** A quantitative study of the spores and anatomy of mycorrhizas formed by a species of *Glomus*, with reference to its taxonomy. Australian Journal of Botany 27: 363 - 375
- Abbott L. K. 1982** Comparative anatomy of vesicular-arbuscular mycorrhizas formed on subterranean clover. Australian journal of Botany 30: 485 - 499
- Abbott J. R. 2009** Revision of *Badiera* (Polygalaceae) and phylogeny of the Polygaleae. Ph. D. Dissertation. Gainesville: University of Florida.
- Abbott J. R. 2011** Notes on the disintegration of *Polygala* (Polygalaceae), with four new genera for The Flora of North America. Journal of the Botanical Research Institute of Texas 5: 127 - 137
- Akhmetzhanova A. A., Soudzilovskaia N. A., Onipchenko V. G., Cornwell W. K., Agafonov V. A., Selivanov I. A., Cornelissen J. H. 2012** A rediscovered treasure: mycorrhizal intensity database for 3000 vascular plant species across the former Soviet Union. Ecology 93: 689 - 690
- Akiyama K., Matsuzaki K. I., Hayashi H. 2005** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. Nature 435: 824 - 827
- Alexander C., Hadley G. 1985** Carbon movement between host and mycorrhizal endophyte during the development of the orchid *Goodyera repens* Br. New Phytologist 101: 657 - 665.
- Alexander T., Meier R., Toth R., Weber H. C. 1988** Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with reference to *Zea mays* L. New Phytologist 110: 363 - 370
- Alexander T., Toth R., Meier R., Weber H. C. 1989** Dynamics of arbuscule development and degeneration in onion, bean, and tomato with reference to vesicular-arbuscular mycorrhizae in grasses. Canadian Journal of Botany 67: 2505 – 2513
- Allen T. R., Millar T., Berch S. M., Berbee M. L. 2003** Culturing and direct DNA extraction find different fungi from the same ericoid mycorrhizal roots. New Phytologist 160: 255 - 272
- Allen M. F. 2007** Mycorrhizal fungi: highways for water and nutrients in arid soils. Vadose Zone Journal 6: 291 - 297
- Allen J. W., Shachar-Hill Y. 2009** Sulfur transfer through an arbuscular mycorrhiza. Plant Physiology 149: 549 - 560
- Ames R. N., Reid C. P. P., Porter L. K., Cambardella C. 1983** Hyphal uptake and transport of nitrogen from two ¹⁵N labelled sources by *Glomus mosseae*, a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus. New Phytologist 95: 381 - 396
- Angelard C., Tanner C. J., Fontanillas P., Niculita-Hirzel H., Masclaux F., Sanders I. R. 2014** Rapid genotypic change and plasticity in arbuscular mycorrhizal fungi is caused by a host shift and enhanced by segregation. The ISME journal 8: 284 - 294
- Antolín Llovera M., Petutsching E. K., Ried M. K., Lipka V., Nürnberger T., Robatzek S., Parniske, M. 2014** Knowing your friends and foes-plant receptor like kinases as initiators of symbiosis or defence. New Phytologist 204: 791 - 802
- Appelhans M., H. C. Weber, Imhof S. 2008** Rutaceae sampled from Germany, Malta, and Mallorca (Spain) are associated with AMF clustering with *Glomus hoi* Berch & Trappe. Mycorrhizae 18: 263 - 268
- Arditti J. 1967** Factors affecting the germination of orchid seeds. The Botanical Review 33: 1 - 97
- Arditti J. 1980** Aspects of the physiology of orchids. In: Advances in botanical research 7: 421 - 655
- Aristodimou A. 2014** Meta-Analyse der Mykorrhiza-Abschlussarbeiten der AG „Spezielle Botanik“. Bachelorarbeit, Philipps-Universität Marburg.

- Van Arle I. M., Cavagnaro T. R., Smith S. E., Smith F. A., Dickson S. 2005.** Metabolic activity of *Glomus intraradices* in Arum- and Paris-type arbuscular mycorrhizal colonization. *New Phytologist*. 166: 611 - 618
- Aroca R., Porcel R., Ruiz Lozano J. M. 2007** How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *New Phytologist* 173: 808 - 816
- Aroca R., Bago A., Sutka M., Paz J. A., Cano C., Amodéo G., Ruiz-Lozano J. M. 2009** Expression analysis of the first arbuscular mycorrhizal fungi aquaporin described reveals concerted gene expression between salt-stressed and nonstressed mycelium. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 1169 - 1178
- Ashton G. D., Dyer P. S. 2016** Sexual Development in Fungi and Its Uses in Gene Expression Systems. In: Schmöll M., Dattenböck C. (eds.) *Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications*. Springer, Cham, Heidelberg, New York, Dordrecht. London
- Augé R. M., Toler H. D., Saxton A. M. 2015** Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza* 25: 13 - 24
- Avio L., Giovannetti M. 1998** The protein pattern of spores of arbuscular mycorrhizal fungi: comparison of species, isolates and physiological stages. *Mycological Research* 102: 985 - 990
- Avio L., Cristani C., Strani P., Giovannetti M. 2009** Genetic and phenotypic diversity of geographically different isolates of *Glomus mosseae*. *Canadian Journal of Microbiology* 55: 242 - 253
- Azcón-Aguilar C., Bago B., Barea J. M. 1999** Saprophytic growth of arbuscular mycorrhizal fungi. In: Varma A., Hock B. (eds.) *Mycorrhiza*. pp. 391 - 408, Springer Berlin Heidelberg.
- Baas Becking LGM. 1934.** *Geobiologie of inleiding tot de milieukunde*. The Hague, the Netherlands: W. P. Van Stockum & Zoon.
- Babikova Z., Gilbert L., Bruce T. J., Birkett M., Caulfield J. C., Woodcock C., ... Johnson, D. 2013** Underground signals carried through common mycelial networks warn neighbouring plants of aphid attack. *Ecology letters* 16: 835 - 843
- Bago B., Azcón-Aguilar C., Piché Y. 1998a** Architecture and developmental dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions. *Mycologia* 90: 52 - 62
- Bago B., Azcón-Aguilar C., Goulet A., Piché Y. 1998b** Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *The New Phytologist* 139: 375 - 388
- Bago B. 2000** Putative sites for nutrient uptake in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 226: 263 - 274
- Bago B., Pfeiffer P. E., Shachar-Hill Y. 2000** Carbon metabolism and transport in Arbuscular Mycorrhizas. *Plant Physiology* 124: 949 - 957
- Bago B., Pfeiffer P. E., Zipfel W., Lammers P., Shachar-Hill Y. 2002** Tracking metabolism and imaging transport in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 244: 189 - 197
- Balestrini R., Berta G., Bonfante P. 1992** The plant nucleus in mycorrhizal roots: positional and structural modifications. *Biology of the Cell* 75: 235 - 243
- Balestrini R., Gómez-Ariza J., Lanfranco L., Bonfante P. 2007** Laser microdissection reveals that transcripts for five plant and one fungal phosphate transporter genes are contemporaneously present in arbusculated cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 1055 - 1062
- Barker D. G., Chabaud M., Russo G., Genre A. 2017** Nuclear Ca²⁺ signalling in arbuscular mycorrhizal and actinorhizal endosymbioses: on the trail of novel underground signals. *New Phytologist* 214: 533 - 538
- Barrett J. T. 1958.** Synthesis of mycorrhiza with pure cultures of *Rhizophagus*. *Phytopathology* 48: 391 - 391
- Barrett C. F., Freudenstein J. V. 2008** Molecular evolution of *rbcL* in the mycoheterotrophic coralroot orchids (*Corallorhiza*

- Gagnebin, Orchidaceae). *Molecular phylogenetics and evolution* 47: 665 - 679
- Barrett C. F., Freudenstein J. V., Lee Taylor D., Köljalg U. 2010** Rangewide analysis of fungal associations in the fully mycoheterotrophic *Corallorhiza striata* complex (Orchidaceae) reveals extreme specificity on ectomycorrhizal Tomentella (Thelephoraceae) across North America. *American Journal of Botany* 97: 628 - 643
- Barrett C. F., Davis J. I. 2012** The plastid genome of the mycoheterotrophic *Corallorhiza striata* (Orchidaceae) is in the relatively early stages of degradation. *American Journal of Botany* 99: 1513 - 1523
- Barto E. K., Weidenhamer J. D., Cipollini D., Rillig M. C. 2012** Fungal superhighways: do common mycorrhizal networks enhance below ground communication? *Trends in plant science* 17: 633 - 637
- Bastian, O. 2013** The role of biodiversity in supporting ecosystem services in Natura 2000 sites. *Ecological Indicators* 24: 12 - 22
- Bécard G., Piché Y. 1989** New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular—arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist* 112: 77 - 83
- Bécard G., Doner L. W., Rolin D. B., Douds D. D., Pfeffer P. E. 1991** Identification and quantification of trehalose in vesicular arbuscular mycorrhizal fungi by in vivo ¹³C NMR and HPLC analyses. *New Phytologist* 118: 547 - 552
- Bécard G., Pfeffer P. E. 1993** Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. *Protoplasma* 174: 62 - 68
- Bécard G., Taylor L. P., Douds D. D., Pfeffer P. E., Doner L. W. 1995** Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions* 8: 252 – 258
- Beijerinck W. 1940** *Calluna*. A monograph on the scotch heather. *Verhandelingen der Koninklijke Nederlandse Akademie Van Wetenschappen, Afdeling Natuurkunde.* 38: 1 - 180
- Bello M. A., Bruneau A., Forest F., Hawkins J. A. 2009** Elusive relationships within order Fabales: phylogenetic analyses using matK and rbcL sequence data. *Systematic Botany* 34: 102 - 114
- Bello M. A., Hawkins J. A., Rudall P. J. 2010** Floral ontogeny in Polygalaceae and its bearing on the homologies of keeled flowers in Fabales.
- Bello M.A., Rudall P.J., Hawkins J.A. 2012** Combined phylogenetic analyses reveal interfamilial relationships and patterns of floral evolution in the eudicot order Fabales. *Cladistics* 28: 393 - 421
- Benedetto A., Magurno F., Bonfante P., Lanfranco L. 2005** Expression profiles of a phosphate transporter gene (GmosPT) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* 15: 620 - 627
- Bentham G, Hooker J. D. 1862 - 1883** *Genera Plantarum* I: 136
- Bentivenga S. P., Morton J. B. 1995** A monograph of the genus *Gigaspora*, incorporating developmental patterns of morphological characters. *Mycologia* 719 - 731
- Benzing D. H., Atwood Jr., J. T. 1984** Orchidaceae: ancestral habitats and current status in forest canopies. *Systematic Botany* 155 - 165
- Berbee M. L., Taylor J. W. 1993** Dating the evolutionary radiations of the true fungi. *Canadian Journal of Botany* 71: 1114 - 1127
- Bernard N. 1899** Sur la germination du *Neottia nidus-avis*. *Compte Rendu de l'Academie des Sciences, Paris* 128: 1253 - 1255
- Bernard N. 1905** Nouvelles espèces d'endophytes d'Orchidées. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* 140: 1272 - 1273
- Bernard N 1908** La culture des orchidées dans ses rapports avec la symbiose. *Société Royale d'Agriculture et de Botanique de Gand, Gand*
- Bernard N. 1911** Sur la fonction fongicide des bulbes d'ophrydées. *Annales des Sciences Naturelles; Botanique* 9: 221 - 234
- Berta G., Sgorbati S., Soler V., Fusconi A., Trotta A., Citterio A., ... & Scannerini S. 1990** Variations in chromatin structure in host nuclei of a vesicular arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist* 114: 199 - 205

- Bever J. D., Morton J. B., Antonovics J., Schultz P. A. 1996** Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. *Journal of ecology* 71: 71 - 82
- Bever J. D., Wang M. 2005** Arbuscular mycorrhizal fungi: hyphal fusion and multigenomic structure. *Nature* 433: E3 -E4
- Bever J. D., Richardson S. C., Lawrence B. M., Holmes J., Watson M. 2009** Preferential allocation to beneficial symbiont with spatial structure maintains mycorrhizal mutualism. *Ecology letters* 12: 13 - 21
- Beyrle H. F., Smith S. E. 1993** The effect of carbohydrate on the development of a *Cattleya* hybrid in association with its mycorrhizal fungus. *Mycorrhiza* 3: 57 - 62
- Beyrle H. F., Smith S. E., Franco C. M. M., Peterson R. L. 1995** Colonization of *Orchis morio* protocorms by a mycorrhizal fungus: effects of nitrogen nutrition and glyphosate in modifying the responses. *Canadian Journal of Botany* 73: 1128 - 1140
- Bidartondo M. I., Kretzer A. M., Pine E. M., Bruns T. D. 2000** High root concentration and uneven ectomycorrhizal diversity near *Sarcodes sanguinea* (Ericaceae): a cheater that stimulates its victims? *American Journal of Botany* 87: 1783 - 1788
- Bidartondo M. I., Bruns T. D. 2001** Extreme specificity in epiparasitic Monotropeae (Ericaceae): widespread phylogenetic and geographical structure. *Molecular Ecology* 10: 2285 - 2295
- Bidartondo M. I., Bruns T. D. 2002** Fine level mycorrhizal specificity in the Monotropeae (Ericaceae): specificity for fungal species groups. *Molecular Ecology* 11: 557 - 569
- Bidartondo M., Redecker D., Hijri I., Wiemken A., Bruns T. D., Dominguez L., Séršic A., Leake J. R., Read J. R. 2002** Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 419: 389 - 392
- Bidartondo M. I., Bruns T. D., Weiß M., Sérgio C., Read D. J. 2003** Specialized cheating of the ectomycorrhizal symbiosis by an epiparasitic liverwort. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 270: 835 – 842
- Bidartondo M. I., Burghardt B., Gebauer G., Bruns T. D., Read D. J. 2004.** Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proceedings of the Royal Society of London B.* 271: 1799-1806
- Bidartondo M. I. 2005** The evolutionary ecology of myco-heterotrophy. *New Phytologist* 167: 335 - 352
- Bidartondo M. I., Bruns T. D. 2005** On the origins of extreme mycorrhizal specificity in the Monotropeae (Ericaceae): performance trade offs during seed germination and seedling development. *Molecular Ecology* 14: 1549 - 1560
- Bidartondo M. I., Read D. J. 2008** Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Molecular Ecology* 17: 3707 - 3716
- Bidartondo M. I., Read D. J., Trappe J. M., Merckx V., Ligrone R., Duckett J. G. 2011.** The dawn of symbiosis between plants and fungi. *Biology Letters* 7: 574 - 577
- Bialeski R. L. 1973** Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Annual review of plant physiology* 24: 225 - 252
- Biermann B., Linderman R. G. 1983** Use of vesicular arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytologist* 95: 97 - 105
- Bingham M. A., Simard S. W. 2012** Mycorrhizal networks affect ectomycorrhizal fungal community similarity between conspecific trees and seedlings. *Mycorrhiza* 22: 317 - 326

- Bitterlich M., Graefe J., Franken P. 2016** Primary metabolism in arbuscular mycorrhizal symbiosis: Carbon, nitrogen and sulfur. In: F. Martin (ed.) *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. pp. 217 - 238.
- Björkman E. 1960** *Monotropa hypopitys* L.- an epiparasite on tree roots. *Physiologia Plantarum* 13: 308 - 327
- Blake S. F. 1924.** Polygalaceae. *North American Flora* 25: 305 - 379
- Blee K. A., Anderson A. J. 1998** Regulation of arbuscule formation by carbon in the plant. *The Plant Journal* 16: 523 - 530
- Blee K. A., Anderson A. J. 2002** Transcripts for genes encoding soluble acid invertase and sucrose synthase accumulate in root tip and cortical cells containing mycorrhizal arbuscules. *Plant molecular biology* 50: 197 – 211
- Boldt K., Pörs Y., Haupt B., Bitterlich M., Kühn C., Grimm B., Franken P. 2011** Photochemical processes, carbon assimilation and RNA accumulation of sucrose transporter genes in tomato arbuscular mycorrhiza. *Journal of plant physiology* 168: 1256 - 1263
- Bolin J. F., Tennakoon K. U., Majid M. B. A., Cameron D. D. 2015** Isotopic evidence of partial mycoheterotrophy in *Burmannia coelestis* (Burmanniaceae). *Plant Species Biology* 32: 74 – 80
- Bonfante-Fasolo P., Gianinazzi-Pearson, V. 1979** Ultrastructural aspects of endomycorrhiza in the Ericaceae: I. Naturally infected hair roots of *Calluna vulgaris* L. Hull. *New Phytologist* 83: 739 - 744
- Bonfante-Fasolo P., Dexheimer J., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V., Scannerini S. 1981** Cytochemical modifications in the host-fungus interface during intracellular interactions in vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Plant Science Letters* 22: 13 - 21
- Bonfante-Fasolo P. 1984** Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: Powell L., Bagyaraj D. J. (eds.) *VA Mycorrhiza*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida
- Bonfante P., Perotto S. 1995** Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *Tansley Review No. 82*. *New Phytologist* 130: 3 - 21
- Bonfante P. 2001** At the interface between mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of cell wall, plasma membrane and cytoskeleton. In: **Esser K. (ed.)** *The Mycota*. Vol. 9. Fungal associations. pp. 45 -61, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Bonfante P., Genre A. 2008** Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. *Trends in plant science* 13: 492 - 498
- Bonfante P., Genre A. 2010** Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications* 1: 48
- Boon E., Zimmerman E., Lang B. F., Hijri M. 2010** Intra-isolate genome variation in arbuscular mycorrhizal fungi persists in the transcriptome. *Journal of evolutionary biology* 23: 1519 - 1527
- Borriello R., Bianciotto V., Orgiazzi A., Lumini E., Bergero R. 2014** Sequencing and comparison of the mitochondrial COI gene from isolates of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to Gigasporaceae and Glomeraceae families. *Molecular phylogenetics and evolution* 75: 1 - 10
- Bougoure D. S., Parkin P. I., Cairney J. W. G., Alexander I. J., Anderson I. C. 2007.** Diversity of fungi in hair roots of Ericaceae varies along a vegetation gradient. *Molecular Ecology* 16: 4624 - 4636
- Bougoure J., Ludwig M., Brundrett M., Grierson P. 2009.** Identity and specificity of the fungi forming mycorrhizas with

the rare mycoheterotrophic ochrid *Rhizanthella gardneri*. *Mycological Research* 113: 1097 - 1106

Bougoure J. J., Brundrett M. C., Grierson P. F. 2010 Carbon and nitrogen supply to the underground orchid, *Rhizanthella gardneri*. *New Phytologist* 186: 947 - 956.

Bougoure J., Ludwig M., Brundrett M., Cliff J., Clode P., Kilburn M., Grierson P. 2014 High resolution secondary ion mass spectrometry analysis of carbon dynamics in mycorrhizas formed by an obligately myco heterotrophic orchid. *Plant, cell & environment* 37: 1223 - 1230

Boullard B. 1988. Observations on the coevolution of fungi with hepatics. In: Pyrozynski K. A. (ed.) *Coevolution of fungi with plants and animals*. Academic, London, pp 107 - 124

Bonneau L., Huguet S., Wipf D., Pauly N., Truong H. N. 2013 Combined phosphate and nitrogen limitation generates a nutrient stress transcriptome favorable for arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* 199: 188 - 202

Börstler B., Thiéry, O., Sýkorová Z., Berner A., Redecker D. 2010 Diversity of mitochondrial large subunit rDNA haplotypes of *Glomus intraradices* in two agricultural field experiments and two semi natural grasslands. *Molecular ecology* 19: 1497 - 1511

Braukmann T., Stefanović S. 2012 Plastid genome evolution in mycoheterotrophic Ericaceae. *Plant molecular biology* 79: 5 - 20

Breuninger M., Requena N. 2004 Recognition events in AM symbiosis: analysis of fungal gene expression at the early appressorium stage. *Fungal Genetics and Biology* 41: 794 - 804

Briones-Moreno A., Hernández-García J., Vargas-Chávez C., Romero-Campero F. J., Romero J. M., Valverde F., Blázquez M. A. 2017 Evolutionary analysis of DELLA-associated transcriptional networks. *Frontiers in plant science* 8

Brundrett M., Piche Y., Peterson R. L. 1985 A developmental study of the early stages of vesicular arbuscular mycorrhiza formation. *Canadian Journal of Botany* 63: 184 - 194

Brundrett M., Kendrick B. 1990. The roots and mycorrhizas of herbaceous woodland plants: I. Quantitative aspects of morphology. *New Phytologist* 114: 457- 468

Brundrett M. 1991 Mycorrhizas in natural ecosystems. *Advances in ecological research* 21: 171 - 313

Brundrett M., Bougher N., Dell B., Grove T. 1996 *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*. Australian Centre for International Agricultural Research.

Brundrett M. C. 2002 Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 154: 275 - 304

Brundrett M. 2004 Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews* 79: 473 - 495

Brundrett, M. C. 2006 Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. In: Schulz B. J., Boyle C. J. C (eds.) 2006 *Microbial root endophytes*. pp. 281 - 298, Springer, Berlin, Heidelberg.

Brundrett M. C. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil*. 320:37 - 77

Bruneau A., Mercure M., Lewis G. P., Herendeen P. S. 2008 Phylogenetic patterns and diversification in the caesalpinoid

legumes. Botany 86: 697 - 78

Brunner I., Herzog C., Dawes M. A., Arend M., Sperisen C. 2015 How tree roots respond to drought. *Frontiers in Plant Science*. 6: 547

Bruns T. D., Bidartondo M. I., Taylor D. L. 2002 Host specificity in ectomycorrhizal communities: what do the exceptions tell us? *Integrative and Comparative Biology* 42: 352 - 359

Bruzzone M. C., Fontenla S. B., Vohník M. 2015 Is the prominent mycorrhizal fungus *Rhizoscyphus ericae* absent in the southern hemisphere's Ericaceae? A case study on the diversity of root mycobionts in *Gaultheria* spp. From northwest Patagonia, Argentina. *Mycorrhiza* 25: 25 - 40

Bucher M., Hause B., Krajinski F., Küster H. 2014 Through the doors of perception to function in arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 204: 833 - 840

Burgeff H. 1909 Wurzelpilze der Orchideen. Ihre Kultur und ihr Leben in der Pflanze. Verlag von Gustav Fischer, Jena.

Burgeff H. 1932 Saprophytismus und Symbiose. Studien an tropischen Orchideen. Verlag von Gustav Fischer, Jena.

Burgeff, H. 1943 Problematik der Mycorrhiza. *Naturwissenschaften* 31: 558 - 567

Burges A. 1939 The defensive mechanism in orchid mycorrhiza. *New Phytologist* 38: 273 - 283

Burggraaf A. J. P., Beringer J. E. 1989 Absence of nuclear DNA synthesis in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. *New Phytologist* 111: 25 - 33

Burkhardt R. 1985 Vergleichende morphologisch-anatomische Untersuchung an den Wurzeln einiger *Gentiana*- und *Gentianella*-Arten. Staatsexamensarbeit. Phillips-Universität Marburg

Burt A. 2000 Perspective: sex, recombination, and the efficacy of selection - was Weismann right? *Evolution* 54: 337 - 351

Butlin R. 2002 The costs and benefits of sex: new insights from old asexual lineages. *Nature Reviews Genetics* 3: 311 - 317

Bücking H., Shachar Hill Y. 2005 Phosphate uptake, transport and transfer by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is stimulated by increased carbohydrate availability. *New Phytologist* 165: 899 - 912

Bücking H., Kafle A. 2015 Role of arbuscular mycorrhizal fungi in the nitrogen uptake of plants: current knowledge and research gaps. *Agronomy* 5: 587 - 612

Cairney J. W. G., Burke R. M. 1998 Extracellular enzyme activities of the ericoid mycorrhizal endophyte *Hymenoscyphus ericae* (Read) Korf & Kernan: their likely roles in decomposition of dead plant tissue in soil. *Plant and Soil* 205: 181 - 192

Cairney J. W. G., Meharg A. A. 2003 Ericoid mycorrhiza: a partnership that exploits harsh edaphic conditions. *European Journal of Soil Science* 54: 735 - 740.

Cameron D. D., Leake J. R., Read D. J. 2006. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist* 171: 405 - 416

Cameron D. D., Johnson I., Leake J. R., Read D. J. 2007 Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *Annals of Botany* 99: 831 - 834

Cameron D. D., Johnson I., Read D. J., Leake J. R. 2008. Giving and receiving: measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. *New Phytologist* 180: 176 - 184

- Cameron D. D., Preiss K., Gebauer G., Read D. J. 2009** The chlorophyll containing orchid *Corallorhiza trifida* derives little carbon through photosynthesis. *New Phytologist* 183: 358 - 364
- Cameron D. D. 2010** Arbuscular mycorrhizal fungi as (agro) ecosystem engineers. *Plant and soil* 333: 1 - 5
- Cameron D. D., Bolin J. F. 2010** Isotopic evidence of partial mycoheterotrophy in the Gentianaceae: *Bartonia virginica* and *Obolaria virginica* as case studies. *American Journal of Botany* 97: 1272 - 1277
- Camp W. H. 1940.** Aphyllous Forms in *Pyrola*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club.* 67: 453 - 465
- Carafa A., Duckett J. G., Ligrone R. 2003.** Subterranean gametophytic axes in the primitive liverwort *Haplomitrium* harbour a unique type of endophytic association with aseptate fungi. *New Phytologist.* 160: 185 - 197
- Cardoso D., Pennington R. T., de Queiroz L. P., Boatwright J. S., Van Wyk B. E., Wojciechowski M. F., Lavin M. 2013** Reconstructing the deep-branching relationships of the papilionoid legumes. *Reconstructing the deep-branching relationships of the papilionoid legumes.* *South African Journal of Botany* 89: 58 - 75
- Carotenuto G., Chabaud M., Miyata K., Capozzi M., Takeda N., Kaku H., ... & Genre A. 2017** The rice LysM receptor like kinase OsCERK1 is required for the perception of short chain chitin oligomers in arbuscular mycorrhizal signaling. *New Phytologist* 214: 1440 - 1446
- Castro S., Silveira P., Navarro L. 2009** Floral traits variation, legitimate pollination, and nectar robbing in *Polygala vayredae* (Polygalaceae). *Ecological Research* 24: 47 - 55
- Catoira R., Galera C., de Billy F., Penmetza R. V., Journet E. P., Maillet F., ... & Dénarié, J. 2000** Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. *The Plant Cell* 12: 1647 - 1665
- Cavagnaro T. R., Smith F. A., Lorimer M. F., Haskard K. A., Ayling S. M., Smith S. E. 2001a.** Quantitative development of *Paris*-type arbuscular mycorrhizas formed between *Asphodelus fistulosus* and *Glomus coronatum*. *New Phytologist* 149: 105 - 113
- Cavagnaro T. R., Gao L. L., Smith F. A., Smith S. E. 2001b.** Morphology of arbuscular mycorrhizas is influenced by fungal identity. *New Phytologist* 151: 469 - 475
- Cavagnaro T. R., Smith F. A., Ayling S. M., Smith S. 2003** Growth and phosphorus nutrition of a *Paris*-type arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 157: 127 - 134
- Chabaud M., Genre A., Sieberer B. J., Faccio A., Fournier J., Novero M., ... & Bonfante P. 2011** Arbuscular mycorrhizal hyphopodia and germinated spore exudates trigger Ca²⁺ spiking in the legume and nonlegume root epidermis. *New Phytologist* 189: 347 - 355
- Chase M. W. 2005** Classification of Orchidaceae in the age of DNA data. *Curtis's Botanical Magazine* 22: 2 - 7
- Chaurasia B., Pandey A., Palni L. M. S. 2005** Distribution, colonization and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with central Himalayan rhododendrons. *Forest Ecology and Management* 207: 315 - 324
- Chen L. Q., Hou B. H., Lalonde S., Takanaga H., Hartung M. L., Qu X. Q., ... & Chermak D. 2010** Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468: 527 - 532
- Cheng L., Booker F. L., Tu C., Burkey K. O., Zhou L., Shew H. D., ... & Hu S. 2012** Arbuscular mycorrhizal fungi increase organic carbon decomposition under elevated CO₂. *Science* 337: 1084 - 1087
- Chodat, R. H. 1891 - 1893** Monographia Polygalacearum. Volumes I-II. *Memoires de la Société de physique et d'histoire naturelle de Genève* 31: 1 - 500
- Chodat, R. 1896** Polygalaceae. In: Engler, A., Prantl, K., *Die natürlichen Pflanzenfamilien* III, 4. pp. 323 - 345, Leipzig: W. Engelmann
- Christenhusz M. J., Byng J. W. 2016** The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*

261: 201 - 217

Chronquist A. 1981 An integrated system of classification of flowering plants. New York, Columbia University Press.

Clapp J. P., Young J. P. W., Merryweather J. W., Fitter A. H. 1995 Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytologist* 130: 259 - 265

Clapp J. P., Fitter A. H., Young J. P. W. 1999 Ribosomal small subunit sequence variation within spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora* sp. *Molecular Ecology* 8: 915 - 921

Clapp J. P., Helgason T., Daniell T. J., Peter J., Young W. 2003 Genetic studies of the structure and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. In: Van der Heijden M. G. A. & Sanders I. R. (ed.). *Mycorrhizal ecology*. pp. 201 - 224, Springer Berlin Heidelberg.

Cooke M. A., Widden P., O'Halloran I. 1993. Development of vesicular-arbuscular mycorrhizae in sugar maple (*Acer saccharum*) and effects of base-cation amendment on vesicle and arbuscule formation. *Canadian Journal of Botany* 71: 1421 - 1426

Corradi N., Hijri M., Fumagalli L., Sanders I. R. 2004 Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) harbour ancient fungal tubulin genes that resemble those of the chytrids (Chytridiomycota). *Fungal Genetics and Biology* 41: 1037 - 1045

Corradi N., Sanders I. R. 2006 Evolution of the P-type II ATPase gene family in the fungi and presence of structural genomic changes among isolates of *Glomus intraradices*. *BMC Evolutionary Biology* 6: 21

Corradi N., Croll D., Colard A., Kuhn G., Ehinger M., Sanders I. R. 2007 Gene copy number polymorphisms in an arbuscular mycorrhizal fungal population. *Applied and environmental microbiology* 73: 366 - 369

Corradi N., Ruffner B., Croll D., Colard A., Horák A., Sanders I. R. 2009 High-level molecular diversity of copper-zinc superoxide dismutase genes among and within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and environmental microbiology* 75: 1970 - 1978

Correa A., Cruz C., Ferrol N. 2015 Nitrogen and carbon/nitrogen dynamics in arbuscular mycorrhiza: the great unknown. *Mycorrhiza* 25: 499 – 515

Courty P. E., Walder F., Boller T., Ineichen K., Wiemken A., Rousteau A., Selosse M. A. 2011 Carbon and nitrogen metabolism in mycorrhizal networks and mycoheterotrophic plants of tropical forests: a stable isotope analysis. *Plant Physiology* 156: 952 - 961

Courty P. E., Doidy J., Garcia K., Wipf D., Zimmermann S. D. 2016 The transportome of mycorrhizal systems. In: **Martin F. (ed.) 2017** *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. pp. 239 – 256. Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Cox G., Sanders F. 1974 Ultrastructure of the host – fungus interface in a vesicular – arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist* 73: 901 - 912

Cox G., Tinker P. B. 1976 Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. I. The arbuscule and phosphorus transfer: a quantitative ultrastructural study. *New Phytologist*, 371 - 378

Cox C. J., Li B., Foster P. G., Embley T. M., Civián P. 2014 Conflicting phylogenies for early land plants are caused by composition biases among synonymous substitutions. *Systematic Biology* 63: 272 – 279

Croll D., Sanders I. R. 2009 Recombination in *Glomus intraradices*, a supposed ancient asexual arbuscular mycorrhizal fungus. *BMC Evolutionary Biology* 9: 13.

Croll D., GioVannetti M., Koch A. M., Sbrana C., Ehinger M., Lammers P. J., Sanders I. R. 2009 Nonsel self vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 181: 924 - 937

Crush J. R. 1976 Endomycorrhizas and legume growth in some soils of the Mackenzie Basin, Canterbury, New Zealand. *New Zealand journal of agricultural research* 19: 473 - 476

Cruz C., Egsgaard H., Trujillo C., Ambus P., Requena N., Martins-Loução M. A., Jakobsen I. 2007 Enzymatic evidence for the key role of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant physiology* 144: 782 - 792

- Cullings K. W., Szaro T. M., Bruns T. D. 1996** Evolution of extreme specialization within a lineage of ectomycorrhizal epiparasites. *Nature* 379: 63.
- Daniell T. J., Husband R., Fitter A. H., Young J. P. W. 2001** Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiology Ecology* 36: 203 - 209
- Davison J., Öpik M., Daniell T. J., Moora M., Zobel M. 2011** Arbuscular mycorrhizal fungal communities in plant roots are not random assemblages. *FEMS Microbiology Ecology* 78: 103 - 115
- Davison J., Öpik M., Zobel M., Vasar M., Metsis M., Moora M. 2012** Communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in forest soil are spatially heterogeneous but do not vary throughout the growing season. *PLoS One* 7: e41938.
- Davison J., Moora M., Öpik M., Adholeya A., Ainsaar L., Bâ A., ... & Johnson N. C. 2015** Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science* 349: 970 - 973
- Davison J., Moora M., Jairus T., Vasar M., Öpik M., Zobel M. 2016** Hierarchical assembly rules in arbuscular mycorrhizal (AM) fungal communities. *Soil Biology & Biochemistry* 97: 63 – 70
- Dawson T. E., Mambelli S., Plamboeck A. H., Templer P. H., Tu K. P. 2002** Stable isotopes in plant ecology. *Annual review of ecology and systematics* 33: 507 - 559
- Dearnaley J. D. W. 2006.** The fungal endophytes of *Erythrorchis cassythoides* - is this orchid saprophytic or parasitic? *Australasian Mycologist* 25: 51 - 57
- Dearnaley J. D. W., Bougoure J. J. 2010.** Isotopic and molecular evidence for saprotrophic Marasmiaceae mycobionts in rhizomes of *Gastrodia sesamoides*. *Fungal Ecology* 3: 288 - 294
- Dearnaley J. D. W. 2007** Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza* 17: 475 - 486
- Dearnaley J. D. W., Martos F., Selosse M. A. 2012** 12 Orchid Mycorrhizas: Molecular Ecology, Physiology, Evolution and Conservation Aspects. In: **Hock B. (ed.)** *The Mycota. Vol. 9. Fungal associations.* pp. 207 - 230, Springer Berlin Heidelberg.
- Dearnaley J., Perotto S., Selosse M.-A. 2016** Structure and development of orchid mycorrhizas. In: **Martin F. (ed.) 2017.** *Molecular Mycorrhizal Symbiosis.* pp. 63 – 86. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey
- Dearnaley J. D., Cameron D. D. 2017** Nitrogen transport in the orchid mycorrhizal symbiosis—further evidence for a mutualistic association. *New Phytologist* 213: 10 - 12
- Declerck S., Strullu D. G., Fortin A. 2005** In vitro culture of mycorrhizas. Vol. 4. Springer Science & Business Media
- Delaux, P. M., Nanda A. K., Mathé C., Sejalón-Delmas N., Dunand C. 2012** Molecular and biochemical aspects of plant terrestrialization. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 14: 49 - 59
- Delaux P.-M., Séjalón-Delmas N., Bécard G., Ané J. M. 2013** Evolution of the plant-microbe symbiotic ‘toolkit’. *Trends in plant science* 18: 298 - 304
- Delaux P. M., Radhakrishnan G. V., Jayaraman D., Cheema J., Malbreil M., Volkening J. D., ... & Rothfels C. J. 2015** Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 13390 - 13395
- de Vega C., Arista M., Ortiz P. L., Talavera S. 2010** Anatomical relations among endophytic holoparasitic angiosperms, autotrophic host plants and mycorrhizal fungi: a novel tripartite interaction. *American Journal of Botany* 97: 730 - 737
- Demuth K., & Weber H. C. 1990** Strukturelle Inkompatibilität der vesikulär-arbuskulären Mycorrhizapilze in Enzianen (Gentianaceae). *Angewandte Botanik* 64: 247 - 252
- Demuth K., Forstreuter W., Weber H. C. 1991** Morphological differences in vesicular-arbuscular mycorrhizae of Gentianaceae produced by different endophytes. *Flora* 185: 127 - 132
- Demuth K. 1993** Morphologisch/anatomische sowie phytochemische Untersuchungen zur Symbiose von Gentianaceen mit vesikulär-arbuskulären Mycorrhiza-Pilzen. Dissertation Marburg/Lahn.

- Den Bakker H. C., VanKuren N. W., Morton J. B., Pawlowska T. E. 2010** Clonality and recombination in the life history of an asexual arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular biology and evolution*. 27: 2474 - 2486
- Desirò A., Duckett J. G., Pressel S., Villarreal J. C., Bidartondo M. I. 2013.** Fungal symbioses in hornworts: a chequered history. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 280: 20130207
- Dexheimer J., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. 1979** Ultrastructural Cytochemistry of the Host-Fungus Interfaces in the Endomycorrhizal Association *Glomus mosseae/Allium cepa*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 92: 191 - 206
- Dexheimer J., Pargney, J. C. 1991** Comparative anatomy of the host-fungus interface in mycorrhizas. *Experientia* 47: 312 - 321
- Dickie I. A., FitzJohn R. G. 2007** Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi: a methods review. *Mycorrhiza* 17: 259 - 270
- Dickson S., Kolesik P. 1999** Visualisation of mycorrhizal fungal structures and quantification of their surface area and volume using laser scanning confocal microscopy. *Mycorrhiza* 9: 205 - 213
- Dickson S. 2004** The *Arum-Paris* continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 163: 187 - 200
- Dickson S., Smith F. A., Smith S. E. 2007** Structural differences in arbuscular mycorrhizal symbioses: more than 100 years after Gallaud, where next?. *Mycorrhiza* 17: 375 - 393
- Dijkstra P., Ishizu A., Doucett R., Hart S. C., Schwartz E., Menyailo O. V., Hungate B. A. 2006** 13C and 15N natural abundance of the soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 3257 - 3266
- Domínguez L. S., Sérsic A. 2004** The southernmost myco-heterotrophic plant, *Arachnitis uniflora*: root morphology and anatomy. *Mycologia* 96: 1143 - 1151
- Domínguez L. S., Melville L., Sersic A., Faccio A., Peterson R. L. 2009** The mycoheterotroph *Arachnitis uniflora* has a unique association with arbuscular mycorrhizal fungi. *Botany* 87: 1198 - 1208
- Dotzler N., Krings M., Taylor T. N., Agerer R. 2006** Germination shields in *Scutellospora* (Glomeromycota: Diversisporales, Gigasporaceae) from the 400 million-year-old Rhynie chert. *Mycological Progress* 5: 178 - 184
- Dotzler N., Walker C., Krings M., Hass H., Kerp H., Taylor T. N., Agerer R. 2009** Acaulosporoid glomeromycotan spores with a germination shield from the 400-million-year-old Rhynie chert. *Mycological Progress* 8: 9 - 18
- Douds Jr, D. D.; Millner P. D. 1999** Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. *Agriculture, ecosystems & environment* 74: 77 - 93
- Douhan G. W., Petersen C., Bledsoe C. S., Rizzo D. M. 2005** Contrasting root associated fungi of three common oak-woodland plant species based on molecular identification: host specificity or non-specific amplification? *Mycorrhiza* 15: 365 - 372
- Dover G. 1982** Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 299: 111
- Dover G. A. 1989** Linkage disequilibrium and molecular drive in the rDNA gene family. *Genetics* 122: 249
- Doyle J. J., Chappill J. A., Bailey C. D., Kajita T. 2000** Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from rbcL sequences and non-molecular data. *Advances in legume systematics* 9: 1 - 20
- Drude O. 1873** Die Biologie von *Monotropa hypopitys* L. und *Neottia nidus avis* L. unter vergleichender Hinzuziehung anderer Orchideen. Druck der Dieterich'schen Univ.-Buchdruckerei (WF Kaestner).
- Duckett J. G., Renzaglia K. S., Pell K. 1991** A light and electron microscope study of rhizoid-ascomycete associations and flagelliform axes in British hepatics with observations on the effects of the fungi on host morphology. *New Phytologist*, 118: 233 - 257
- Duckett, J. G., Read, D. J. 1995** Ericoid mycorrhizas and rhizoid ascomycete associations in liverworts share the same mycobiont: isolation of the partners and resynthesis of the associations in vitro. *New Phytologist* 129: 439 - 447
- Duckett J. G., Carafa A., Ligrone R. 2006a** A highly differentiated glomeromycotean association with the mucilage-

secreting, primitive antipodean liverwort *Treubia* (Treubiaceae): clues to the origins of mycorrhizas. *American Journal of Botany* 93: 797 - 813

Ducket J. G., Russell J., Ligrone R. 2006b Basidiomycetous endophytes in jungermannialean (leafy) liverworts have novel cytology and species-specific host ranges: a cytological and experimental study. *Canadian Journal of Botany*. 84: 1075 - 1093

Ducouso M, Bourgeois C, Buyck B, Eyssartier G, Vincelette M, Rabévoitra R, Béna G, Randrihasipara L, Dreyfus B, Prin Y 2004 The last common ancestor of Sarcolaenaceae and asian dipterocarp trees was ectomycorrhizal before the India-Madagascar separation, about 88 million years ago. *Molecular Ecology* 13: 231 - 236

Ducouso M, Ramanankierana H, Duponnois R, Rabévoitra R, Randrihasipara L, Vincelette M, Dreyfus B, Prin B 2008 Mycorrhizal status of native trees and shrubs from eastern Madagascar littoral forests with special emphasis on one new ectomycorrhizal endemic family, the Asteropeiaceae. *New Phytologist* 178: 233 – 238

Duddridge J. A., Read D. J. 1982a An ultrastructural analysis of the development of mycorrhizas in *Monotropa hypopitys* L. *New Phytologist* 92: 203 - 214

Duddridge J. A., Read D. J. 1982b An ultrastructural analysis of the development of mycorrhizas in *Rhododendron ponticum*. *Canadian Journal of Botany* 60: 2345 - 2356

Dumbrell A. J., Ashton P. D., Aziz N., Feng G., Nelson M., Dytham C., ... Helgason, T. 2011 Distinct seasonal assemblages of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by massively parallel pyrosequencing. *New Phytologist* 190: 794 - 804

Egger K. N., Hibbett D. S. 2004 The evolutionary implications of exploitation in mycorrhizas. *Canadian Journal of Botany* 82: 1110 - 1121

Eom A.-H., Hartnett D. C., Wilson G. W. T. 2000 Host plant species effects on arbuscular fungal communities in tallgrass prairie. *Oecologia* 122: 435 - 444

Ercole E., Adamo M., Rodda M., Gebauer G., Girlanda M., Perotto S. 2015 Temporal variation in mycorrhizal diversity and carbon and nitrogen stable isotope abundance in the wintergreen meadow orchid *Anacamptis morio*. *New Phytologist* 205: 1308 - 1319

Eriksen B. 1993a. Floral anatomy and morphology in the Polygalaceae. *Plant Systematics and Evolution* 186:17 - 32

Eriksen B. 1993b. Phylogeny of the Polygalaceae and its taxonomic implications. *Plant Systematics and Evolution* 186: 33 – 55

Eriksen B., Persson C. 2007 Polygalaceae. In: Kubitzki K (ed.) 2007 *Flowering Plants· Eudicots*. pp. 345-363, Springer, Berlin, Heidelberg.

Eriksson O., Kainulainen K. 2011 The evolutionary ecology of dust seeds. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 13: 73 - 87

Esnault A.-L., Masuhara G., McGee P. A. 1994 Involvement of exodermal passage cells in mycorrhizal infection of some orchids. *Mycological Research* 98: 672 - 676.

Etemadi M., Gutjahr C., Couzigou J. M., Zouine M., Laressergues D., Timmers A., ... & Combier J. P. 2014 Auxin perception is required for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* 166: 281 - 292

Ezawa T., Saito K. 2018 How do arbuscular mycorrhizal fungi handle phosphate? New insight into fine tuning of phosphate metabolism. *New Phytologist* 220: 1116 - 1121

Feddermann N., Finlay R., Boller T., Elfstrand M. 2010 Functional diversity in arbuscular mycorrhiza - the role of gene expression, phosphorous nutrition and symbiotic efficiency. *Fungal Ecology* 3: 1 - 8

Feild T. S., Brodribb T. J. 2005 A unique mode of parasitism in the conifer coral tree *Parasitaxus ustus* (Podocarpaceae). *Plant, Cell & Environment* 28: 1316 - 1325

- Fellbaum, C. R., Gachomo, E. W., Beesetty, Y., Choudhari, S., Strahan, G. D., Pfeffer, P. E., ... & Bücking, H. 2012a** Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 2666 - 2671
- Fellbaum C. R., Mensah J. A., Pfeffer P. E., Kiers E. T., Bücking H. 2012b** The role of carbon in fungal nutrient uptake and transport. *Plant Signaling & Behavior* 7: 1509 - 1512
- Fellbaum C. R., Mensah J. A., Cloos A. J., Strahan G. E., Pfeffer P. E., Kiers E. T., Bücking H. 2014** Fungal nutrient allocation in common mycorrhizal networks is regulated by the carbon source strength of individual host plants. *New Phytologist* 203: 646 - 656
- Felsenstein J. 1978** Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Systematic zoology* 27: 401 - 410
- Field K. J., Cameron D. D., Leake J. R., Tille S., Bidartondo M. I., Beerling D. J. 2012.** Contrasting arbuscular mycorrhizal responses of vascular and non-vascular plants to a simulated Palaeozoic CO₂ decline. *Nature Communications* 3: 835
- Field K. J., Rimington W. R., Bidartondo M. I., Allinson K. E., Beerling D. J., Cameron D. D., Duckett J. G., Leake J. R., Pressel S. 2015a.** First evidence of mutualism between ancient plant lineages (*Halomitriopsida* liverworts) and Mucoromycotina fungi and its response to stimulated Palaeozoic changes in atmospheric CO₂. *New Phytologist* 205: 743 - 756
- Field K. J., Leake J. R., Tille S., Allinson K. E., Rimington W. R., Bidartondo M. I., Beerling D. J., Cameron D. D. 2015b.** From mycoheterotrophy to mutualism: mycorrhizal specificity and functioning in *Ophioglossum vulgatum* sporophytes. *New Phytologist* 205: 1492 - 1502
- Field K. J., Pressel S., Duckett J. G., Rimington W. R., Bidartondo M. I. 2015c.** Symbiotic options for the conquest of land. *Trends in Ecology & Evolution* 30: 477 - 486
- Field K. J., Rimington W. R., Bidartondo M. I., Allinson K. E., Beerling D. J., Cameron D. D., ... & Pressel S. 2016** Functional analysis of liverworts in dual symbiosis with Glomeromycota and Mucoromycotina fungi under a simulated Palaeozoic CO₂ decline. *The ISME journal* 10: 1514
- Finlay R. D., Söderström B. 1992** Mycorrhiza and carbon flow to the soil. In: Allen M. (ed) *Mycorrhiza Functioning*. pp. 134-160. Chapman and Hall, London, UK.
- Fiorilli V., Belmondo S., Khouja H. R., Abbà S., Faccio A., Daghino S., Lanfranco L. 2016** RiPEIP1, a gene from the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *Mycorrhiza* 26: 609 - 621
- Fitter A. H. 2005** Darkness visible: reflections on underground ecology. *Journal of Ecology* 93: 231 - 243
- Fitter A. H. 2006** What is the link between carbon and phosphorus fluxes in arbuscular mycorrhizas? A null hypothesis for symbiotic function. *New Phytologist* 172: 3 - 6
- Floss D. S., Levy J. G., Lévesque-Tremblay V., Pumplin N., Harrison M. J. 2013** DELLA proteins regulate arbuscule formation in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: E5025 - E5034
- Floss D. S., Gomez S. K., Park H. J., MacLean A. M., Müller L. M., Bhattarai K. K., ... & Harrison M. J. 2017** A transcriptional program for arbuscule degeneration during AM symbiosis is regulated by MYB1. *Current Biology* 27: 1206 - 1212
- Fochi V., Chitarra W., Kohler A., Voyron S., Singan V. R., Lindquist E. A., ... & Balestrini R. 2017** Fungal and plant gene expression in the *Tulasnella calospora*-*Serapias vomeracea* symbiosis provides clues about nitrogen pathways in orchid mycorrhizas. *New Phytologist* 213: 365 - 379
- Foo E. 2013** Auxin influences strigolactones in pea mycorrhizal symbiosis. *Journal of plant physiology* 170: 523 - 528
- Forbes P. J., Millam S., Hooker J. E., Harrier L. A. 1998** Transformation of the arbuscular mycorrhiza *Gigaspora rosea* by

particle bombardment. *Mycological Research* 102: 497 - 501

Forest F., Manning J. C. 2006 Evidence for inclusion of South African Endemic *Nylandtia* in *Muraltia* (Polygalaceae). *Systematic Botany* 31: 525 - 532

Forest F., Chase M.W., Persson C., Crane P.R., Hawkins J.A. 2007 The role of biotic and abiotic factors in evolution of ant dispersal in the milkwort family (Polygalaceae). *Evolution: International Journal of Organic Evolution*. 61: 1675 - 1694

Francis R., Read D. J. 1984 Direct transfer of carbon between plants connected by vesicular-arbuscular mycorrhizal mycelium. *Nature* 307: 53

Francis R., Read D. J. 1995 Mutualism and antagonism in the mycorrhizal symbiosis, with special reference to impacts on plant community structure. *Canadian Journal of Botany* 73: 1301 – 1309

Francke H. L. 1934 Beiträge zur Kenntnis der Mykorrhiza von *Monotropa hypopitys* L.: Analyse und Synthese der Symbiose. *Flora oder Allgemeine Botanische Zeitung* 129: 1 - 52

Frank A. B. 1885a Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Berichte der deutschen Botanischen Gesellschaft* 3: 128 - 145

Frank A. B. 1885b Neue Mittheilungen über die Mycorrhiza der Bäume und der *Monotropa hypopytis*. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* XXVII - XXXIII

Frank A. B. 1887 Ueber neue Mykorrhiza-Formen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 5: 395 - 409

Frank A. B. 1888 Ueber die physiologische Bedeutung der Mycorrhiza. *Berichte der deutschen Botanischen Gesellschaft* 6: 248 - 268

Frank A. B. 1891 Ueber die Verdauung von Pilzen abzielende Symbiose der mit endotrophen Mykorrhizen begabten Pflanzen, sowie der Leguminosen und Erlen. *Berichte der deutschen botanische Gesellschaft*. Bd. IX

Frank A. B. 1892 *Lehrbuch der Botanik*. Leipzig, Verlag von Wilhelm Engelmann

Franke M., Morton J.B. 1994 Ontogenetic comparisons of arbuscular mycorrhizal fungi *Scutellospora heterogama* and *Scutellospora pellucida*: revision of taxonomic character concepts, species descriptions and phylogenetic hypothesis. *Canadian Journal of Botany* 72: 122 - 134

Franke T. 2002 The myco-heterotrophic *Voyria flavescens* (Gentianaceae) and its associated fungus. *Mycological Progress* 1: 367 - 376

Franke T., Beenken L., Döring M., Kocyan A., Agerer R. 2006 Arbuscular mycorrhizal fungi of the Glomus-group A lineage (Glomerales; Glomeromycota) detected in myco-heterotrophic plants from tropical Africa. *Mycological Progress* 5: 24 - 31

Franken P. 2012 The plant strengthening root endophyte *Piriformospora indica*: potential application and the biology behind. *Applied microbiology and biotechnology* 96: 1455 - 1464

Frean M. R., Abraham E. R. 2004 Adaptation and enslavement in endosymbiont-host associations. *Physical Review E* 69: 051913.

Freire-Fierro, A. 2015 Systematics of *Monnina*. PhD-Thesis. Drexel University. Published by ProQuest LLC

Friese C. F., Allen M. F. 1991 The spread of VA mycorrhizal fungal hyphae in the soil: inoculum types and external hyphal architecture. *Mycologia* 409 - 418

Fuchs A., Ziegenspeck H. 1924. V. Die Pilzverdauung der Orchideen. Aus der Monographie des Orchis Traunsteineri Saut 193 - 206

Fuchs A., Ziegenspeck H. 1925 Bau und Form der Wurzeln der einheimischen Orchideen in Hinblick auf ihre Aufgaben. *Botanisches Archiv. Zeitschrift für die gesamte Botanik*. Verlag des Repertorium, Dahlem bei Berlin, Fabeckstraße Nr. 49

Furman T. E., Trappe J.M. 1971 Phylogeny and Ecology of Mycotrophic Achlorophyllous Angiosperms. *Quarterly Review of Biology*. 46: 219 - 225

- Gallaud I. 1905.** Etudes sur les mycorhizes endotrophes. *Revue Générale de Botanique*. 17: 7 - 48, 66 - 85, 123 - 136, 223 - 239, 313 - 325, 423 - 433
- Gamper, H. A., Walker, C., & Schüßler, A. (2009).** *Diversispora celata* sp. nov: molecular ecology and phylotaxonomy of an inconspicuous arbuscular mycorrhizal fungus *New Phytologist* 182: 495 - 506
- Gandolfi A., Sanders I. R., Rossi V., Menozzi P. 2003** Evidence of recombination in putative ancient asexuals. *Molecular Biology and Evolution* 20: 754 – 761
- García-Garrido J. M., Rejon-Palomares A., Ocampo J. A., García-Romera I. 1999** Effect of xyloglucan and xyloglucanase activity on the development of the arbuscular mycorrhizal *Glomus mosseae*. *Mycological research* 103: 882 - 886
- García-Romera I., Garcia-Garrido J. M., Martinez-Molina E., Ocampo J. A. 1990** Possible influence of hydrolytic enzymes on vesicular arbuscular mycorrhizal infection of alfalfa. *Soil Biology and Biochemistry* 22: 149 - 152
- García-Romera I., Garcia-Garrido J. M., Martinez-Molina E., Ocampo J. A. 1991** Production of pectolytic enzymes in lettuce root colonized by *Glomus mosseae*. *Soil Biology and Biochemistry* 23: 597 - 601
- Garcia K., Zimmermann S. D. 2014** The role of mycorrhizal associations in plant potassium nutrition. *Frontiers in plant science*, 5: 337
- Garcia K., Doidy J., Zimmermann S. D., Wipf D., Courty P. E. 2016** Take a trip through the plant and fungal transportome of mycorrhiza. *Trends in plant science* 21: 937 - 950
- García de León D., Moora M., Öpik M., Neuenkamp L., Gerz M., Jairus T., Vasar M., Bueno C. G., Davison J., Zobel M. 2016.** Symbiont dynamics during ecosystem succession: co-occurring plant and arbuscular mycorrhizal fungal communities. *FEMS microbiology ecology* 92 (7)
- Gebauer G., Meyer M. 2003** 15N and 13C natural abundance of autotrophic and myco heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytologist* 160: 209 - 223
- Gebauer G., Preiss K., Gebauer A. C. 2016** Partial mycoheterotrophy is more widespread among orchids than previously assumed. *New Phytologist* 211: 11 - 15
- Gehrig H., Schüßler A., Kluge M. 1996** *Geosiphon pyriforme*, a fungus forming endocytobiosis with *Nostoc* (Cyanobacteria), is an ancestral member of the glomales: Evidence by SSU rRNA Analysis. *Journal of Molecular Evolution* 43: 71 – 81
- Genre A., Chabaud M., Timmers T., Bonfante P., Barker D. G. 2005** Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *The Plant Cell* 17: 3489 - 3499
- Genre A., Chabaud M., Faccio A., Barker D. G., Bonfante P. 2008** Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *The Plant Cell* 20: 1407 - 1420
- Genre A., Chabaud M., Balzergue C., Puech Pagès V., Novero M., Rey T., ... & Barker D. G. 2013** Short chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytologist* 198: 190 - 202
- Genre A., Bonfante P. 2016** The structure of arbuscular mycorrhizas: A cell biologist's view. In: Martin F. (ed.) 2017 *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. pp. 33 - 46, Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Genre A., Russo G. 2016** Does a common pathway transduce symbiotic signals in plant-microbe interactions? *Frontiers in plant science* 7: 96
- Gerdemann J. W. 1965.** Vesicular-arbuscular mycorrhizae formed on maize and tuliptree by *Endogone fasciculata*. *Mycologia* 57: 562 - 575
- Gerdemann, J. W. 1971** Fungi that form the vesicular-arbuscular type of endomycorrhiza. In: *Mycorrhizae, Proceedings of*

the first north American conference on mycorrhizae. Vol. 1189: 9 - 18, USDA Miscellaneous Publications

Gerdemann J. W., Trappe J. M. 1974 The endogonaceae in the Pacific Northwest. Mycologia Memoirs. No. 5

Gerdemann J.W., Trappe J.M. 1975 Taxonomy of the Endogonaceae. In: Sanders F. E., Mosse B., Tinker P. B. (eds.) Endomycorrhizas. pp. 35 - 51, Academic Press, London, UK

Gianinazzi S., Gianinazzi Pearson V., Dexheimer J. 1979 Enzymatic studies on the metabolism of vesicular arbuscular mycorrhiza. III. Ultrastructural localization of acid and alkaline phosphatase in onion roots infected by *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.). New Phytologist 82: 127 - 132

Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. 1988 Morphological integration and functional compatibility between symbionts in vesicular arbuscular endomycorrhizal associations. In: Scannerini S., Smith D., Bonfante-Fasolo P., Gianinazzi-Pearson V. (eds.) Cell to Cell Signals in Plant, Animal and Microbial Symbiosis. pp. 73 - 84, Springer, Berlin, Heidelberg.

Gianinazzi Pearson V., Smith S. E., Gianinazzi S., Smith F. A. 1991 Enzymatic studies on the metabolism of vesicular - arbuscular mycorrhizas: V. Is H⁺ATPase a component of ATP hydrolysing enzyme activities in plant—fungus interfaces?. New Phytologist 117: 61 – 74

Gianinazzi S. 1991 Vesicular-arbuscular (endo-) mycorrhizas: cellular, biochemical and genetic aspects. Agriculture, ecosystems & environment 35: 105 - 119

Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S., Guillemin J. P., Trouvelot A., Duc G. 1991 Genetic and cellular analysis of resistance to vesicular arbuscular (VA) mycorrhizal fungi in pea mutants. In: Hennecke H., Verma D.P.S. (eds.) 1991 Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions Vol. 1, pp. 336 – 342. Springer, Dordrecht.

Gianinazzi-Pearson V., Gollotte A., Tisserant B., Franken P., Dumas-Gaudot E., Lemoine M. C., ... & Lherminier J. 1995 Cellular and molecular approaches in the characterization of symbiotic events in functional arbuscular mycorrhizal associations. Canadian Journal of Botany 73: 526 - 532

Gianinazzi-Pearson V. 1996 Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. The Plant Cell 8: 1871

Gianinazzi-Pearson V., Arnould C., Oufattole M., Arango M., Gianinazzi S. 2000 Differential activation of H⁺-ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco. Planta 211: 609 – 613

Gilbert L., Johnson D. 2017 Plant-Plant Communication Through Common Mycorrhizal Networks. In: Becard G. (ed.) Advances in Botanical Research. Vol. 82 Academic Press.

Giovannetti M., Hepper C. M. 1985 Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in *Hedysarum coronarium* and *Onobrychis viciaefolia*: host-endophyte specificity. Soil biology & biochemistry 17: 899 - 900

Giovannetti M., Avio L., Sbrana C., Citernesi A. S. 1993a Factors affecting appressorium development in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe. New Phytologist 123: 115 - 122

Giovannetti M., Sbrana C., Avio L., Citernesi A. S., Logi C. 1993b Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre infection stages. New Phytologist 125: 587 - 593

Giovannetti M., Sbrana C. 1998 Meeting a non-host: the behaviour of AM fungi. Mycorrhiza 8: 123 - 130

Giovannetti M., Azzolini D., Citernesi A. S. 1999 Anastomosis formation and nuclear and protoplasmic exchange in arbuscular mycorrhizal fungi. Applied and Environmental Microbiology, 65: 5571 - 5575

Giovannetti M., Fortuna P., Citernesi A. S., Morini S., Nuti M. P. 2001 The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. New Phytologist 15: 717 - 724

Giovannetti M, Sbrana C, Strani P, Agnolucci M, Rinaudo V, Avio L. 2003 Genetic diversity of isolates of *Glomus mosseae* from different geographic areas detected by vegetative compatibility testing and biochemical and molecular analysis. Applied and Environmental Microbiology 69: 616 - 624

Giri B., Saxena B. 2017 Response of Arbuscular Mycorrhizal Fungi to Global Climate Change and Their Role in Terrestrial

Ecosystem C and N Cycling. In: Varma A., Prasad R., Tuteja N. (eds.) Mycorrhiza-Function, Diversity, State of the Art. pp. 305 - 327, Springer International Publishing.

Girlanda M., Selosse M.-A., Cafasso D., Brilli F., Delfine S., Fabbian R., Ghignone S., Pinelli P., Segreto R., Loreto F., Cozzolino S., Perotto S. 2006. Inefficient photosynthesis in the mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. *Molecular Ecology* 15: 491 - 504

Girlanda M., Segreto R. Cafasso D., Liebel H. T., Rodda M., Ercole E., Cozzolino S., Gebauer G., Perotto S. 2011. Photosynthetic mediterranean meadow orchids feature mycoheterotrophy and specific mycorrhizal associations. *American Journal of Botany* 98: 1148 - 1163

Glassop D., Smith S. E., Smith F. W. 2005 Cereal phosphate transporters associated with the mycorrhizal pathway of phosphate uptake into roots. *Planta* 222: 688 - 698

Gobbato E., Marsh J. F., Vernié T., Wang E., Maillet F., Kim J., ... & Mysore K. S. 2012 A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling. *Current Biology* 22: 2236 – 2241

Goldberg A. 1986 Classification, evolution, and phylogeny, of the families of the dicotyledons. *Smithsonian Contributions to Botany* 58:1 - 314

Goldblatt P., Rodriguez A., Powell M. P., Davies J. T., Manning J. C., Van der Bank M., Savolainen V. 2008 Iridaceae/out of Australasia? Phylogeny, biogeography, and divergence time based on plastid DNA sequences. *Systematic Botany*, 33: 495 - 508

Gollotte A., Van Tuinen D., Atkinson D. 2004 Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza* 14: 111 - 117

Gomes S. I., Aguirre Gutiérrez J., Bidartondo M. I., Merckx V. S. 2017 Arbuscular mycorrhizal interactions of mycoheterotrophic *Thismia* are more specialized than in autotrophic plants. *New Phytologist* 213: 1418 - 1427

Gomes S. I., van Bodegom P. M., Merckx V. S., Soudzilovskaia N. A. 2019a Global distribution patterns of mycoheterotrophy. *Global Ecology and Biogeography*. 1 – 13 (Advance online publication)

Gomes S. I., van Bodegom P. M., Merckx V. S., Soudzilovskaia N. A. 2019b Environmental drivers for cheaters of arbuscular mycorrhizal symbiosis in tropical rainforests. *New Phytologist*. (Advance online publication)

Gomez-Ariza J., Balestrini R., Novero M., Bonfante P. 2009 Cell-specific gene expression of phosphate transporters in mycorrhizal tomato roots. *Biology and Fertility of Soils* 45: 845 - 853

Gonneau C., Jersakova J., de Tredern E., Till-Bottraud I., Saarinen K., Sauve M., Roy M., Hajek T., Selosse M.-A. 2014 Photosynthesis in perennial mixotrophic *Epipactis* spp. (Orchidaceae) contributes more to shoot and fruit biomass than to hypogeous survival. *Journal of Ecology* 102: 1183 - 1194

Gonzalez-Chavez M. C., Carrillo-Gonzalez R., Wright S. F., Nichols K. A. 2004 The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental pollution* 130: 317 - 323

González-Guerrero, M., Benabdellah, K., Ferrol, N., & Azcón-Aguilar, C. 2009 Mechanisms underlying heavy metal tolerance in arbuscular mycorrhizas. In: Azcón-Aguilar C., Barea J. M., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. (eds.) *Mycorrhizas-Functional Processes and Ecological Impact*. Springer, Berlin, Heidelberg.

Gough C., Bécard G. 2016 Strigolactones and lipo-chitooligosaccharides as molecular communication signals in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. In: Martin F. (ed.) 2017. *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. pp. 107 - 124. Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey

Govindarajulu M., Pfeffer P. E., Jin H., Abubaker J., Douds D. D., Allen J. W., ... & Shachar-Hill, Y. 2005 Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* 435: 819 - 823

Graham S. W., Lam V. K., Merckx V. S. 2017 Plastomes on the edge: the evolutionary breakdown of mycoheterotroph plastid genomes. *New Phytologist* 214: 48 - 55

- Grelet G.-A, Johnson D., Vrålstad T., Alexander I. J., Anderson I. C. 2010.** New insights into the mycorrhizal *Rhizoscyphus ericae* aggregat: spatial structure and co-colonization of ectomycorrhizal and ericoid roots. *New Phytologist* 188: 210 - 222
- Grelet G., Martino E., Dickie I. A., Tajuddin R., Artz R. 2016** Ecology of ericoid mycorrhizal fungi: What insight have we gained with molecular tools and what's missing?. In Martin F. (ed.) 2017 *Molecular Mycorrhizal Symbiosis* 405 – 419. Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey
- Greuner F. 2015** Mykorrhizastrukturen bei *Erica tetralix* und *Calluna vulgaris* (Ericaceae). Staatsexamensarbeit, Philipps-Universität Marburg, FB Biologie, Abteilung Spezielle Botanik, AG Imhof.
- Gray L. E., Gerdemann J.W. 1976.** Influence of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizas on the uptake of Phosphorus-32 by *Liriodendron tulipifera* and *Liquidambar styraciflua*. *Nature* 7: 106 - 107
- Grime J. P., Mackey J. M. L., Hillier S. H., Read D. J. 1987** Floristic diversity in a model system using experimental microcosms. *Nature* 328: 420
- Groom P. 1895a** Contributions to the knowledge of monocotyledonous saprophytes. *Journal of the Linnean Society of London* 31: 149 - 215
- Groom P. 1895b** On a new Saprophytic Monocotyledon. *Annals of Botany* 9: 45 - 58
- Guether M., Neuhauser B., Balestrini R., Dynowski M., Ludewig U., Bonfante P. 2009** A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology* 150: 73 - 83
- Gutjahr C., Novero M., Guether M., Montanari O., Udvardi M., Bonfante P. 2009** Presymbiotic factors released by the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* induce starch accumulation in *Lotus japonicus* roots. *New Phytologist* 183: 53 - 61
- Gutjahr C., Parniske M. 2013** Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 29: 593 - 617
- Gutjahr C. 2014** Phytohormone signaling in arbuscular mycorrhiza development. *Current opinion in plant biology* 20: 26 - 34
- Gutjahr C., Parniske M. 2017** Cell biology: control of partner lifetime in a plant-fungus relationship. *Current Biology* 27: R420 - R423
- Guttenberger M. 1998** Apoplastic pH in VA mycorrhizas. The periarbuscular space as an acidic compartment. Abstracts of the workshop 'Methods for studying the physiology of nutrient transport in arbuscular mycorrhizas'. COSR Action 821/ICOM-2, Uppsala, Sweden.
- Hadley G. 1969** Cellulose as a carbon source for orchid mycorrhiza. *New Phytologist* 68: 933 - 939
- Hadley G. 1970.** Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. *New Phytologist* 69: 1015 - 1025
- Hadley G., Williamson B. 1971.** Analysis of the post-infection growth stimulus in orchid mycorrhiza. *New Phytologist*. 70: 445 - 455
- Hadley G., Johnson R. P. C., John D. A. 1971.** Fine Structure of the host-fungus-interface in orchid Mmcorrhiza. *Planta*. 100: 191 - 199
- Hadley G., Purves S. 1974** Movement of ¹⁴carbon from host to fungus in orchid mycorrhiza. *New Phytologist* 73: 475 - 482
- Halary S., Malik S. B., Lildhar L., Slamovits C. H., Hijri M., Corradi N. 2011** Conserved meiotic machinery in *Glomus* spp., a putatively ancient asexual fungal lineage. *Genome Biology and Evolution* 3: 950 - 958
- Halary S., Daubois L., Terrat Y., Ellenberger S., Wöstemeyer J., Hijri M. 2013** Mating type gene homologues and putative sex pheromone-sensing pathway in arbuscular mycorrhizal fungi, a presumably asexual plant root symbiont. *PLoS One* 8: e80729
- Hambleton S., Sigler L. 2005** *Meliniomyces*, a new anamorph genus for root-associated fungi with phylogenetic affinities to

Rhizoscyphus ericae (= *Hymenoscyphus ericae*), Leotiomycetes. *Studies in Mycology* 53: 1 - 27

Hammer E. C., Pallon J., Wallander H., Olsson P. A. 2011 Tit for tat? A mycorrhizal fungus accumulates phosphorus under low plant carbon availability. *FEMS Microbiology Ecology* 76: 236 - 244

Harper C. J., Taylor T. N., Krings M., Taylor E. L. 2013 Mycorrhizal symbiosis in the Paleozoic seed fern *Glossopteris* from Antarctica. *Review of Palaeobotany and Palynology* 192: 22 - 31

Harrison M. J., Van Buuren M. L. 1995 A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378: 626 - 629

Harrison M. J. 1996 A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *The Plant Journal* 9: 491 - 503

Harrison M. J. 1999 Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual review of plant biology* 50: 361 - 389

Harrison M. J., Dewbre G. R., Liu J. 2002 A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *The Plant Cell* 14: 2413 - 2429

Harrison M. J. 2012 Cellular programs for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current opinion in plant biology* 15: 691 - 698

Hashimoto Y., Fukukawa S., Kunishi A., Suga H., Richard F., Sauve M., Selosse M. A. 2012 Mycoheterotrophic germination of *Pyrola asarifolia* dust seeds reveals convergences with germination in orchids. *New Phytologist* 195: 620 - 630

Hart M. M., Reader R. J., Klironomos J. N. 2001 Life-history strategies of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to their successional dynamics. *Mycologia* 1186 - 1194

Hart M. M., Klironomos J. N. 2003 Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and ecosystem functioning. In: Van der Heijden M. G. A., Sanders I. R. (eds.) 2003 *Mycorrhizal ecology*, pp. 225 - 242. Springer, Berlin, Heidelberg.

Hartig T. 1840 *Vollständige Naturgeschichte der forstlichen Culturpflanzen Deutschlands*. Förstner'sche Verlagsbuchhandlung, Berlin

Hartnett D. C., Wilson G. W. 1999 Mycorrhizae influence plant community structure and diversity in tallgrass prairie. *Ecology* 80: 1187 - 1195

Haugen L. M., Smith S. E. 1992 The effect of high temperature and fallow period on infection of mung bean and cashew roots by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Plant and Soil* 145: 71 - 80

Hause B., Fester T. 2005 Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta* 221: 184 - 196

Hayashi T., Banba M., Shimoda Y., Kouchi H., Hayashi M., Imaizumi Anraku H. 2010 A dominant function of CCaMK in intracellular accommodation of bacterial and fungal endosymbionts. *The Plant Journal* 63: 141 - 154

Hawkins, J.A., 2002. Evolutionary developmental biology: impact on systematic theory and practise, and the contribution of systematics. In: Cronk, Q.C.B., Bateman, R.M., Hawkins, J.A. (Eds), *Developmental Genetics and Plant Evolution*. pp. 32 - 51, Taylor & Francis, London

Van der Heijden M. G., Boller T., Wiemken A., Sanders I. R. 1998a Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology* 79: 2082 - 2091

Van der Heijden M. G., Klironomos J. N., Ursic M., Moutoglis P., Streitwolf-Engel R., Boller T., ...& Sanders I. R. 1998b Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69 - 72

Van der Heijden M. G., Wiemken A., Sanders I. R. 2003 Different arbuscular mycorrhizal fungi alter coexistence and resource distribution between co-occurring plant. *New Phytologist* 157: 569 - 578

Van der Heijden M. G. 2004 Arbuscular mycorrhizal fungi as support systems for seedling establishment in grassland. *Ecology letters* 7: 293 - 303

Van der Heijden M. G., Streitwolf Engel R., Riedl R., Siegrist S., Neudecker A., Ineichen K., ... & Sanders I. R. 2006 The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New*

- Van der Heijden M. G., Horton T. R. 2009** Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *Journal of Ecology* 97: 1139 - 1150
- Van der Heijden, M. G. Martin, F. M. Selosse, M. A., Sanders I. R. 2015** Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist* 205: 1406 - 1423
- Heinricher 1900/01** Unsere heimischen *Polygala*-Arten sind keine Parasiten. *Berichte der naturwissenschaftlich-medizinischen Vereins in Innsbruck*. XXVI
- Helber N., Requena N. 2008** Expression of the fluorescence markers DsRed and GFP fused to a nuclear localization signal in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 177: 537 - 548
- Helber N., Wippel K., Sauer N., Schaarschmidt S., Hause B., Requena N. 2011** A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp is crucial for the symbiotic relationship with plants. *The Plant Cell* 23: 3812 - 3823
- Helgason T., Daniell T. J., Husband R., Fitter A. H., Young J. P. W. 1998** Ploughing up the wood-wide web?. *Nature* 394: 431 - 431
- Helgason T., Fitter A. H., Young J. P. W. 1999** Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising *Hyacinthoides non scripta* (bluebell) in a seminatural woodland. *Molecular ecology* 8: 659 - 666
- Helgason T., Merryweather J. W., Denison J., Wilson P., Young J. P. W., Fitter, A. H. 2002** Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology* 90: 371 - 384
- Helgason T., Watson I. J., Young J. P. W. 2003** Phylogeny of the Glomerales and Diversisporales (Fungi: Glomeromycota) from actin and elongation factor 1 alpha sequences. *FEMS Microbiology Letters* 229: 127 - 132
- Helgason T., Fitter A. 2005** The ecology and evolution of the arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologist* 19: 96 - 101
- Helgason T., Merryweather J. W., Young J. P. W., Fitter A. H. 2007** Specificity and resilience in the arbuscular mycorrhizal fungi of a natural woodland community. *Journal of Ecology* 95: 623 - 630
- Helgason T., & Fitter A. H. 2009** Natural selection and the evolutionary ecology of the arbuscular mycorrhizal fungi (Phylum Glomeromycota). *Journal of experimental botany* 60: 2465 - 2480
- Hempel S., Renker C., Buscot F. 2007** Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spore, root and soil communities in a grassland ecosystem. *Environmental Microbiology* 9: 1930 - 1938
- Henderson M. W. 1919** A comparative study of the structure and saprophytism of the Pyrolaceae and Monotropaceae with reference to their derivation from the Ericaceae. *Contributions from the Botanical Laboratory of the University of Pennsylvania* 5: 42 – 109, University of Pennsylvania Philadelphia
- Hetrick B. A. D., Wilson G. W. T., Todd T. C. 1996** Mycorrhizal response in wheat cultivars: relationship to phosphorus. *Canadian Journal of Botany* 74: 19 - 25
- Heymons S. 1985** Vergleichende Untersuchungen zur Morphologie, Anatomie und Phytochemie an mycotrophen und nichtmycotrophen Gentianaceen. *Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg*
- Heymons S. 1989** Untersuchungen zur Vesikulär-Arbuskulären Mycorrhiza bei *Gentiana lutea* L. (Gentianaceae). *Dissertation Phillips-Universität Marburg*.
- Hibbett D. S., Binder M., Bischoff J. F., Blackwell M., Cannon P. F., Eriksson O. E., ... & Lumbsch H. T. 2007** A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research* 111: 509 - 547
- Hiiesalu I., Pärtel M., Davison J., Gerhold P., Metsis M., Moora M., ... & Wilson S. D. 2014** Species richness of arbuscular mycorrhizal fungi: associations with grassland plant richness and biomass. *New Phytologist* 203: 233 - 244
- Hijri M., Sanders I. R. 2005** Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different

nuclei. *Nature* 433: 160

Hirsch A. M., Lum M. R., Downie J. A. 2001 What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiology* 127: 1484 - 1492

Ho I., Trappe. J. M. 1973 Translocation of ¹⁴C from *Festuca* plants to their endomycorrhizal fungi. *Nature, New Biology* 244: 30 - 31

Hobbie E. A., Macko S. A., Shugart H. H. 1999 Insights into nitrogen and carbon dynamics of ectomycorrhizal and saprotrophic fungi from isotopic evidence. *Oecologia* 118: 353 - 360

Hobbie E. A. 2006 Carbon allocation to ectomycorrhizal fungi correlates with belowground allocation in culture studies. *Ecology* 87: 563 - 569

Hobbie E. A., Högberg P. 2012 Nitrogen isotopes link mycorrhizal fungi and plants to nitrogen dynamics. *New Phytologist* 196: 367 - 382

Hodge A., Helgason T., Fitter A. H. 2010 Nutritional ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Ecology* 3: 267 - 273

Hoeksema J. D. 1999 Investigating the disparity in host specificity between AM and EM fungi: lessons from theory and better-studied systems. *Oikos* 327 - 332

Horn S., Hempel S., Verbruggen E., Rillig M. C. 2017 Linking the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi and plants: a story of interdependence? *The ISME Journal* 11: 1400

Horton T. R. (ed.) 2015 Mycorrhizal networks. Dordrecht, Netherlands, Springer.

Howell G. J., Slater A. T., Knox R. B. 1993 Secondary pollen presentation in angiosperms and its biological significance. *Australian Journal of Botany* 41: 417 - 438

Huang T. 1980 Miocene palynomorphs of Taiwan, V. Angiosperm grains. *Taiwania* 25: 57 - 103

Humphreys C. P., Franks P. J., Rees M., Bidartondo M. I., Leake J. R., Beerling D. J. 2010 Mutualistic mycorrhiza-like symbiosis in the most ancient group of land plants. *Nature communications* 1: 103

Husband R., Herre E. A., Turner S. L., Gallery R., Young J. P. W. 2002a Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and patterns of host association over time and space in a tropical forest. *Molecular Ecology* 11: 2669 - 2678

Husband R., Herre E. A., Young J. P. W. 2002b Temporal variation in the arbuscular mycorrhizal communities colonising seedlings in a tropical forest. *FEMS Microbiology Ecology* 42: 131 - 136

Hutchinson J. 1967 Polygalaceae. *The Genera of Flowering Plants* 2. pp. 336 – 344, Oxford: Clarendon Press

Hynson N. A., Bruns T. D. 2009 Evidence of a myco-heterotroph in the plant family Ericaceae that lacks mycorrhizal specificity. *Proceedings of the Royal Society of London B* 276: 4053 - 4059

Hynson N. A., Preiss K., Gebauer G. 2009a Is it better to give than to receive? A stable isotope perspective on orchid-fungal carbon transport in the green orchid species *Goodyera repens* and *Goodyera oblongifolia*. *New Phytologist* 182: 8 - 11

Hynson N. A., Preiss K., Gebauer G., Bruns T. D. 2009b Isotopic evidence of full and partial myco heterotrophy in the plant tribe Pyroleae (Ericaceae). *New Phytologist* 182: 719 - 726

Hynson N. A., Bruns T. D. 2010 Fungal hosts for mycoheterotrophic plants: a nonexclusive, but highly selective club. *New Phytologist* 185: 598 - 601

Hynson N. A., Madsen T. P., Selosse M. A., Adam I. K., Ogura-Tsujita Y., Roy M., Gebauer G. 2013 The physiological ecology of mycoheterotrophy. In: Merckx V.S.F. (ed.) 2013 *Mycoheterotrophy*. pp. 297 - 342, Springer New York

Imhof S. 1997 Root anatomy and mycotrophy of the achlorophyllous *Voyria tenella* Hook.(Gentianaceae). *Plant Biology* 110: 298 - 305

Imhof S., Weber H. C. 1997 Root anatomy and mycotrophy (AM) of the achlorophyllous *Voyria truncata* (Standley) Standley & Steyermark (Gentianaceae). *Botanica Acta* 110: 127 – 134

- Imhof S. 1998** Subterranean structures and mycotrophy of the achlorophyllous *Triuris hyalina* (Triuridaceae). Canadian Journal of Botany 76: 2011 - 2019
- Imhof 1999** Root morphology, anatomy and mycotrophy of the achlorophyllous *Voyria aphylla* (Jacq.) Pers. (Gentianaceae). Mycorrhiza 9: 33 - 39
- Imhof S., Weber H. C. 2000** Root structures and mycorrhiza of the achlorophyllous *Voyria obconica* Progel (Gentianaceae). Symbiosis 29: 201 – 212
- Imhof S. 2003** A dorsiventral mycorrhizal root in the achlorophyllous *Sciaphila polygyna* (Triuridaceae). Mycorrhiza 13: 327 - 332
- Imhof S. 2006** Two distinct fungi colonize roots and rhizomes of the myco-heterotrophic *Afrothismia gesnerioides* (Burmanniaceae). Botany 84: 852 - 861
- Imhof S. 2007** Specialized mycorrhizal colonization pattern in achlorophyllous *Epirixanthes* spp.(Polygalaceae). Plant Biology: 9: 786-792.
- Imhof S. 2008** Are Monocots particularly suited to develop mycoheterotrophy? Diversity, phylogeny, and evolution in the Monocotyledons. Aarhus University Press, Aarhus, Denmark: 11 - 23
- Imhof S. 2009** Arbuscular, ecto-related, orchid mycorrhizas - three independent structural lineages towards mycoheterotrophy: implications for classification? Mycorrhiza 19: 357 - 363
- Imhof S., Massicotte H. B., Melville L. H., Peterson R. L. 2013** Subterranean morphology and mycorrhizal structures. In: Merckx V. S. F. T. (ed.) 2013 Mycoheterotrophy - The Biology of Plants Living on Fungi. pp. 157 – 214, Springer New York
- James T. Y., Kauff F., Schoch C. L., Matheny P. B., Hofstetter V., Cox C. J., ... & Lumbsch H. T. 2006.** Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. Nature 443: 818 - 822.
- Jackson A. P. 2004** A reconciliation analysis of host switching in plant-fungal symbioses. Evolution 58: 1909 - 1923
- Jacquelinet-Jeanmougin S., Gianinazzi Pearson V. 1983** Endomycorrhizas in the Gentianaceae. New Phytologist 95: 663 - 666
- Jacquemyn H., Honnay O., Cammue B., Brys R., Lievens B. 2010** Low specificity and nested subset structure characterize mycorrhizal associations in five closely related species of the genus *Orchis*. Molecular Ecology 19: 4086 - 4095
- Janse J. M. 1897** Les endophytes radicaux de quelques plantes Javanaise. Annales du Jardin botanique de Buitenzorg 14: 53 - 201
- Jany J. L., Pawlowska T. E. 2010** Multinucleate spores contribute to evolutionary longevity of asexual Glomeromycota. The American Naturalist 175: 424 - 435
- Jauch B. 1918** Quelques points de l'anatomie et de la biologie des Polygalacées. Bulletin de la Société botanique de Genève. 10: 47 - 84
- Javot H., Penmetsa R. V., Terzaghi N., Cook D. R., Harrison M. J. 2007** A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences 104: 1720 - 1725
- Javot H., Penmetsa R. V., Breuillin F., Bhattarai K. K., Noar R. D., Gomez S. K., ... & Harrison M. J. 2011** *Medicago truncatula* mtp4 mutants reveal a role for nitrogen in the regulation of arbuscule degeneration in arbuscular mycorrhizal symbiosis. The Plant Journal 68: 954 - 965
- Jennings, A. V., Hanna H. 1898** *Corallorhiza innata* R. Br., and its Mycorrhiza. Royal Dublin Society.
- Jin H., Pfeffer P. E., Douds D. D., Piotrowski E., Lammers P. J., Shachar Hill Y. 2005** The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. New Phytologist 168: 687 - 696
- Johansen A., Finlay R. D., Olsson P. A. 1996** Nitrogen metabolism of external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. New Phytologist 133: 705 - 712

- Johansson V. A., Mikusinska A., Ekblad A., Eriksson O. 2015** Partial mycoheterotrophy in Pyroleae: nitrogen and carbon stable isotope signatures during development from seedling to adult. *Oecologia* 177: 203 - 211
- Johnson N. C., Graham J. H., Smith F. A. 1997** Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New phytologist* 135: 575 - 585
- Johnson N. C. 2010** Resource stoichiometry elucidates the structure and function of arbuscular mycorrhizas across scales. *New Phytologist* 185: 631 - 647
- Johnson N. C., Wilson G. W., Bowker M. A., Wilson J. A., Miller R. M. 2010** Resource limitation is a driver of local adaptation in mycorrhizal symbioses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 2093 - 2098
- Johow F. 1885** Die chlorophyllfreien Humusbewohner West-Indiens, biologisch-morphologisch dargestellt. *Jahrbücher für wissenschaftlichen Botanik* 16: 415 - 449
- Johow F. 1889** Die chlorophyllfreien Humuspflanzen nach ihren biologischen und anatomisch-entwicklungs-geschichtlichen Verhältnissen. *Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik* 20: 475 - 525
- Jones F. R. 1924** A mycorrhizal fungus in the roots of legumes and some other plants. *Journal of Agricultural Research* 29: 459 - 470
- Jones M. D., Smith S. E. 2004** Exploring functional definitions of mycorrhizas: are mycorrhizas always mutualisms? *Canadian Journal of Botany* 82: 1089 - 1109
- Jonsson L., Nylund J. E. 1979** *Favolaschia dybowskyana* (Singer) Singer (Aphyllophorales), a new orchid mycorrhizal fungus from tropical Africa. *New Phytologist* 83: 121 - 128
- Julou T., Burghardt B., Gebauer G., Berveiller D., Damesin C., Selosse, M. A. 2005** Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytologist* 166: 639 - 653
- Jumpponen A. R. I., Trappe J. M. 1998** Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *The New Phytologist* 140: 295 - 310
- Juniper B. E., Robins R. J., Joel D. M. 1989** The carnivorous plants. pp. 512 – 513, London, etc.: Academic Press.
- Kamienski F. M. 1881** Die Vegetationsorgane der *Monotropa hypopitys* L. Vorläufige Mittheilung. *Botanische Zeitung* 29: 457 - 461
- Kamienski F. M. 1882** Les organes végétatifs du *Monotropa hypopitys* L.. *Mémoires de la Société nationale des sciences naturelles et mathématiques de Cherbourg* 24: 5 - 40
- Kaldorf M., Ludwig-Müller J. 2000** AM fungi might affect the root morphology of maize by increasing indole 3 butyric acid biosynthesis. *Physiologia Plantarum* 109: 58 - 67
- Karandashov V., Nagy R., Wegmüller S., Amrhein N., Bucher M. 2004** Evolutionary conversation of a phosphate transporter in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101: 6285 - 6290
- Kenrick P., Crane P. R. 1997** The origin and early evolution of plants on land. *Nature* 389: 33 - 39
- Kenrick P., Wellman C. H., Schneider H., Edgecombe G. D. 2012** A timeline for terrestrialization: consequences for the carbon cycle in the Palaeozoic. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 367: 519 - 536
- Kerner von Marilaun A. 1887** Pflanzenleben, Bd. 1, Verlag des Bibliograph. Instituts, Leipzig.
- Kiernan J. M., Hendrix J. W., Maronek D. M. 1983** Fertilizer-induced pathogenicity of mycorrhizal fungi to sweetgum seedlings. *Soil Biology and Biochemistry* 15: 257 - 262
- Kiers E. T., Van der Heijden M. G. 2006** Mutualistic stability in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: exploring hypotheses of evolutionary cooperation. *Ecology* 87: 1627 - 1636

- Kiers E. T., Duhamel M., Beesetty Y., Mensah J. A., Franken O., Verbruggen E., ... & Palmer T. M. 2011** Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 333: 880 - 882
- Kikuchi G., Higuchi M., Yoshimura H., Morota T., Suzuki A. 2008.** In vitro symbiosis between *Gastrodia elata* Blume (Orchidaceae) and *Armillaria* Kummer (Tricholomataceae) species isolated from the orchid tuber. *Journal of Japanese Botany* 83: 77
- Kikuchi Y., Hijikata N., Yokoyama K., Ohtomo R., Handa Y., Kawaguchi M., ... & Ezawa T. 2014** Polyphosphate accumulation is driven by transcriptome alterations that lead to near synchronous and near equivalent uptake of inorganic cations in an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 204: 638 - 649
- Kikuchi Y., Hijikata N., Ohtomo R., Handa Y., Kawaguchi M., Saito K., ... & Ezawa T. 2016** Aquaporin mediated long distance polyphosphate translocation directed towards the host in arbuscular mycorrhizal symbiosis: application of virus induced gene silencing. *New Phytologist* 211: 1202 - 1208
- Kinden D. A., Brown M. F. 1975a** Electron microscopy of vesicular-arbuscular mycorrhizae of yellow poplar. I. Characterization of endophytic structures by scanning electron stereoscopy. *Canadian journal of microbiology* 21: 989 - 993
- Kinden D. A., Brown M. F. 1975b** Electron microscopy of vesicular-arbuscular mycorrhizae of yellow poplar. II. Intracellular hyphae and vesicles. *Canadian Journal of Microbiology* 21: 1768 - 1780
- Kinden D. A., Brown M. F. 1975c** Electron microscopy of vesicular-arbuscular mycorrhizae of yellow poplar. III. Host-endophyte interactions during arbuscular development. *Canadian journal of microbiology* 21: 1930 - 1939
- Kistner C., Winzer T., Pitzschke A., Mulder L., Sato S., Kaneko T., ... & Szczyglowski K. 2005** Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. *The Plant Cell* 17: 2217 - 2229
- Kivlin S. N., Hawkes C. V., Treseder K. K. 2011** Global diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 2294 – 2303
- Klironomos J. N. 2000** Host-specificity and functional diversity among arbuscular mycorrhizal fungi. *Microbial Biosystems: New Frontiers* 1: 845 - 851
- Klironomos, J. N., & Hart, M. M. 2002** Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. *Mycorrhiza* 12: 181 - 184
- Klironomos J. N. 2003** Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 84: 2292 - 2301
- Kloppholz S., Kuhn H., Requena N. 2011** A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Current Biology* 21: 1204 – 1209
- Knöbel M., Weber H. C. 1988** Vergleichende Untersuchungen zur Mycotrophie bei *Gentiana verna* L. und *Voyria truncata* (Stand.) Stand. & Stey. (Gentianaceae) Beiträge zur rBiologie der Pflanzen 63: 463 - 477
- Koenen E. J. M., Vos J. M., Atchison G. W., Simon M. F., Schrire B. D., de Souza E. R., de Queiroz L. P., Hughes C. E. 2013** Exploring the tempo of species diversification in legumes. *South African Journal of Botany*. 89: 19 – 30
- Koide R. T., Mosse B. 2004** A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza* 14: 145 - 163
- Kosuta S., Chabaud M., Lougnon G., Gough C., Dénarié J., Barker D. G., Bécard G. 2003** A Diffusible Factor from Arbuscular Mycorrhizal Fungi Induces Symbiosis-Specific MtENOD11 Expression in Roots of *Medicago truncatula*. *Plant physiology* 131: 952 - 962
- Kosuta S., Hazledine S., Sun J., Miwa H., Morris R. J., Downie J. A., Oldroyd G. E. 2008** Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105: 9823 - 9828

- Krajinski F., Courty P. E., Sieh D., Franken P., Zhang H., Bucher M., ... & Hause B. 2014** The H⁺-ATPase HA1 of *Medicago truncatula* is essential for phosphate transport and plant growth during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The plant cell* 26: 1808 - 1817
- Krings M., Taylor T. N., Hass H., Kerp H., Dotzler N., Hermsen E. J. 2007a** Fungal endophytes in a 400 million yr old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytologist* 174: 648 - 657
- Krings M., Taylor T. N., Hass H., Kerp H., Dotzler N., Hermsen, E. J. 2007b** An alternative mode of early land plant colonization by putative endomycorrhizal fungi. *Plant signaling & behavior* 2: 125 - 126
- Krings M., Taylor T. N., Taylor E. L., Dotzler N., Walker, C. 2011** Arbuscular mycorrhizal like fungi in Carboniferous arborescent lycopsids. *New Phytologist* 191: 311 - 314
- Köljalg U., Nilsson R. H., Abarenkov K., Tedersoo L., Taylor A. F., Bahram M., ... & Douglas, B. 2013** Towards a unified paradigm for sequence based identification of fungi. *Molecular Ecology* 22: 5271 - 5277
- Koorem K., Tulva I., Davison J., Jairus T., Öpik M., Vasar M., ... & Moora M. 2017** Arbuscular mycorrhizal fungal communities in forest plant roots are simultaneously shaped by host characteristics and canopy-mediated light availability. *Plant and Soil* 410: 259 – 271
- Kottke I., Nebel M. 2005** The evolution of mycorrhiza like associations in liverworts: an update. *New Phytologist* 167: 330 - 334.
- Kottke I., Beiter A., Weiss M., Haug I., Oberwinkler F., Nebel M. 2003** Heterobasidiomycetes form symbiotic associations with hepatic: Jungermanniales have sebacinoid mycobionts while *Aneura pinguis* (Metzgeriales) is associated with a *Tulasnella* species. *Mycological Research* 107: 957 - 968
- Kowalchuk G. A., De Souza F. A., Van Veen J. A. 2002** Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. *Molecular Ecology* 11: 571 - 581
- Kühn K. D., Weber H. C. 1986** Vesicular arbuscular mycorrhiza in *Gentiana asclepiadea* L.(Gentianaceae) on natural habitats. *Angewandte Botanik* (Germany, FR).
- Kuga Y., Sakamoto N., Yurimoto H. 2014.** Stable isotope cellular imaging reveals that both live and degenerating fungal pelotons transfer carbon and nitrogen to orchid protocorms. *New Phytologist*. 202: 594 - 605.
- Kuhn G., Hijri M., Sanders I. R. 2001** Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 414: 745 - 748
- Kuhn H., Küster H., Requena N. 2010** Membrane steroid binding protein 1 induced by a diffusible fungal signal is critical for mycorrhization in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* 185: 716 - 733
- Kuijt J. 1969** The biology of parasitic flowering plants. University of California Press, Berkeley.
- Kusano S., 1911** *Gastrodia elata* and its symbiotic association with *Armillaria mellea*. *Journal of the College of Agriculture, Tokyo Imperial University* 4: 1 - 66
- Krishnamoorthy R., Premalatha N., Karthik M., Anandham R., Senthilkumar M., Gopal N. O., ... & Sa T. 2017** Molecular Markers for the Identification and Diversity Analysis of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF). In: Singh B. P., Gupta V. K. (eds.) *Molecular Markers in Mycology*. Springer International Publishing Switzerland
- Kron K. A., Judd W. S., Stevens P. F., Crayn D. M., Anderberg A. A., Gadek P. A., ... & Luteyn J. L. 2002** Phylogenetic classification of Ericaceae: molecular and morphological evidence. *The Botanical Review* 68: 335 - 423
- Krüger M., Stockinger H., Krüger C., Schübler A. 2009** DNA based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 183: 212 - 223
- Krüger M., Krüger C., Walker C., Stockinger H., Schübler A. 2012** Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist* 193: 970 – 984

- Lack A. J., Kay Q. O. N. 1987** Genetic structure, gene flow and reproductive ecology in sand-dune populations of *Polygala vulgaris*. *Journal of Ecology* 75: 259-276
- Lahrman U., Ding Y., Banhara A., Rath M., Hajirezaei M. R., Döhlemann S., ... & Zuccaro A. 2013** Host-related metabolic cues affect colonization strategies of a root endophyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 13965 - 13970
- Laiho O., Mikola P. 1964** Studies on the effect of some eradicates on mycorrhizal development in forest nurseries.
- Laiho O. 1965** Further studies on the ectendotrophic mycorrhiza.
- Lallemand F., Gaudeul M., Lambourdière J., Matsuda Y., Hashimoto Y., Selosse M. A. 2016** The elusive predisposition to mycoheterotrophy in Ericaceae. *New Phytologist* 212: 314 - 319
- Látalová K., Baláž M. 2010.** Carbon nutrition of mature green orchid *Serapias strictiflora* and its mycorrhizal fungus *Epularhiza* sp.. *Biologia Plantarum* 54: 97 - 104
- Lavin M., Herendeen P. S., Wojciechowski M. F. 2005** Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the Tertiary. *Systematic biology* 54: 575 - 594
- Law R. 1985** Evolution in a mutualistic environment. In: Boucher D. H (ed.) *The Biology of mutualism: Ecology and evolution*. pp. 145 - 170, Oxford University Press
- Leake, J. R. 1994** The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist* 127: 171 – 216
- Leake J. R. 2004** Myco-heterotroph/epiparasitic plant interactions with ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Current opinion in plant biology* 7: 422 - 428
- Leake J. R. 2005** Plants parasitic on fungi: unearthing the fungi in myco-heterotrophs and debunking the 'saprophytic' plant myth. *Mycologist* 19: 113 - 122
- Leake J. R., Cameron D. D., Beerling D. J. 2008** Fungal fidelity in the myco-heterotroph to autotroph life cycle of Lycopodiaceae: a case of parental nurture? *New Phytologist* 177: 572 - 576
- Leake J. R., Cameron D. D. 2010** Physiological ecology of mycoheterotrophy. *New Phytologist* 185: 601 - 605
- Lee J., Lee S., Young J. P. W. 2008** Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 65: 339 - 349
- Lee J., Young J. P. W. 2009** The mitochondrial genome sequence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* isolate 494 and implications for the phylogenetic placement of *Glomus*. *New Phytologist* 183: 200 - 211
- Lee E. H., Eo J. K., Ka K. H., Eom A. H. 2013** Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and their roles in ecosystems. *Mycobiology* 41: 121 - 125
- Lehto T., Zwiazek J. J. 2011** Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review. *Mycorrhiza* 21: 71 - 90
- Leigh J., Hodge A., Fitter A. H. 2009** Arbuscular mycorrhizal fungi can transfer substantial amounts of nitrogen to their host plant from organic material. *New Phytologist* 181: 199 - 207
- Leins P., Erbar C. 2000** Blüte und Frucht. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller), Stuttgart
- Lewis D. H. 1973** Concepts in fungal nutrition and the origin of biotrophy. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 48: 261 - 277
- Li H., Smith S. E., Holloway R. E., Zhu Y., Smith F. A. 2006** Arbuscular mycorrhizal fungi contribute to phosphorus uptake by wheat grown in a phosphorus fixing soil even in the absence of positive growth responses. *New Phytologist* 172: 536 - 543
- Li L. F., Li T., Zhao Z. W. 2007** Differences of arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community between a cultivated land, an old field, and a never-cultivated field in a hot and arid ecosystem of southwest China. *Mycorrhiza* 17: 655 - 665
- Li L. F., Li T., Zhang Y., Zhao Z. W. 2010** Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and their distribution patterns

- related to host plants and habitats in a hot and arid ecosystem, southwest China. *FEMS Microbiology Ecology* 71: 418 - 427
- Li H.-L., Wang W., Mortimer P. E., Li R.-Q., Li D.-Z., Hyde K. D., Xu J.-C., Soltis D. E., Chen Z.-D. 2015** Large-scale phylogenetic analyses reveal multiple gains of actinorhizal nitrogen-fixing symbioses in angiosperms associated with climate change. *Scientific reports* 5: 14023
- Li H.-L., Wang W., Li R.-Q., Zhang J.-B., Sun M., Naeem R., Su J.-X., Xiang X.-G., Mortimer P. E., Li D.-Z., Hyde K. D., Xu J.-C., Soltis D. E., Soltis P. S., Li J., Zhang S.-Z., Wu H., Chen Z.-D., Lu A.-M. 2016** Global versus Chinese perspectives on the phylogeny of the N-fixing clade. <https://www.researchgate.net>
- Liebel H. T., Bidartondo M. I., Preiss K., Segreto R., Stöckel M., Rodda M., Gebauer G. 2010** C and N stable isotope signature reveal constraints to nutritional modes in orchids from the Mediterranean and Macaronesia. *American journal of Botany* 97: 903 – 912
- Lihnell D. 1942** Keimungsversuche mit Pyrolasamen. *Acta Universitatis Upsaliensis*.
- Lin K., Limpens E., Zhang Z., Ivanov S., Saunders D. G., Mu D., ... & Zhou Q. 2014.** Single nucleus genome sequencing reveals high similarity among nuclei of an endomycorrhizal fungus. *PLoS Genetics* 10: e1004078
- Ligrone R., Carafa A., Lumini E., Bianciotto V., Bonfante P., Duckett J. G. 2007** Glomeromycotean associations in liverworts: a molecular, cellular, and taxonomic analysis. *American Journal of Botany* 94: 1756 - 1777
- Liu Z. W., Zhou J., Liu E. D., Peng H. 2010** A molecular phylogeny and a new classification of *Pyrola* (Pyroleae, Ericaceae). *Taxon* 59: 1690 – 1700
- Liu W., Kohlen W., Lillo A., den Camp R. O., Ivanov S., Hartog M., ... & Yang, W. C. 2011** *Strigolactone biosynthesis* in *Medicago truncatula* and rice requires the symbiotic GRAS-type transcription factors NSP1 and NSP2. *The Plant Cell* 23: 3853 - 3865
- Liu Y., Cox C. J., Wang W., Goffinet B. 2014** Mitochondrial phylogenomics of early land plants: Mitigating the effects of saturation, compositional heterogeneity, and codon-usage bias. *Systematic Biology* 63: 862 - 878
- Lohman M. L. 1917** Occurrence of mycorrhiza in Iowa forest plants. *University of Iowa Studies* 11: 33 – 57, Published by the University, Iowa City, Iowa
- Lovelock C. E., Ewel J. J. 2005** Links between tree species, symbiotic fungal diversity and ecosystem functioning in simplified tropical ecosystems. *New Phytologist* 167: 219 - 228
- López-Pedrosa A., González-Guerrero M., Valderas A., Azcón-Aguilar C., Ferrol N. 2006** GintAMT1 encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. *Fungal Genetics and Biology* 43: 102 - 110
- Ludwig-Müller J., Güther M. 2007** Auxins as signals in arbuscular mycorrhiza formation. *Plant signaling & behavior* 2: 194 - 196
- Luginbuehl L., Oldroyd G. E. 2016** Calcium signaling and transcriptional regulation in arbuscular mycorrhizal symbiosis. In: Martin F. (ed.) 2017 *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. pp. 125 - 140, Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Lundeberg G. 1970** Utilisation of various nitrogen sources, in particular bound soil nitrogen, by mycorrhizal fungi. *Studia Forestalia Suecica* Nr. 79
- Luo Z. B., Li K., Gai Y., Göbel C., Wildhagen H., Jiang X., ... & Polle A. 2011** The ectomycorrhizal fungus (*Paxillus involutus*) modulates leaf physiology of poplar towards improved salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 72: 304 - 311
- Luo Z.-B., Wu C., Zhang C., Li H., Lipka U., Polle A. 2014** The role of ectomycorrhiza in heavy metal stress tolerance of host plants. *Environmental and Experimental Botany* 108: 47 - 62

- Lutz R. W., Sjolund R. D. 1973** *Monotropa uniflora*: ultrastructural details of its mycorrhizal habit. *American Journal of Botany*, 339 - 345.
- Maas P. J. M., Rübsamen T. 1986** Monograph Number 40 - Triuridaceae. *Flora Neotropica*. The New York Botanical Garden.
- Maas P. J. M., Maas-Van de Kamer J., Van Benthem J., Snelders H. C. M., Rübsamen T. 1986** *Flora Neotropica* Monographie Nr. 42 - Burmanniaceae. Published by The New York Botanical Garden.
- MacDougal D. T. (1899)** Symbiotic Saprophytism. *Annals of Botany* 8: 1 - 47
- MacDougal D. T., Dufrenoy J. 1944** Mycorrhizal Symbiosis in *Aplectrum*, *Corallorhiza*, and *Pinus*. *Plant Physiology* 19: 440 - 465
- Magallon S., Crane P. R., Herendeen P. S. 1999** Phylogenetic pattern, diversity, and diversification of eudicots. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 297 - 372
- Magnus W. 1900** Studien an der endotrophen Mycorrhiza von *Neottia nidus avis* L. *Jahrbuch der Wissenschaftlichen Botanik* 35: 205 - 272
- Maillet E., Poinot V., Andre O., Puech-Pagès V., Haouy A., Gueunier M., ... & Martinez E. A. 2011** Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 46: 58 - 63
- Maldonado-Mendoza I. E., Dewbre G. R., Harrison M. J. 2001** A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 1140 - 1148
- Maldonado-Mendoza I. E., Dewbre G. R., Blaylock L., Harrison M. J. 2005** Expression of a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene, Mt-XTH1, from *Medicago truncatula* is induced systemically in mycorrhizal roots. *Gene* 345: 191 - 197
- Malloch D. W., Pirozynski K. A., Raven P. H. 1980** Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77: 2113 - 2118
- Manck-Götzenberger, J., & Requena, N. 2016** Arbuscular mycorrhiza symbiosis induces a major transcriptional reprogramming of the potato SWEET sugar transporter family. *Frontiers in plant science* 7: 487
- Mandyam K., Jumpponen A. 2014** Unraveling the dark septate endophyte functions: insights from the *Arabidopsis* model. In: Verma V. C., Gange A. C. (eds.) *Advances in endophytic research*. pp. 115 - 141, Springer, New Delhi.
- Manning J.C., Staden J. Van 1987.** The development and mobilisation of seed reserves in some african orchids. *Australian Journal of Botany*. 33: 343 - 353
- Marcuse M. (1902)** Anatomisch-biologischer Beitrag zur Mykorrhizenfrage. Dissertation, Jena, Germany
- Maremmani A., Bedini S., Matosevic I., Tomei P. E., GioVannetti M. 2003** Type of mycorrhizal associations in two coastal nature reserves of the mediterranean basin. *Mycorrhiza* 13: 33 - 40
- Martin H. A. 1982** Changing Cenozoic barriers and the Australian paleobotanical record. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 69: 625 - 667
- Martin F. 1985** Sur la mycorrhization de *Monotropa hypopithys* par quelques espèces du genre *Tricholoma*. *Bulletin de la Société Mycologique de France* 101: 249 - 256
- Martin F., Gianinazzi Pearson V., Hijri M., Lammers P., Requena N., Sanders I. R., ... & Young J. P. W. 2008** The long hard road to a completed *Glomus intraradices* genome. *New Phytologist* 180: 747 - 750
- Martin F. (ed.) 2017.** *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Martínez-García L. B., Richardson S. J., Tylianakis J. M., Peltzer D. A., Dickie I. A. 2015** Host identity is a dominant

driver of mycorrhizal fungal community composition during ecosystem development. *New Phytologist* 205: 1565 - 1576

Martínez-García L. B., De Deyn G. B., Pugnaire F. I., Kothamasi D., Van der Heijden M. G. 2017 Symbiotic soil fungi enhance ecosystem resilience to climate change. *Global Change Biology* 23: 5228 - 5236

Martos F., Dulormne M., Paillet T., Bonfante P., Faccio A., Fournel J, Dubois M.-P., Selosse M.-A. 2009 Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids. *New Phytologist* 184: 668 - 681

Martos F., Munoz F., Paillet T., Kottke I., Gonneau C., Selosse M. A. 2012 The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. *Molecular Ecology* 21: 5098 - 5109

Marx D. H. 1969 The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59: 153 - 163

Marx C., Dexheimer J., Gianinazzi Pearson V., Gianinazzi S. 1982 Enzymatic studies on the metabolism of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizas. *New Phytologist* 90: 37 - 43

Massicotte H.B., Melville L.H., Peterson R.L. 2005a Structural features of mycorrhizal associations in two members of the Monotropeae, *Monotropa uniflora* and *Pterospora andromedea*. *Mycorrhiza* 15:101 - 110

Massicotte H.B., Melville L.H., Peterson R.L. 2005b Structural characteristics of root-fungal interactions for five ericaceous species in eastern Canada. *2005 Canadian Journal of Botany* 83: 1057 - 1064

Massicotte H. B., Melville L. H., Tackaberry L. E., Peterson R. L. 2008 A comparative study of mycorrhizas in several genera of Pyroleae (Ericaceae) from western Canada. *Botany* 86: 610 - 622

Massicotte H. B., Melville L. H., Peterson R. L., Tackaberry L. E., Luoma D. L. 2010 Structural characteristics of root-fungus associations in two mycoheterotrophic species, *Allotropia virgata* and *Pleuricospora fimbriolata* (Monotropeae), from southwest Oregon, USA. *Mycorrhiza* 20: 391 - 397

McCormick M. K., Jacquemyn H. 2014 What constrains the distribution of orchid populations? *New Phytologist* 202: 392 - 400

McGee P. A. 1985 Lack of spread of endomycorrhizas of *Centaurium* (Gentianaceae). *New phytologist* 101: 451 - 458

McGee P. 1986 Mycorrhizal associations of plant species in a semiarid community. *Australian Journal of Botany* 34: 585 - 593

McGonigle, T. P., Fitter, A. H. 1990 Ecological specificity of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations. *Mycological research* 94: 120 - 122

McKendrick S. L., Leake J. R., Read D. J. 2000 Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. *The New Phytologist* 145: 539 - 548

Van der Meijden R. 1988 Polygalaceae. In: **Van Steenis C.G.G.J., de Wilde W.J.J.O (eds.)** *Flora Malesiana* 10: 455 - 539 Kluwer, Dordrecht, Netherlands

Melin E. 1923 Experimentelle Untersuchungen über die Konstitution und Ökologie der Mykorrhizen von *Pinus sylvestris* L. und *Picea abies* (L.) Karst. *Mykologische Untersuchungen und Berichte* 2: 73 – 331

Melin E., Nilsson H. 1953 Transfer of labelled nitrogen from glutamic acid to pine seedlings through the mycelium of *Boletus variegatus* (Sw.) Fr. *Nature* 171: 134.

- Melville L., Dickson S., Farquhar M. L., Smith S. E., Peterson R. L. 1998** Visualization of mycorrhizal fungal structures in resin embedded tissues with xanthene dyes using laser scanning confocal microscopy. *Canadian journal of botany* 76:174 - 178
- Mennes C. B., Moerland M. S., Rath M., Smets E. F., Merckx V. S. F. T. 2015** Evolution of mycoheterotrophy in Polygalaceae: the case of *Epirixanthes*. *American Journal of Botany* 102: 598 - 608
- Mensah J. A., Koch A. M., Antunes P. M., Kiers E. T., Hart M., Bücking H. 2015** High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi is associated with differences in phosphate and nitrogen uptake and fungal phosphate metabolism. *Mycorrhiza* 25: 533 - 546
- Mensah J. A. 2016** Cooperation and punishment in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: Implications for resource exchange & biological market dynamics. PhD-Thesis. South Dakota State University.
- Merckx V., Schols P., Maas-Van de Kamer H., Maas P., Huysmans S., Smets E. 2006** Phylogeny and evolution of Burmanniaceae (Dioscoreales) based on nuclear and mitochondrial data. *American Journal of Botany* 93: 1684 - 1698
- Merckx V., Bidartondo M. I. 2008** Breakdown and delayed cospeciation in the arbuscular mycorrhizal mutualism. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 275: 1029 – 1035
- Merckx V., Chatrou L. W., Lemaire B., Sainge M. N., Huysmans S., Smets E. F. 2008** Diversification of myco-heterotrophic angiosperms: evidence from Burmanniaceae. *BMC Evolutionary Biology* 8: 178.
- Merckx V., Bakker F. T., Huysmans S., Smets E. 2009a** Bias and conflict in phylogenetic inference of myco-heterotrophic plants: a case study in Thismiaceae. *Cladistics* 25: 64 - 77
- Merckx V., Bidartondo M. I., Hynson N. A. 2009b** Myco-heterotrophy: when fungi host plants. *Annals of Botany* 104: 1255 - 1261
- Merckx V., Freudenstein J. V. 2010** Evolution of mycoheterotrophy in plants: a phylogenetic perspective. *New Phytologist* 185: 605 - 609
- Merckx V., Stöckel M., Fleischmann A., Bruns T. D., Gebauer G. 2010** ¹⁵N and ¹³C natural abundance of two mycoheterotrophic and a putative partially mycoheterotrophic species associated with arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 188: 590 - 596
- Merckx V. S., Janssens S. B., Hynson N. A., Specht C. D., Bruns T. D., Smets, E. F. 2012** Mycoheterotrophic interactions are not limited to a narrow phylogenetic range of arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Ecology* 21: 1524 - 1532
- Merckx V. S. F. T. (ed) 2013 Mycoheterotrophy - an introduction.** In: Merckx V. S. F. T. (ed). 2013 Mycoheterotrophy - The Biology of Plants Living on Fungi. pp. 1 - 13, Springer New York Heidelberg Dordrecht London
- Merckx V. S., Freudenstein J. V., Kissling J., Christenhusz M. J., Stotler R. E., Crandall-Stotler B., ... & Maas P. J. 2013a** Taxonomy and classification. In: Merckx V. S. F. T. (ed). 2013 Mycoheterotrophy - The Biology of Plants Living on Fungi. pp. 19 - 101, Springer New York, Heidelberg, Dordrecht, London
- Merckx V. S. F. T., Smets E. F., Specht C. D. 2013b Biogeography and Conversation.** In: Merckx V. S. F. T. (ed). 2013 Mycoheterotrophy - The Biology of Plants Living on Fungi., pp. 103 - 148, Springer New York Heidelberg Dordrecht London
- Merckx V. S. F. T., Mennes C. B., Peay K. G., Geml J. 2013c** Evolution and Diversification. In: Merckx V. S. F. T. (ed). 2013 Mycoheterotrophy - The Biology of Plants Living on Fungi. pp. 215 - 238, Springer New York Heidelberg Dordrecht

London

- Merckx V. S., Kissling J., Hentrich H., Janssens S. B., Mennes C. B., Specht C. D., Smets E. F. 2013d** Phylogenetic relationships of the mycoheterotrophic genus *Voyria* and the implications for the biogeographic history of Gentianaceae. *American journal of botany* 100: 712 - 721
- Merckx V. S. F. T., Gomes S. I. F., Wapstra M., Hunt C., Steenbeeke G., Mennes C. B., ... & Bidartondo M. 2017** The biogeographical history of the interaction between mycoheterotrophic *Thismia* (Thismiaceae) plants and mycorrhizal Rhizophagus (Glomeraceae) fungi. *Journal of Biogeography* 44: 1869 - 1879
- Merryweather J., Fitter A. 1998a** The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides non-scripta* I. Diversity of fungal taxa. *The New Phytologist* 138: 117 - 129
- Merryweather, J., Fitter A. 1998b** The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides non-scripta* II. Seasonal and spatial patterns of fungal populations. *The New Phytologist* 138: 131 - 142
- Meyer C. P., Paulay G. 2005** DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS biology*, 3: e422
- Mikola P. 1988** Ectendomycorrhiza of conifers. *Silva Fennica* 22: 19 - 27
- Miller M. H., McGonigle T. P., Addy H. D. 1995** Functional ecology of vesicular arbuscular mycorrhizas as influenced by phosphate fertilization and tillage in an agricultural ecosystem. *Critical Reviews in Biotechnology* 15: 241 - 255
- Miller, J. B., Pratap, A., Miyahara, A., Zhou, L., Bornemann, S., Morris, R. J., & Oldroyd, G. E. 2013** Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase is negatively and positively regulated by calcium, providing a mechanism for decoding calcium responses during symbiosis signaling. *The Plant Cell* 25: 5053 - 5066
- Miyata K., Kozaki T., Kouzai Y., Ozawa K., Ishii K., Asamizu E., ... & Akiyama K. 2014** The bifunctional plant receptor, OsCERK1, regulates both chitin-triggered immunity and arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice. *Plant and Cell Physiology* 55: 1864 - 1872
- Modjo H.S., Hendrix J.W. 1986** The mycorrhizal fungus *Glomus macrocarpum* as a cause of tobacco stunt disease. *Phytopathology* 76: 688 - 691
- Molina R., Trappe J. M. 1982** Lack of mycorrhizal specificity by the ericaceous hosts *Arbutus menziesii* and *Arctostaphylos uva-ursi*. *New Phytologist* 90: 495 - 509
- Molina R., Massicotte H., Trappe J. M. 1992** Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: Community-ecological consequences and practical implications. In: Allen M. F. (ed.) 1992 *Mycorrhizal functioning: An integrative plant-fungal process*. pp. 357 - 423, Chapman and Hall, New York
- Montfort C., Küsters G. 1940** Saprophytismus und Photosynthese. I. Biochemie und physiologische Studien an Humus-Orchideen. *Botanisches Archiv - Zeitschrift für die gesamte Botanik*. Band 40: 560 - 633
- Moora M., Öpik M., Sen R., Zobel M. 2004** Native arbuscular mycorrhizal fungal communities differentially influence the seedling performance of rare and common *Pulsatilla* species. *Functional Ecology* 18: 554 - 562
- Moora M., Davison J., Öpik M., Metsis M., Saks Ü., Jairns T., Vasar M., Zobel M. 2014** Anthropogenic land use shapes the composition and phylogenetic structure of soil arbuscular mycorrhizal fungal communities. *FEMS Microbiology Ecology* 90: 609 - 621
- Morgan B. S., Egerton-Warburton L. M. 2017** Barcoded NS31/AML2 primers for sequencing of arbuscular mycorrhizal communities in environmental samples. *Applications in plant sciences* 5: 1700017

- Morton J. B. 1988** Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon* 32: 267 – 324
- Morton J. B. 1990** Species and clones of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes): their role in macro- and microevolutionary processes. *Mycotaxon* 37: 493 - 515
- Morton J. B., Benny G. L. 1990** Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37: 471 - 491
- Morton J. B. 1995** Taxonomic and phylogenetic divergence among five *Scutellospora* species based on comparative developmental sequences. *Mycologia* 127 - 137
- Morton J. B., Bentivenga S. P., Bever J. D. 1995** Discovery, measurement, and interpretation of diversity in arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes). *Canadian Journal of Botany* 73: 25 - 32
- Morton J. B., Redecker D. 2001** Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 181 - 195
- Motomura H., Selosse M.-A., Martos F., Kagawa A., Yukawa T. 2010.** Mycoheterotrophy evolved from mixotrophic ancestors: evidence in *Cymbidium* (Orchidaceae). *Annals of Botany* 106: 573 - 581
- Moscatiello R., Sello S., Novero M., Negro A., Bonfante P., Navazio L. 2014** The intracellular delivery of TAT aequorin reveals calcium mediated sensing of environmental and symbiotic signals by the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *New Phytologist* 203: 1012 - 1020
- Moser B., Kipfer T., Richter S., Egli S., Wohlgenuth T. 2015** Drought resistance of *Pinus sylvestris* seedlings conferred by plastic root architecture rather than ectomycorrhizal colonisation. *Annals of Forest Science* 72: 303 - 309
- Mosse B., Hepper C. 1975** Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. *Physiological Plant Pathology* 5: 215 - 223
- Msiska Z., Morton J. B. 2009** Isolation and sequence analysis of a β -tubulin gene from arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 19: 501
- Muller H. J. 1964** The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1: 2 - 9
- Muller J. 1981** Fossil pollen records of extant angiosperms. *The Botanical Review* 47: 1.
- Muthukumar T., Udaiyan K. 2000** Arbuscular mycorrhizas of plants growing in the western ghats region, southern India. *Mycorrhiza* 9, 297 - 313
- Müller J., Boller T., Wiemken A. 1995** Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant science* 112: 1 - 9
- Müller T., Avolio M., Olivi M., Benjdia M., Rikirsch E., Kasaras A., ... & Wipf D. 2007** Nitrogen transport in the ectomycorrhiza association: the *Hebeloma cylindrosporum* - *Pinus pinaster* model. *Phytochemistry* 68: 41 - 51.
- Nagahashi G., & Douds D. D. 1997** Appressorium formation by AM fungi on isolated cell walls of carrot roots. *New Phytologist* 136: 299 - 304
- Nagahashi G., Douds D. D. 2011** The effects of hydroxy fatty acids on the hyphal branching of germinated spores of AM fungi. *Fungal biology* 115: 351 - 358
- Nagy R., Drissner D., Amrhein N., Jakobsen I., Bucher M. 2009** Mycorrhizal phosphate uptake pathway in tomato is

phosphorus repressible and transcriptionally regulated. *New Phytologist* 181: 950 - 959

Nakano A., Takahashi K., Kimura M. 1999 The carbon origin of arbuscular mycorrhizal fungi estimated from $\delta^{13}\text{C}$ values of individual spores. *Mycorrhiza* 9: 41 - 47

Nara K. 2015 The Role of ectomycorrhizal networks in seedling establishment and primary succession. In: Horton T. R. (ed.) *Mycorrhizal Networks*. pp. 177-201. Springer, Dordrecht

Nägeli C. 1842 Pilze im Innern von Zellen. *Linnaea* 16: 278 - 285

Nehls U., Das A., Neb D. 2016 Carbohydrate metabolism in ectomycorrhizal symbiosis. In: Martin F. (ed.) 2017 *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. pp. 161 - 178. Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey

Neumann G. 1934 Über die Mykorrhiza in der Gattung *Gentiana*. *Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*. II. Abt. Bd. 89 No. 21/24: 433 - 458

Newsham K. K., Fitter A. H., Watkinson, A. R. 1995 Arbuscular mycorrhiza protect an annual grass from root pathogenic fungi in the field. *Journal of ecology* 991 - 1000

Neyland R., Merchant M. 2011 The Phylogenetic Position Of Subfamily Monotropoideae (Ericaceae) Inferred From Large Ribosomal Subunit (26S) rRNA Gene DNA Sequences. *Journal of the Mississippi Academy of Sciences* 56: 190 - 196

Nicolson T. H. 1967 Vesicular-arbuscular mycorrhiza - a universal plant symbiosis. *Science Progress (1933-)*: 561 - 581

Nieuwland J. A. 1914 Critical Notes on New and Old Genera of Plants. I. *The American Midland Naturalist*, Vol. 3(7): 170 - 197

Noë R., Hammerstein P. 1994 Biological markets: supply and demand determine the effect of partner choice in cooperation, mutualism and mating. *Behavioral ecology and sociobiology* 35: 1 - 11

Noë R., Hammerstein P. 1995 Biological markets. *Trends in Ecology & Evolution* 10: 336 - 339

Norkrans B. 1950 Studies in growth and cellulolytic enzymes of *Tricholoma*, with special reference to mycorrhiza formation. *Symbolae Botanicae Upsalienses*, Uppsala 11.

Nouri E., Breuillin-Sessoms F., Feller U., Reinhardt D. 2014 Phosphorus and nitrogen regulate arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Petunia hybrida*. *PLoS One* 9: e90841

Nowara D., Gay A., Lacomme C., Shaw J., Ridout C., Douchkov D., ... & Schweizer P. 2010. HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *The Plant Cell* 22: 3130 - 3141

O'Connor P. J., Smith S. E., Smith F. A. 2002 Arbuscular mycorrhizas influence plant diversity and community structure in a semiarid herbland. *New Phytologist* 154: 209 - 218

Oehl F., Schneider D., Sieverding E., Burga C. A. 2011a Succession of arbuscular mycorrhizal communities in the foreland of the retreating Morteratsch glacier in the Central Alps. *Pedobiologia* 54: 321 - 331

Oehl F., Sieverding E., Palenzuela J., Ineichen K. 2011b Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. *IMA Fungus* 2: 191 - 199

Ogura-Tsujita Y., Yukawa T. 2008 High mycorrhizal specificity in a widespread mycoheterotrophic plant, *Eulophia zollingeri* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 95: 93 - 97

Ogura-Tsujita Y., Yokoyama J., Miyoshi K., Yukawa, T. 2012 Shifts in mycorrhizal fungi during the evolution of autotrophy to mycoheterotrophy in *Cymbidium* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 99: 1158 - 1176

- Ogura-Tsujita Y., Sakoda A., Ebihara A., Yukawa T., Imaichi R. 2013.** Arbuscular mycorrhiza formation in cordate gametophytes of two ferns, *Angiopteris lygodiiifolia* and *Osmunda japonica*. *Journal of Plant Research*. 126: 41 - 50
- Ogura-Tsujita Y., Hirayama Y., Sakoda A., Suzuki A., Ebihara A., Morita N., Imaichi R. 2016.** Arbuscular mycorrhizal colonization in field-collected terrestrial cordate gametophytes of pre-polypod leptosporangiate ferns (Osmundaceae, Gleicheniaceae, Plagiogyriaceae, Cyatheaceae). *Mycorrhiza* 26: 87 - 97
- Okayama M., Yamato M., Yagame T., Iwase K. 2012** Mycorrhizal diversity and specificity in *Lecanorchis* (Orchidaceae). *Mycorrhiza* 22: 545 - 553
- Olson A. R. 1991.** Post fertilization changes in ovules of *Monotropa uniflora* L. (Monotropaceae). *American Journal of Botany* 78: 99 - 107
- Olsson P. A., Van Aarle I. M., Allaway W. G., Ashford A. E., Rouhier H. 2002** Phosphorus effects on metabolic processes in monoxenic arbuscular mycorrhiza cultures. *Plant physiology* 130: 1162 - 1171
- Olsson P. A., Eriksen B., Dahlberg A. 2004** Colonization by arbuscular mycorrhizal and fine endophytic fungi in herbaceous vegetation in the Canadian High Arctic. *Canadian Journal of Botany* 82: 1547 - 1556
- Oostermeijer J. G. B. 1989** Myrmecochory in *Polygala vulgaris* L., *Luzula campestris* (L.) DC. and *Viola curtisii* Forster in a Dutch Dune Area. *Oecologia* 78: 302 - 311
- Orchard S., Standish R. J., Dickie I. A., Renton M., Walker C., Moot D., Ryan, M. H. 2017** Fine root endophytes under scrutiny: a review of the literature on arbuscule-producing fungi recently suggested to belong to the Mucoromycotina. *Mycorrhiza*, 27: 619 - 638
- Otero J. T., Flanagan N. S., Herre E. A., Ackerman J. D., Bayman P. 2007** Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 94: 1944 - 1950
- Õpik M., Moora M., Liira J., Kõljalg U., Zobel M., Sen R. 2003** Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of *Pulsatilla* spp. in boreal Scots pine forest and grassland soils. *New Phytologist* 160: 581 - 593
- Õpik M., Moora M., Liira J., Zobel M. 2006** Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology* 94: 778 - 790
- Õpik M., Moora M., Zobel M., Saks Ü., Wheatley R., Wright F., Daniell T. 2008** High diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreal herb rich coniferous forest. *New Phytologist* 179: 867 - 876
- Õpik M., Metsis M., Daniell TJ, Zobel M, Moora M. 2009.** Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. *New Phytologist* 184: 424-437.
- Õpik M., Vanatoa A., Vanatoa E., Moora M., Davison J., Kalwij J. M., ... & Zobel M. 2010** The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist* 188: 223 - 241
- Õpik M., Zobel M., Cantero J. J., Davison J., Facelli J. M., Hiiesalu I., ... & Liira J. 2013a** Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 23: 411 - 430
- Õpik M., Davison J., Moora M., Zobel M. 2013b** DNA-based detection and identification of Glomeromycota: the virtual taxonomy of environmental sequences. *Botany* 92: 135 - 147
- Õpik M., Davison J. 2016** Uniting species-and community-oriented approaches to understand arbuscular mycorrhizal fungal diversity. *Fungal Ecology* 24: 106 - 113
- Paiva J. A. R. 1998** A revision of the African and Malagasy species of the genus *Polygala* L. (Polygalaceae), and a synopsis of the genus *Heterosamara* Kuntze, segregated from the former and extending throughout Africa and Asia. *Fontqueria* 50: 1 -

- Parniske M. 2008** Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* 6: 763 - 775
- Pastore J. F., Abbott J. R. 2012** Taxonomic notes and new combinations for *Asemeia* (Polygalaceae). *Kew Bulletin* 67: 801 - 813
- Pastore J. F. 2012** *Caamembeca*: Generic status and new name for *Polygala* subgenus *Ligustrina* (Polygalaceae). *Kew Bulletin* 67: 435 - 442
- Pastore J. F. B., Abbott J. R., Neubig K. M., Whitten W. M., Mascarenhas R. B., Mota M. C. A., Berg C. V. D. 2017** A Molecular Phylogeny and Taxonomic Notes in *Caamembeca* (Polygalaceae). *Systematic Botany* 42: 54 - 62
- Pawlowska T. E., Taylor J. W. 2004** Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 427: 733 - 737
- Pawlowska, T. E. 2005** Genetic processes in arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS microbiology letters* 251: 185 - 192
- Pearson V., Read D. J. 1973** The biology of mycorrhiza in the Ericaceae: I. The isolation of the endophyte and synthesis of mycorrhizas in aseptic culture. *New Phytologist* 72: 371 - 379
- Pendry C. A. 2001** Polygalaceae. In: Santisuk T., Larsen K. (eds.) *Flora of Thailand* (7): 498 - 538 Royal Forest Department, Bangkok, Thailand.
- Penzig O. 1901** Beiträge zur Kenntniss der Gattung *Epirrhizanthes* Bl. *Annales du Jardin Botanique de Buitenzorg* 17: 142 - 170
- Perotto S., Perotto R., Faccio A., Schubert A., Varma A., Bonfante P. 1995** Ericoid mycorrhizal fungi: cellular and molecular bases of their interactions with the host plant. *Canadian Journal of Botany* 73: 557 - 568
- Perotto S., Rodda M., Benetti A., Sillo F., Ercole E., Rodda M., ... & Balestrini, R. 2014** Gene expression in mycorrhizal orchid protocorms suggests a friendly plant-fungus relationship. *Planta* 239: 1337 - 1349
- Persson C. 2001** Phylogenetic Relationships in Polygalaceae Based on Plastid DNA Sequences from the trnL-F Region. *Taxon* 50: 763 - 779
- Peterson T. A., Mueller W. C., Englander L. 1980** Anatomy and ultrastructure of a *Rhododendron* root-fungus association. *Canadian Journal of Botany* 58: 2421 - 2433
- Peterson R. L., Howarth M. J., Whittier D. P. 1981** Interactions between a fungal endophyte and gametophyte cells in *Psilotum nudum*. *Canadian Journal of Botany* 59: 711 - 720
- Peterson R. L., Uetake Y., Bonfante, P., Faccio A. 1996** The interface between fungal hyphae and orchid protocorm cells. *Canadian Journal of Botany* 74: 1861 - 1870
- Peterson R. L., Massicotte H. B. 2004** Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient-exchange interfaces. *Canadian Journal of Botany* 82: 1074 - 1088
- Peterson R. L., Massicotte H. B., Melville L. H. 2004** *Mycorrhizas: anatomy and cell biology*. NRC Research Press
- Peyronel B., Fassi B., Fontana A., Trappe J. M. 1969** Terminology of mycorrhizae. *Mycologia*. 61: 410 - 411
- Pfeffer W. 1877** Über fleischfressende Pflanzen und über die Ernährung durch Aufnahme organischer Stoffe überhaupt. *Landwirtschaftliche Jahrbücher* 6: 969 - 988
- Pfeffer P. E., Douds D. D., Bécard G., Shachar-Hill Y. 1999** Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* 120: 587 - 598
- Phipps C. J., Taylor T. N. 1996** Mixed arbuscular mycorrhizae from the Triassic of Antarctica. *Mycologia* 707 - 714
- Phoris C.** Strukturelle Untersuchung der Mykorrhiza bei *Polygala*-Arten. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg, FB Biologie, Abteilung Spezielle Botanik, AG Weber.

- Van der Pijl L. 1934** Die Mycorrhiza von *Burmannia* und *Epirrhizanthes* und die Fortpflanzung ihres Endophyten. Recueil des Travaux Botaniques Néerlandais 31: 761 - 779
- Pimprikar P., Carbonnel S., Paries M., Katzer K., Klingl V., Bohmer M. J., ... & Gutjahr C. 2016** A CCaMK-CYCLOPS-DELLA complex activates transcription of RAM1 to regulate arbuscule branching. *Current Biology* 26: 987 - 998
- Pimprikar P., Gutjahr C. 2018** Transcriptional regulation of arbuscular mycorrhiza development. *Plant and Cell Physiology* 59: 673 - 690
- Pirozynski K. A., Malloch D. W. 1975** The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *Biosystems* 6: 153 - 164
- Pivato B., Mazurier S., Lemanceau P., Siblot S., Berta G., Mougel C., Van Tuinen D. 2007** Medicago species affect the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with roots. *New Phytologist* 176: 197 - 210
- Plett J. M., Martin F. M. 2011** Blurred boundaries: Lifestyle lessons from ectomycorrhizal fungal genomes. *Trends in Genetics* 27: 14 - 22.
- Pocock K., Duckett J. G. 1985** The alternative mycorrhizas: fungi and hepatics. *Bulletin of the British Bryological Society* 45: 10 - 11
- Pozo M. J., Azcón-Aguilar C. 2007** Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current opinion in plant biology* 10: 393 - 398
- Preiss K., Adam I. K., Gebauer G. 2010** Irradiance governs exploitation of fungi: fine-tuning of carbon gain by two partially myco-heterotrophic orchids. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 277: 1333 - 1336
- Prenner G. 2004** Floral development in *Polygala myrtifolia* (Polygalaceae) and its similarities with Leguminosae. *Plant Systematics and Evolution* 249: 67-76
- Pressel S., Bidartondo M. I., Ligrone R., Duckett J. G. 2010.** Fungal symbioses in bryophytes: New insights in the Twenty First Century. *Phytotaxa* 9: 238 - 253
- Pressel S., Bidartondo M. I., Field K. J., Rimington W. R., Duckett J. G. 2016.** Pteridophyte fungal associations: Current knowledge and future perspectives. *Journal of Systematics and Evolution*. 54: 666 - 678
- Pringle A., Moncalvo J. M., Vilgalys R. 2000** High levels of variation in ribosomal DNA sequences within and among spores of a natural population of the arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora colossica*. *Mycologia*: 259 - 268
- Pringle A., Taylor J. W. 2002** The fitness of filamentous fungi. *Trends in microbiology* 10: 474 - 481
- Purin S., Rillig M. C. 2007** The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin: limitations, progress, and a new hypothesis for its function. *Pedobiologia* 51: 123 - 130
- Purves S., Hadley G. 1975** Movement of carbon compounds between the partners in orchid mycorrhiza. In: *Endomycorrhizas; Proceedings of a Symposium*.
- Qiu Y. L., Cho Y., Cox J. C., Palmer J. D. 1998** The gain of three mitochondrial introns identifies liverworts as the earliest land plants. *Nature* 394: 671 - 674
- Qiu Y. L., Li L., Wang B., Chen Z., Dombrowska, O., Lee, J., ...&, Taylor, D. W. 2007** A nonflowering land plant phylogeny inferred from nucleotide sequences of seven chloroplast, mitochondrial, and nuclear genes. *International Journal of Plant Sciences* 168: 691 - 708
- Ramírez S. R., Gravendeel B., Singer R. B., Marshall C. R., Pierce N. E. 2007** Dating the origin of the Orchidaceae from a fossil orchid with its pollinator. *Nature* 448: 1042
- 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

Rasmussen, H. N. 2002 Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and soil* 244: 149 – 163

Rasmussen H. N., Whigham D. F. 2002 Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. *New Phytologist* 154: 797 - 807

Rasmussen H. N. 2003 *Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press.

Rasmussen H. M. & Rasmussen F. N. 2007. Trophic relationships in orchid mycorrhiza - diversity and implications for conservations. *Lankesteriana* 7: 334 - 341

Rasmussen H. M. & Rasmussen F. N. 2009 Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. *Oikos* 118: 334 - 345

Rasmussen H. N., & Rasmussen, F. N. 2014 Seedling mycorrhiza: a discussion of origin and evolution in Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 175: 313 - 327

Rasmussen H. N., Dixon K. W., Jersáková J., Těšitelová T. 2015 Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. *Annals of botany* 116: 391 - 402

Rath C. 1993 Vergleichende Untersuchungen an den unterirdischen Organen von Rubiaceen. Diplomarbeit, Philipps-University, Marburg

Rath M. 2005 Morphologisch/anatomische Untersuchung von *Sabatia grandiflora* (Gray) Small und *Eustoma exaltatum* (L.) Salisb. (Gentianaceae) unter besonderer Berücksichtigung ihrer Mykorrhiza. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg

Rath M., Weber H. C., Imhof S. 2013 Morpho-anatomical and molecular characterization of the mycorrhizas of European *Polygala* species. *Plant Biology* 15: 548 - 557

Rath M., Grolig F., Hauelsen J., Imhof S. 2014 Combining microtomy and confocal laser scanning microscopy for structural analyses of plant–fungus associations. *Mycorrhiza* 24: 293 - 300

Rath M. Sasirat S. Weber H.C., Imhof S. From trees to mycoheterotrophic plants - morpho-anatomical aspects in evolution of arbuscular mycorrhiza in Polygalaceae. Manuscript A (unpublished)

Rath M., Sasirat S., Imhof S. Systematic analysis of arbuscular mycorrhizal symbionts of Polygalaceae from America, Southeast Asia and Europe - clues for functional constraints of partner choice in the evolution of mycoheterotrophy? Manuscript B (unpublished)

Ravnskov S., Jakobsen I. 1995 Functional compatibility in arbuscular mycorrhizas measured as hyphal transport to the plant. *New Phytologist* 129: 611 - 618

Ravin N. V., Gruzdev E. V., Beletsky A. V., Mazur A. M., Prokhortchouk E. B., Filyushin M. A., ... & Skryabin, K. G. 2016 The loss of photosynthetic pathways in the plastid and nuclear genomes of the non-photosynthetic mycoheterotrophic eudicot *Monotropa hypopitys*. *BMC plant biology* 16: 238

Ray P., Craven K. D. 2016 *Sebacina vermifera*: a unique root symbiont with vast agronomic potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32: 16

Read D. J. 1974 *Pezizella ericae* sp. nov., the perfect state of a typical mycorrhizal endophyte of Ericaceae. *Transactions of the British Mycological Society* 63: 381 - 383

Read, D. J., Koucheki, H. K., & Hodgson, J. 1976 Vesicular-arbuscular mycorrhiza in natural vegetation systems: I. The occurrence of infection. *New Phytologist* 77: 641 - 653

- Read, D. J., Duckett J. G., Francis R., Ligrone R., Russell A. 2000.** Symbiotic fungal associations in 'lower' land plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B.* 351: 1413 - 1420
- Read, D. J., Perez Moreno J. 2003** Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems-a journey towards relevance? *New Phytologist* 157: 475 - 492
- Read D. J., Leake J. R., Perez-Moreno J. 2004** Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes. *Canadian Journal of Botany* 82: 1243 - 1263
- Redecker D., Morton J. B., Bruns T. D. 2000a** Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Molecular phylogenetics and evolution* 14: 276 - 284
- Redecker D., Kodner R., Graham L. E. 2000b** Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920
- Redecker D., Kodner R., Graham E. 2002** *Palaeoglomus grayi* from the Ordovician. *Mycotaxon* 8: 33 - 37
- Redecker D. 2002** Molecular identification and phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 244: 67 - 73
- Redecker D., Raab P. 2006** Phylogeny of the Glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologia* 98: 885 - 895
- Redecker D., Schüßler A., Stockinger H., Stürmer S. L., Morton J. B., Walker C. 2013** An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza* 23: 515 - 531
- Redecker D., Schüßler A. 2014** Glomeromycota. In: McLaughlin D. J., Spatafora J. W. (eds.) *The Mycota. Vol. 7 Systematics and evolution.* pp. 251 - 269. Springer, Berlin, Heidelberg
- Remy W., Taylor T. N., Hass H., Kerp H. 1994** Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhiza. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 91: 11841 - 11843
- Requena N., Mann P., Hampp R., Franken P. 2002** Early developmentally regulated genes in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*: identification of GmGIN1, a novel gene with homology to the C-terminus of metazoan hedgehog proteins. *Plant and soil* 244: 129 - 139
- Requena N., Serrano E., Ocón A., Breuninger M. 2007** Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry* 68: 33 - 40
- Rhodes L. H., Gerdemann J. W. 1975** Phosphate uptake zones of mycorrhizal and non mycorrhizal onions. *New Phytologist* 75: 555 - 561
- Riley R., Charron P., Idnurm A., Farinelli L., Dalpé Y., Martin F., Corradi N. 2014** Extreme diversification of the mating type-high mobility group (MATA HMG) gene family in a plant associated arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 201: 254 - 268
- Riley R., Charron P., Marton T., Corradi N. 2016** Evolutionary genomics of arbuscular mycorrhizal fungi. In: Martin F. (ed.) 2017 *Molecular Mycorrhizal Symbiosis.* Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Rillig M. C., Wright S. F., Shaw M. R., Field C. B. 2002** Artificial climate warming positively affects arbuscular mycorrhizae but decreases soil aggregate water stability in an annual grassland. *Oikos* 97: 52 - 58
- Rillig M. C. 2004a** Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes. *Ecology Letters* 7: 740 - 754
- Rillig, M. C. 2004b** Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science* 84: 355 - 363
- Rimington W. R., Pressel S., Duckett J. G., Bidartondo M. I. 2015.** Fungal associations of basal vascular plants: reopening

a closed book? *New Phytologist* 205: 1394 - 1398

Rimington W. R., Pressel S., Field K. J., Strullu Derrien C., Duckett J. G., Bidartondo M. I. 2016 Reappraising the origin of mycorrhizas. In: Martin F. (ed.) 2017 *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. pp. 31 - 32. Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Robinson D., Fitter A. 1999 The magnitude and control of carbon transfer between plants linked by a common mycorrhizal network. *Journal of Experimental Botany* 50: 9 - 13

Rodriguez A., Clapp J. P., Dodd J. C. 2004 Ribosomal RNA gene sequences diversity in arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Ecology* 6: 986 - 989

Ropars J., Corradi N. 2015 Homokaryotic vs heterokaryotic mycelium in arbuscular mycorrhizal fungi: different techniques, different results? *New Phytologist* 208: 638 - 641

Ropars J., Toro K. S., Noel J., Pelin A., Charron P., Farinelli L., ... & Corradi N. 2016 Evidence for the sexual origin of heterokaryosis in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature microbiology* 1: 16033.

Rommel L.-G. 1939 The ecological problem of mycotrophy. *Ecology* 20: 163 - 167

Rosenberg A., Bouchard F. "Fitness", *The Stanford Encyclopedia of Philosophy* (Fall 2015 Edition), Edward N. Zalta (ed.), URL = <https://plato.stanford.edu/archives/fall2015/entries/fitness>

Rosendahl S., Taylor J. W. 1997 Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP™. *Molecular Ecology* 6: 821 - 829

Rosendahl S., Stukenbrock E. H. 2004 Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in undisturbed vegetation revealed by analyses of LSU rDNA sequences. *Molecular Ecology* 13: 3179 - 3186

Rosendahl S. 2008 Communities, populations and individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 178: 253 - 266

Rosewarne G. M., Barker S. J., Smith S. E. 1997 Production of near-synchronous fungal colonization in tomato for developmental and molecular analyses of mycorrhiza. *Mycological Research* 101: 966 - 970

Roy M., Yagame T., Yamato M., Iwase K., Heinz C., Faccio A., ... & Selosse M. A. 2009a Ectomycorrhizal *Inocybe* species associate with the mycoheterotrophic orchid *Epipogium aphyllum* but not its asexual propagules. *Annals of Botany* 104: 595 - 610

Roy M., Watthana S., Stier A., Richard F., Vessabutr S., Selosse M. A. 2009b Two mycoheterotrophic orchids from Thailand tropical dipterocarpacean forests associate with a broad diversity of ectomycorrhizal fungi. *BMC biology* 7: 51

Rubinstein C. V., Gerrienne P., de la Puente G., Astini R. A., Steemans P. 2010 Early Middle Ordovician evidence for land plants in Argentina (eastern Gondwana). *New Phytologist* 188: 365 - 369

Ruiz-Lozano J. M., Porcel R., Bárzana G., Azcón R., Aroca R. 2012 Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant drought tolerance: state of the art. In: Aroca R. (ed.) *Plant responses to drought stress*. Springer, Berlin, Heidelberg.

Ruiz-Lozano J. M., Aroca R., Zamarreño Á. M., Molina S., Andreo Jiménez B., Porcel R., ... & López Ráez J. A. 2016 Arbuscular mycorrhizal symbiosis induces strigolactone biosynthesis under drought and improves drought tolerance in lettuce and tomato. *Plant, cell & environment* 39: 441 - 452

Russel J., Bulman S. 2005. The liverwort *Marchantia foliacea* forms a specialized symbiosis with arbuscular mycorrhizal

fungi in the genus *Glomus*. *New Phytologist* 165: 567 - 579

Russo G., Spinella S., Sciacca E., Bonfante P., Genre, A. 2013 Automated analysis of calcium spiking profiles with CaSA software: two case studies from root-microbe symbioses. *BMC plant biology* 13: 224

Ruytinx J., Martino E., Rozpądek P., Daghino S., Turnau K., Colpaert J., Perotto S. 2016 Homeostasis of trace elements in mycorrhizal fungi. In: **Martin F. (ed.)** 2017 *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. pp. 276 - 298. Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Rybczyński J. J., Davey M. R., Mikula, A. (eds.). 2014 *The Gentianaceae-Volume 1: Characterization and Ecology*. Springer.

Saito K., Ezawa T. 2016 Phosphorus metabolism and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis. In: **Martin F. (ed.)** 2017 *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. pp. 197 - 216. Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey

Saks Ü., Davison J., Öpik M., Vasar M., Moora M., Zobel M. 2013 Root-colonizing and soil-borne communities of arbuscular mycorrhizal fungi in a temperate forest understorey. *Botany* 92: 277 - 285

Sanders F. E., Mosse B., Tinker P. B. 1975 *Endomycorrhizas - Proceedings of a symposium held at the University of Leeds, 22 - 25 July 1974*

Sanders I. R., Alt M., Groppe K., Boller T., Wiemken A. 1995 Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytologist* 130: 419 - 427

Sanders, I. R. 1999 Evolutionary genetics: No sex please, we're fungi. *Nature* 399: 737 - 739

Sanders I. R. 2002 Specificity in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. In: **Van der Heijden M. G. A., Sanders I. R.(eds.)** *Mycorrhizal Ecology*. pp. 415 - 437. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

Sanders I. R., Croll D. 2010 Arbuscular mycorrhiza: the challenge to understand the genetics of the fungal partner. *Annual review of genetics* 44: 271 - 292

Sanderson, M. J. 2003 Molecular data from 27 proteins do not support a Precambrian origin of land plants. *American Journal of Botany* 90: 954 - 956

Santos J. C., Finlay R. D., Tehler A. 2006 Molecular analysis of arbuscular mycorrhizal fungi colonising a semi natural grassland along a fertilisation gradient. *New Phytologist* 172: 159 - 168

Santos-González J. C., Finlay R. D., Tehler A. 2007 Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities in roots in a seminatural grassland. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5613 - 5623

Scales P. F., Peterson R. L. 1991 Structure and development of *Pinus banksiana*-*Wilcoxina* ectendomycorrhizae. *Canadian journal of botany* 69: 2135 - 2148.

Scannerini S., Bonfante-Fasolo P. 1983 Comparative ultrastructural analysis of mycorrhizal associations. *Canadian Journal of Botany* 61: 917 - 943

Schaarschmidt S., Roitsch T., Hause B. 2006 Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Journal of experimental botany* 57: 4015 - 4023

Schäfer P., Khatabi B., Kogel K. H. 2007 Root cell death and systemic effects of *Piriformospora indica*: a study on mutualism. *FEMS microbiology letters* 275: 1 - 7

Scheublin T. R., Ridgway K. P., Young J. P. W., Van der Heijden M. G. 2004 Nonlegumes, legumes, and root nodules harbor different arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 6240 - 6246

Schlicht A. 1888 Ueber neue Fälle von Symbiosen der Pflanzenwurzeln mit Pilzen. *Berichte der deutschen Botanischen*

Gesellschaft 6: 269 - 272

Schlicht A. 1889 Beitrag zur Kenntniss der Verbreitung und der Bedeutung der Mykorrhizen. Landwirtschaftliche Jahrbücher. 18: 478 - 506

Schmid E., Oberwinkler F. 1994 Light and electron microscopy of the host-fungus interaction in the achlorophyllous gametophyte of *Botrychium lunaria*. Canadian Journal of Botany 72: 182 - 188

Schmitz A. M., Harrison M. J. 2014 Signaling events during initiation of arbuscular mycorrhizal symbiosis. Journal of integrative plant biology 56: 250 - 261

Schoch C. L., Seifert K. A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J. L., Levesque C. A., ... & Miller, A. N. 2012 Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences 109: 6241 - 6246

Schubert A., Hayman D. S. 1986 Plant growth responses to Vesicular Arbuscular Mycorrhiza. New Phytologist 103: 79 - 90

Schüßler A., Mollenhauer D., Schnepf E., Kluge M. 1994 *Geosiphon pyriforme*, an endosymbiotic association of fungus and cyanobacteria: the spore structure resembles that of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. Plant Biology, 107: 36 - 45

Schüßler A. 1999 Glomales SSU rRNA gene diversity. New Phytologist 144: 205 - 207

Schüßler A. 2000 *Glomus claroideum* forms an arbuscular mycorrhiza-like symbiosis with the hornwort *Anthoceros punctatus*. Mycorrhiza 10: 15 - 21

Schüßler A., Kluge M. 2001 *Geosiphon pyriforme*, an endocytosymbiosis between fungus and cyanobacteria, and its meaning as a model system for arbuscular mycorrhizal research. In: Esser K. (ed.) The Mycota. Vol. 9 Fungal associations. pp. 151-161. Springer Berlin Heidelberg.

Schüßler A., Schwarzott D., Walker C. 2001 A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycological research 105: 1413 - 1421

Schüßler A. 2002 Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of *Geosiphon pyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi. In: Smith S. E., Smith F. A. (eds.) Diversity and Integration in Mycorrhizas. pp. 75 - 83. Springer Netherlands.

Schüßler A., Martin H., Cohen D., Fitz M., Wipf D. 2006 Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi. Nature 444: 933

Schüßler A., Martin H., Cohen D., Fitz M., Wipf D. 2007 Arbuscular mycorrhiza: studies on the *Geosiphon symbiosis* lead to the characterization of the first Glomeromycotan sugar transporter. Plant signaling & behavior 2: 431 - 434

Schüßler A., Walker C., 2010. The Glomeromycota: a Species List with New Families and New Genera. Published in libraries at The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University. Arthur Schüßler & Christopher Walker, Gloucester. URL: <http://www.amf-phylogeny.com>.

Schüßler A., Walker C. 2011 Evolution of the 'Plant-Symbiotic' Fungal Phylum, Glomeromycota. In: Pöggeler S., Wöstemeyer J. (eds) The Mycota. Vol. 14. pp. 163 - 185. Springer, Berlin, Heidelberg

Schüßler A. 2012 The *Geosiphon-Nostoc* endosymbiosis and its role as a model for arbuscular mycorrhiza research. In: Schwarzott D, Walker C, Schüßler A. 2001 *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is non-monophyletic. Molecular Phylogenetics and Evolution 21:190 - 197

Schwartz M. W., Hoeksema J. D. 1998 Specialization and resource trade: biological markets as a model of mutualisms. Ecology 79: 1029 - 1038

Schwarzott D, Walker C, Schüßler A. 2001 *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is non-monophyletic. Molecular Phylogenetics and Evolution 21:190 - 197

Schweiger J. M. I., Kemnade C., Bidartondo M. I., Gebauer G. 2019 Light limitation and partial mycoheterotrophy in rhizoctonia-associated orchids. Oecologia 1 - 9

Selosse M.-A., Weiß M., Jany J.-L., Tillier A. 2002. Communities and populations of sebacinoïd basidiomycetes associated

with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. And neighbouring tree ectomycorrhizae. *Molecular Ecology* 11: 1831 - 1844

Selosse M.-A., Faccio A., Scappaticci G., Bonfante P. 2004. Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal Septomycetes, including Truffles. *Microbial Ecology* 47: 416 - 426

Selosse M.-A., Setaro S., Glatard F., Richard F., Urcelay C., Weiß M. 2007 Sebaciniales are common mycorrhizal associates of Ericaceae. *New Phytologist* 174: 864 - 878

Selosse M. A., Roy M. 2009 Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. *Trends in plant science* 14: 64 - 70

Selosse M. A., Martos F., Perry B., Maj P., Roy M., Pailler T. 2010 Saprotrophic fungal symbionts in tropical achlorophyllous orchids: Finding treasures among the ‘molecular scraps’?. *Plant signaling & behavior* 5: 349 - 353

Selosse M. A., Boullard B., Richardson D. 2011 Noël Bernard (1874 - 1911): orchids to symbiosis in a dozen years, one century ago. *Symbiosis* 54: 61 – 68

Selosse M.-A., Boullard B., Richardson D. 2011. Noël Bernard (1874 - 1911): orchids to symbiosis in a dozen years, one century ago. *Symbiosis* 54: 61 - 68

Selosse M.-A., Rousset F. 2011 The plant-fungal marketplace. *Science* 333: 828 - 829

Selosse M. A., Martos F. 2014 Do chlorophyllous orchids heterotrophically use mycorrhizal fungal carbon? *Trends in Plant Science* 19: 683 - 685

Selosse M. A., Strullu Derrien C., Martin F. M., Kamoun S., Kenrick P. 2015 Plants, fungi and oomycetes: a 400 million year affair that shapes the biosphere. *New Phytologist* 206: 501 - 506

Selosse M. A., Bocayuva M. F., Kasuya M. C. M., Courty P. E. 2016a Mixotrophy in mycorrhizal plants: Extracting carbon from mycorrhizal networks. In Martin F. (ed.) 2017 *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. pp. 451 - 471. Springer

Selosse M. A., Vincenot L., Öpik M. 2016b Data processing can mask biology: towards better reporting of fungal barcoding data? *New Phytologist* 210: 1159 - 1164

Setaro S., Weiß M., Oberwinkler F., Kottke I. 2006a Sebaciniales form ectendomycorrhizas with *Cavendishia nobilis*, a member of the Andean clade of Ericaceae, in the mountain rain forest of southern Ecuador. *New Phytologist* 169: 355 - 365

Setaro S., Kottke I., Oberwinkler F. 2006b Anatomy and ultrastructure of mycorrhizal associations of neotropical Ericaceae. *Mycological Progress* 5: 243

Shachar-Hill Y., Pfeffer P. E., Douds D., Osman S. F., Doner L. W., Ratcliffe R. G. 1995 Partitioning of intermediary carbon metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizal leek. *Plant Physiology* 108: 7 - 15

Sheldrake M., Rosenstock N. P., Revillini D., Olsson P. A., Mangan S., Sayer E. J., ... & Tanner E. V. 2017a Arbuscular mycorrhizal fungal community composition is altered by longterm litter removal but not litter addition in a lowland tropical forest. *New Phytologist* 214: 455 - 467

Sheldrake M., Rosenstock N. P., Revillini D., Olsson P. A., Wright S. J., Turner B. L. 2017b A phosphorus threshold for mycoheterotrophic plants in tropical forests. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284: 20162093

Shimura H., Matsuura M., Takada N., Koda Y. 2007 An antifungal compound involved in symbiotic germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* (Orchidaceae). *Phytochemistry* 68: 1442 - 1447

Sieberer B. J., Chabaud M., Fournier J., Timmers A. C., Barker D. G. 2012 A switch in Ca²⁺ spiking signature is concomitant with endosymbiotic microbe entry into cortical root cells of *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* 69: 822 -

- Simard S. W., Perry D. A., Jones M. D., Myrold D. D., Durall D. M., Molina R. 1997** Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature* 388: 579
- Simon L., Lalonde M., Bruns T. D. 1992** Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 291 - 295
- Simon L., Bousquet J., Lévesque R. C., Lalonde M. 1993** Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67
- Simon L. 1996** Phylogeny of the Glomales: deciphering the past to understand the present. *New Phytologist*, 133: 95 - 101
- Sinclair W. A., Sylvia D. M. 1982** Disease suppression and growth promotion in Douglas-Fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Forest Science* 28: 191 – 201
- Singh S., Katzer K., Lambert J., Cerri M., Parniske M. 2014** CYCLOPS, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development. *Cell host & microbe* 15: 139 - 152
- Smith S. E. 1966** Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytologist* 65: 488 - 499
- Smith S. E. 1967** Carbohydrate translocation in orchid mycorrhizas. *New Phytologist* 66: 371 - 378
- Smith D., Muscatine L., Lewis D. 1969** Carbohydrate movement from autotrophs to heterotrophs in parasitic and mutualistic symbiosis. *Biological Reviews* 44: 17 – 85
- Smith S. E., Gianinazzi-Pearson V., Koide R., Cairney J. W. G. 1994** Nutrient transport in mycorrhizas: structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis. *Plant and Soil* 159: 103
- Smith F. A., Smith S. E. 1996** Mutualism and Parasitism: Diversity in Function and Structure in the „Arbuscular“ (VA) Mycorrhizal Symbiosis. *Advances in Botanical Research*. 22: 1 - 43. Academic Sydney
- Smith F. A., Smith S. E. 1997** Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 137: 373 - 388
- Smith M. D., Hartnett D. C., Wilson G. W. T. 1999** Interacting influence of mycorrhizal symbiosis and competition on plant diversity in tallgrass prairie. *Oecologia* 121: 574 - 582
- Smith S. E., Smith F. A., Jakobsen I. 2003** Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant physiology* 133: 16 - 20
- Smith S. E., Smith F. A., Jakobsen I. 2004** Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytologist* 162: 511 – 524
- Smith S. E., Read D. J. 2008** Mycorrhizal symbiosis. 3rd Edition. Academic press.
- Smith S. E., Facelli E., Pope S., Smith F. A. 2010** Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil*, 326: 3 - 20
- Smith S. E., Smith F. A. 2011** Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual review of plant biology* 62: 227 – 250
- Smith S. E., Smith F. A. 2012** Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia* 104: 1 - 13
- Smith S. A., Beaulieu J. M., Stamatakis A., Donoghue M. J. 2011** Understanding angiosperm diversification using small and large phylogenetic trees. *American Journal of Botany*. 98: 404 - 414
- Soltis D. E., Smith S. A., Cellinese N., Wurdack K. J., Tank D. C., Brockington S. F., ... & Soltis P. S. 2011** Angiosperm Phylogeny: 17 Genes, 640 Taxa. *American Journal of Botany* 98: 704 - 730
- Sommer J., Pausch J., Brundrett M. C., Dixon K. W., Bidartondo M. I., Gebauer G. 2012** Limited carbon and mineral

- nutrient gain from mycorrhizal fungi by adult Australian orchids. *American Journal of Botany* 99: 1133 - 1145
- Song Y. Y., Zeng R. S., Xu J. F., Li J., Shen X., Yihdego W. G. 2010** Interplant communication of tomato plants through underground common mycorrhizal networks. *PloS one* 5: e13324.
- Spatafora J. W., Chang Y., Benny G. L., Lazarus K., Smith M. E., Berbee M. L., ... & James T. Y. 2016** A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* 108: 1028 – 1046
- Stahl E. 1900** Der Sinn der Mykorrhizenbildung. *Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik* Bd. 34 Heft 4
- Stark C., Babik W., Durka W. 2009** Fungi from the roots of the common terrestrial orchid *Gymnadenia conopsea*. *Mycological Research* 113: 952 - 959
- Stelz T. 1968** Mycorrhizes et vegetation des pelouses calcaires. Dissertation, Rouen, France.
- Stevens P. F. 2001** (onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017 [and more or less continuously updated since]. URL = <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
- Stockinger H., Walker C., Schüßler A. 2009** ‘*Glomus intraradices* DAOM197198’, a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 183: 1176 - 1187
- Stockinger H., Krüger M., Schüßler A. 2010** DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 187: 461 - 474
- Stockinger H., Peyret-Guzzon M., Koegel S., Bouffaud M. L., Redecker D. 2014** The largest subunit of RNA polymerase II as a new marker gene to study assemblages of arbuscular mycorrhizal fungi in the field. *PLoS One* 9: e107783.
- Stockinger H., Krüger M., Schüßler A. 2010** DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 187: 461 – 474
- Stoyke G., Egger K. N., Currah R. S. 1992** Characterization of sterile endophytic fungi from the mycorrhizae of subalpine plants. *Canadian Journal of Botany* 70: 2009 - 2016
- Stöckel M., Meyer C., Gebauer G. 2011** The degree of mycoheterotrophic carbon gain in green, variegated and vegetative albino individuals of *Cephalanthera damasonium* is related to leaf chlorophyll concentrations. *New Phytologist* 189: 790 - 796
- Stöckel M., Těšitelová T., Jersáková J., Bidartondo M. I., Gebauer G. 2014** Carbon and nitrogen gain during the growth of orchid seedlings in nature. *New Phytologist* 202: 606 – 615
- Stubblefield S. P., Taylor T. N., Trappe J. M. 1987** Vesicular arbuscular mycorrhizae from the Triassic of Antarctica. *American Journal of Botany* 74: 1904 - 1911
- Stürmer S. L., Morton J. B. 1997** Developmental patterns defining morphological characters in spores of four species in *Glomus*. *Mycologia* 72 - 81
- Stürmer S. L., Morton J. B. 1999** Taxonomic reinterpretation of morphological characters in Acaulosporaceae based on developmental patterns. *Mycologia* 849 – 857
- Strother P. K., Al-Hajri S., Traverse A. 1996** New evidence for land plants from the lower Middle Ordovician of Saudi Arabia. *Geology* 24: 55 - 58
- Strullu-Derrien C., Strullu D. G. 2007** Mycorrhization of fossil and living plants. *Comptes Rendus Palevol* 6: 483 - 494
- Strullu Derrien C., Rioult J. P., Strullu D. G. 2009** Mycorrhizas in Upper Carboniferous *Radiculites* type cordaitalean rootlets. *New Phytologist* 182: 561 - 564.
- Strullu Derrien C., Kenrick P., Pressel S., Duckett J. G., Rioult J. P., Strullu D. G. 2014** Fungal associations in *Horneophyton ligneri* from the Rhynie Chert (c. 407 million year old) closely resemble those in extant lower land plants: novel insights into ancestral plant-fungus symbioses. *New Phytologist* 203: 964 - 979
- Strullu Derrien C., Kenrick P., Selosse M.-A. 2016.** Origins of the mycorrhizal symbioses. In: Martin F. (ed) 2017 *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. pp. 3-20. Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey

- Struwe L., Kadereit J. W., Klackenberg J., Nilsson S., Thiv M., Von Hagen K. B., Albert V. A. 2002** Systematics, character evolution, and biogeography of Gentianaceae, including a new tribal and subtribal classification. *Gentianaceae: systematics and natural history*. Cambridge University Press, Cambridge, 21 - 309
- Suetsugu K., Kawakita A., Kato M. 2014** Evidence for specificity to *Glomus* group Ab in two Asian mycoheterotrophic *Burmanna* species. *Plant species biology* 29: 57 - 64
- Suetsugu K., Yamato M., Miura C., Yamaguchi K., Takahashi K., Ida Y., ... & Kaminaka H. 2017** Comparison of green and albino individuals of the partially mycoheterotrophic orchid *Epipactis helleborine* on molecular identities of mycorrhizal fungi, nutritional modes and gene expression in mycorrhizal roots. *Molecular ecology* 26: 1652 - 1669
- Sun J., Miller J. B., Granqvist E., Wiley-Kalil A., Gobbato E., Maillet F., ... & Morris R. J. 2015** Activation of symbiosis signaling by arbuscular mycorrhizal fungi in legumes and rice. *The Plant Cell* 27: 823 - 838
- Swarts N. D., Dixon K. W. 2009** Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany*, 104: 543 - 556
- Swarts N. D., Sinclair E. A., Francis A., Dixon K. W. 2010** Ecological specialization in mycorrhizal symbiosis leads to rarity in an endangered orchid. *Molecular Ecology* 19: 3226 - 3242
- Sylvia D. M., Sinclair W. A. 1983** Phenolic compounds and resistance to fungal pathogens induced in primary roots of Douglas-Fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Phytopathology* 73: 390 - 397
- Sylvia D.M., Wilson D.O., Graham J.H., Maddox J.J., Millner P., Morton J.B., Skipper H.D., Wright S.F., Jarstfer A.G., 1993** Evaluation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in diverse plants and soils. *Soil Biology and Biochemistry* 25: 705 - 713
- Sýkorová Z., Wiemken A., Redecker D. 2007a** Cooccurring *Gentiana verna* and *Gentiana acaulis* and their neighboring plants in two Swiss upper montane meadows harbor distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Applied and environmental microbiology* 73: 5426 - 5434
- Sýkorová Z., Ineichen K., Wiemken A., Redecker D. 2007b** The cultivation bias: different communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in roots from the field, from bait plants transplanted to the field, and from a greenhouse trap experiment. *Mycorrhiza* 18: 1 - 14
- Sýkorová Z. 2014** The Role of Arbuscular Mycorrhiza in the Growth and Development of Plants in the Family Gentianaceae. In: Rybczyński J. J., Davey M. R., Mikuła A. (eds.) 2014 *The Gentianaceae-Volume 1: Characterization and Ecology*. pp. 303-316. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Taiz L., Zeiger E. Møller I. M, Murphy A. 2015** *Plant Physiology and Development* Vol. 6 Sinauer Associates.
- Takeda N., Maekawa T., Hayashi M. 2012** Nuclear-localized and deregulated calcium-and calmodulin-dependent protein kinase activates rhizobial and mycorrhizal responses in *Lotus japonicus*. *The Plant Cell* 24: 810 - 822
- Takeda N., Handa Y., Tsuzuki S., Kojima M., Sakakibara H., Kawaguchi M. 2015** Gibberellins interfere with symbiosis signaling and gene expression and alter colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in *Lotus japonicus*. *Plant physiology* 167: 545 - 557
- Takhtajan A. 1997** *Diversity and classification of flowering plants*. New York, Columbia University Press
- Tamasloukht M. B., Séjalon-Delmas N., Kluever A., Jauneau A., Roux C., Bécard G., Franken P. 2003** Root factors induce mitochondrial-related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Plant Physiology* 131: 1468 - 1478
- Taylor T. N., Remy W., Hass H., Kerp. H. 1995** Fossil Arbuscular Mycorrhizae from the Early Devonian. *Mycologia* 87: 560 - 573
- Taylor D. L., Bruns T. D. 1997** Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 94: 4510 -4515

- Taylor D. L., Bruns T. D. 1999** Population, habit and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza maculata* and *C. mertensiana*. *Molecular Ecology* 8: 1719 - 1732
- Taylor D. L., Bruns T. D., Leake J. R., Read D. J. 2002** Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In: Van der Heijden M. G. A., Sanders I. (eds.) *Mycorrhizal Ecology*. pp. 375-413. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Taylor A. F., Fransson P. M., Högborg P., Högborg M. N., Plamboeck A. H. 2003** Species level patterns in 13C and 15N abundance of ectomycorrhizal and saprotrophic fungal sporocarps. *New Phytologist* 159: 757 - 774
- Taylor D. L., Bruns T. D., Hodges S. A. 2004** Evidence for mycorrhizal races in a cheating orchid. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 271: 35 - 43
- Taylor D. L. 2004** Mycoheterotroph-fungus marriages-is fidelity over rated? *New Phytologist* 163: 217 – 221
- Taylor A. F., Alexander I. A. N. 2005** The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist* 19: 102 - 112.
- Taylor J. W., Berbee M. L. 2006** Dating divergences in the Fungal Tree of Life: review and new analyses. *Mycologia* 98: 838 - 849
- Taylor T. N., Krings M., Taylor E. L. 2014** Fossil fungi. Academic Press, San Diego
- Tedersoo L., Pellet P., Koljalg U., Selosse M. A. 2007** Parallel evolutionary paths to mycoheterotrophy in understory Ericaceae and Orchidaceae: ecological evidence for mixotrophy in Pyroleae. *Oecologia* 151: 206 – 217
- Těšitelová T, Těšitel J, Jersáková J, Říhová G, Selosse M-A. 2012** Symbiotic germination capability of four *Epipactis* species (Orchidaceae) is broader than expected from adult ecology. *American Journal of Botany* 99: 1020 - 1032
- Thiéry O., Moora M., Vasar M., Zobel M., Öpik M. 2012** Inter- and intrasporal nuclear ribosomal gene sequence variation within one isolate of arbuscular mycorrhizal fungus, *Diversispora* sp. *Symbiosis* 58: 135 - 147
- Thiéry O., Vasar M., Jairus T., Davison J., Roux C., Kivistik P. A., ... & Zobel M. 2016** Sequence variation in nuclear ribosomal small subunit, internal transcribed spacer and large subunit regions of *Rhizophagus irregularis* and *Gigaspora margarita* is high and isolate dependent. *Molecular ecology* 25: 2816 - 2832
- Thorne R.F. 1992.** An updated phylogenetic classification of flowering plants. *Aliso* 13: 365 - 389.
- Tian C., Kasiborski B., Koul R., Lammers P. J., Bücking H., Shachar-Hill Y. 2010** Regulation of the nitrogen transfer pathway in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: gene characterization and the coordination of expression with nitrogen flux. *Plant Physiology* 153: 1175 – 1187
- Tiemann C., Demuth K., Weber H. C. 1994a** Zur Symbiose von *Cynanchum vincetoxicum* (L.) Pers., *Asclepias curassavica* L. und *Ceropegia woodii* Schl.(Asclepiadaceae) mit Mycorrhiza-Pilzen (VAM). *Flora* 189: 1 - 6
- Tiemann C., Demuth K., Weber H. C. 1994b** Zur VA-Mycorrhiza von *Gelsemium rankinii* und *G. sempervirens* (Loganiaceae). *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 68: 311 - 321
- Tisserant E., Kohler A., Dozolme Seddas P., Balestrini R., Benabdellah K., Colard, A., ... & Ferrol N. 2012** The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytologist* 193: 755 - 769
- Tisserant E., Malbreil M., Kuo A., Kohler A., Symeonidi A., Balestrini R., ... & Gilbert L. B. 2013** Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 20117 - 20122
- Tollot M., Wong Sak Hoi J., Van Tuinen D., Arnould C., Chatagnier O., Dumas B., ... & Seddas P. 2009** An STE12 gene identified in the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* restores infectivity of a hemibiotrophic plant pathogen. *New Phytologist* 181: 693 - 707
- Tommerup I. C., Abbott L. K. 1981** Prolonged survival and viability of VA mycorrhizal hyphae after root death. *Soil Biology and Biochemistry* 13: 431 - 433
- Tommerup I. C., Sivasithamparam K. 1990** Zygospores and asexual spores of *Gigaspora decipiens*, an arbuscular

mycorrhizal fungus. *Mycological Research* 94: 897 - 900

Tommerup I. C. 1984 Development of infection by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in *Brassica napus* L. and *Trifolium subterraneum* L. *New Phytologist* 98: 487 - 495

Torrecillas E., Alguacil M. M., Roldán A. 2012 Host preferences of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing annual herbaceous plant species in semiarid Mediterranean prairies. *Applied and environmental microbiology* 78: 6180 - 6186

Trappe J. M., Berch S. M. 1985 The Prehistory of Mycorrhizae: A. B. Frank's Predecessors. In: Molina R. (ed.) 6th North American Conference on Mycorrhizae. Oregon State University Corvallis. Forest Research Laboratory

Trappe, J. M. 1987 Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. In: Safir G. R. (ed.) *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*. pp. 5 - 25. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

Treseder K. K., Cross A. 2006 Global distribution of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Ecosystems* 9: 305 - 316

Trivers R. L. 1971 The evolution of reciprocal altruism. *The Quarterly review of biology* 46: 35 - 57

Trudell S. A., Rygielwicz P. T., Edmonds R. L. 2003 Nitrogen and carbon stable isotope abundances support the myco heterotrophic nature and host specificity of certain achlorophyllous plants. *New Phytologist* 160: 391 - 401

Tsuzuki S., Handa Y., Takeda N., Kawaguchi M. 2016 Strigolactone-induced putative secreted protein 1 is required for the establishment of symbiosis by the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 29: 277 - 286

Uetake Y., Kobayashi K., Ogoshi A. 1992 Ultrastructural changes during the symbiotic development of *Spiranthes sinensis* (Orchidaceae) protocorms associated with binucleate *Rhizoctonia* anastomosis group C. *Mycological Research* 96: 199 - 209.

Umata H. 1995. Seed Germination of *Galeola altissima*, an achlorophyllous orchid, with aphyllophorales fungi. *Mycoscience* 36: 369 - 372

Umehara M., Hanada A., Yoshida S., Akiyama K., Arite T., Takeda-Kamiya N., ... & Kyojuka, J. 2008 Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455: 195

Unger F. 1840 Beiträge zur Kenntniss der parasitischen Pflanzen: Oder anatomisch-physiologischer Theil. Wien

Untch H., Weber H. C. 1997 Strukturen der Mycorrhizsa (AM) bei *Ceropegia dichotoma* Haw., *Ceropegia fusca* Bolle und *Periploca laevigata* Ait. (Asclepiadaceae). *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 69: 129 - 140

Upson R., Read D. J., Newsham K. K. 2007 Widespread association between the ericoid mycorrhizal fungus *Rhizoscyphus ericae* and a leafy liverwort in the maritime and sub Antarctic. *New Phytologist* 176: 460 - 471

Vandenkoornhuyse P., Husband R., Daniell T. J., Watson I. J., Duck J. M., Fitter A. H., Young J. P. W. 2002 Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Molecular Ecology* 11: 1555 - 1564

Vandenkoornhuyse P., Ridgway K. P., Watson I. J., Fitter A. H., Young J. P. W. 2003 Co existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology* 12: 3085 - 3095

Varma A., Bakshi M., Lou B., Hartmann A., Oelmueller R. 2012 *Piriformospora indica*: a novel plant growth-promoting mycorrhizal fungus. *Agricultural Research* 1: 117 - 131

Vályi K., Rillig M. C., Hempel S. 2015 Land use intensity and host plant identity interactively shape communities of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of grassland plants. *New Phytologist* 205: 1577 - 1586

Vályi K., Mardhiah U., Rillig M. C., Hempel S. 2016 Community assembly and coexistence in communities of arbuscular mycorrhizal fungi. *The ISME journal*.

Veiga R. S., Faccio A., Genre A., Pieterse C. M., Bonfante P., Van der Heijden M. G. 2013 Arbuscular mycorrhizal fungi reduce growth and infect roots of the non host plant *Arabidopsis thaliana*. *Plant, cell & environment* 36: 1926 - 1937

- Verma S., Varma A., Rexer K. H., Hassel A., Kost G., Sarbhoy A., ... & Franken P. 1998** *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. *Mycologia* 90: 896 - 903
- Verkerke W. 1984** Ovule and seed of *Xanthophyllum* (Polygalaceae). *Blumea* 29: 409 - 421
- Viera A., Glenn M. G. 1990** DNA content of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores. *Mycologia* 82: 263 - 267
- Villarreal Ruiz L., Anderson I. C., Alexander I. J. 2004** Interaction between an isolate from the *Hymenoscyphus ericae* aggregate and roots of *Pinus* and *Vaccinium*. *New Phytologist* 164: 183 - 192
- Villarreal-Ruiz L., Neri-Luna C., Anderson I. C., Alexander, I. J. 2012** In vitro interactions between ectomycorrhizal fungi and ericaceous plants. *Symbiosis* 56: 67 - 75
- Vogelsang K. M., Reynolds H. L., Bever J. D. 2006** Mycorrhizal fungal identity and richness determine the diversity and productivity of a tallgrass prairie system. *New Phytologist* 172: 554 - 562
- Vogelsang K. M., Bever J. D. 2009** Mycorrhizal densities decline in association with nonnative plants and contribute to plant invasion. *Ecology* 90: 399 - 407
- Vogt K. A., Grier C. C., Meier C. E., Edmonds R. L. 1982** Mycorrhizal role in net primary production and nutrient cycling in *Abies amabilis* ecosystems in Western Washington. *Ecology* 63: 370 - 380
- Vohník M., Sadowsky J. J., Kohout P., Lhotáková Z., Nestby R., Kolařík M. 2012** Novel root-fungus symbiosis in Ericaceae: sheathed ericoid mycorrhiza formed by a hitherto undescribed basidiomycete with affinities to Trechisporales. *PLoS one* 7: e39524.
- Vrålstad T., Fossheim T., Schumacher T. 2000** *Piceirhiza bicolorata*—the ectomycorrhizal expression of the *Hymenoscyphus ericae* aggregate? *The New Phytologist* 145: 549 - 563
- Vrålstad T., Schumacher T., Taylor A. F. 2002a** Mycorrhizal synthesis between fungal strains of the *Hymenoscyphus ericae* aggregate and potential ectomycorrhizal and ericoid hosts. *New Phytologist* 20: 143 - 152
- Vrålstad T., Myhre E., Schumacher T. 2002b** Molecular diversity and phylogenetic affinities of symbiotic root-associated ascomycetes of the Helotiales in burnt and metal polluted habitats. *New Phytologist* 155: 131 - 148
- Walker C. 1983** Taxonomic concepts in the Endogonaceae: spore wall characteristics in species descriptions. *Mycotaxon*
- Walker C. 1985** *Endogone lactiflua* forming ectomycorrhizas with *Pinus contorta*. *Transactions of the British Mycological Society* 84: 353 - 355
- Walker C. M. 1992** Systematics and taxonomy of the arbuscular endomycorrhizal fungi Glomales – a possible way forward. *Agronomie* 12: 887 - 897
- Walker C., Vestberg M., Demircik F., Stockinger H., Saito M., Sawaki H., ... & Schüßler A. 2007** Molecular phylogeny and new taxa in the Archaeosporales (Glomeromycota): *Ambispora fennica* gen. sp. nov., Ambisporaceae fam. nov., and emendation of Archaeospora and Archaeosporaceae. *Mycological Research* 111: 137 - 153
- Wallace G. D. 1975** Studies of the Monotropoideae (Ericaceae): taxonomy and distribution. *Wasmann Journal of Biology* 33: 1 - 88
- Wang H., Wang Z., Zhang F., Liu J., He X. 1997.** A cytological study on the nutrient-uptake mechanism of a saprophytic orchid *Gastrodia elata*. *Acta Botanica Sinica* 19: 500 - 504
- Wang H., Moore M. J., Soltis P. S., Bell C. D., Brockington S. F., Alexandre R., ... & Soltis D. E. 2009.** Rosid radiation and the rapid rise of angiosperm-dominated forests. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 3853 - 3858
- Wang B., Qiu Y. L. 2006** Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299 - 363
- Wang B., Yeun L. H., Xue J. Y., Liu Y., Ané J. M., Qiu Y. L. 2010** Presence of three mycorrhizal genes in the common ancestor of land plants suggests a key role of mycorrhizas in the colonization of land by plants. *New Phytologist* 186: 514 - 525

- Wang E., Yu N., Bano S. A., Liu C., Miller A. J., Cousins D., ... & Downie J. A. 2014** A H⁺-ATPase that energizes nutrient uptake during mycorrhizal symbioses in rice and *Medicago truncatula*. *The Plant cell* 26: 1818 - 1830
- Warcup J. H., Talbot P. H. B. 1969.** Perfect states of Rhizoctonias associated with orchids. *New Phytologist*. 66: 631 - 641
- Warcup J. H., Talbot P. H. B. 1971.** Perfect states of Rhizoctonias associated with orchids. II. *New Phytologist*. 70: 34 - 40
- Warcup J. H., Talbot P. H. B. 1980.** Perfect states of Rhizoctonias associated with orchids. III. *New Phytologist*. 86: 267 - 272
- Waterman R. J., Klooster M. R., Hentrich H., Bidartondo M. I. 2013** Species interactions of mycoheterotrophic plants: specialization and its potential consequences. In: V. S. F. T. Merckx (ed.) 2013 Mycoheterotrophy pp. 267 - 296. Springer New York
- Watts-Williams S. J., Cavagnaro T. R. 2014** Nutrient interactions and arbuscular mycorrhizas: a meta-analysis of a mycorrhiza-defective mutant and wild-type tomato genotype pair. *Plant and soil* 384: 79 - 92
- Weber, H.C., Forstreuter W. 1993** Parasitismus von Blütenpflanzen. Wissenschaftl. Buchgesellschaft Darmstadt.
- Weber H.C., Klahr A., Marron-Heimbuch M. 1995** Anatomical structures of the VA mycorrhiza in the Apocynaceae (Gentianales). *Plant Biology* 108: 525 - 534
- Weiß M., Šýkorová Z., Garnica S., Riess K., Martos F., Krause C., ... & Redecker D. 2011** Sebaciniales everywhere: previously overlooked ubiquitous fungal endophytes. *PLoS ONE* 6: e16793.
- Weiß M., Waller F., Zuccaro A., Selosse M. A. 2016** Sebaciniales—one thousand and one interactions with land plants. *New Phytologist* 211: 20 - 40
- Welch M. D., Meselson M. 2000** Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science* 288: 1211 - 1215
- Wellman C. H., Osterloff P. L., Mohiuddin U. 2003** Fragments of the earliest land plants. *Nature* 425: 282 - 285
- Wellman C. H. 2010** The invasion of the land by plants: when and where? *New Phytologist* 188: 306 - 309
- Westerkamp C. 1997** Keel blossoms: bee flowers with adaptations against bees. *Flora* 192: 125 - 132
- Westerkamp C., Weber A. 1999** Keel flowers of the Polygalaceae and Fabaceae: a functional comparison. *Botanical Journal of the Linnean Society* 129: 207 - 221
- West S. A., Griffin A. S., Gardner A. 2007** Evolutionary explanations for cooperation. *Current Biology* 17: R661 - R672
- Wickett N. J., Zhang Y., Hansen S. K., Roper J. M., Kuehl J. V., Plock S. A., ... & Goffinet B. 2008** Functional gene losses occur with minimal size reduction in the plastid genome of the parasitic liverwort *Aneura mirabilis*. *Molecular Biology and Evolution* 25: 393 - 401
- Wickett N. J., Mirarab S., Nguyen N., Warnow T., Carpenter E., Matasci N., ... & Ruhfel B. R. 2014** Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: E4859 - E4868.
- Wikström N., Savolainen V., Chase M. W. 2001.** Evolution of the angiosperms: calibrating the family tree. *Proceedings of the Royal Society B* 268: 2211 - 2220
- Wikström N., He-Nygrén X., Shaw A. J. 2009** Liverworts (Marchantiophyta). *The timetree of life*. 146 – 152
- Willmann M., Gerlach N., Buer B., Polatajko A., Nagy R., Koebke E., ... & Bucher M. 2013** Mycorrhizal phosphate uptake pathway in maize: vital for growth and cob development on nutrient poor agricultural and greenhouse soils. *Frontiers in plant science* 4: 533
- Wilson B. J., Addy H. D., Tsuneda A., Hambleton S., Currah R. S. 2004** *Phialocephala sphaeroides* sp. nov., a new species among the dark septate endophytes from a boreal wetland in Canada. *Canadian Journal of Botany* 82: 607 - 617
- Wilson G. W., Rice C. W., Rillig M. C., Springer A., Hartnett D. C. 2009** Soil aggregation and carbon sequestration are tightly correlated with the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi: results from long term field experiments. *Ecology*

letters 12: 452 - 461

Winther J. L., Friedman W. E. 2007 Arbuscular mycorrhizal symbionts in *Botrychium* (Ophioglossaceae). *American Journal of Botany* 94: 1248 - 1255

Winther J. L., Friedman W. E. 2008 Arbuscular mycorrhizal associations in Lycopodiaceae. *New Phytologist* 177: 790 - 801

Winther J. L., Friedman W. E. 2009 Phylogenetic affinity of arbuscular mycorrhizal symbionts in *Psilotum nudum*. *Journal of plant research* 122: 485 – 496

Wojciechowski M. F., Lavin M., Sanderson M. J. 2004. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well supported subclades within the family. *American journal of botany* 91: 1846-1862.

Wright D. P., Scholes J. D., Read D. J. 1998a Effects of VA mycorrhizal colonization on photosynthesis and biomass production of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell & Environment* 21: 209 - 216

Wright D. P., Read D. J., Scholes J. D. 1998b Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell & Environment* 21: 881 - 891

Wright M., Guest D., Cross R. 2005 Development of mycorrhizal associations in *Caladenia tentaculata*. *Selbyana* 114 - 124

Wubet T., Kottke I., Teketay D., Oberwinkler F. 2009 Arbuscular mycorrhizal fungal community structures differ between co-occurring tree species of dry Afromontane tropical forest, and their seedlings exhibit potential to trap isolates suited for reforestation. *Mycological progress* 8: 317 - 328

Xue L., Cui H., Buer B., Vijayakumar V., Delaux P. M., Junkermann S., Bucher M. 2015 Network of GRAS transcription factors involved in the control of arbuscule development in *Lotus japonicus*. *Plant physiology* 167: 854 – 871

Yagame T., Yamato M., Suzuki A., Iwase K. 2008. Ceratobasidiaceae mycorrhizal fungi isolated from nonphotosynthetic orchid *Chamaegostrodia sikokiana*. *Mycorrhiza* 18: 97 - 101

Yagame T., Orihara T., Selosse M. A., Yamato M., Iwase K. 2012 Mixotrophy of *Platanthera minor*, an orchid associated with ectomycorrhiza forming Ceratobasidiaceae fungi. *New Phytologist* 193: 178 - 187

Yamato M., Yagame T., Suzuki A., Iwase K. 2005. Isolation and identification of mycorrhizal fungi associating with an achlorophyllous plant, *Epipogium roseum* (Orchidaceae). *Mycoscience* 46: 73 - 77

Yamato M., Yagame T., & Iwase, K. 2011a Arbuscular mycorrhizal fungi in roots of non-photosynthetic plants, *Sciaphila japonica* and *Sciaphila tosaensis* (Triuridaceae). *Mycoscience* 52: 217 - 223

Yamato M., Yagame T., Shimomura N., Iwase K., Takahashi H., Ogura-Tsujita Y., Yukawa T. 2011b Specific arbuscular mycorrhizal fungi associated with non-photosynthetic *Petrosavia sakuraii* (Petrosaviaceae). *Mycorrhiza* 21: 631 – 639

Yamato M., Ogura-Tsujita Y., Takahashi H., Yukawa T. 2014 Significant difference in mycorrhizal specificity between an autotrophic and its sister mycoheterotrophic plant species of *Petrosaviaceae*. *Journal of plant research* 127: 685 - 693

Yang S. Y., Grønlund M., Jakobsen I., Grotemeyer M. S., Rentsch D., Miyao A., ... & Catausan S. 2012 Nonredundant regulation of rice arbuscular mycorrhizal symbiosis by two members of the PHOSPHATE TRANSPORTER1 gene family. *The Plant Cell* 24: 4236 - 4251

Yano K., Yoshida S., Müller J., Singh S., Banba M., Vickers K., ... & Asamizu E. 2008 CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 20540 - 20545

Yawney W. J., Schultz R. C. 1990. Anatomy of a vesicular—arbuscular endomycorrhizal symbiosis between sugar maple (*Acer saccharum* Marsh) and *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann. *New Phytologist*. 114: 47 – 57

Yoneyama K., Xie X., Kim H. I., Kisugi T., Nomura T., Sekimoto H., ... & Yoneyama K. 2012 How do nitrogen and phosphorus deficiencies affect strigolactone production and exudation? *Planta* 235: 1197 - 1207

Young J. P. W. 2015 Genome diversity in arbuscular mycorrhizal fungi. *Current opinion in plant biology* 26: 113 - 119

- Yu T. E., Egger K. N., Peterson L. R. 2001** Ectendomycorrhizal associations-characteristics and functions. *Mycorrhiza* 11: 167 - 177
- Yu N., Luo D., Zhang X., Liu J., Wang W., Jin Y., ... & Zeng L. 2014** A DELLA protein complex controls the arbuscular mycorrhizal symbiosis in plants. *Cell research* 24: 130
- Yukawa T., Ogura-Tsujita Y., Shefferson R. P., Yokoyama J. 2009.** Mycorrhizal diversity in *Apostasia* (Orchidaceae) indicates the origin and evolution of orchid mycorrhiza. *American Journal of Botany* 96: 1997 – 2009
- Zhang X., Dong W., Sun J., Feng F., Deng Y., He Z., ... & Wang E. 2015** The receptor kinase CERK1 has dual functions in symbiosis and immunity signalling. *The Plant Journal* 81: 258 - 267
- Zhao M. M., Zhang G., Zhang D. W., Hsiao Y. Y., Guo S. X. 2013** ESTs analysis reveals putative genes involved in symbiotic seed germination in *Dendrobium officinale*. *PLoS One* 8: e72705.
- Zhao X., Zhang J., Chen C., Yang J., Zhu H., Liu M., Lv F. 2014** Deep sequencing-based comparative transcriptional profiles of *Cymbidium hybridum* roots in response to mycorrhizal and non-mycorrhizal beneficial fungi. *BMC genomics* 15: 747
- Zhi-Chen S., Wei-Ming W., Fei H. 2004** Fossil pollen records of extant angiosperms in China. *The Botanical Review* 70: 425 - 458
- Zhu Y. G., Miller R. M. 2003** Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil - plant systems. *Trends in plant science* 8: 407 - 409
- Zimmer K., Hynson N. A., Gebauer G., Allen E. B., Allen M. F., Read D.J. 2007.** Wide geographical and ecological distribution of nitrogen and carbon gains from fungi in pyroloids and monotropoids (Ericaceae) and in orchids. *New Phytologist* 175: 166 – 17
- Zimmer K., Meyer C., Gebauer G. 2008 The ectomycorrhizal specialist orchid *Corallorhiza trifida* is a partial myco heterotroph. *New Phytologist* 178: 395 – 400
- Zobel M., Öpik M. 2014** Plant and arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities–which drives which? *Journal of Vegetation Science* 25: 1133 - 1140

Quellenverweis des Online-Bildmaterials

Fig. 37: ***Buxbaumia aphylla***: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Buxbaumia_aphylla_13042013b.jpg

Fig. 40: ***Polygala myrtifolia***: Wikimedia [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polygala_myrtifolia - San Luis Obispo Botanical Garden - DSC05967.JPG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polygala_myrtifolia_-_San_Luis_Obispo_Botanical_Garden_-_DSC05967.JPG)

Salomonina cantoniensis: Hong Kong Herbarium <http://www.herbarium.gov.hk/subpages.aspx?id=7597>

Salomonina ciliata: Nature Photography (Taiwan) <http://nc.biodiv.tw/bbs/showthread.php?p=591157#post591157> Eigentümer und Copyrights: Lin Chia Long

Epirixanthes elongata: BioLib.cz <https://www.biolib.cz/en/image/id275708/>

Eigentümer und Copyrights: M. Hroneš. Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, CZ-78371 Olomouc, Czech Republic

Fig. 41 c: ***Polygala setacea* (Blattrosette)**: <http://florida.plantatlas.usf.edu/plant.aspx?id=2980>

XV Publikationen

Akzeptiert:

Rath M., Weber H. C., Imhof S. 2013 Morphoanatomical and molecular characterization of the mycorrhizas of European *Polygala* species. *Plant Biology* 15: 548 - 557

Rath M., Grolig F., Haueisen J., Imhof S. 2014 Combining microtomy and confocal laser scanning microscopy for structural analyses of plant-fungus associations. *Mycorrhiza* 24: 293 - 300

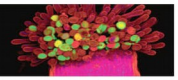
Mennes C. B., Moerland M. S., Rath M., Smets, E. F., Merckx, V. S. 2015 Evolution of mycoheterotrophy in Polygalaceae: The case of *Epirixanthes*. *American Journal of Botany* 102: 598 - 608

Manuskripte:

Rath M., Sasirat S., Weber H. C., Imhof S. From trees to mycoheterotrophic plants - morpho-anatomical aspects in evolution of arbuscular mycorrhiza in Polygalaceae. Manuskript A (eingereicht)

Rath M., Sasirat S., Imhof S. Systematic analysis of arbuscular mycorrhizal symbionts of Polygalaceae from America, Southeast Asia and Europe - clues for functional constraints of partner choice in the evolution of mycoheterotrophy? Manuskript B

S. 226 – 330: Publikationen und Manuskripte in thematischer Reihenfolge



RESEARCH PAPER

Morpho-anatomical and molecular characterization of the mycorrhizas of European *Polygala* species

M. Rath, H. C. Weber & S. Imhof

Spezielle Botanik und Mykologie, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany

Keywords

Evolution; mycorrhizal shift; mycorrhizal specificity; Polygalaceae.

Correspondence

M. Rath, Spezielle Botanik und Mykologie,
 Fachbereich Biologie, Philipps-Universität
 Marburg, 35032 Marburg, Germany.
 E-mail: rath@biologie.uni-marburg.de

Editor

P. Franken

Received: 25 June 2012; Accepted: 28 August
 2012

doi:10.1111/j.1438-8677.2012.00680.x

ABSTRACT

The mycorrhizas of 12 species of *Polygala* (Polygalaceae), including herbs, subshrubs and one shrub, collected from Germany, Mallorca (Spain) and Malta, were investigated by morpho-anatomical and molecular methods. Aseptate hyphae, arbuscules and vesicles indicate an arbuscular mycorrhiza in all species examined. Hyphal spread in *Polygala* is predominantly, but not exclusively, intracellular and comprises three characteristic stages of colonization: (i) intracellular, linear hyphal growth in a cascading manner after penetration towards the penultimate parenchyma layer (layer 2), (ii) initially linear hyphal growth in the cells of layer 2 from where hyphal branches repeatedly penetrate the anatomically distinct innermost parenchyma layer (layer 1), forming arbuscule-like structures therein which are subject to degeneration, (iii) more branches from the linear hyphae in layer 2 develop, but coil and make contact to the layer outside layer 2 (layer 3) in which arbuscule-like structures similar to those in layer 1 form and degenerate. This general colonization pattern differs in details between the species, and critical comparisons, in particular between the woody *P. myrtifolia*, the herbaceous *Polygala* spp. and the mycoheterotrophic *Epirixanthes* spp. (Polygalaceae) suggest an evolutionary shift of mycorrhizal features within the family towards an optimization of plant benefit through the fungus. Based on the molecular marker 18S rDNA mycorrhizal fungi detected in roots of *Polygala* spp. are largely restricted to five clades of Glomeraceae 1 (Glomus Group A). This result rejects the hypothesis of a strict symbiotic specificity in Polygalaceae but may stimulate a discussion on functionally compatible groups of fungi.

INTRODUCTION

Polygalaceae (21 genera, 800–1000 species after Eriksen & Persson 2007) are one out of only three non-monocot plant families which have developed mycoheterotrophy, *i.e.* an achlorophyllous habit with complete dependence on a mycorrhizal fungus for carbon supply. The Polygalaceae comprise all major life forms as there are trees, shrubs, subshrubs, lianas, perennial and annual herbs, herbs with limited photosynthetic tissue (*e.g.* *P. setacea*, *Salomonina* spp.) and achlorophyllous species. Except for Polygalaceae, this only holds for Ericaceae having ecto-related mycorrhizas, and Gentianaceae/Apocynaceae (Gentianales) being arbuscular mycorrhizal (Imhof 2009). Hence, Polygalaceae provide a rare opportunity to investigate how mycorrhizal plants evolved mycoheterotrophy. The final stage of mycorrhizal specialization in this family, namely in the achlorophyllous *Epirixanthes* spp., has already been characterized (Imhof 2007). The present paper focuses on a set of closely related (exception *P. chamaebuxus*) species of *Polygala* in tribe Polygaleae (Forest *et al.* 2007) and describes the mycorrhizal features of a shrub, two sub-shrubs and several herba-

ceous species for elucidation of the putative mycorrhizal progression.

Identification of mycobionts in several, often mycoheterotrophic plant taxa have revealed narrow specificity towards symbiotic fungi relative to the generalist associations of photosynthetic plants (*e.g.* Bidartondo *et al.* 2002; Leake 2004; Bidartondo & Bruns 2005; Franke *et al.* 2006; Hynson & Bruns 2010). The molecular characterization of the mycorrhizal fungi in *Polygala* in this study tests the hypothesis that plant families comprising mycoheterotrophic representatives might be relatively selective.

MATERIAL AND METHODS

Eleven species of *Polygala* L., one species represented by two subspecies, were arbitrarily collected from geographically distant sites in Germany, Spain (Mallorca) and Malta (see Table 1). For spatial distribution of the collecting sites see Fig. 1A.

Structural investigation

Immediately after collection, the samples were fixed in FPA [formalin (37%): propionic acid (>99%): ethanol (50%), 0,5:0,5:9] for several days and subsequently preserved in 70% ethanol. Additionally, herbarium specimens were taken from each species and stored in the Herbarium of the Philipps-University of Marburg.

This article was published online on 17 December 2012. Errors were subsequently identified throughout the text. This notice is included in the online and print versions to indicate that both have been corrected 29 January 2013.

Table 1. Species of *Polygala* (L.) and collecting sites used for the study.

Sites 1	a) <i>P. comosa</i> (1)	b) <i>P. vulgaris</i> ssp. <i>vulgaris</i> (3); <i>P. amara</i> ssp. <i>brachyptera</i> (3); <i>P. comosa</i> (1)	c) <i>P. vulgaris</i> ssp. <i>vulgaris</i> (1); <i>P. amara</i> ssp. <i>brachyptera</i> (2); <i>P. comosa</i> (2)
Sites 2	a) <i>P. vulgaris</i> ssp. <i>vulgaris</i> (5)	b) <i>P. serpyllifolia</i> (3)	
Site 3	<i>P. serpyllifolia</i> (1)		
Site 4	<i>P. vulgaris</i> ssp. <i>collina</i> (4)		
Site 5	<i>P. serpyllifolia</i> (2)		
Site 6	<i>P. amarella</i> (2); <i>P. calcarea</i> (1)		
Site 7	<i>P. calcarea</i> (1)		
Sites 8	a) <i>P. amara</i> ssp. <i>brachyptera</i> (1); <i>P. chamaebuxus</i> (2)	b) <i>P. chamaebuxus</i> (2); <i>P. comosa</i> (1)	
Site 9	<i>P. amara</i> ssp. <i>brachyptera</i> (1); <i>P. alpestris</i> (3)		
Sites 10	a) <i>P. rupestris</i> (2)	b) <i>P. rupestris</i> (2)	c) <i>P. rupestris</i> (1)
Sites 11	a) <i>P. monspeliaca</i> (1)	b) <i>P. monspeliaca</i> (1)	d) <i>P. myrtifolia</i> (1)

Collecting sites of *Polygala* spp. in Germany, Spain and Malta. One of each specimen in bold font were used for molecular fungal identification; in brackets are the number of investigated plants. Sites 1: Werra-Meißner-Kreis a) Kesteig, b) Rückerode, c) Badenstein; Sites 2: Kreis Marburg-Biedenkopf a) Wommelshausen, b) Burgwald near Schönstadt; Site 3: Kreis Olpe, Lindenbergring near Schreibershof; Site 4: Hochsauerland-Kreis, Hildfeld; Site 5: Kreis Trier, Thiergarten; Site 6: Kreis Südwestpfalz, Werderhof; Site 7: Saarpfalz-Kreis, Hardter Eck near Gersheim; Sites 8: Kreis Forchheim a) Bärenschlucht near Tüchersfeld, b) Sieben Brüder near HaBlach; Site 9: Kreis Garmisch-Partenkirchen, Mittleres Hörnle near Unterammergau; Sites 10: a) Costa de la Calma, b) Randa, c) Cala Mondragó, d) roadside near Palma; Sites 11: a) Nardur Tower, b) Ta' Qali Nat.

At least five root segments of each of the 50 collected individuals were dehydrated in an ascending ethanol series and embedded in Unicryl™ (British Biocell International, Cardiff, UK). Sequential series of 4 µm thick longitudinal and transversal sections (Leica, Supercut 2065, Leica Instruments, Nussloch, Germany) were stained with toluidine blue O (SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Germany) (1 g toluidine blue O + 1 g sodium tetraborate in 100 ml distilled H₂O) and mounted in Corbit balsam. In total, approximately 30,000 root sections were examined. For histological analyses paraffin (57–60 °C; Merck Millipore, Darmstadt, Germany) embedded root material (Gerlach 1984) was cut with a rotary microtome (Leitz 1512; Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar, Germany) in 15 µm thick transversal and longitudinal sections. The slices were deparaffinated in Roti-Histol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) followed by rehydration in an descending ethanol series before staining with chlor-zinc-iodide and Lugol-Solution + diluted H₂SO₄ (Gerlach 1984) for cellulose respectively Oil Red [0.5 g Oil Red O (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany) in 100 ml Isopropanol, diluted with distilled H₂O 1.5:1] for suberin detection was applied. Pictures were taken with a Leica SD6 macroscope and a Leica DMRB microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), both equipped with a digital camera [Leica DFC280 (Leica) or Moticom 2300 (Moticom Deutschland GmbH, Wetzlar, Germany)]. Macroscopic pictures of the root system were taken with a Nikon D70 digital SLR camera (Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

Molecular identification of the mycorrhizal fungi

Directly after collection, root material from the species and sites indicated in Table 1 was rinsed with distilled H₂O and fixed in CTAB buffer (Lodhi *et al.* 1994). In the lab, a root sample (3–10 mm in length) was randomly taken from each of the 12 individuals chosen for analysis, ensuring that most collection sites (about 1400 km apart) and all species (except *P. monspeliaca* (Malta) and *P. chamaebuxus*) are represented in the analysis by at least one individual. *P. amara* ssp. *brachyptera* and *P. vulgaris* ssp. *vulgaris* were taken from two collection sites. The root samples were frozen in liquid nitrogen in an Eppendorf tube

and coarsely ground with a steel pestle. Root residues were rinsed off the pestle with 400 µl of CTAB buffer. Fine grinding was done by adding 0.4 ml of glass beads to the coarsely ground root material, treated in a cell mill (Retsch® MM200; RETSCH GmbH, Haan, Germany) for 30 min at 25 Hz. DNA was obtained using standard phenol/chloroform extraction followed by ethanol precipitation (*e.g.* Müllhardt 2006). The resulting DNA samples were applied to a PCR with Pfu Polymerase (Promega, Corporation, Madison, WI, USA) using the primer set AM1 (Helgason *et al.* 1998) and NS31 (Simon *et al.* 1992) which, although causing a bias against Archaeosporaceae, Paraglomeraceae and *Gigaspora* spp. (Redecker *et al.* 2000; Schreiner & Mihara 2009) amplify many clades in Glomeromycota and, in particular, allows comparison with a multitude of sequences stored in molecular databases. The PCR product was run on a 1% TAE gel, the resulting 550 bp fragment cut out and purified using a Kit (Avegene, Life Sciences, Orlando, FL, USA). The purified PCR products were cloned in a pJET1.2 vector (Fermentas International Inc., Burlington, Canada) and transformed in TOP10 *E. coli* cells (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). At least 20 colonies were picked from each root sample and prepared after the protocols of Sambrook *et al.* (1989). A fraction of each clone was digested with the restriction enzyme BglII. Those clones showing an insert of 550 bp were purified using 30% PEG 8000 soluted in 30 mM MgCl (modified after Paithankar & Prasad 1991) and bidirectionally sequenced using the plasmid primers SL619 and SL620 (primer sequences: see Table S1). Sequences were stored at the EMBL Nucleotide Sequence Database in the European Nucleotide Archive (ENA). 141 published sequences (Table S2) comprising isolates of arbuscular mycorrhizal fungi from South and Central America, North America, Europe, Central Africa and Asia were aligned with the sequences obtained from the investigated *Polygala* species using MUSCLE (vers. 3.8.31, Edgar 2004) implemented in PhyDE (vers. 09971, Müller *et al.* 2010). Alignment (see supplemental files) was revised manually, and taken for maximum parsimonious (MP) analyses using modules Dnapars, Seqboot and Consense implemented in PHYLIP (vers. 3.69, Felsenstein 2005) and MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). The MP trees were evaluated by a bootstrap analysis with 10,000 repli-

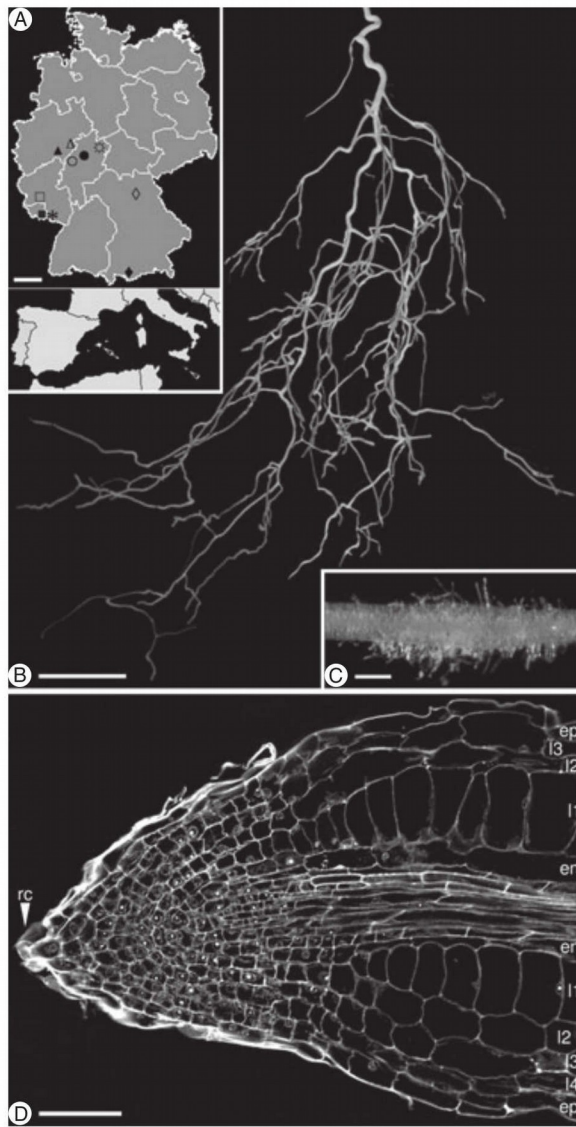


Fig. 1. A: Germany (upper map) and the mediterranean region (lower map) with collecting sites: ⚡ = site 1a,b,c; ○ = site 2a; ● = site 2b; ▲ = site 3; △ = site 4; □ = site 5; * = site 6; ■ = site 7; ◇ = site 8a,b; ◆ = site 9; arrow = Mallorca, site 10a,b,c,d; arrowhead = Malta, site 11a,b. Scale (Germany) = 100 km. B: Allorhizic root system of *P. vulgaris* ssp. *vulgaris* with hyaline fine roots. Scale = 1 cm. C: Primary root of *P. vulgaris* ssp. *vulgaris* showing a tuft of short root hairs. Scale = 0.3 mm. D: Longitudinal section of a root tip of *P. serpyllifolia* showing root cap (rc), epidermis (ep), endodermis (en), and four cortex parenchyma layers (l1–4). Note the early anatomical distinction of layer 1 (l1). Scale = 50 μ m.

cates limiting the maximum tree number to 10,000 to be used for majority rule consensus tree generation. MrBayes analyses was done using gamma distribution rate variation among sites and 10,000,000 generations of the MCMC chains in runs of 14 chains apiece; otherwise the default parameters were used. The first 25,000 trees were discarded as burn-in; the rest was used to calculate a 50% majority rule consensus tree. *Endogone pisiformis* strain NG_017181 was used as an outgroup.

RESULTS

Morpho-anatomical description

All species have an allorhizic, *i.e.* the embryonic root develops into the main root with side roots (Fig. 1B). The youngest roots are fragile and nearly hyaline, easily breaking off during excavation. Primary roots vary in diameters from 220 to 590 μ m. The papillous or short (63–313 μ m) root hairs are scattered to lacking, occasionally they build tufts (Fig. 1C).

The persistent cells of the root epidermis are longitudinally elongated (90–120 μ m). An exodermis is lacking, but the endodermis cell walls contain a suberin lamella. Depending on the species, the number of parenchyma cell layers varies from three to four in *P. vulgaris* and *P. serpyllifolia* (Figs 1D and 3A), three to occasionally five layers in *P. alpestris*, *P. amarella*, *P. calcarea*, *P. comosa*, *P. chamaebuxus* and more often five layers in *P. amara* ssp. *brachyptera*, *P. rupestris*, *P. monspeliaca* and *P. myrtifolia*. In longitudinal direction, the outer parenchyma cells are longer (70–130 μ m) than the cells of the innermost parenchyma layer (30–50 μ m, layer 1) (Figs 1D and 2G). Instead, the cells of layer 1 are enlarged radially up to 70 μ m (Figs 1D and 3A). This striking difference in cell shape is already visible shortly behind the root apical meristem (Fig. 1D), and reflects the functional differences of layer 1 and layer 2 (externally next to layer 1). The diarchic central cylinder (Fig. 3A) shows secondary growth, eventually resulting in the obliteration of the primary cortex parenchyma. In *P. myrtifolia*, layer 1 is not as uniform as in the herbaceous *Polygala* spp. It varies in cell shape (Fig. 3B) and occasionally is even two-layered (Fig. 3C).

With few exceptions, the mycorrhizal structures are virtually identical in all of the investigated species. Therefore, the following descriptions are representative of all species and only the differences will be mentioned along with the correspond taxa. External hyphae are often closely attached to the epidermis. Branches of these hyphae mostly penetrate the epidermis cells intracellularly without appressoria (Fig. 2A) and penetrations of root hairs can also occur. Only occasionally, the hyphae grow between two adjacent cells of the epidermis and penetrate the cells of the outermost cortex layer directly. After penetration, the hyphae grow linearly but with multiple branching in longitudinal, tangential and radial direction within the outer cortex layers, seeking close contact to the inner periclinal cell walls. At such cell wall contacts, the adjacent cell may be penetrated through a hyphal branch. However, this only happens when the respective cell has not previously been colonized by the same hyphal system, *i.e.* the hyphae avoid double penetrations of a cell (Fig. 2A). This relatively simple hyphal distribution pattern, based on the determination whether a cell is already inhabited by fungal hyphae or not, automatically allocates the fungus in a cascading manner into multiple cells of layer 2 (Fig. 2A). As indicated above, layer 2 indeed has an important distribution function in the symbiosis, since it has contact to the putative digestive layers 1 and 3. In layer 2, double penetrations of cells can occur. Within layer 2, the hyphae initially still grow straight along the inner periclinal cell walls in longitudinal and tangential direction (Fig. 2B). At points of very close contact to the inner periclinal cell walls, hyphae ramify to enter layer 1 (digestion layer) and build terminal arbuscule-like structures (ALS) therein (Fig. 2C). These structures

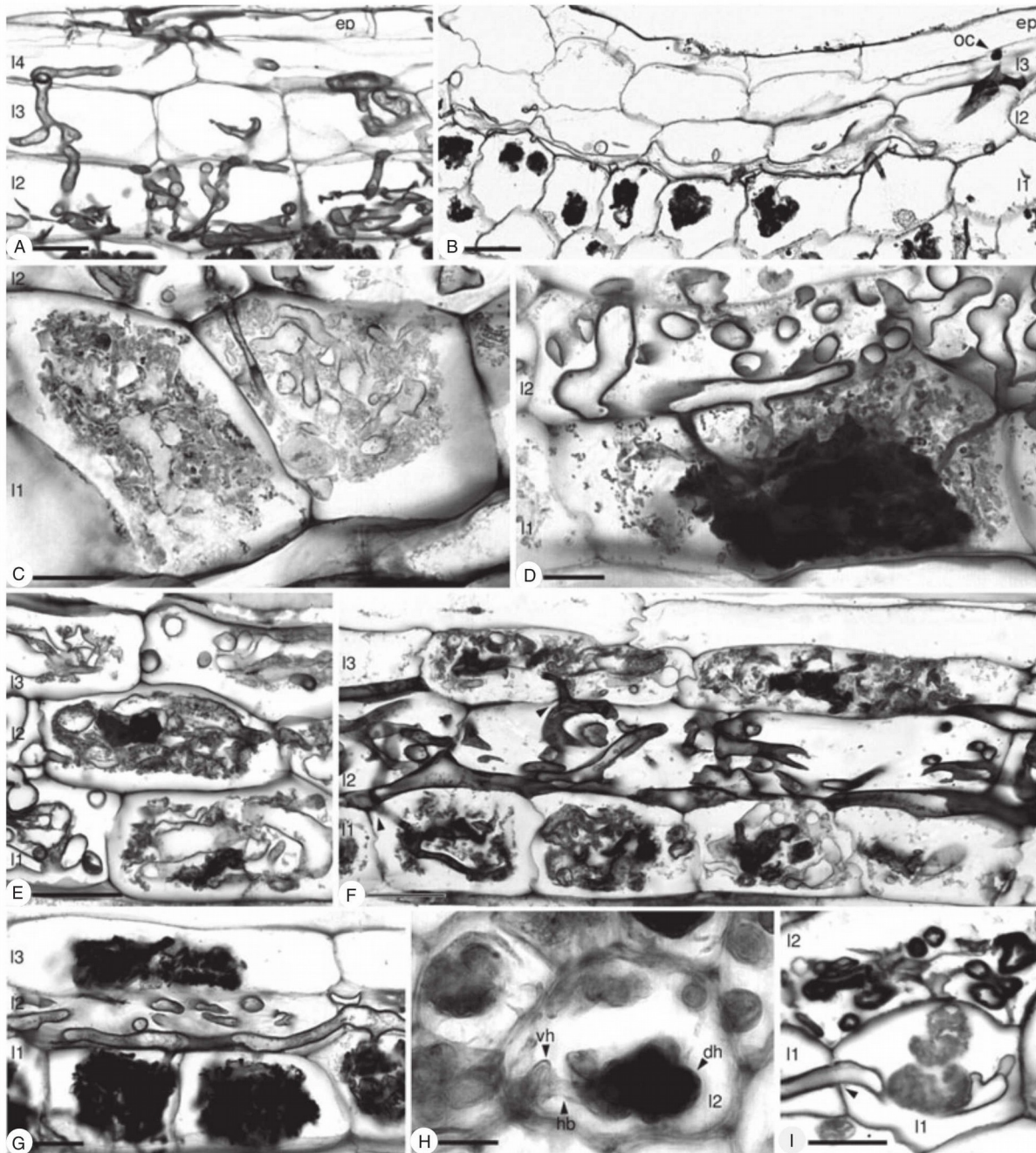


Fig. 2. A: Longitudinal root section of *P. vulgaris* ssp. *collina* showing the characteristic cascading spread of hyphae after penetration. Scale = 50 μ m. B: Longitudinal root section of *P. serpyllifolia*. Hyphae in layer 2 initially grow linearly along the inner periclinal cell walls, and send branches into layer 1 where they degenerate quickly. oc = origin of colonisation. Scale = 50 μ m. C: Close-up of two cells of layer 1 in the root of *P. chamaebuxus* containing arbuscule-like structures (transversal section). Scale = 30 μ m. D: Close-up of a longitudinal root section of *P. vulgaris* ssp. *collina*. A cell of layer 1 is penetrated three times from layer 2 and arbuscule-like structures are formed followed by heavy degeneration. Scale = 20 μ m. E: Longitudinal root section of *P. amarella* showing a late stage of colonization with terminal ALS in cells of layer 1 and lateral ALS in layer 2. Scale = 25 μ m. F: Late stage of colonization in a longitudinal root section of *P. amarella* showing intercellular hyphae between layer 1 and layer 3 projecting ALS in layer 1 (arrowhead), intracellular hyphal coiling in layer 2 with branches projecting terminal ALS in cells of layer 3 (arrowhead). Scale = 15 μ m. G: Root of *P. vulgaris* ssp. *collina* with linear hyphae growing closely attached to the inner tangential cell wall of layer 2 partly hidden by cooccurrence of coiled hyphae lying inside the same cells (longitudinal section). Scale = 30 μ m. H: Close-up of a cell of layer 2 in a root of *P. rupestris* stained with chlor-zink-iodide. Vital (living) hyphae (vh) not covered with cellulose connected via hyphal bridge (hb) to the degenerated arbuscule-like structure which shows strong (black stained) cellulose apposition (transversal section). Scale = 25 μ m. I: Close-up of two cells in layer 1 of *P. myrtifolia*, with a hyphal transition (arrowhead) between these cells (root, longitudinal section). Scale = 20 μ m.

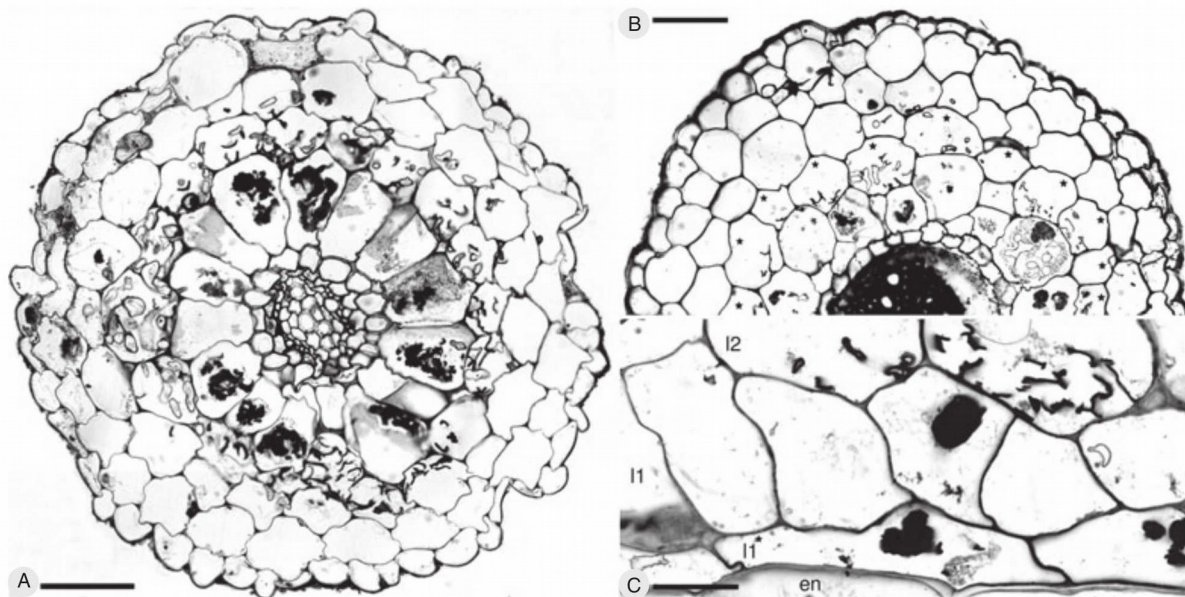


Fig. 3. A: Transversal root section of *P. serpyllifolia* showing the histological distinct layer 1 consisting of radially enlarged cells. Scale = 50 µm. B: Transversal root section of *P. myrtifolia*. Layer 2 is marked by asterisks, layer 1, the layer beneath layer 2, is not as anatomically uniform as in the other *Polygala* sp.. Cells of layer 1 contain arbuscule-like structures (ALS). Scale = 100 µm. C: Longitudinal root section of *P. myrtifolia* showing an additional cell layer beneath layer 1, layer 1* (l1*), harbouring degenerated arbuscule-like structures alike those in layer 1 above. Scale = 25 µm.

are similar to arbuscules in their terminal position, but due to larger diameters of the hyphal branches it also is reminiscent to the coils of a *Paris*-type AM. All hyphae that have entered layer 1 will degenerate to amorphous clumps (Fig. 2B,D). This degeneration process, which is best explained as a digestion of hyphal material through the root cells, is presumably rather quick, since only few vital (*i.e.* apparently living) looking hyphae can be found there. Nevertheless, since cells of this layer can become colonized several times from layer 2, amorphous clumps can occur together with less degraded ALS, suggesting a time-dependent digestion process (Fig. 2D). In *P. myrtifolia*, the terminal nature of ALS is less strict and branches of the ALS occasionally proceed into neighboring cells of layer 1 (Fig. 2I), which is a rare phenomenon in the herbaceous species. After having sent hyphae into layer 1, the straight hyphae in layer 2 also start to branch. This eventually disguises the linear growth of the early colonization (Fig. 2G) and fills the cells with hyphal coils (Fig. 2D,G). However, hyphal degeneration in layer 2 does not occur up to this stage. When every cell of layer 1 in the vicinity of the colonization is filled with hyphal material, and provided there are at least two more cell layers between layer 2 and the epidermis (4–5-layered cortex parenchyma), the coiled hyphae in layer 2 also send branches into layer 3 (externally next to layer 2) (Fig. 2F). Again, close physical contact is necessary for penetration, and the delayed coiling of the hyphae in layer 2 therefore seems a prerequisite for the colonization of layer 3 in order to reach the outer periclinal cell wall. In layer 3, similar ALS are formed and digested as in the layer 1 (Fig. 2F,G). Hence, layer 3 can be colonized by two different hyphal morphologies, depending from where it became penetrated. At the same time, lateral ALS are formed at the coils in layer 2, and, in contrast to the coils, also undergo a degeneration process (Fig. 2E). In a 3-layered cortex parenchyma, ALS are missing in layer 3, and only the lateral ALS in

layer 2 develop. Hence, the outermost parenchyma layer stays free of ALS and only hosts the straight hyphae coming from initial root penetrations. The degeneration of fungal material is specifically indicated by strong cellulose appositions and could only be detected at the ALS. This holds for all parenchyma layers, even for layer 2, where cellulose appositions and degeneration are lacking on coils and straight hyphae, but are present at the lateral ALS, all together in a single cell (Fig. 2H).

Intercellular hyphal growth is also present in most species and its abundance is positively correlated with colonization density. Intercellular hyphae are frequent especially in *P. amara* ssp. *brachyptera* and *P. amarella* (Fig. 2F), mostly occurring in the intercellular spaces around layer 2. They frequently re-enter the cells of layer 2, but once having penetrated layers 1 or 3, they turn into ALS (Fig. 2F). In *P. myrtifolia* and *P. chamaebuxus*, intercellular hyphae were found only rarely. Vesicles occur intra- and occasionally also intercellularly. Due to secondary growth, the primary cortex and the inhabiting fungi finally become squeezed and are lost for the symbiosis.

Molecular characterization of the fungal symbionts

Partial 18S rDNA sequences of 20 different fungal OTUs (Operational Taxonomic Unit) were obtained from 10 of the 12 investigated *Polygala* species (see supplemental files Table S3). With three exceptions (sequences F–H), they split into five distinct clades (A–E) within Glomeraceae 1 (GlGrA). These results were obtained independently by MrBayes (Fig. 4) and parsimonious analyses (see Fig. S1). Posterior probability as well as bootstrap values are rather low in some branches of the trees. This is due to the high number of sequences used in order to increase the credibility of the results. The inclusion of less sequences would result in higher values, but also in a biased systematic relationship.

lution of the AM from woody to achlorophyllous species in Polygalaceae.

Imhof (2007) noticed the cascading hyphal spread in the outer cortex parenchyma of *Epirixanthes* spp., interpreted this pattern as the first, coarse level of a two level hyphal distribution strategy, but could not explain its development. With the finding that the straight hyphae in the outer cortex layers only penetrate uncolonized cells this cascading pattern now becomes comprehensible. The finding points to the existence of a recognition mechanism, responsible for segregating cells that are not to be colonized (neighbouring cell already contains hyphae) from cells that can be colonized (neighbouring cell is free of hyphae). The close contact of hyphae to the inner periclinal host cell walls ('creeping' growth) might be a structural sign of this recognition process. Investigations on early stages of AM formation in *Medicago truncatula* and *Daucus carota* have revealed host cell nucleus migration with subsequent formation of a cytoplasmic assembly called prepenetration apparatus (PPA) foreshadowing the course of the hyphae within the cell and indicating a primarily host plant-controlled mechanism of hyphal growth pattern (Genre *et al.* 2005, 2008; Bonfante & Genre 2008). *Polygala* and *Epirixanthes* could have adapted this mechanism to allow nucleus migration and PPA formation only once per cell in the outer root cortex, thus fixing the cascading hyphal spread in their genetic program. The advantage could be that, in combination with hyphal ramifications, this colonization mode multiplies a single root penetration point into numerous hyphal growing tips in a widespread allocation when reaching layer 2. This spreading effect is more pronounced when more cortex parenchyma layers are present. In fact, the fully mycoheterotrophic *Epirixanthes* spp. have one or two layers of cortex parenchyma more than the European *Polygala* species (Imhof 2007), and, thus, benefit more from the cascading distribution mode, a first clue for a mycorrhizal shift within this family.

Degeneration of fungal structures is more probably a digestive process either of coils (tolyphagy) or arbuscules (thamniscophagy, after Burgeff 1938, 1943). Most obvious is the tolyphagy in mycoheterotrophic plants, which essentially depend on carbon from the fungus (*e.g.* Magnus 1900; Dörr & Kollmann 1969; Imhof 1997, 1998, 1999a,c, 2003, 2006; Imhof & Weber 2000; Franke 2002). The expression 'thamniscophagy' has not been used in recent publications, since the degeneration of arbuscules was interpreted as an aging effect of an ephemeral structure possibly triggered by autolytic processes rather than a digestion (Alexander *et al.* 1988, 1989; Peterson & Bonfante 1994; Smith & Read 2008). However, in contrast to *Epirixanthes* spp., which show degeneration of coiled hyphae in layer 1, *Polygala* spp. still reveal arbuscule-like structures (ALS) in this layer, before they degenerate. The iterative colonization of layer 1 with ALS and their pronounced degeneration compared to the coils in layer 2 relate to the meaning of 'thamniscophagy', including its functional interpretation as a nutrient transfer from fungus to plant (Burgeff 1938, 1943). Nevertheless, digestion of hyphal coils appears to be more effective in terms of matter transfer than digestion of arbuscules, simply due to the higher ratio of fungal cytoplasm to cell wall material. Furthermore, structural (Bonfante-Fasolo *et al.* 1981; Blee & Anderson 1998), physiological (Marx *et al.* 1982; Bago 2000) and molecular results (Blee & Anderson 1998, 2002; Schüßler *et al.* 2006) argue for an essential role of the arbuscular inter-

face in carbon uptake by the endophyte. Hence, reduction of arbuscules in favor of coils is, speaking economically, advantageous especially for plants that are vulnerable to carbon loss. Moreover, the degeneration process of hyphae in layer 1 of *Epirixanthes* spp. is characterized by immediate swelling and collapsing of thick hyphae. *Polygala* spp. allow the hyphae in layer 1 at least to ramify into an ALS and sometimes non-degenerated branches are still found. Very rarely, the hyphae may even spread to neighboring cells, indicating that the specialization of layer 1 for hyphal digestion is not yet fully accomplished. The structural change from ALS (*Polygala* spp.) to coils (*Epirixanthes* spp.) as well as the incomplete specialisation of layer 1 can be seen as a second clue for the mycorrhizal shift in Polygalaceae. The infrequent occurrence of an additional cortex layer between layer 1 and the endodermis leads over to the next point.

So far, anatomically distinct cells serving for the digestion of fungal material have been found only in mycoheterotrophic plants (Imhof 1998, 2001, 2003, 2007). *Polygala* spp. are the first photosynthetic plants having this feature. However, cells of layer 1 in *P. myrtifolia* are not as uniformly enlarged and strictly uniseriate as they are in its sister species and, thus, must be considered as less specialized with respect to root anatomy, too. Because the anatomical differentiation of layer 1 is connected to its function in the mycorrhizal pattern, the deviating root anatomy of *P. myrtifolia* provides a third clue for the existence of a mycorrhizal shift.

The most obvious difference between the mycorrhizas of *Epirixanthes* spp. and *Polygala* spp. is the occurrence of intercellular hyphae in the latter. Intercellular spaces are known to contain considerable amounts of carbohydrates (Farrar 1985; Chapleo & Hall 1989; Farrar *et al.* 2003) and several publications suggest an ability of intercellular AMF hyphae to absorb carbohydrates derived from host plants (Mosse & Hepper 1975; Gianinazzi-Pearson *et al.* 1991a; Smith *et al.* 1994; Smith & Smith 1997). Therefore, plants should be under evolutionary pressure to minimize this carbon leakage by excluding fungi from intercellular spaces. Indeed, mycoheterotrophic plants, being particularly sensitive to carbon loss, have exclusively intracellular fungal colonization (Imhof 2009). Moreover, intercellular hyphae cannot be manipulated in their growth via a prepenetration apparatus (Genre *et al.* 2005, 2008; Bonfante & Genre 2008), and sophisticated colonization patterns, present in many mycoheterotrophic plants (Imhof 2010), are difficult to establish. We, therefore, regard the intercellular hyphae present in green Polygalaceae as a plesiomorphic (primitive) feature and it represents the fourth clue for the evolutionary shift of mycorrhiza in the family.

Hyphal coils and ALS react differently with respect to digestion, as observed in layer 2 of *Polygala* spp. and earlier in *Burmannia tenella* (Imhof 1999c). Only the degenerating ALS are covered by strong cellulose appositions. Cellulose appositions were found to be part of some plant-pathogen interactions (Baayen & Rijkenberg 1999; Zahiri *et al.* 2010), and have previously been reported for mycorrhizas by other authors (Marcuse 1902; Burgeff 1938, 1943; Cox & Sanders 1974; Kinden & Brown 1975). In the present case, the appositions signify but still can not explain the pronounced selectivity of the digestion process, being able to discriminate between fungal material subject to digestion or not, even within a single cell.

Until now information on the systematic status of the mycorrhizal fungi of Polygalaceae are lacking (*e.g.* Helgason

et al. 2002; MaarjAM Database Öpik *et al.* 2010, 2006, 2008, 2009). Although the arbuscular mycorrhizal status of this family has been shown already in structural investigations (*e.g.* Marcuse 1902; Imhof 2007), our results are the first molecular evidence for an AM symbiosis. Mycoheterotrophic plants were often found to be highly specific with respect to their mycorrhizal fungi (*e.g.* Bidartondo *et al.* 2002; Taylor *et al.* 2002; Franke *et al.* 2006; Winther & Friedman 2007, 2008; Ogura-Tsujita & Yukawa 2008; McCormick *et al.* 2009; Yamato *et al.* 2011). The specificity is interpreted as an indication for coevolutionary processes (Kiers & van der Heidjen 2006; Merckx & Bidartondo 2008; Merckx *et al.* 2009). As Polygalaceae comprise six mycoheterotrophic species (Imhof 2010) as well as some semi-chlorophyllous species we expected a certain degree of fungal specificity in this family as well. However, since the OTUs found cluster in five distinct clades within Glomeraceae 1 (GlGrA), our hypothesis must be partly discarded. On the other hand, reports on fungal specificity are often contradictory. Distinct fungal communities (Vandenkoornhuysen *et al.* 2003), preference for only few phylotypes (Russell & Bulman 2005) and even specificity (Appelhans *et al.* 2008) occur in green plants, whereas less specificity has also been found in mycoheterotrophic plants (Hynson & Bruns 2009; Martos *et al.* 2009; Roy *et al.* 2009; Winther & Friedman 2009; Merckx *et al.* 2010; Courty *et al.* 2011). The concentration of nearly all OTUs in five clades instead of an even dispersion within Glomeraceae 1 (GlGrA) also speaks against a random selection. Indeed, a similar clustering of OTUs has been found in mycoheterotrophic species (Merckx *et al.* 2010) and both findings might give an impetus to a new notion of specificity. Possibly we need to discard mycorrhizal specificity purely in the systematic sense but accept functionally compatible groups of fungi for a given plant species. These groups may appear apart in a phylogenetic tree, but share traits making them compatible to associate with a particular plant species. Those traits may be characteristic enough to cluster several fungal OTUs in a molecular phylogeny, but their significance is not sufficient to subsume them in a monophylum. The three isolated sequences detected (sequences F, G, H) can be interpreted either as exceptions or, more likely, as indicators for additional compatible clades. The species considered here thus have several opportunities to associate with fungal symbionts, but do not have to be generalists in their choice. If this is true, the natural selection of associates will filter out the compatible groups of fungi for a taxon. This effect is expectedly most pronounced when plants are collected from a large geographical range, because AMF phylotypes are not as evenly distributed as formally thought (Carvalho *et al.* 2001; Öpik *et al.* 2006, 2009, 2010). After all, despite the phylogenetic distance between the five clusters of *Polygala* endophytes, the mycorrhizal colonisation pattern (morphotype) is almost identical, corroborating the notion that the mycorrhizal morphotype is mainly controlled by the host plant (*e.g.* Gerdemann 1965; Jacquelinet-Jeanmougin & Gianinazzi-Pearson 1983; Demuth & Weber 1990).

REFERENCES

Alexander T., Meier R., Toth R., Weber H.C. (1988) Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Ave-*

na sativa L. with reference to *Zea mays* L. *New Phytologist*, **110**, 363–370.

Alexander T., Toth R., Meier R., Weber H.C. (1989) Dynamics of arbuscule development and degeneration in onion, bean, and tomato with reference to

vesicular–arbuscular mycorrhizae in grasses. *Canadian Journal of Botany*, **67**, 2505–2513.

Appelhans M., Weber H.C., Imhof S. (2008) Rutaceae sampled from Germany, Malta, and Mallorca (Spain) are associated with AMF clustering with *Glomus hoi* Berch & Trappe. *Mycorrhiza*, **18**, 263–268.

In summary, the mycorrhizas in *Polygala* spp. are similar to the highly specialized colonization pattern in *Epirixanthes* spp., but differ in details. As indicated above, there is a trend from rather diffuse structures to a strictly determined pattern between the shrub *P. myrtifolia* and the achlorophyllous herbs of *Epirixanthes* spp. which is characterized by: (i) An increasing number of cortex parenchymal layers enhancing the coarse hyphal spread, (ii) a reduction of ALS in favour of hyphal coils, (iii) functional specialization of layer 2 (hyphal distribution) and layer 1 + 3 (degeneration of hyphae) and (iv) the decrease of intercellular growth. Finally the non arbitrary choice of the fungal symbionts by *Polygala* spp. reminds of findings in some mycoheterotrophic associations.

The Polygalaceae, hence, are candidates for an analogous mycorrhizal shift line as in Gentianales and Ericaceae (Imhof 2009). Supplementary investigations especially on woody members (*e.g.* *Xanthophyllum* spp., *Securidaca* spp. and *Monnina* spp.) and the almost leafless *Polygala setacea* are in progress to provide more clues for the mycorrhizal evolution in Polygalaceae. Moreover, isotope measurements (¹⁵N and ¹³C) would be interesting to test if some *Polygala* spp. are yet mixotrophic (usage of phototrophic and heterotrophic modes for carbon supply), as is the case in *Pyrola* spp. and some green orchids (Gebauer & Meyer 2003; Bidartondo *et al.* 2004; Julou *et al.* 2005; Zimmer *et al.* 2007; Girlanda *et al.* 2011; Stöckel *et al.* 2011).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Petra Happel (MPI Marburg), Evelyn Vollmeister (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf), Janine Koepke (BMFZ Marburg), Kai Heimel and Christoph Basse (KIT/Universität Karlsruhe) for their good advice during the molecular analyses, Neela Enke (FU Berlin) for her assistance on calculating the phylogenetic trees and helpful discussions on the phylogenetic analyses, and Bernd Kendzior for collecting plant material on Malta. We are also very grateful to Hugues Massicotte (University of Northern British Columbia) and the anonymous referees for their valuable comments on the manuscript.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Majority rule consensus tree (parsimony) presenting fungal symbiont (Sy.) OTUs isolated from 10 host species in *Polygala* spp. collected at 11 sites (S.).

Table S1. Primer used for clone sequencing.

Table S2. Published partial 18S rDNA sequences of arbuscular mycorrhizal fungi used for MrBayes and parsimonious analyses in this study.

Table S3. Symbiont OTUs from 10 different host species of *Polygala* (L.) at 11 various sites.

- Baayen R.P., Rijkenberg F.H.J. (1999) Fine structure of the early interaction of lily roots with *Fusarium oxysporum* f.sp. *lilii*. *European Journal of Plant Pathology*, **105**, 431–443.
- Bago B. (2000) Putative sites for nutrient uptake in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, **226**, 263–274.
- Baylis G.T.S. (1972) Fungi, phosphorus, and the evolution of root systems. *Search*, **3**, 257–258.
- Baylis G.T.S. (1975) The magnolioid mycorrhiza and mycotrophy in root systems derived from it. In: Sanders F.E., Mosse B., Tinker P.B. (Eds), *Endomycorrhizas*. Academic Press, London, UK, pp 373.
- Bidartondo M.I., Bruns T.D. (2005) On the origins of extreme mycorrhizal specificity in the Monotropoidae (Ericaceae): performance trade-offs during seed germination and seedling development. *Molecular Ecology*, **14**, 1549–1560.
- Bidartondo M.I., Redecker D., Hijiri I., Wiemken A., Bruns T.D., Dominguez L., Sérisc A., Leake J.R., Read D.J. (2002) Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, **419**, 389–392.
- Bidartondo M.I., Burghardt B., Gebauer G., Bruns T.D., Read D.J. (2004) Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **271**, 1799–1806.
- Blee K.A., Anderson A.J. (1998) Regulation of arbuscule formation by carbon in the plant. *The Plant Journal*, **16**, 523–530.
- Blee K.A., Anderson A.J. (2002) Transcripts for genes encoding soluble acid invertase and sucrose synthase accumulate in root tip and cortical cells containing mycorrhizal arbuscules. *Plant Molecular Biology*, **50**, 197–211.
- Bonfante P., Genre A. (2008) Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. *Trends in Plant Science*, **13**, 492–498.
- Bonfante-Fasolo P., Dexheimer J., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V., Scannerini S. (1981) Cytochemical modifications in the host-fungus interface during intracellular interactions in vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Plant Science Letters*, **22**, 13–21.
- Burgeff H. (1938) Mycorrhiza. In: Verdoorn F. (Ed.), *Manual of Pteridology*. Martinus Nijhoff, The Hague, the Netherlands, pp 159.
- Burgeff H. (1943) Problematik der Mycorrhiza. *Die Naturwissenschaften*, **31**, 558–567.
- Carvalho L.M., Caçador I., Martins-Loução M.A. (2001) Temporal and spatial variation of arbuscular mycorrhizas in salt marsh plants of the Tagus estuary (Portugal). *Mycorrhiza*, **11**, 303–309.
- Chapleo S., Hall J.L. (1989) Sugar unloading in roots of *Ricinus communis* L. *New Phytologist*, **111**, 391–396.
- Courty P.E., Walder F., Boller T., Ineichen K., Wiemken A., Rousteau A., Selosse M.A. (2011) Carbon and nitrogen metabolism in mycorrhizal networks and mycoheterotrophic plants of tropical forests: a stable isotope analysis. *Plant Physiology*, **156**, 952–961.
- Cox G., Sanders F. (1974) Ultrastructure of the host-fungus interface in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist*, **73**, 901–912.
- Demuth K., Weber H.C. (1990) Strukturelle Inkompatibilität der vesikulär-arbuskulären Mycorrhizapilze in Enzianen (Gentianaceae). *Angewandte Botanik*, **64**, 247–252.
- Dörr I., Kollmann R. (1969) Fine structure of mycorrhiza in *Neottia nidus-avis* (L.) L. C. Rich. (Orchidaceae). *Planta*, **89**, 372–375.
- Edgar R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, **32**, 1792–1797.
- Eriksen B., Persson C. (2007) Polygalaceae. In: Kubitzki K. (Ed.), *The Families and Genera of Vascular Plants IX*. Springer, Berlin, Germany, pp 345.
- Farrar J. (1985) Fluxes of carbon in roots of barley plants. *New Phytologist*, **99**, 57–69.
- Farrar J., Hawes M., Jones D., Lindow S. (2003) How roots control the flux of carbon to the rhizosphere. *Ecology*, **84**, 827–837.
- Felsenstein J. (2005) *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6*. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle WA, USA.
- Fisher J.B., Jayachandran K. (2005) Presence of arbuscular mycorrhizal fungi in South Florida native plants. *Mycorrhiza*, **15**, 580–588.
- Forest F., Chase M.W., Persson C., Crane P.R., Hawkins J.A. (2007) The role of biotic and abiotic factors in evolution of ant dispersal in the milkwort family (Polygalaceae). *Evolution*, **61**, 1675–1694.
- Franke T. (2002) The myco-heterotrophic *Voyria flavescens* (Gentianaceae) and its associated fungus. *Mycological Progress*, **1**, 367–376.
- Franke T., Beenken L., Döring M., Kocyan A., Agerer R. (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi of the *Glomus*-group A lineage (Glomerales; Glomeromycota) detected in myco-heterotrophic plants from tropical Africa. *Mycological Progress*, **5**, 24–31.
- Gebauer G., Meyer M. (2003) ¹⁵N and ¹³C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytologist*, **160**, 209–223.
- Genre A., Chabaud M., Timmers T., Bonfante P., Barker D.G. (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *The Plant Cell*, **17**, 3489–3499.
- Genre A., Chabaud M., Faccio A., Barker D.G., Bonfante P. (2008) Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *The Plant Cell*, **20**, 1407–1420.
- Gerdemann J.W. (1965) Vesicular-arbuscular mycorrhizae formed on maize and tuliptree by *Endogone fasciculata*. *Mycologia*, **57**, 562–575.
- Gerlach D. (1984) *Botanische Mikrotechnik – Eine Einführung*. 3rd edition. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany.
- Gianinazzi-Pearson V., Smith S.E., Gianinazzi S., Smith F.A. (1991a) Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas V. Is H⁺ -ATPase a component of ATP-hydrolysing enzyme activities in plant-fungus interfaces?. *New Phytologist*, **117**, 61–74.
- Girlanda M., Segreto R., Cafaso D., Liebel H.T., Rodda M., Ercole E., Cozzolino S., Gebauer G., Perotto S. (2011) Photosynthetic mediterranean meadow orchids feature partial mycoheterotrophy and specific mycorrhizal associations. *American Journal of Botany*, **98**, 1148–1163.
- Helgason T., Daniell T.J., Husband R., Fitter A.H., Young J.P.W. (1998) Ploughing up the wood-wide web? *Nature*, **394**, 431–431.
- Helgason T., Merryweather J.W., Denison J., Wilson P., Young J.P.W., Fitter A.H. (2002) Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology*, **90**, 371–384.
- Hynson N.A., Bruns T.D. (2009) Evidence of a myco-heterotroph in the plant family Ericaceae that lacks mycorrhizal specificity. *Proceedings of the Royal Society B*, **276**, 4053–4059.
- Hynson N.A., Bruns T.D. (2010) Fungal hosts for mycoheterotrophic plants: a nonexclusive, but highly selective club. *New Phytologist*, **185**, 598–601.
- Imhof S. (1997) Root anatomy and mycotrophy of the achlorophyllous *Voyria tenella* Hook (Gentianaceae). *Botanica Acta*, **110**, 298–305.
- Imhof S. (1998) Subterranean structures and mycotrophy of the achlorophyllous *Triuris hyalina* Miers (Triuridaceae). *Canadian Journal of Botany*, **76**, 2011–2019.
- Imhof S. (1999a) Anatomy and mycotrophy of the achlorophyllous *Afrothisia winkleri* (Engl.) Schltr (Burmanniaceae). *New Phytologist*, **144**, 533–540.
- Imhof S. (1999b) Subterranean structures and mycorrhiza of the achlorophyllous *Burmanna tenella* Benth (Burmanniaceae). *Canadian Journal of Botany*, **77**, 637–643.
- Imhof S. (1999c) Root morphology, anatomy and mycotrophy of the achlorophyllous *Voyria aphylla* (Jacq.) Pers (Gentianaceae). *Mycorrhiza*, **9**, 33–39.
- Imhof S. (2001) Subterranean structures and mycotrophy of the achlorophyllous *Dictyostegia orobanchioides* (Burmanniaceae). *Revista de Biología Tropical*, **49**, 239–247.
- Imhof S. (2003) A dorsiventral mycorrhizal root in the achlorophyllous *Sciaphila polygyna* (Triuridaceae). *Mycorrhiza*, **13**, 327–332.
- Imhof S. (2006) Two distinct fungi colonize roots and rhizomes of the myco-heterotrophic *Afrothisia gesnerioides* (Burmanniaceae). *Canadian Journal of Botany*, **84**, 852–861.
- Imhof S. (2007) Specialized mycorrhizal colonization pattern in achlorophyllous *Epirixanthes* spp. (Polygalaceae). *Plant Biology*, **9**, 786–792.
- Imhof S. (2009) Arbuscular, ecto-related, orchid mycorrhizas — three independent structural lineages towards mycoheterotrophy: implications for classification? *Mycorrhiza*, **19**, 357–363.
- Imhof S. (2010) Mycoheterotrophic plants – How many of them are there? Scratchpad – Biodiversity. Available from <http://mhp.myspecies.info>.
- Imhof S., Weber H.C. (2000) Root structures and mycorrhiza of the achlorophyllous *Voyria obconica* Progel (Gentianaceae). *Symbiosis*, **29**, 201–211.
- Jacquelinet-Jeanmougin S., Gianinazzi-Pearson V. (1983) Endomycorrhizas in the Gentianaceae I. The fungi associated with *Gentiana lutea* L. *New Phytologist*, **95**, 663–666.
- Julou T., Burghardt B., Gebauer G., Berveiller D., Damezin C., Selosse M.A. (2005) Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytologist*, **166**, 639–653.
- Kiers E.T., van der Heijden M.G.A. (2006) Mutualistic stability in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: exploring hypotheses of evolutionary cooperation. *Ecology*, **87**(7), 1627–1636.
- Kinden D.A., Brown M.F. (1975) Electron microscopy of vesicular-arbuscular mycorrhizae of yellow poplar II. Intracellular hyphae and vesicles. *Canadian Journal of Microbiology*, **21**, 1768–1780.
- Leake J.R. (2004) Myco-heterotroph/epiparasitic plant interactions with ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**, 422–428.

- Lodhi M.A., Ye G.-N., Weeden N.F., Reisch B.I. (1994) A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* Species. *Plant Molecular Biology Reporter*, **12**, 6–13.
- Magnus W. (1900) Studien an der endotrophen Mycorrhiza von *Neottia Nidus avis* L. *Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik*, **35**, 205–272.
- Marcuse M. (1902) Anatomisch-biologischer Beitrag zur Mykorrhizenfrage. Dissertation, Jena, Germany.
- Maremmani A., Bedini S., Matošević L., Tomei P.E., Giovannetti M. (2003) Type of mycorrhizal associations in two coastal nature reserves of the Mediterranean basin. *Mycorrhiza*, **13**, 33–40.
- Martos F., Dulormne M., Pailler T., Bonfante P., Faccio A., Fournel J., Dubois M.-P., Selosse M.-A. (2009) Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids. *New Phytologist*, **184**, 668–681.
- Marx C., Dexheimer J., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (1982) Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas IV. Ultracytoenzymological evidence (Atpase) for active transfer processes in the host-arbuscule interface. *New Phytologist*, **90**, 37–43.
- McCormick M.K., Whigham D.F., O'Neill J.P., Becker J.J., Werner S., Rasmussen H.N., Bruns T.D., Taylor D.L. (2009) Abundance and distribution of *Corallorhiza odororhiza* reflect variations in climate and ectomycorrhizae. *Ecological Monographs*, **79**, 619–635.
- McGee P. (1986) Mycorrhizal associations of plant species in a semi-arid community. *Australian Journal of Botany*, **34**, 585–593.
- Merckx V., Bidartondo M.I. (2008) Breakdown and delayed cospeciation in the arbuscular mycorrhizal mutualism. *Proceedings of the Royal Society B*, **275**, 1029–1035.
- Merckx V., Bidartondo M.I., Hynson N.A. (2009) Myco-heterotrophy: when fungi host plants. *Annals of Botany*, **104**, 1255–1261.
- Merckx V., Stöckel M., Fleischmann A., Bruns T.D., Gebauer G. (2010) ¹⁵N and ¹³C natural abundance of two mycoheterotrophic and a putative partially mycoheterotrophic species associated with arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, **188**, 590–596.
- Mosse B., Hepper C. (1975) Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. *Physiological Plant Pathology*, **5**, 215–223.
- Mülhardt C. (2006) *Der Experimentator—Molekularbiologie/Genomics* 5th edition. Spektrum Akademischer Verlag, Munich, Germany.
- Müller K., Quandt D., Müller J., Neinhuis C. (2010) PhyDE-1 vers. 0.9971: Phylogenetic Data Editor. Available from: <http://www.phyde.de>.
- Muthukumar T., Udaiyan K. (2000) Arbuscular mycorrhizas of plants growing in the Western Ghats region, southern India. *Mycorrhiza*, **9**, 297–313.
- Ogura-Tsujita Y., Yukawa T. (2008) High mycorrhizal specificity in a widespread mycoheterotrophic plant, *Eulophia zollingeri* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, **95**, 93–97.
- Öpik M., Moora M., Liira J., Zobel M. (2006) Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology*, **94**, 778–790.
- Öpik M., Moora M., Zobel M., Saks Ü., Wheatley R., Wright F., Daniell T. (2008) High diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreal herb-rich coniferous forest. *New Phytologist*, **179**, 867–876.
- Öpik M., Metsis M., Daniell T.J., Zobel M., Moora M. (2009) Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. *New Phytologist*, **184**, 424–437.
- Öpik M., Vanatoa A., Vanatoa E., Moora M., Davison J., Kalwij J.M., Reier Ü., Zobel M. (2010) The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist*, **188**, 223–241.
- Paithankar K.R., Prasad K.S.N. (1991) Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Research*, **19**, 1346.
- Peterson R.L., Bonfante P. (1994) Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. *Plant and Soil*, **159**, 79–88.
- Redecker D., Morton J.B., Bruns T.D. (2000) Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **14**, 276–284.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**, 1572–1574.
- Roy M., Wathana S., Stier A., Richard F., Vessabutr S., Selosse M.-A. (2009) Two mycoheterotrophic orchids from Thailand tropical dipterocarpacean forests associate with a broad diversity of ectomycorrhizal fungi. *BMC Biology*, **7**, 1–17.
- Russell J., Bulman S. (2005) The liverwort *Marchantia foliacea* forms a specialized symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi in the genus *Glomus*. *New Phytologist*, **165**, 567–579.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Schreiner R.P., Mihara K.L. (2009) The diversity of arbuscular mycorrhizal fungi amplified from grapevine roots (*Vitis vinifera* L.) in Oregon vineyards is seasonally stable and influenced by soil and vine age. *Mycologia*, **101**, 599–611.
- Schüsler A., Martin H., Cohen D., Fitz M., Wipf D. (2006) Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi. *Nature*, **444**, 933–936.
- Schweiger P.F., Robson A.D., Barrow N.J. (1995) Root hair length determines beneficial effect of a *Glomus* species on shoot growth of some pasture species. *New Phytologist*, **131**, 247–254.
- Simon L., Lalonde M., Bruns T.D. (1992) Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 291–295.
- Smith S.E., Read D.J. (2008) *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd edition. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Smith F.A., Smith S.E. (1997) Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, **137**, 373–388.
- Smith S.E., Gianinazzi-Pearson V., Koide R., Cairney J.W.G. (1994) Nutrient transport in mycorrhizas: structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis. *Plant and Soil*, **159**, 103–113.
- Stelz T. (1968) *Mycorrhizes et végétation des pelouses calcaires*. Dissertation, Rouen, France.
- Stöckel M., Meyer C., Gebauer G. (2011) The degree of mycoheterotrophic carbon gain in green, variegated and vegetative albino individuals of *Cephalanthera damasonium* is related to leaf chlorophyll concentrations. *New Phytologist*, **189**, 790–796.
- Taylor D.L., Bruns T.D., Leake J.R., Read D.J. (2002) Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In: van der Heijden M.G.A., Sanders I. Eds, *Mycorrhizal Ecology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, pp 375.
- Vandenkoornhuise P., Ridgway K.P., Watson I.J., Fitter A.H., Young J.P.W. (2003) Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology*, **12**, 3085–3095.
- Winther J.L., Friedman W.E. (2007) Arbuscular mycorrhizal symbionts in *Botrychium* (Ophioglossaceae). *American Journal of Botany*, **94**, 1248–1255.
- Winther J.L., Friedman W.E. (2008) Arbuscular mycorrhizal associations in Lycopodiaceae. *New Phytologist*, **177**, 790–801.
- Winther J.L., Friedman W.E. (2009) Phylogenetic affinity of arbuscular mycorrhizal symbionts in *Psilotum nudum*. *Journal of Plant Research*, **122**, 485–496.
- Yamato M., Yagame T., Iwase K. (2011) Arbuscular mycorrhizal fungi in roots of non-photosynthetic plants, *Sciaphila japonica* and *Sciaphila tosaensis* (Triuridaceae). *Mycoscience*, **51**, 217–223.
- Zahiri A., Heimel K., Wahl R., Rath M., Kämper J. (2010) The *Ustilago maydis* Forkhead transcription factor Fox1 is involved in the regulation of genes required for the attenuation of plant defenses during pathogenic development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **23**, 1118–1129.
- Zimmer K., Hynson N.A., Gebauer G., Allen E.B., Allen M.F., Read D.J. (2007) Wide geographical and ecological distribution of nitrogen and carbon gains from fungi in pyrrolids and monotropoids (Ericaceae) and in orchids. *New Phytologist*, **175**, 166–175.

Manuskript A (eingereicht)

**From trees to mycoheterotrophic plants - morpho-anatomical aspects in evolution of
arbuscular mycorrhiza in Polygalaceae**

Magnus Rath ¹, Sawitree Sasirat ², Hans Christian Weber ¹, Stephan Imhof ¹

¹Philipps-Universität Marburg, Spezielle Botanik, 35032 Marburg, Germany; ²Queen Sirikit Botanic Garden, Mae Rim, 50180 Chiang Mai, Thailand

rath@biologie.uni-marburg.de
sawitree@qsbg.mail.go.th
weber@biologie.uni-marburg.de
imhof@biologie.uni-marburg.de

key words: Polygalaceae, arbuscular mycorrhiza, mycorrhizal structures, evolution, mycoheterotrophy

Abstract

The Polygalaceae provide a unique opportunity to shed light on the mycorrhizal changes along the morphological gradient from large trees to small achlorophyllous, mycoheterotrophic herbs. This study suggests an incremental morphological progression of the root system as well as the arbuscular mycorrhizal structures in Polygalaceae from allorhizic, intensively branched root systems with less complex mycorrhizal colonisation patterns conserved in the woody species, to scarcely branched, homorhizic root systems with distinctive mycorrhizal morphotypes in the herbaceous lifeforms. 10 woody species and 12 annual herbs in various stages of morphological reduction were investigated. Microscopic analyses of the mycorrhizal structures allowed the distinction of two morphotypes in Polygalaceae: *Type I* in the woody species, and *Type II* in the herbaceous species. Altogether, this study describes a set of 9 progressive modifications from the presumably ancestral mycorrhiza in the woody species, which accumulate in various combinations and degrees in the herbs. Due to the combination of some of these progressive traits, some photosynthetic herbs from various clades already resemble the highly complex mycorrhiza in the mycoheterotrophic Polygalaceae *Epirixanthes* spp. (Imhof 2007). On basis of these results a new notion on the origin of mycoheterotrophy is suggested.

Introduction

Mycoheterotrophic plants (MHP; Leake 1994), which lack chlorophyll and entirely depend on their mycorrhizal fungi for carbon supply, have fascinated scientists for many years (e. g. Unger 1840, Newman 1842, Kamienski 1882, Frank 1885, Henderson 1919, Burgeff 1932, Imhof & Weber 1997, Bidartondo et al. 2002, Gebauer & Meyer 2003, Merckx 2013). We do know some about the taxonomy, morphological adaptations and mycorrhizal characteristics of MHP (e. g. Johow 1885, Groom 1894, Furman & Trappe 1971, Imhof 2009, Merckx et al. 2013a, Imhof et al. 2013) as well as their ecophysiology (e. g. Björkman 1960, Smith 1967, Trudell et al. 2003, Julou et al. 2005, Zimmer et al. 2007, Selosse & Roy 2009, Cameron & Bolin 2010, Stöckel et al. 2011, Hynson et al. 2013). Molecular based analyses elucidated their systematic position (e. g. Kron et al. 2002, Neyland & Hennigan 2003, Merckx et al. 2006, Neyland & Merchant 2011, Barret & Freudenstein 2011, Merckx et al. 2013a), the fungal partners involved (e. g. McKendrick et al. 2000, Selosse et al. 2002, Yang & Pfister 2006, Franke et al. 2006, Winther & Friedman 2007, Martos et al. 2009,

Hynson & Bruns 2009, Merckx et al. 2012, Waterman et al. 2013, Yamato et al. 2014) and the evolutionary background (e.g. Brundrett 2002, Bidartondo 2005, Merckx & Bidartondo 2008, Merckx & Freudenstein 2010, Merckx et al. 2013b, Mennes et al. 2015a,b). However, few studies have tried to shed light on the evolution of the highly derived colonisation patterns, which are important for the sustained carbon flow into the mycoheterotrophic plants (Imhof 2010). The only existing evidence for a structural progression of mycorrhizas towards complex colonisation patterns comes from mycoheterotrophic genera (Imhof 1999, 2003, 2006). However, in order to trace back the entire evolution of mycoheterotrophy the mycorrhizal structures of the photosynthetic relatives of MHP must also be taken into account. Among the arbuscular mycorrhizal plant families, the Polygalaceae are uniquely suited for this purpose since it not only consists of all major autotrophic lifeforms (Eriksen & Persson 2007) but also six mycoheterotrophic species in the achlorophyllous genus *Epirixanthes* (Van der Meijden 1988, Pendry 2001, 2010). The first hints of a mycorrhizal progression within this family have been provided by the mycorrhizal structures of mostly European *Polygala* species (including shrubs, subshrubs, perennial and annual herbs; Rath et al. 2013), which are similar but not identical to the highly complex mycorrhiza of *Epirixanthes* spp. (Penzig 1901, Van der Pijl 1934, Imhof 2007). Furthermore, molecular analyses of the fungal symbionts of green representatives in the Polygalaceae revealed a degree of specificity between plant and fungal partners (Rath et al. 2013), a well-documented characteristic of mycoheterotrophic plants (e.g. Bidartondo et al. 2002, Taylor et al. 2002, Bidartondo & Bruns 2005, Hynson & Bruns 2010, Yamato et al. 2011). Such specificity may also indicate a trend towards mycoheterotrophy. To provide a more complete investigation of the structural evolution of mycorrhiza within the Polygalaceae we broadened the systematic and geographic range of investigated species to encompass the whole family, including trees, shrubs, lianas besides annual representatives from three continents and several biomes. We included species with progressively reduced photosynthetic surfaces, including phylogenetically basal (*Xanthophyllum* spp., *Moutabea longifolia*) and intermediate woody (*Moninna* spp., *Securidaca* spp.) and herbaceous taxa (*Asemeia grandiflora*), alongside derived herbs from two genera (*Polygala* spp. s. str., *Salomonina* spp.) (after Persson 2001, Forest et al. 2007, Abbott 2009, Mennes et al. 2015b) and visualised mycorrhizal structures using a combination of conventional microtomy and a new confocal laser scanning microscopy approach (Rath et al. 2014).

Material and Methods

Plant material

22 species in the Polygalaceae were collected from 32 sites in Ecuador, Panama, Costa Rica, USA (Florida) and Thailand. These included two trees in *Xanthophyllum* (*X. lanceatum*, *X. cf. flavescens*), one woody liana in *Moutabea* (*M. longifolia*), two woody lianas in *Securidaca* (*S. diversifolia*, *S. inappendiculata*), five small trees or shrubs in *Monnina* (*M. parasylvatica*, *M. xalapensis*, *M. crepinii*, *M. costaricensis*, *M. spec.*), 12 herbs from *Polygala* s. str., *Salomonina* and *Asemeia* (*P. baldunii*, *P. nana*, *P. longicaulis*, *P. paniculata*, *P. ramosa*, *P. setacea*; *P. chinensis*; *S. contoniensis*, *S. ciliata*, *S. longiciliata*, *S. kradungensis*; *A. grandiflora*). Preserved material of *Salomonina* spp. was kindly provided by Narumol Piwpuan from the Khon Kaen University (Thailand). Data on sites, date of collecting and number of analysed individuals are summarized in Table S-1.

Structural investigation

Immediately after collection, the root samples were carefully rinsed with water, fixed in FPA [formalin (37%): propionic acid (>99%): ethanol (50%); 0.5:0.5:9] for several days and subsequently stored in 70% ethanol. Herbarium specimens were taken from each species and deposited at the Herbarium Marburgense of the Philipps-Universität of Marburg. At least 8 root segments of each of the investigated 68 individuals were dehydrated in an ascending ethanol series and embedded in Unicryl™ (British Biocell International, Cardiff, UK) for serial sectioning or confocal laser scanning microscopy. Sequential series of 4 µm thick longitudinal and transversal sections (Leica, Supercut 2065, Leica Instruments, Nussloch, Germany) were stained with toluidine blue O (SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Germany; 1 g toluidine blue O + 1 g sodium tetraborate in 100 ml distilled H₂O) and mounted in Corbit balsam. In total, approximately 20100 root sections were examined by light microscopy. An additional 140 root samples were prepared for confocal laser scanning microscopy after the protocol described in Rath et al. (2014). Deviating from this protocol and in order to optimize permeability of the epidermis and the delicate primary cortex tissue for the staining procedure, the following boiling times in KOH were applied: *Monnina* spp., *Moutabea longifolia* and *Xanthophyllum* spp., *Securidaca diversifolia*, *Securidaca inappendiculata* (depending on root constitution and thickness 3 – 6 min.); *Polygala* spp., *Salomonina* spp. and *Asemeia grandiflora* (1.30 – 2.30 min.). Confocal stacks were obtained using a Leica TCS SP2 or Leica TCS SP5 confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems,

Wetzlar, Germany). Image processing of the resulting data sets were done with AMIRA[®] (FEI[™] Visualization Sciences Group, Düsseldorf, Germany). For histological analyses paraffin (57–60 °C; Merck Millipore, Darmstadt, Germany) embedded root material (Gerlach 1984) was sectioned with a rotary microtome (Leitz 1512; Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar, Germany). The slices were deparaffinated in Roti-Histol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) followed by rehydration in an descending ethanol series before staining with chlor-zinc-iodide for cellulose, Lugol-Solution for starch, Phloroglycin + HCl (25%) for lignin (Gerlach, 1984) and Oil Red [0.5 g Oil Red O (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany) in 100 ml Isopropanol, diluted with distilled H₂O 1.5:1] for suberin detection. Pictures were taken with a Leica SD6 macroscope and a Leica DMRB microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a digital camera [Leica DFC280 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) or Moticam 2300 (Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Germany)]. Macroscopic pictures of the root system were taken with a Nikon D70 or Nikon D200 digital SLR camera (Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

Results

Morphology of the root system

All investigated woody species including trees (*Xanthophyllum* spp.), shrubs (*Monnina* spp.) and woody vines (*Moutabea longifolia*, *Securidaca* spp.) had a multibranched allorhizic root system (Fig. 1a). No roots beyond the fifth order were found in *Monnina* spp.. However, the root systems of some species (*M. xalapensis*, *M. crepinii*, *M. costaricensis*) were collected from immature plants, and older individuals of respective species may have had roots of higher order. This especially accounts for the full grown plants of *Xanthophyllum* spp., *Moutabea longifolia* and *Securidaca* spp. where only small parts of the root system could be excavated. In *Xanthophyllum* spp. densely branched short rootlets were found to cluster at roots of lower order, resulting in coralloid agglomerations. Most of the investigated herbs (*Polygala paniculata*, *P. nana*, *P. setacea*, *P. longicaulis*, *P. chinensis*, *Asemeia grandiflora*) also had allorhizic root systems but usually with less ramifications (p. 242, Fig. 1b; p. 266, Figs. S-1a,b). Roots up to the fifth (*P. paniculata*), fourth (*Asemeia grandiflora*) or only third (*P. nana*, *P. setacea*) order were found. *Polygala balduinii*, *Polygala ramosa* and all investigated species of *Salomonina* had dense agglomerations of adventitious roots at the shoot base beside the reduced primary root (Fig. 1d; Fig. S-1c). The roots of these secondarily homorhizic root systems were scarcely branched and had side roots only up to

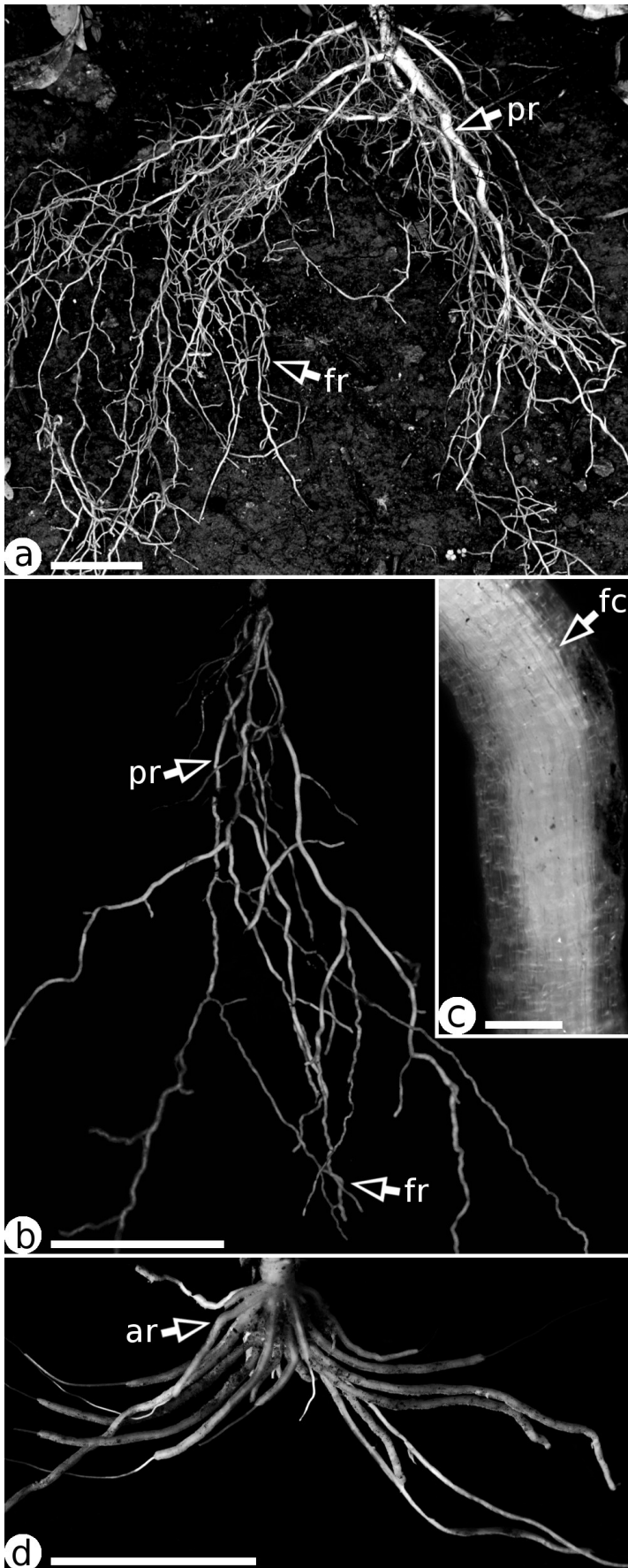


Fig. 1 **a)** Allorhizic root system of *Monnina xalapensis*, showing a secondary thickened primary root (pr) and many fine roots (fr) hosting mycorrhizal fungi. Scale = 4 cm. **b)** Already reduced, few branched, allorhizic root system of *Polygala setacea*. pr = primary root; fr = mycorrhiza hosting fine roots that usually lack root hairs. Scale = 2 cm. **c)** Close up of a hairless fine root of *Polygala setacea*. Macroscopic view on the whitish cortical inclusions indicating a dense, vital fungal colonisation (fc). Scale = 200 μm **d)** Homorhizic, few branched, star like root system of *Salomonina ciliata* composed of almost hairless adventitious roots (ar). Scale = 1 cm.

the third order. *Monnina* spp. had the longest and the most numerous root hairs, distributed evenly along the root (Fig. S-1d), occasionally forming tuft-like agglomerations. However, sometimes, even in this genus roots with only very few or no root hairs at all were found. *Xanthophyllum* spp., *Securidaca* spp. and *Moutabea longifolia* had only papillous root hairs and in some cases no root hairs at all. Roots of the herbaceous *Asemeia grandiflora*, *Polygala paniculata*, *P. nana*, *P. chinensis* and *Polygala longicaulis* had scattered or tuft-like agglomerated short root hairs (Fig. S-1e) which, like in *Polygala balduinii*, *Polygala ramosa*, *Polygala setacea* or *Salomonina* spp., could frequently be

completely absent in most parts of the root system (Fig. 1c). The hyaline root cortex in *Monnina* spp. and all herbal species allowed us to estimate the extent of fungal colonisation already from external inspection (Fig. 1c; Figs. S-1d,e). Moreover, the brownish appearance of degenerated fungal material in contrast to the whitish younger colonisations (Fig. 1c; Figs. S-1d,e) indicated fungal vitality. A continuous fungal colonisation was observed in the roots of *Monnina* spp., *Polygala paniculata*, *P. balduinii*, *P. ramosa*, *P. setacea*, *P. nana*, *Salomonina* spp.. An abundant colonisation with gaps was found in *Polygala chinensis*, *P. longicaulis* and *Asemeia grandiflora*. Serial sections revealed only a patchy colonisation in the more intransparent roots of *Xanthophyllum* spp., *Securidaca* spp. and *Moutabea longifolia*.

Root anatomy and histology

All species had a single layered epidermis with prosenchymatic, and in some species (*Xanthophyllum* spp., *Moutabea longifolia*, *Securidaca* spp.) slightly suberized cells. No exodermis could be detected, but *Moutabea longifolia* displayed characteristic thickenings and slight suberization and lignification of the inner tangential and radial cell walls of the hypodermis (p. 247>Fig. 2e). As shown in Table 1, the always starch free cortex parenchyma differed in number of cell layers between the species. Within the cortex parenchyma obvious (*Monnina* spp., *Securidaca* spp., *Asemeia grandiflora*, *Polygala* spp.; Figs. 2c,g), or small to hardly visible intercellular spaces (*Xanthophyllum* spp., *Moutabea longifolia*; Fig. 2e) were detected. *Salomonina* spp. even had large, regularly arranged lacunae within the cortex parenchyma (Fig. p. 268>S-2h; tomographic animation S-A4). The root cortices of all Polygalaceae were differentiated in two anatomically distinct tissues separated by a transitional layer (TL, Fig. 2a). The outer cortex parenchyma (OCP) consisted of prosenchymatic cells (Fig. 2a), the inner cortex parenchyma (ICP) usually consisted of cells of rather isodiametric (\pm cubic) to even radially enlarged cells (Figs. 2a,d,g). The cells of the TL were similar to the prosenchymatic cells in the OCP but were sometimes shorter in length, resulting in an intermediate shape between those of the OCP and ICP (Figs. 2a,f). For detailed morphometric data see Table S-2 (see usb-stick). The ICP differed in number of layers, depending on woody or herbaceous habit as well as the total number of cortex parenchyma layers. Herbaceous species, irrespective of their cortical extent, had only one layer of ICP (Fig. 2f). In the woody species roots with only three parenchyma layers had almost always one (Fig. 2e), rarely two layers of ICP. In the latter case the OCP may have been locally absent (Fig. 2d). Roots of woody species with four layers of parenchyma had one to two, roots with more than four parenchyma layers occasionally one, but usually two or three (Figs. 2a,b) and in case of more than 7 layers even up to four layers of ICP.

Species	Number of parenchyma layers	Specifications
<i>Polygala</i> spp.	3 - (4)	<i>P. setacea</i> : 3 - more frequently 4 <i>P. ramosa</i> : 3 - (4) in side roots; (3) 4 - (5) in adventitious roots.
<i>Asemeia grandiflora</i>	3 - more frequently 4	
<i>Salomonina</i> spp.	3 - 5 (6)	
<i>Xanthophyllum</i> spp.	3 - 5	
<i>Moutabea longifolia</i>	3 - 5	
<i>Securidaca diversifolia</i>	(2) 3 - 5	
<i>Securidaca inappendiculata</i>	3 - 7	
<i>Monnina</i> spp.	3 - 7	<i>Mon. parasylvatica</i> : rarely up to 9

Table 1: Cellular composition of the cortex parenchyma in the investigated species of Polygalaceae.

The multilayered *ICP* of the woody species was comprised of a mixture of slightly prosenchymatic, isodiametric or even radially elongated cells (Figs. 2b,d,c; Fig. S-2h). Cells in the innermost layer occasionally appeared significantly reduced in size compared to the *ICP* cells above (Fig. S-2d). In any case, cube-like or radially enlarged cells in the *ICP* were more distinct where less *ICP* layers were present (Fig. S-2l; compare Figs. S-2a,b & S-2h,j). This was most obvious in the always single layered *ICP* of the herbaceous species (Figs. 2f,g; Fig. S-2o)! All species had an endodermis with suberin lamella, a single layered pericycle, and a usually di- or, occasionally, triarchic central cylinder with slightly lignified vessels and phloem cells. Starting with the in innermost parenchyma layer (*ICP*), secondary growth causes the stepwise obliteration of all cells above the endodermis (Fig. S1-f) which eventually results in the complete loss of epidermis and primary cortex in all woody and allorhizic herbaceous species. In *Asemeia grandiflora* secondary growth transforms the primary root and its immediate side roots in up to 4.2 mm thick storage organs (Fig. S-1a). In contrast, the small, homorhizic *P. ramosa*, (less significant but still observable, *P. balduinii*) and *Salomonina* spp. lost their cortex parenchyma, at the most proximal parts of the root system, if at all (Figs. S-1g,h,i).

Mycorrhizal colonisation

The two types of mycorrhizal colonisation presented here represent two extremes of a structural continuum. *Type I* occurred in the woody *Monnina* spp., *Xanthophyllum* spp., *Securidaca* spp. and *Moutabea longifolia*. *Type II* was found in herbaceous *Polygala* spp., *Salomonina* spp. and *Asemeia grandiflora* having a single layered *ICP*. *Type I* and *Type II* were linked by intermediate stages occurring in the woody species with a single layered *ICP*.

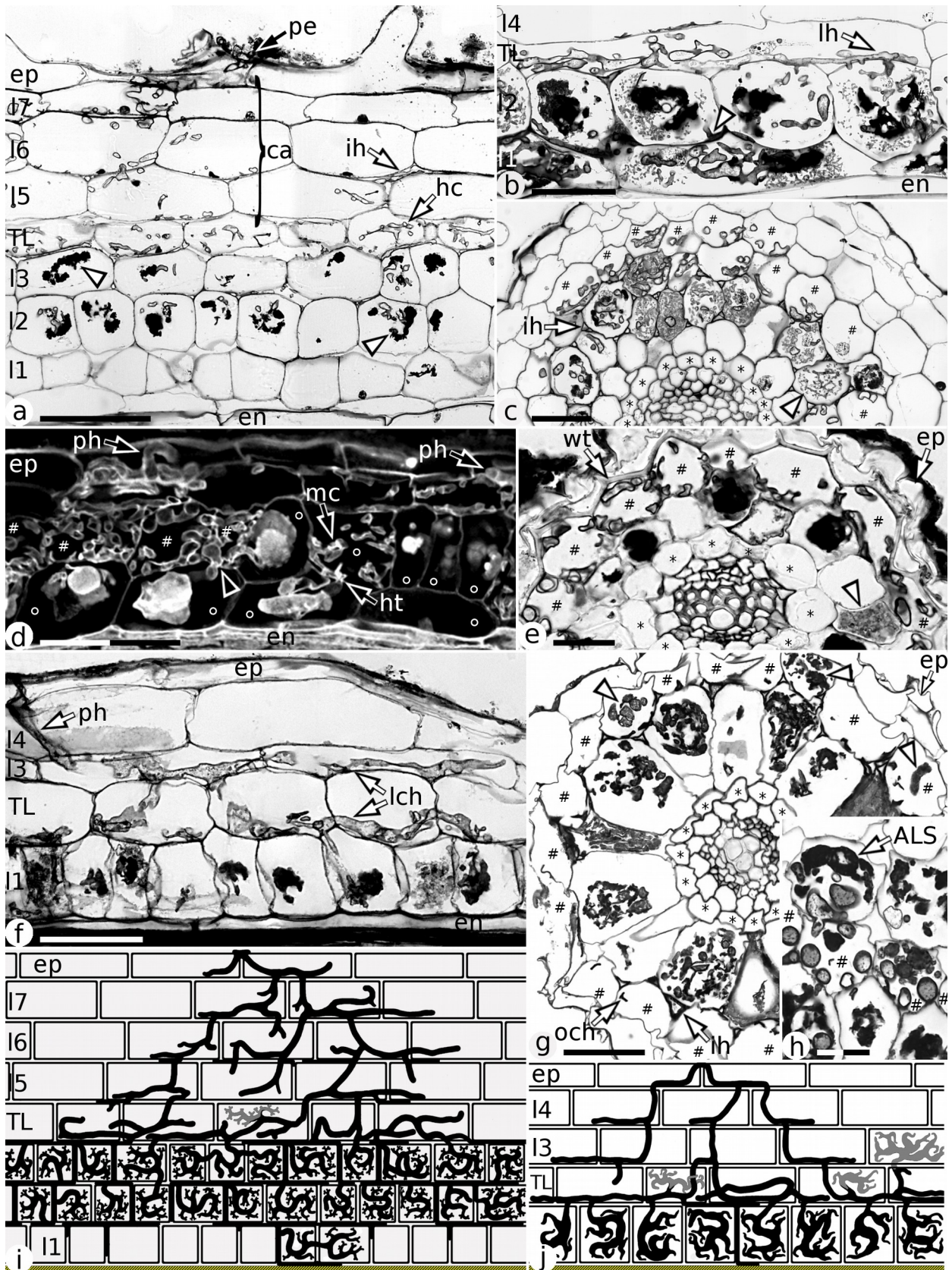
Type I: The intracellular hyphal penetration of the epidermis cells (Fig. 2a) was sometimes accompanied by appressorium-like swellings (tomographic animation S-A1>see usb stick). Root hair penetrations have been observed in *Monnina* spp. (Fig. S-2g). After penetration, the hyphae can branch and coil (Fig. S-2l) while growing towards the inner tangential cell wall. Along the inner tangential cell wall they display short stages of intimately attached “creeping” growth (Fig. S-2h; tomographic animation S-A1) before branches cross into the hypodermal cells. On their way deeper into the root, this pattern of “creeping growth”, branching, penetration and cell passage is repeated until the hyphae reach the *TL* (Fig. 2i). Hyphae tended to avoid radial penetrations of those epidermis, *OCP* and *TL* cells which had already been colonized by hyphae from the same hyphal system before (i.e. no repetitive radial colonisation of host cells above the *ICP* in the initial stage of colonisation)! In combination with hyphal branching this results in a cascade-like hyphal spread, increasing the spatial expansion of the colonisation within the *OCP* and efficiently multiplying the amount of *TL* cells reached from a single penetration point (Fig. 2i; Fig. S-2f; tomographic animation S-A1). As far as our material allowed statistical analyses, this feature was most expressed in *Polygala* spp. and *Salomonina* spp., still significant in *Securidaca* while *Monnina* did not show this trait regularly (p. 269>Graph S-3). The restricted material of *Asemeia*, *Moutabea* and *Xanthophyllum* did not provide sufficient colonisation events to do valid statistics.

Within the *TL* hyphae formed intracellular coils (Figs. 2a,d,e,i; Figs. S-2e,h) and developed for a few (*Monnina* spp.) or several cell passages (all other woody genera) in longitudinal and tangential direction within the *TL*. In *Monnina* spp. those coils sometimes included some linear hyphal sections (Fig. 2b; tomographic animation S-A1), whereas the other woody species had no significant linear growth in the *TL* (Figs. 2d,e; Fig. S-2l).

The hyphal spread in the *OCP* was not always intracellular. Especially in *Monnina* spp., to a lesser extent in *Moutabea longifolia*, *Securidaca* spp., and rarely in *Xanthophyllum* spp., intercellular hyphae occurred in the *OCP* (Fig. 2a). In the advanced stages of colonisation they were also found beneath the *TL* cells where they proliferate between the *ICP* cells (Fig. 2c; Fig. S-2h). The intracellular coils in, as well as the intercellular hyphae beneath the *TL* both contribute to the colonisation of the *ICP* cells with characteristic fungal structures (Fig. 2b,i; tomographic animation S-A1). These structures include intensively fine branched hyphae and were often in terminal position, reminiscent of *Arum*-Type arbuscules (p. 249>Fig. 3a; Figs. S-2c,k,d). However, due to their large fraction of voluminous, thick walled hyphae (Fig. S-2m) and, most importantly, their potential to pass over into neighbouring cells (i.e. non-terminal position, Fig. 3a; Fig. S-2i) they are also reminiscent of *Paris*-Type coils. Hence, these structures are better referred to as arbuscule-like

structures (ALS) rather than arbuscules or coils. ALS were not uniform. They ranged from terminal or non-terminal structures close to arbuscules (Fig. 3a; Figs. S-2c,m) to thick-walled coiled and branched hyphae with only few lateral fine branchings (Fig. 3a). Finally, thick-walled coiled hyphae reminiscent of those in the TL with similar high potential to pass into the adjoining ICP cells were found in single ICP cells (Fig. 2d). Such coils may either represent ALS in an extreme stage of fine-branching-reduction or alternatively, topologically misplaced TL coils. In contrast to the hyphal cascade in the OCP, the coils in the TL and the intercellular hyphae in the ALS degenerate more quickly. Degeneration began at the fine arbusculate hyphae which eventually turned into amorphous clumps (Figs. 2a,d). The walled trunk hyphae remained intact for longer but, nevertheless, collapsed eventually. Corresponding to the extent of intercellular colonisation, its significance for providing

Fig. 2 (page 247): **a**) Longitudinal root section of *Monnina parasylvatica*. pe = fungal penetration of the epidermis (ep); l5-l7 = outer cortex parenchyma (OCP) filled with hyphae forming an intracellular hyphal cascade (ca) while growing towards the transitional layer (TL); hc = thick walled branched hyphal coils in the cells of the TL; ih = intercellular hyphae within the OCP; arrowheads = degenerated arbuscule-like structures (ALS) within the inner cortex parenchyma (ICP, l1-l3); en = endodermis. Scale = 100 µm. **b**) Longitudinal root section of *Monnina xalapensis*. lh = intracellular linear hyphae closely attached to the inner tangential cell wall of the TL cell give rise to ALS in the outermost ICP layer (l2). Intercellular hyphae can also colonize the ICP with ALS (arrowhead). Scale = 50 µm. **c**) Cross section of a root of *Monnina xalapensis*. Inbetween the TL (#) and the endodermis (*) the outer layers of the anatomical variable ICP are densely filled with ALS (arrowhead) whereas the innermost ICP cells can stay free of ALS. Intercellular hyphae are abundant within the ICP. Scale = 50 µm. **d**) Confocal microscopic based 3-D projection of a longitudinal root section of *Securidaca diversifolia*. ph = penetration hyphae in the epidermis passing into the TL where they form durable hyphal coils; ° = single to double layered ICP which is predominantly intracellularly colonized with (here already degenerated) ALS (arrowhead); mc = misplaced coil from which hyphal transitions (ht) into the adjoining ICP cells occur. Scale = 80 µm. **e**) *Moutabea longifolia*. Root cross section showing a single layered, anatomical indistinct ICP filled with vital (arrowhead) and degenerated ALS; wt = characteristic cell wall thickening. Scale = 25 µm. **f**) Longitudinal root section of *Salomonina longiciliata*. The penetration hyphae grows straight into the innermost layer of the OCP (l3); lch = linearly creeping hyphae at the inner tangential cell walls in layer 3 branch radially into the TL cells, thus forming a distinct hyphal cascade and give rise to new lch that successively colonise the evenly longitudinally shortened cells of the single layered ICP with terminal ALS. Scale = 50 µm. **g**) *Polygala nana*. Root cross section showing abundant intercellular hyphae. Between the endodermis and the TL cells of the single layered ICP are evenly radially enlarged and filled with degenerated ALS; arrowhead = late formed ALS in the TL; och = old collapsed hyphae within the TL. Scale = 50 µm. **h**) *Polygala ramosa*. Root cross section. In the late stage of colonization, ALS are not only formed within the TL but, in case of an more than three layered cortex parenchyma, also in the layer above the TL. Scale = 15 µm. **i,j**) Schemes (fungal structures depicted in grey indicate late formations in the mycorrhizal ontogeny). **i**) Type I: *Monnina* spp. exemplifying the basic mycorrhizal features in the woody Polygalaceae with a multilayered ICP. **j**) Type II: *Polygala ramosa* exemplifying the basic features of the mycorrhizal colonisation in a herbaceous Polygalaceae with modified ALS.



ALS to the *ICP* varied. Hence, *ALS* originating from intercellular hyphae were sparse in *Xanthophyllum* spp. and could be more frequent in *Securidaca* spp. and *Moutabea longifolia*. In *Monnina* spp. the extensive intercellular growth strongly contributed to *ALS* formation (Figs. 2b,i; tomographic animation S-A1). In later stages of the colonisation, when the *ICP* was largely colonized, *ALS* also developed in the *TL*, either laterally at hyphal coils (Fig. S-2h) or as projections from intercellular hyphae. Inter- as well as intracellular vesicles were also found in the cortex parenchyma. Most frequently, they were formed in and beneath the *TL* (Fig. S-2g; tomographic animation S-A1).

Type II was similar to *Type I* in roots with a single layered *ICP* but differed in the following:

- Due to a more pronounced “creeping growth” combined with significantly more consistent avoidance of double penetrations of cells in the *OCP* and *TL* the cascading hyphal spread in the *OCP* is more distinctive than in *Type I* (Figs. 2f,j; Fig. S-2n; Graph S-3, tomographic animations S-A4, S-A3).
- The initial colonisation of the *TL* was mostly linear and frequently “creeping” along multiple cells in longitudinal and tangential direction (Fig. 2f,j; Fig. S-2o; tomographic animations S-A2, S-A3), in contrast to the hyphal coils in *Type I*. In later stages of colonisation the linear growth is disguised by branching of these hyphae, resulting in secondary coils still primarily attached to the inner tangential walls in most herbs (tomographic animations S-A3, S-A4). Only in *Asemeia grandiflora*, the secondary coils eventually filled the complete cell lumen. The material of *Polygala longicaulis* and *Polygala chinensis* did not provide enough information to evaluating this aspect.
- When a root had more than three layers of cortex parenchyma, late colonisation stages of *Type II* show *ALS* also in the innermost *OCP* layer (Fig. 2h). These late *ALS* originate from hyphae in the *TL* (tomographic animation S-A4) or from intercellular hyphae and only occurred when the *ICP* was fully colonized. Such *ALS* formation outside the *TL* was never observed in *Type I*!
- The amount of intercellular colonisation decreases in the investigated herbs. It was still present in abundance in *Polygala nana* (Fig. 2g) and considerably common in *Asemeia grandiflora* and *Polygala paniculata* but less frequent in *Polygala balduinii*, *Polygala ramosa*, *Polygala setacea*

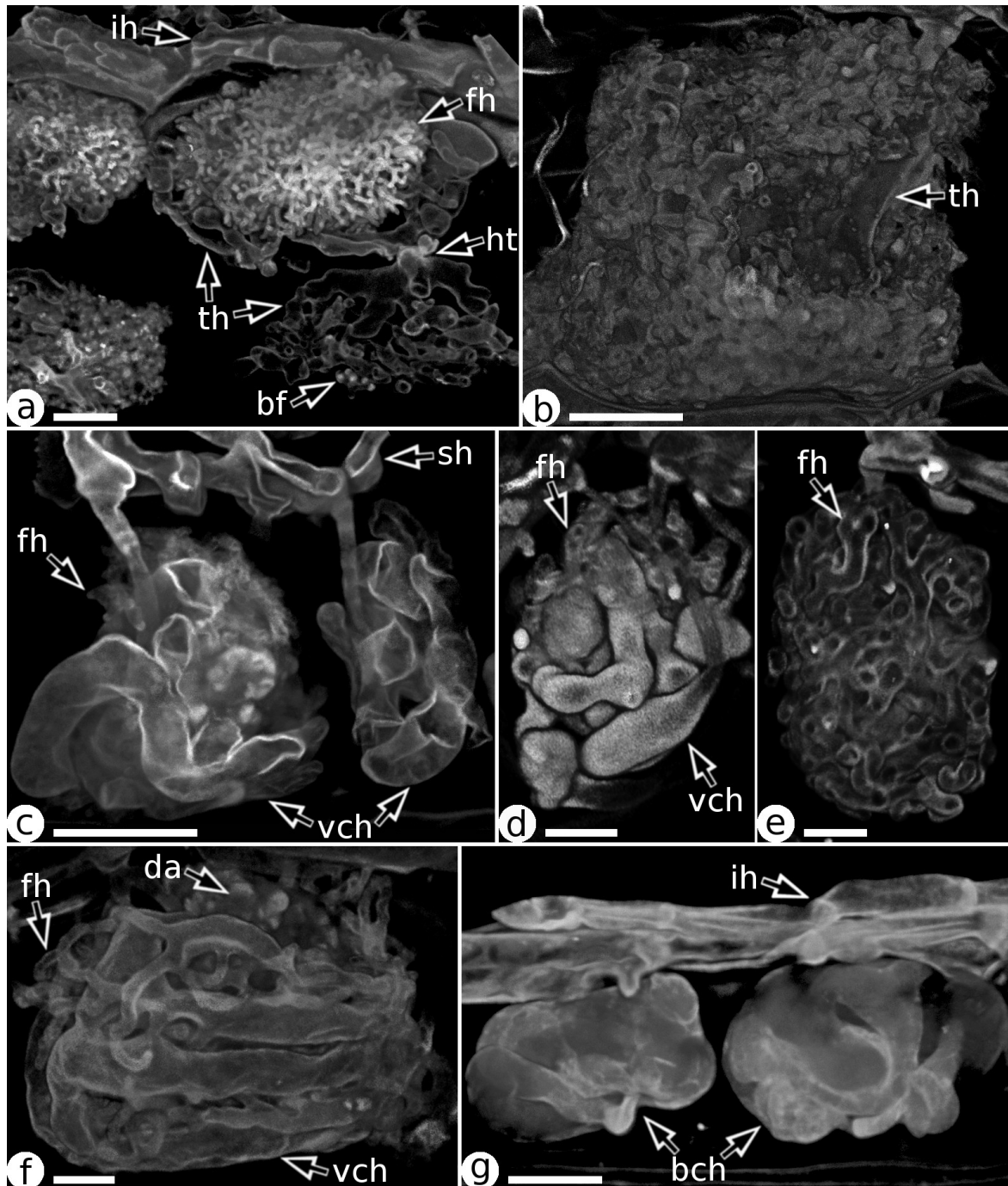


Fig. 3: **a**) Non terminal arbuscule like structures (ALS) of *Monnina costaricensis* composed of branched, thick walled trunk hyphae (th) and a large fraction of fine hyphae (fh); ht = hyphal transition between two ALS within the inner cortex parenchyma (ICP); bf = budding fine hyphae; ih = intercellular hyphae. Scale = 13 μ m **b**) Finely branched ALS of *Asemeia grandiflora* densely surrounding the thick walled trunk hyphae (th). Scale = 13 μ m. **c-f**) Successive steps of fine hyphae reduction in favour of voluminous, coiled hyphae (vch) in *Salomonina kradungensis* (**c**), *Polygala setacea* (**d,e**) and *Polygala balduinii* (**f**). sh = intracellular spreading hyphae within the transitional layer (TL); da = degenerated ALS. Scales: c = 18 μ m; d,e = 8 μ m; f = 6 μ m. **e**) Final stage of ALS modification in *Polygala nana*, fine hyphal branches are completely reduced and only bladder like, coiled hyphae (bch) remain. Scale = 14 μ m

and rare in *Salomonina* spp. (Fig. 2f). The material of *Polygala chinensis* and *Polygala longicaulis* did not provide sufficient information to address this question. In any case, the potential to access all cells in the single layered *ICP* via intracellular hyphae from the *TL* was mirrored by the strong occurrence of intracellular colonisation in all herbaceous species. This contrasted with those woody species with significant intercellular growth (e. g. *Monnina* spp.) where an increase of intercellular colonisation improved the accessibility of the inner *ICP* layers.

- Compared to the much and finely branched ALS with thick walled trunk hyphae in *Type I* (Fig. 3a), the ALS in *Type II* ranged from still branched forms found in *Asemeia grandiflora* (Fig. 3b) and *Polygala chinensis*, over stages with more coiled, voluminous, thin walled and less fine branched hyphae (*Salomonina* spp., *P. paniculata*, *P. setacea*, *P. ramosa*, *P. balduinii*, *P. nana*; Figs. 3c,d,e,f; Fig. S-2p) to the strictly terminal coils of swollen hyphae found in *Polygala nana* (Fig. 3g). *Polygala longicaulis* possessed only degenerated ALS and, were thus omitted from this analysis. The high percentage of amorphous clumps in the investigated roots indicate a quick degeneration of ALS in *Type II*.
- Unlike in the woody species, non-terminal ALS in the *ICP* did not occur! However, like in the woody life-forms, some cells may contain non-terminal thick walled coiled hyphae identical to those in the *TL* and clearly different from the typical ALS in the respective herbaceous species. Due to their anatomical distinctiveness, we interpret these hyphal structures as topologically misplaced *TL* coils reminiscent of the (presumably ancestral) dual function of the *ICP* for both hyphal spread and for the formation of ALS.

Discussion

Morphology of the root systems

That mycoheterotrophic plants evolved from photosynthetic ancestors is strongly supported by the systematic proximity of green and achlorophyllous members in several plant families and the incremental reductions therein (e. g. Henderson 1919, Burgeff 1932, Dressler 1981, Maas et al. 1986, Salmia 1989, Kron et al. 2002, Cameron et al. 2003, Merckx et al. 2006, Tedersoo et al. 2007, Selosse & Roy 2009, Motomura et al. 2010, Merckx et al. 2013a, Mennes et al. 2015b). However, only two plant families (Ericaceae and Polygalaceae) include members of all life forms from trees over shrubs, lianas, subshrubs, perennial and annual herbs to mycoheterotrophic herbs. Because the

Ericaceae are associated with ectomycorrhiza or related mycorrhizal types (Smith & Read 2008, Imhof 2009) only the Polygalaceae permit study of the structural changes of arbuscular mycorrhiza along the complete progression of morphological reduction. This study confirms that the gross morphology of the subterranean parts show reductions largely parallel to those of the above ground organs, from extended allorhizic root systems with side roots at least up to the 5th order in the woody taxa to scarcely branched, secondary homorhizic root systems in some herbs. The latter already resembles the one in the mycoheterotrophic *Epirixanthes* spp. (Imhof, 2007) and it has been argued that scarcely branched star-like root systems frequently found in MHPs (e.g. Imhof 1997, Domínguez & Sérsic 2004, Rasmussen et al. 1995) are beneficial for a mycoheterotrophic mode of life (Imhof 2010). Molecular systematics support the more basal position of the woody representatives (after Persson 2001, Forest et al. 2007, Abbott 2009, Mennes et al. 2015b) and thus agree on the evolutionary trend sketched here. However, the below ground changes do not exactly match with the epiterraneous reductions. The root system of *Polygala setacea*, the most reduced species in this investigation with a basal rosette of few minuscule leaves and tiny scale leaves at its flowering shoots only, is scarcely branched but still allorhizic, whereas the leafy herbs *Salomonina* spp., *Polygala ramosa* and *Polygala baldunii* have reduced homorhizic or even star-like root systems, an example of mosaic evolution. Nevertheless, we regard the change from intensively branched allorhizic, over scarcely branched, to homorhizic star-like root systems as well as the reduction of root hairs (Schlicht 1889, Baylis 1970, 1972) in all herbaceous species as the first (I) aspect of the mycorrhizal progression within Polygalaceae.

Mycorrhizal colonisation

Arbuscules are considered to be the primary site for the active and presumably bidirectional nutrient transfer between host and fungus (Cox and Tinker 1976, Marx et al. 1982, Gianinazzi et al. 1983, Gianinazzi-Pearson et al. 1991, Bonfante-Fasolo 1984, Bago 2000). The arbuscule-like structures (ALS) in all woody and some herbaceous Polygalaceae, like arbuscules, also increase their surface area by intensive branching and, thus seem to function as nutrient exchange organs. Since ALS mostly occur in the ICP, it should be advantageous to spread the fungal colonisation to as much ICP cells as possible in order to maximize the benefit from the association. In that process the passage through the OCP and the amount of colonized TL cells is relevant. In *Epirixanthes* spp., a characteristic cascading fungal colonisation pattern within the OCP efficiently spreads the hyphae to the inner cortex region (Imhof 2007). For European *Polygala* spp. this hyphal cascade could indicate a strategy by which penetration of such OCP cells that are already colonized by hyphae

from the same hyphal system may be avoided (Rath et al. 2013). Furthermore, the conspicuous “creeping growth” of the hyphae could mediate the reciprocal perception between fungus and the neighbouring host cell allowing to initiate (or to avoid!) those host cellular mechanisms necessary for actual fungal entry into the host cell (Genre et al. 2005, 2008). The resulting discrimination of colonized vs. uncolonized cells, combined with hyphal branching, widens the early colonisation spread and eventually increases the number of colonized *TL* cells. This spreading effect depends on two criteria: 1) the more cell layers in the *OCP*, the more expanded the hyphal cascade providing hyphal tips to the *TL*; and 2) the more strictly colonized cells are avoided by spreading hyphae, the more efficient the cascading effect. The woody species of Polygalaceae tend to have multilayered *OCP* (i.e. at least two layers of cortex parenchyma above the *TL*) and meet criterion 1). In the herbaceous species, usually having less *OCP* layers than the woody representatives, criterion 2) still allows benefit from the hyphal cascade due to the especially distinctive expression of criterion 2). This criterion therefore, appears to be a critical feature in hyphal cascade establishment and may enable herbs to save resources which woody species would need to invest in extra cortex layers and hyphal biomass within the *OCP* to achieve a similar efficient initial colonisation. Thus, criterion 2) is regarded as the second (II) progressive trait in the mycorrhiza of Polygalaceae. Since criterion 2) in contrast to many other structural features in this study can be quantified well, we could add some statistical data regarding criterion 2). The statistics clearly support criterion 2) to be more frequently expressed in the derived herbs in *Polygala* and *Salomonina*, but show a less clear expression of criterion 2) in *Monnina* spp.. Since woody genus *Securidaca* spp. express criterion 2) more pronounced than *Monnina* (albeit still less than the herbal species), *Securidaca* might represent a transitional stage of this feature which is also supported by its phylogenetic proximity to both *Polygala* s.str. and *Monnina* as well (Forest et al. 2007, Mennes et al. 2015). Alternatively, *Monnina* might have lost its ability to avoid repetitive radial colonisations of cells above the *ICP* in the course of evolution. In that case, this genus might have been especially prone for evolving (or keeping) a multilayered *ICP* that provides additional space for fungal proliferation compensating for a less efficient initial colonisation. A strategy that only pays in case of very intensive intercellular growth within the inner cortex layers - a trait which is especially pronounced in this genus indeed (see also page 253 for an evaluation of this topic). Interestingly, achlorophyllous *Epirixanthes* spp., being absolutely dependent on mycorrhizas, displays both criteria, the multilayered *OCP* and the expression of an hyphal cascade by means of criterion 2) as well (Imhof 2007). At least in *Epirixanthes* spp. the advantage of a multilayered *OCP* offsets the energy expended in its maintenance. The multilayered *OCP* is therefore the third (III) progressive trait.

Having reached the *TL*, the “creeping growth” from the *OCP* is initially kept in the *TL*, too, sending hyphal branches into the *ICP* cells to build *ALS*. The shorter the *ICP* cells, the more of them can be supplied with *ALS* from a given hyphal segment in the *TL*. This explains the more consistently abbreviated *ICP* cells in the herbaceous Polygalaceae. Together with the radial cell elongation, this *ICP* anatomy combines an improved accessibility from the *TL* with a comparable large cell lumen for nutrient transfer. The *ALS* supply of the *ICP* should even be accelerated if hyphae grow in a linear “creeping” mode rather than in a coiled fashion, which is what we found in the herbaceous species. Hence, we interpret the characteristic anatomy of the *ICP* cells in herbs compared to the more variable cell forms in the *ICP* of the woody representatives as the fourth (IV), the linear hyphal growth in the *TL* in contrast to the more coiled hyphae in trees, lianas and shrubs as the fifth (V) feature indicating a progression towards a more efficient use of the mycorrhizal fungus.

A common feature of most woody species is a multilayered *ICP*. Its occurrence in the phylogenetically basal woody taxa *Xanthophyllum* spp. and *Moutabea longifolia* and its lack in the more derived herbaceous species speak for an ancestral origin of this trait in Polygalaceae. From a functional point of view, additional layers of *ICP* enhance the number of cellular compartments hosting *ALS*. Indeed, spatial proximity of many *ALS* to the host vascular tissue seems optimal for nutrient transfer (Blee & Anderson 1998, Appelhans et al. 2008) especially for the large, nutrient demanding woody lifeforms. However, since our earlier observations (Rath et al. 2013) on phylogenetically more derived woody Polygalaceae only show an infrequent (*Polygala myrtifolia*) or absent multilayered *ICP* (*Polygala chamaebuxus*, *P. rupestris*), this trait seems to have lost its significance during evolution. A multilayered *ICP* is favourable only when all *ICP* cells are accessible, either by intercellular hyphal growth (similar to the *Arum-Type* colonisation) or non-terminal *ALS* (reminds to the *Paris-Type* colonisation). In fact, only those Polygalaceae have a multilayered *ICP* which allow at least one of these two colonisation patterns. For example, *Monnina* spp. have extensive intercellular growth, and in *Xanthophyllum* spp., *Moutabea longifolia* and *Securidaca* spp., having less intercellular hyphae, intracellular spread by means of non-terminal *ALS* is observed. The occasional appearance of hyphal transitions within the *ICP* in herbaceous species is regarded as a relic of its evolutionary background. Intriguingly, only the fully mycoheterotrophic *Epirixanthes* spp. develop exclusively terminal *ALS* in the *ICP* (Imhof 2007) indicating the relevance of this feature for evolution of mycoheterotrophy in Polygalaceae as it provides a striking example of the gradual change towards functionally specialized mycorrhizal tissue, being so characteristic for many MHPs (Imhof 2010). Nevertheless, the inner *ICP* layers of the woody Polygalaceae, in contrast to the single *ICP* layer of the herbs, often leave cells free of

hyphae, although the *OCP* and *TL* are intensively colonized. This suggests that neither strategy is able to utilize the full capacity of the *ICP*. The consequent reduction of the *ICP* to a single layer is a measure to ease the accessibility of the *ICP* cells from the intracellular hyphae within the *TL*. The putative disadvantage of having fewer cells to host ALS can likewise be considered an economic advantage due to the omission of inefficient tissue. Since the single layered *ICP* is strongly associated with its longitudinally abbreviated cells we accordingly regard it as a part of progressive trait IV. Intercellular growth is rather prominent in *Type I*, decreases in *Type II* where it becomes especially rare in *Salomonina* spp. and is absent in *Epirixanthes* spp. (Imhof 2007). Since in the herbaceous species intercellular hyphae are functionally replaceable by linear intracellular hyphae in the *TL*, we regard their abundance in some species like *Polygala nana* or *Asemeia grandiflora* as ancestral. In reverse, the increasing tendency to intracellular hyphal spread in the other investigated herbs of this study is considered as the sixth (VI) progressive trait in mycorrhiza of Polygalaceae. At least in late stages of colonisation, all life forms develop *ALS* in the *TL*. Their formation in the innermost layer of the *OCP*, however, is unique to the herbs. There *ALS* occur later during the colonisation process, not until all cells of the *ICP* are fully colonized. These supplemental *ALS* provide an extra option for nutrient transfer and thus may further compensate for the loss of *ICP* layers. By contrast, occurrence of *ALS* in the layer above the *TL* allows direct reachability by hyphae from the *TL*. Moreover, their delayed formation in the anatomical less adapted cortex layers above the *ICP* indicates a remarkable spatial and temporal coordination process with inherent priorities of locations for *ALS*! We regard this as the seventh (VII) progressive trait in Polygalaceae mycorrhizas. In fact, the morphological most derived new world species in the analyses, *Polygala setacea* and *Polygala ramosa* as well as the closest relatives of *Epirixanthes* spp. (after Mennes et al. 2015b) *Salomonina* spp., express this trait more frequently than the other herbaceous species in this study and only the achlorophyllous *Epirixanthes* spp. always express this additional layer for fungal digestion (Imhof 2007)! *Epirixanthes* spp. also shows an intensive hyphal branching and coiling of the *TL* hyphae in its advanced stages of colonisation (Imhof 2007). This is in contrast to most of the investigated herbs in this study but very similar to our findings in the previously investigated *Polygala* species from Europe and South Africa (Rath et al. 2013) where we presumed that intensive, cell filling hyphal coiling should increase the frequency of hyphal contacts to the additional *ALS*-layer above the *TL* and thus support the formation of new *ALS* therein. Remarkably, in our previous study nearly all species were also found to express roots with the additional layer for *ALS* formation quite often whereas this is more variable in the herbs in this study, with *P. setacea*, *P. ramosa* and *A. grandiflora* expressing such roots comparably frequent while in the other

herbs the trait is found only rarely (personal observation based on the material from Rath et al. 2013)! The evolution of a more frequently expressed additional *ALS* layer and intensive cell filling hyphal coiling in the *TL* seems therefore to have evolved in parallel - very likely to optimize the usage of this additional *ALS* layer. However, the considerable variability in these mycorrhizal features is only observed in the photosynthetic but not in the achlorophyllous species within the family. This provides both, an impression as to the significance of the additional *ALS* for mycoheterotrophic nutrition in *Epirixanthes* spp. as well as another example for mosaic like spread of progressive mycorrhizal traits in Polygalaceae.

Another relevant modification in the mycorrhiza of Polygalaceae is the gradual change of *ALS* from finely branched, more arbuscule-like and frequently non-terminal forms in most woody species to the terminal coils of voluminous, thin walled hyphae in some of the green herbs (e.g. *Polygala ramosa*, *P. nana*). This morphological trend was suspected already in the study on European members of Polygalaceae (Rath et al. 2013) in which, however, *ALS* modification did not attain the same degree as in the most derived cases of this study. Readily degenerating voluminous hyphal coils and vesicles as well as the scarce occurrence or even lacking of arbuscule-like branches are common in mycoheterotrophic plants (e.g. Schmid & Oberwinkler 1994, Imhof 1997, 2003; Domínguez & Sérsic 2004) presumably indicating a strategy to accumulate fungal biomass within their roots. The mycoheterotrophic Polygalaceae *Epirixanthes* spp. as well have only fast degenerating, bladder-like *ALS* (called terminal coils in Imhof 2007), so far the final stage of *ALS* modification in Polygalaceae. Since structural (Kinden & Brown 1975, Bonfante-Fasolo 1984), physiological (Cox et al. 1975, Bécard & Piché 1989, Blee & Anderson 1998, Bago 2000) and molecular (Schüßler et al. 2006, Helber et al. 2011) evidence indicate the functional importance of the finely branched arbuscule interface in carbon transfer from host to fungal symbiont, the structural modifications of the *ALS* in the green Polygalaceae might indicate the change from an active, surface dependent nutrient transfer from plant to fungus to a digestive mode of nutrient acquisition in the opposite direction (Burgeff 1932, Kuga et al. 2014). The morphology of the *ALS*, hence, could be an important parameter to assess the trophic status of the species. Interestingly, the progression from arbuscule-like structures to the digestion of voluminous coils parallel to the change from autotrophy to mycoheterotrophy is also found in Gentianales (Knöbel & Weber 1987, Weber et al. 1995, Imhof 1999, Imhof & Weber 2000). We therefore regard the modification from highly branched *ALS* to bladder like terminal coils as the eighth (VIII) progressive mycorrhizal trait in Polygalaceae. Finally, all herbaceous species with a homorhizic root system have a more or less pronounced delay in the loss of their primary cortex even in the proximal parts of the root system.

Although secondary growth is active in all herbs, indicated by increased and more lignified vessels and fibres, a prolonged cell division activity within the cortex paranchyma as well as an extended dilatation growth of the endodermis keep this essential tissue for mycorrhizal function alive. Persistence of primary cortices is also a prerequisite for MHP (Imhof 2010) and should be considered as the final (IX) indication for a mycorrhizal progression in Polygalaceae.

	<i>Trees, Shrubs, Lianas</i>	<i>Annual herbs with chlorophyll.</i>	<i>Epirixanthes spp. (from Imhof '07)</i>
<i>Multilayered OCP. (III)</i>	- or + or ++	- or +	++
<i>Linear hyphae within the TL. (V)</i>	- or °	+	+
<i>Hyphal cascade. (II)</i>	- or °	++	++
<i>Single layered ICP composed of even shaped cubic to radially elongated cells. (IV)</i>	- or °	° or ++	++
<i>Additional OCP-layer for ALS formation. (VII)</i>	-	° or +	++
<i>Reduced root system. (I)</i>	-	° or +	++
<i>ALS progression (VIII)</i>	-	° or + or ++	++
<i>Reduced intercellular growth. (VI)</i>	- or °	- or ° or +	++
<i>Persistent primary cortex.(IX)</i>	-	- or ° or +	++

Table 2: Summary of the progressive structural traits in the mycorrhiza of Polygalaceae.

++ = trait always and very distinctively expressed; + = trait present; ° = trait present in intermediate stage; - = trait absent.

The occurrence of four of these traits (II,IV,V,VII) in the monophylum comprising *Asemeia grandiflora*, *Polygala* s. str. and *Salomonium/Epirixanthes* (after Forest et al. 2007, Abbott 2009, Mennes et al. 2015b; see p. 258>Fig. 4) speaks for a synapomorphy of these four basic mycorrhizal traits in this herbaceous-rich clade. The evolution of this set of basic traits might have been favoured due to their already primitive or incomplete realization in the phylogenetic more ancestral woody taxa. However, *Polygala balduinii*, *Polygala ramosa*, *Polygala setacea* and *Salomonium* spp. are especially close to *Epirixanthes* spp. in their expression of a reduced root system (I), primarily intracellular hyphal growth (VI), reduction of fine branched ALS (VIII) and, with the exception of *P. setacea*, prolonged cellular integrity of the primary root cortex parenchyma (IX). Since *Salomonium* is the sister taxa to *Epirixanthes* (after Mennes et al. 2015b) the high similarity to the mycoheterotrophic genus seems not surprising. The occurrence of these, in their combination most progressive mycorrhizal traits also in the close related monophyllum *Polygala* s. str. (after Forest et al. 2007, Abbott 2009 & Mennes et al. 2015) however, suggests a parallel evolutionary scenario for these traits in both of the phylogenetic most derived clades in Polygalaceae. The advanced stage of mycorrhizal structures already in photosynthetic herbs supports an evolutionary model where selection for more efficient mycorrhizal performance (implying e.g. an improved mineral acquisition in natural habitats; Selosse & Roy 2009) has finally led to these traits in *Polygala* s. str.,

Salomonina spp. and *Epirixanthes* spp.. Furthermore, a highly efficient structured mycorrhiza might also allow for a very special kind of “facultative epiparasitism“ (Molina 1992, Bruns et al. 2002) where especially herbs in *Polygala* and *Salomonina* reduce their own investment in the fungal symbionts in terms of reduction of “excessive“ intraradical fungal biomass while still profiting from an efficient nutrient transfer in specialized cells (*ICP*) and incorporation in a common mycorrhizal network. This extreme mycotrophic specialisation might also bear the potential for early forms of partial mycoheterotrophy as the first step to mycoheterotrophy (Abadie et al. 2006; Motomura et al. 2010) and could thus have favoured the switch to achlorophyllous life in *Epirixanthes* spp.. As a relative young mycoheterotrophic lineage (after Mennes et al., 2015b), *Epirixanthes*, therefore might just be the “spearhead“ of mycoheterotrophic evolution in Polygalaceae while those clades in *Polygala* and *Salomonina* combining most of the 9 progressive traits might comprise hitherto undiscovered partial mycoheterotrophic species. Hence, the Polygalaceae represent the third lineage within the dicotyledons (besides Ericaceae and Gentianales/Gentianaceae) in which successive reductions of root and shoot systems correlates with progressive mycorrhizal structures and eventually, a mycoheterotrophic mode of life (Imhof 2009). Since this trend has now been shown in three unrelated plant families it thus provides compelling evidence that such advanced traits are essential conditions for evolution of mycoheterotrophy. For Polygalaceae in specific, we suggest a model in which enhanced mycotrophy is the initial step in the evolution of mycoheterotrophic lifestyle which might also have allowed for early forms of partial mycoheterotrophy. These trophic stages are thus seen as the incremental steps ahead of the evolution of initial mycoheterotrophy and advanced forms of partial mycoheterotrophy the latter of which we also see as the last step before actual loss of photosynthetic abilities (see p. 270>Fig. S-4).

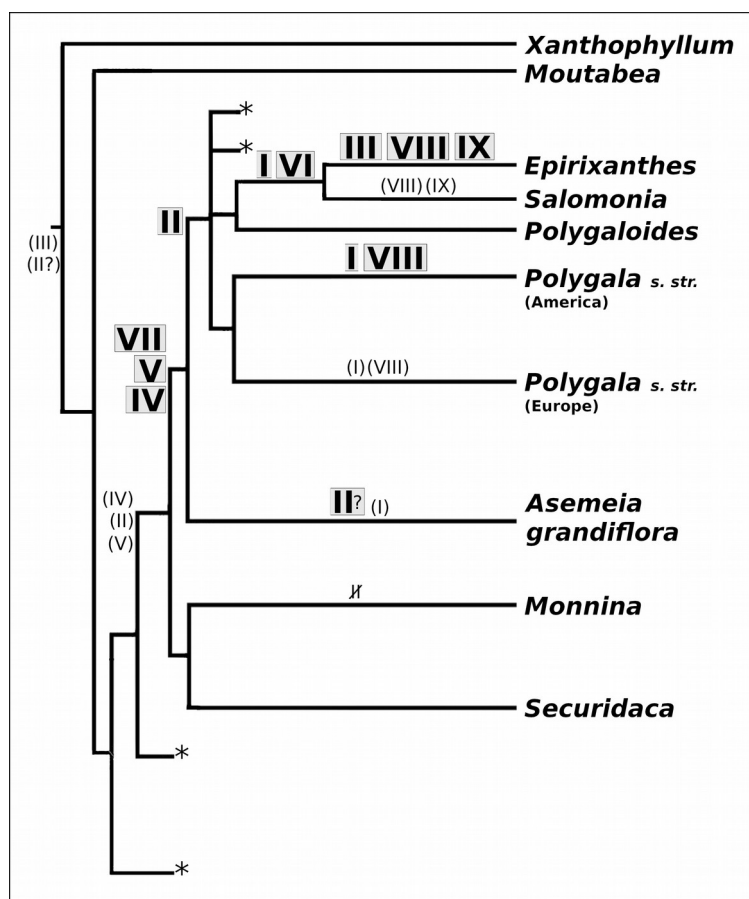


Fig. 4: Mycorrhizal traits found in this study (see Table 2) plotted in the recent phylogeny of Polygalaceae (adapted from Forest et al. 2007 and Mennes et al. 2015). Bold numbers with grey frame indicate traits which are found especially distinct in the respective clades. Traits in parenthesis are found less pronounced or in intermediate stage in the respective clade. Slashed numbers indicates reduction of the respective trait. Question marks behind trait number indicate uncertainty about the stage of expression in this trait due to lack of material. Asterix refers to clades which were not incorporated in this study. Already described species of European Polygalaceae (Rath et al. 2013) and mycoheterotrophic *Epirixanthes* (Imhof 2007) were also assigned to the respective traits.

Conclusions

The incremental changes of nine structural mycorrhizal traits pointed out here are largely parallel to the above ground reduction from trees to almost leafless herbs and are strong arguments for an evolutionary progression. We suspect that mycoheterotrophy within Polygalaceae (*Epirixanthes* spp.) is based on favourable structural prerequisites already present in basal, woody taxa of Polygalaceae, which could have been gradually adapted in herbs to optimize the benefit from that e. g. *Salomonina* spp. *Polygala setacea*, *Polygala baldunii* and *Polygala ramosa* are partially mycoheterotrophic. This could be tested through stable isotope analysis. The notion of preadaptation as an essential factor in the evolution of mycoheterotrophy also allowed us to formulate a model for stepwise evolution of mycoheterotrophy starting with autotrophic lifeforms expressing advanced mycotrophic structural traits as a prerequisite for early forms of partial mycoheterotrophy and finally advanced forms of partial mycoheterotrophy as the last step before full mycoheterotrophy. Moreover, future analysis should identify the fungal symbionts in

Polygalaceae mycorrhizas to shed light on the potential host specificities. In any case, Polygalaceae are an excellent model for studying many aspects of mycorrhizal evolution.

Acknowledgements

We would like to thank Colin Pendry from the University of Edinburgh, Jack Fisher from Fairchild Botanical Garden in Miami, Rainaldo Arguilar from the biological station “Los Charcos de Osa” (Costa Rica, Puntarenas), Narumol Piwpuan from Kohn Kaeng University in Thailand, Pitak Panyachan from Queen Sirikit Botanical Gardens in Thailand and my good fellows Frank Bonacker and Sebastian Zoll for information and help while collecting the plant material. We are grateful to Merlin Sheldrake from Cambridge University and the anonymous referees for their valuable comments on the manuscript.

References

- Abadie JC, Püttsepp Ü, Gebauer G, Faccio A, Bonfante P, Selosse MA. 2006.** *Cephalanthera longifolia* (Neottieae, Orchidaceae) is mixotrophic: a comparative study between green and nonphotosynthetic individuals. *Canadian Journal of Botany*. **84**: 1462-1477
- Abbott JR. 2009.** Phylogeny of the Polygalaceae and a revision of *Badiera*. PhD Thesis. Published Online. Copyrights by J. R. Abbott.
- Appelhans M, Weber HC, Imhof S. 2008.** Rutaceae sampled from Germany, Malta, and Mallorca (Spain) are associated with AMF clustering with *Glomus hoi* Berch & Trappe. *Mycorrhiza*. **18**: 263-268.
- Bago B. 2000.** Putative sites for nutrient uptake in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*. **226**: 263-274
- Barrett CF, Freudenstein JV. 2011.** An integrative approach to delimiting species in a rare but widespread mycoheterotrophic orchid. *Molecular Ecology*. **20**: 2771-2786
- Baylis GTS. 1970.** Root hairs and phycomycetous mycorrhizas in phosphorus-deficient soil. *Plant and Soil*. **33**: 713-716
- Baylis GTS. 1972.** Fungi, phosphorus, and the evolution of root systems. *Search*. **3**: 257-258
- Bécard G, Piché Y. 1989.** New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist*. **112**: 77-83
- Bidartondo MI, Redecker D, Hijri I, Wiemken A, Bruns TD, Domínguez L, Séršic A, Leake JR, Read DJ. 2002.** Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*. **419**: 389-392
- Bidartondo MI. 2005.** The evolutionary ecology of myco-heterotrophy. *New Phytologist*. **167**: 335-352
- Bidartondo MI, Bruns TD. 2005.** On the origins of extreme mycorrhizal specificity in the Monotropeae (Ericaceae): performance trade-offs during seed germination and seedling development. *Molecular Ecology*. **14**: 1549-1560
- Blee KA, Anderson AJ. 1998.** Regulation of the arbuscular formation by carbon in the plant. *The Plant Journal*. **16**: 523-530

- Bonfante-Fasolo P. 1984.** “Anatomy and morphology of VA Mycorrhizae”. In: Powell CL, Bagyaraj DJ (eds.). *VA Mycorrhiza*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp. 5-33
- Björkmann E. 1960.** *Monotropa Hypopytis* L. - an Epiparasite on Tree Roots. *Physiologia Plantarum*. **13**: 308-327
- Brundrett M. 2002.** Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*. **154**: 275-304
- Bruns TD, Bidartondo MI, Taylor DL 2002** Host specificity in ectomycorrhizal communities: what do the exceptions tell us? *Integrative and Comparative Biology* 42: 352 – 359
- Burgeff H. 1932.** Saprophytismus und Symbiose. Studien an tropischen Orchideen. *Gustav Fischer Verlag, Jena*.
- Cameron KM, Chase MW, Rudall PJ. 2003.** Recircumscription of the monocotyledonous family Petrosaviaceae to include *Japonolirion*. *Brittonia*. **55**: 214-225
- Cameron DD, Bolin JF. 2010.** Isotopic evidence of partial mycoheterotrophy in Gentianaceae: *Bartonia virginica* and *Obolaria virginica* as case studies. *American Journal of Botany*. **97**: 1272-1277
- Cox G, Sanders FE, Tinker PB, Wild JA. 1975.** “Ultrastructural evidence relating to host-endophyte transfer in a vesicular-arbuscular mycorrhiza.” In: Sanders FE, Mosse B, tinker PB (eds.) *Endomycorrhizas*. Academic Press Inc, London, pp 297-306
- Cox G, Tinker, PB 1976.** Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. I. The arbuscule and phosphorus transfer: a quantitative ultrastructural study. *New Phytologist*. **77**: 371-378.
- Domínguez LS, Sérsic A. 2004.** The southernmost myco-heterotrophic plant, *Arachnitis uniflora*: root morphology and anatomy. *Mycologia*. **96**: 1143-1151
- Dressler RL. 1981.** The Orchids. Natural history and classification. *Harvard University Press. Cambridge, Mass. & London*.
- Eriksen B, Persson C. 2007** “Polygalaceae.” In: Kubitzki K. (ed.), *The Families and Genera of Vascular Plants IX*. Springer, Berlin, Germany. pp. 345
- Forest F, Chase MW, Persson C, Crane PR, Hawkins JA. 2007.** The role of biotic and abiotic factors in evolution of ant dispersal in the milkwort family (Polygalaceae). *Evolution*. **61**: 1675–1694
- Frank B. 1885.** Neue Mittheilungen über die Mycorrhiza der Bäume und der *Monotropa hypopytis*. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. **3**: 27-33
- Franke T, Beenken L, Döring M, Kocyan A, Agerer R. 2006.** Arbuscular mycorrhizal fungi of the Glomus-group A lineage (Glomerales; Glomeromycota) detected in myco-heterotrophic plants from tropical Africa. *Mycological Progress*. **5**: 24-31
- Furman TE, Trappe JM. 1971.** Phylogeny and Ecology of Mycotrophic Achlorophyllous Angiosperms. *The Quarterly Review of Biology*. **46**: 219-225
- Gebauer G, Meyer M. 2003.** ¹⁵N and ¹³C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytologist*. **160**: 209-223
- Genre A, Chabaud M, Timmers T, Bonfante P, Barker DG. 2005.** Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *The Plant Cell*. **17**: 3489-3499.
- Genre A, Chabaud M, Faccio A, Barker DG, Bonfante P. 2008.** Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonisation patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *The Plant Cell*. **20**: 1407-1420
- Gerlach D. 1984.** Botanische Mikrotechnik - Eine Einführung. 3rd edn. *Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York*
- Gianinazzi S, Dexheimer J, Gianinazzi-Pearson V, Marx C. 1983.** Role of the host-arbuscule interface in the VA mycorrhizal symbiosis: ultracytological studies of processes involved in the phosphate and carbohydrate exchange. *Plant and Soil*. **71**: 211-215
- Gianinazzi-Pearson V, Smith SE, Gianinazzi S, Smith FA. 1991.** Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. V. Is H⁺-ATPase a component of ATP-hydrolysing enzyme activities in plant-fungus interfaces? *New*

Phytologist. **117**: 61-74

Groom P. 1894. Contributions to the Knowledge of Monocotyledonous Saprophytes. *The Journal of the Linnean Society*. **31**: 149-215

Helber N, Wippel, K, Sauer N, Schaarschmidt S, Hause B, Requena N. 2011. A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp. is crucial for the symbiotic relationship with plants. *The Plant Cell*. **23**: 3812-3823

Henderson M. 1919. A Comparative Study of the Structure and Saprophytism of the Pyrolaceae and Monotropaceae with Reference to their Derivation from the Ericaceae. *Contributions from the Botanical Laboratory of the University of Pennsylvania*. **5**: 42-109

Hynson NA, Bruns TD. 2009. Evidence of a myco-heterotroph in the plant family Ericaceae that lacks mycorrhizal specificity. *Proceedings of the Royal Society |B*. **276**: 4053-4059

Hynson NA, Bruns TD. 2010. Fungal hosts for mycoheterotrophic plants: a non exclusive, but highly selective club. *New Phytologist*. **185**: 598-601

Hynson NA, Madsen TP, Selosse M-A, Adam IKU, Ogura-Tsujita Y, Roy M, Gebauer G. 2013. “The Physiological Ecology of Mycoheterotrophy” In: Merckx SFT (ed.): *The Biology of Plants Living on Fungi*. Springer, New York. pp. 297-342

Imhof S. 1997. Root anatomy and mycotrophy of the achlorophyllous *Voyria tenella* Hooker (Gentianaceae). *Botanica Acta*. **110**: 298-305

Imhof S, Weber HC. 1997. Root anatomy and mycotrophy (AM) of the achlorophyllous *Voyria truncata* (Standley) Standley & Steyermark (Centianaceae). *Botanica Acta*. **110**: 127-134

Imhof S. 1999. Root morphology, anatomy and mycotrophy of the achlorophyllous *Voyria aphylla* (Jacq.). Pers. (Gentianaceae). *Mycorrhiza*. **9**: 33-39

Imhof, S., Weber, HC. 2000: Root structures and mycorrhiza of the achlorophyllous *Voyria obconica* Progel (Gentianaceae). *Symbiosis*. **29**: 201 – 211

Imhof S. 2003. A dorsiventral mycorrhizal root in the achlorophyllous *Sciaphila polygyna* (Triuridaceae). *Mycorrhiza*. **13**: 327-332

Imhof S. 2006. Two distinct fungi colonize roots and rhizomes of the myco-heterotrophic *Afrothismia gesnerioides* (Burmanniaceae). *Canadian Journal of Botany*. **84**: 852-861

Imhof S. 2007. Specialized mycorrhizal colonisation pattern in achlorophyllous *Epirixanthes* spp. (Polygalaceae). *Plant Biology*. **9**: 786–792

Imhof S. 2009. Arbuscular, ecto-related, orchid mycorrhizas – three independent structural lineages towards mycoheterotrophy: implications for classification? *Mycorrhiza*. **19**: 357-363

Imhof S. 2010. Are Monocots particularly suited to develop mycoheterotrophy? In: Seberg O, Petersen G, Barfod A, Davis JI (eds): *Diversity, phylogeny, and evolution in the Monocotyledons*. Aarhus University Press, Kopenhagen. pp. 11-23

Imhof S, Massicotte HB, Melville LH, Peterson RL 2013. “Subterranean Morphology and Mycorrhizal Structures” In: Merckx SFT (ed.): *The Biology of Plants Living On Fungi*. Springer, New York. pp. 157-214

Johow F. 1885. Die chlorophyllosen Humusbewohner West-Indiens, biologisch-morphologisch dargestellt. *Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik*. **16**: 415-449

Julou T, Burghardt B, Gebauer G, Berveiller D, Damesin C, Selosse M-A. 2005. Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytologist*. **166**: 639-653

Kamienski F. 1882. Les organes végétatifs du *Monotropa hypopitys* L. *Mémoires de la Société Nationale des Sciences*

- Kinden DA, Brown MF. 1975.** Electron microscopy of vesicular-arbuscular mycorrhizae of yellow poplar. III. Host-endophyte interactions during arbuscular development. *Canadian Journal of Microbiology*. **21**: 1930–1939
- Knöbel M, Weber HC. 1987.** Vergleichende Untersuchung zur Mycotrophie bei *Gentiana verna* L. und *Voyria truncata* (Stand.) Stand. & Stey. (Gentianaceae). Observations on Mycorrhiza of *Gentiana verna* L. and *Voyria truncata* (Stand.) Stand. & Stey (Gentianaceae). *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*. **63**: 463-477
- Kron KA, Judd WS, Stevens PF, Crayn DM, Anderberg AA, Gadek PA, Quinn CJ, Luteyn JL. 2002.** Phylogenetic classification of Ericaceae: Molecular and morphological Evidence. *The Botanical Review*. **68**: 335-423
- Kuga Y, Sakamoto N, Yurimoto H. 2014.** Stable isotope cellular imaging reveals that both live and degenerating fungal pelotons transfer carbon and nitrogen to orchid protocorms. *New Phytologist*. **202**: 594-605
- Leake JR. 1994.** The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist*. **127**: 171-216
- Maas PJM, Maas-van de Kamer H, van Benthem J, Snelders HCM, Rübsamen T. 1986.** Burmanniaceae. Flora Neotropica Monogr. **42**.
- Martos F, Dulormne M, Pailler T, Bonfante P, Faccio A, Fournel J, Dubois M-P, Selosse M-A. 2009.** Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids. *New Phytologist*. **184**: 668–681
- Marx C, Dexheimer J, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S. 1982.** Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. IV. Ultracytoenzymological evidence (Atpase) for active transfer processes in the host-arbuscule interface. *New Phytologist*. **90**: 37-43
- McKendrick SL, Leake JR, Taylor DL, Read DJ. 2000.** Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: ontogeny of *Corallorhiza trifida* and characterization of its mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. **145**: 523-537
- Van der Meijden R. 1988.** "Polygalaceae." In: C. G. G. J. van Steenisand & W. J. J. O. de Wilde (eds.): Flora Malesiana, vol. **10**: 455–539, Kluwer, Dordrecht, Netherlands.
- Mennes CB, Lam VKY, Rudall PJ, Lyon SP, Graham SW, Smets EF, Merckx VSFT. 2015a.** Ancient Gondwana break-up explains the distribution of the mycoheterotrophic family Corsiaceae (Liliales). *Journal of Biogeography*. **42**: 1123-1136
- Mennes CB, Moerland MS, Rath M, Smets EF, Merckx VSFT. 2015b.** Evolution of mycoheterotrophy in Polygalaceae: The case of *Epirixanthes*. *American Journal of Botany*. **102**: 598-608
- Merckx V, Schols P, Maas-van de Kamer H, Maas P, Huysmans S, Smets E. 2006.** Phylogeny and evolution of Burmanniaceae (Dioscoreales) based on nuclear and mitochondrial data. *American Journal of Botany* **93**: 1684-1698
- Merckx V, Bidartondo MI. 2008.** Breakdown and delayed cospeciation in the arbuscular mycorrhizal mutualism. *Proceedings of the Royal Society |B*. **275**: 1029-1035.
- Merckx V, Freudenstein JV. 2010.** Evolution of mycoheterotrophy in plants: a phylogenetic perspective. *New Phytologist*. **185**: 605-609
- Merckx VSFT, Janssens SB, Hynson NA, Specht CD, Bruns TD, Smets EF. 2012.** Mycoheterotrophic interactions are not limited to a narrow phylogenetic range of arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Ecology*. **21**: 1524-1532
- Merckx VSFT (ed.). 2013.** The Biology of Plants Living On Fungi. *Springer, New York*.
- Merckx VSFT, Freudenstein JV, Kissling J, Christenhusz MJM, Stotler RE, Crandall-Stotler B, Wickett N, Rudall PJ, Maas-van de Kamer H, Maas PJM. 2013a.** "Taxonomy and Classification." In: Merckx VSFT (ed.): The Biology of Plants Living On Fungi. *Springer, New York*. pp. 19-101
- Merckx VSFT, Kissling J, Hentrich H, Janssens SB, Mennes CB, Specht CD, Smets E. 2013b.** Phylogenetic relationships of the mycoheterotrophic genus *Voyria* and the implications for the biogeographic history of Gentianaceae. *American Journal of Botany*. **100**: 712-721
- Molina R, Massicotte H, Trappe JM 1992** Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: Community-ecological

consequences and practical implications. In: Allen M. F. (ed.) Mycorrhizal functioning: An integrative plant-fungal process. Chapman and Hall, New York.

Motomura H, Selosse M-A, Martos F, Kagawa A, Yukawa T. 2010. Mycoheterotrophy evolved from mixotrophic ancestors: evidence in *Cymbidium* (Orchidaceae). *Annals of Botany*. **106**: 573-581

Newman E. 1842. Notes on the supposed parasitism of *Monotropa Hypopitys*. *The Phytologist* **1**: 297-299

Neyland R, Hennigan M. 2003. A phylogenetic analysis of large-subunit (26S) ribosome DNA sequences suggests that the Corsiaceae are polyphyletic. *New Zealand Journal of Botany*. **41**: 1-11

Neyland R, Merchant M. 2011. The phylogenetic position of subfamily Monotropoideae (Ericaceae) inferred from large ribosomal subunit (26S) rRNA Gene DNA sequences. *Journal of the Mississippi Academy of Sciences*. **55&56**: 190-196

Pendry CA. 2001. Polygalaceae. In T. Santisuk and K. Larsen (eds.): Flora of Thailand, vol. **7**: 498–538, Royal Forest Department, Bangkok, Thailand.

Pendry CA. 2010. *Epirixanthes compressa* Pendry, a new mycoheterotrophic species of Polygalaceae from Thailand. *Thai Forest Bulletin* **38**: 184–186

Penzig O. 1901. Beiträge zu Kenntniss der Gattung *Epirrhizantes* Bl. *Annales du Jardin Botanique de Buitenzorg*. **17**: 142-170

Persson C. 2001. Phylogenetic relationships in Polygalaceae based on plastid DNA sequences from the trnL-F region. *Taxon*. **50**: 763-779

Van der Pijl L. 1934. Die Mycorrhiza von *Burmannia* und *Epirrhizantes* und die Fortpflanzung ihres Endophyten. *Recueil des Travaux Botaniques Néerlandais*. **31**: 761-779.

Rath M, Weber HC, Imhof S. 2013. Morpho-anatomical and molecular characterization of the mycorrhizas of European *Polygala* species. *Plant Biology*. **15**: 548–557

Rath M, Hauelsen J, Grolig F, Imhof S. 2014. Combining microtomy and confocal laser scanning microscopy for structural analyses of plant–fungus associations. *Mycorrhiza*. **24**: 293-300

Rasmussen HN. 1995. Terrestrial Orchids – from seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press.

Salmia A. 1989. General morphology and anatomy of chlorophyll-free and green forms of *Epipactis helleborine* (Orchidaceae). *Annales Botanici Fennici*. **26**: 95-105

Schmid E, Oberwinkler F. 1994. Light and electron microscopy of the host-fungus interaction in the achlorophyllous gametophyte of *Botrychium lunaria*. *Canadian Journal of Botany*. **72**: 182-188

Schlicht A. 1889. Beitrag zur Kenntniss der Verbreitung und Bedeutung der Mycorrhizen. *Landwirtschaftliche Jahrbücher*. **18**: 478–506

Schüßler A., Martin H., Cohen D., Fitz M., Wipf D. 2006. Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi. *Nature*. **444**: 933–936

Selosse M-A, Weiß M, Jany J-L, Tillier A. 2002. Communities and populations of sebacinoïd basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. *Molecular Ecology*. **11**: 1831-1844

Selosse M-A, Roy M. 2009. Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. *Trends in Plant Science*. **14**: 64-70

Smith SE. 1967. Carbohydrate translocation in orchid mycorrhizas. *New Phytologist*. **66**: 371-378

Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd edn. London, Academic Press

Stöckel M, Meyer C, Gebauer G. 2011. The degree of mycoheterotrophic carbon gain in green, variegated and vegetative albino individuals of *Cephalanthera damasonium* is related to leaf chlorophyll concentrations. *New Phytologist*. **189**: 790-796

Taylor DL, Bruns TD, Leake JR, Read DJ. 2002. “Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants.” In:

- Van der Heijden MGA, Sanders I. (eds.): *Mycorrhizal Ecology*. Springer, Berlin. Vol. 157, pp. 375-413
- Tedersoo L, Pellet P, Kõljalg U, Selosse M-A. 2007.** Parallel evolutionary paths to mycoheterotrophy in understory Ericaceae and Orchidaceae: ecological evidence for mixotrophy in Pyroleae. *Oecologia*. **151**: 206-217
- Trudell SA, Rygiewicz PT, Edmonds RL. 2003.** Nitrogen and carbon stable isotope abundance support the mycoheterotrophic nature and host-specificity of certain achlorophyllous plants. *New Phytologist*. **160**: 391-401
- Unger F. 1840.** Beiträge zur Kenntniss der parasitischen Pflanzen. Erster oder anatomisch-physiologischer Theil. *Annalen des Wiener Museums der Naturgeschichte*. **Vol. 2**
- Waterman RJ, Klooster MR, Hentrich H, Bidartondo MI. "Species Interactions of Mycoheterotrophic Plants: Specialization and its Potential Consequences." 2013.** In: Merckx VSFT (ed.): *The Biology of Plants Living on Fungi*. Springer, New York. pp. 267-296
- Weber HC, Klahr A, Marron-Heimbuch M. 1995.** Anatomical structures of the VA Mycorrhiza in the Apocynaceae (Gentianales). *Botanica Acta*. **108**: 525-534
- Winther JL, Friedman WE. 2007.** Arbuscular mycorrhizal symbionts in *Botrychium* (Ophioglossaceae). *American Journal of Botany*. **94**: 1248-1255.
- Yamato M, Yagame T, Shimomura N, Iwase K, Takahashi H, Ogura-Tsujita Y, Yukawa T. 2011.** Specific arbuscular mycorrhizal fungi associated with non-photosynthetic *Petrosavia sakurarii* (Petrosaviaceae). *Mycorrhiza*. **21**: 631-639
- Yamato M, Ogura-Tsujita Y, Takahashi H, Yukawa T. 2014.** Significant difference in mycorrhizal specificity between an autotrophic and its sister mycoheterotrophic plant species of Petrosaviaceae. *Journal of Plant Research*. **127**: 685-693
- Yang S, Pfister DH. 2006.** *Monotropa uniflora* plants of eastern Massachusetts form mycorrhizae with a diversity of russulacean fungi. *Mycologia*. **98**: 535-540
- Zimmer K, Hynson NA, Gebauer G, Allen EB, Allen MF, Read DJ. 2007.** Wide geographical and ecological distribution of nitrogen and carbon gains from fungi in pyrolids and monotropoids (Ericaceae) and in orchids. *New Phytologist*. **175**: 166-175

Supplementary material

(für eine vergrößerte Darstellung der Abbildungen, siehe die PDF-Version dieser Arbeit auf dem beiliegenden
USB Stick)

Species	Site-No.	Site	No. of Individuals	Collecting Date
<i>Monnina parasylvatica</i> C.M.Taylor	1	Costa Rica (Alajuela): N 10°53'29.8" W 085°23'00.9"	1	03.10.2008
	2	Costa Rica (Alajuela): N 10°52'37.9" W 085°23'32.6"	1	03.10.2008
<i>Monnina xalapensis</i> Kunth	3	Costa Rica (San Jose): N 09°44'15.6" W 083°57'28.8"	1	03.15.2008
	4	Costa Rica (San Jose): N 09°44'18.9" W 083°57'33.6"	1	03.15.2008
	5	Costa Rica (San Jose): N 09°41'03.8" W 083°55'18.1"	1	03.21.2008
<i>Monnina crepinii</i> Chodat ex T.Durand & Pittier	6	Costa Rica (San Jose): N 09°33'22.5" W 083°42'52.4"	2	03.15.2008
	7	Costa Rica (San Jose): N 09°37'09.7" W 083°49'35.8"	1	03.21.2008
<i>Monnina costaricensis</i> Chodat ex T.Durand & Pittier	8	Costa Rica (San Jose): N 09°40'05.3" W 083°52'12.3"	1	03.15.2008
<i>Monnina spec.</i>	9	Ecuador (Loja): Near street No. 35 between Loja and Catamayo.	1	09.27.2008
<i>Securidaca diversifolia</i> (L.) S.F.Blake	10	Costa Rica (Puntarenas): N 10°00'59.4" W 084°36'37.1"	2	03.07.2008
	11	Costa Rica (Guanacaste): N 10°44'18.0" W 085°28'10.4"	2	03.09.2008
	12	Costa Rica (Guanacaste): N 10°59'11.5" W 085°37'29.7"	2	03.11.2008
<i>Securidaca inappendiculata</i> Hassk.	13	Thailand (Chiang Mai): N 18°53.58' E 98°53.1'	1	04.05.2010
<i>Xanthophyllum lanceatum</i> (Miq.) J.J.Sm.	14	Thailand (Chiang Mai): N 18°53'29.7" E 098°51'48.1"	1	04.02.2010
<i>Xanthophyllum cf. flavescens</i> Roxb.	15	Thailand (Chiang Mai): N 18°53.2' E 098°51.5'	1	04.06.2010
<i>Moutabea longifolia</i> Poepp. & Endl.	16	Costa Rica (Puntarenas): N 08°40'19.8" W 083°30'01.42"	4	03.19.2008
	17	Costa Rica (Puntarenas): N 08°40'19.8" W 083°30'16.7"	2	03.19.2008
<i>Polygala paniculata</i> L.	18	Costa Rica (Guanacaste): N 10°21'58.2" W 084°51'11.0"	2	03.13.2008
	19	Panama (Chiriquí): N 08°52'57.1" W 082°45'33.1"	2	03.16.2008
<i>Polygala setacea</i> Michx.	21	USA (Florida): N 27°39'46.0" W 081°24'01.7"	2	03.26.2008
	23	USA (Florida): N 27°54'42.2" W 080°37'19.2"	4	03.27.2008
<i>Polygala nana</i> (Michx.) DC.	23	USA (Florida): N 27°54'42.2" W 080°37'19.2"	4	03.27.2008
<i>Polygala ramosa</i> Elliot	25	USA (Florida): N 27°46'17.9" W 081°22'05.3"	3	03.26.2008
<i>Polygala baldunii</i> Nutt	25	USA (Florida): N 27°46'17.9" W 081°22'05.3"	3	03.26.2008
<i>Polygala chinensis</i> L.	26	Thailand (Chiang Mai): N 18°53'40.5" E 98°51'32.3"	2	04.07.2010
<i>Polygala longicaulis</i> Kunth	20a	Costa Rica (Guanacaste): N 10°41'22.9" W 085°25'38.2"	3	03.09.2008
	20b	Costa Rica (Guanacaste): N 10°41'24.6" W 085°25'39.5"	1	03.12.2008
<i>Asemeia grandiflora</i> (Walter) Small	22	USA (Florida): N 25°52'01.6" W 081°09'18.7"	2	03.28.2008
	24	USA (Florida): N 25°35'53.9" W 080°23'32.3"	2	03.24.2008
<i>Salomonina cantoniensis</i> Lour.	27	Thailand (Kho Lang): Krabi	1	10.24.2004
	28	Thailand (Chiyapnum): Phu Koei	1	10.19.2005
<i>Salomonina kradungensis</i> H. Koyama	29	Thailand (Loei): Phu Kradung N. P.	3	10.30.2005
<i>Salomonina ciliata</i> DC.	30	Thailand (Loei): Phu Kradung N. P.	1	10.29.2005
		Thailand (Sakon Nakhon): Phu Phan N. P.	4	10.03.2005
<i>Salomonina longiciliata</i> Kurz	31	Thailand (Loei): Phu Raea	3	09.24.2004

Table S-1: Species, collecting sites and number of the investigated individuals of Polygalaceae.

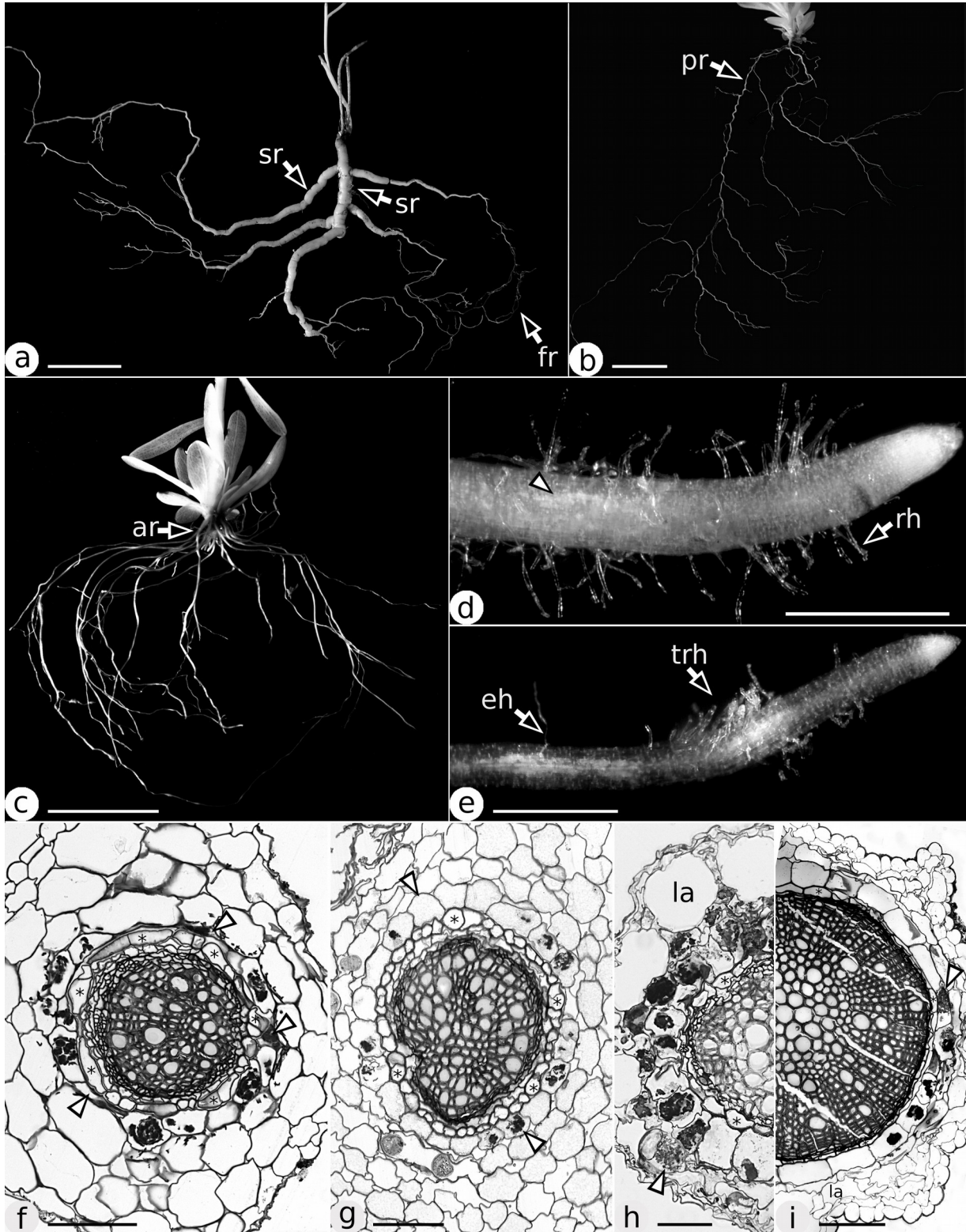
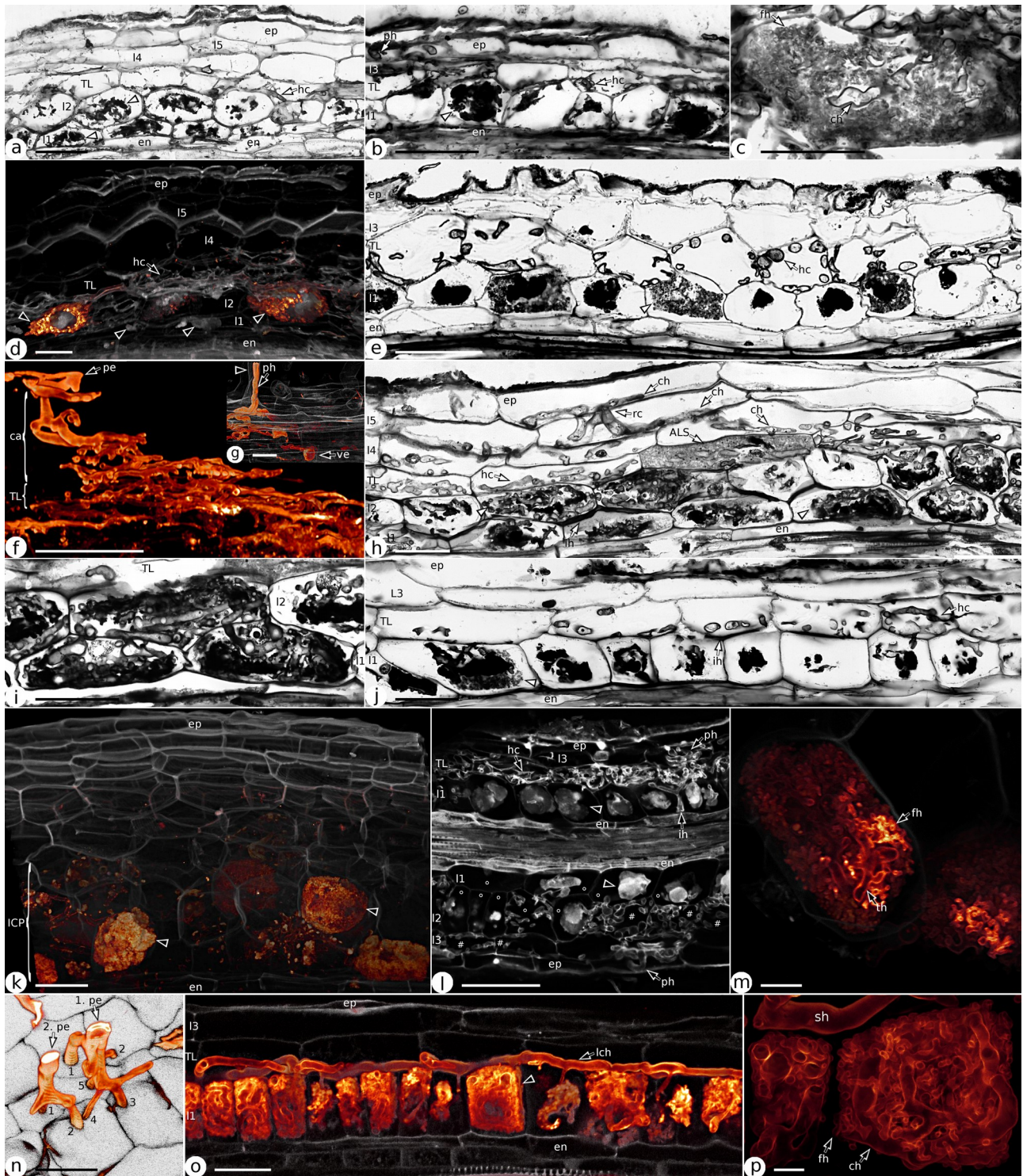


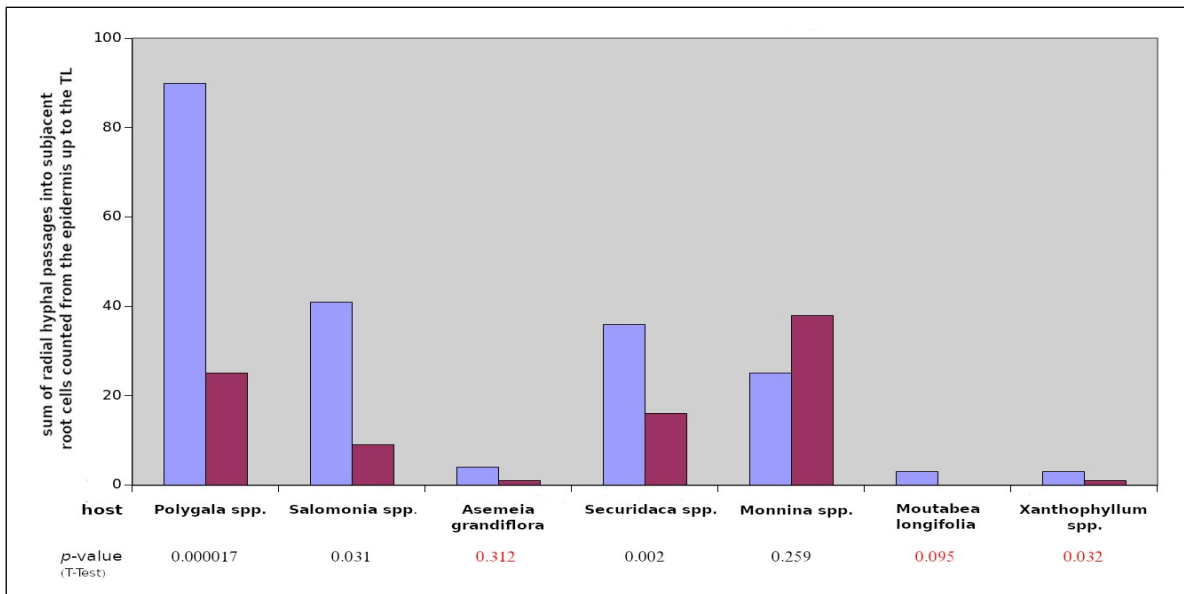
Fig. S-1: **a)** Allorhizic root system of *Asemeia grandiflora* with primary roots and side roots of basal order which are secondary thickened to non-mycorrhizal storage roots (sr). fr = fine roots with intact primary cortex parenchyma hosting mycorrhiza. Scale = 2 cm. **b)** Allorhizic root system of *Polygala nana*. Only side roots up to the third order are expressed. pr = primary root. Scale = 2 cm. **c)** Homorhizic root system of *Polygala ramosa* composed of scarcely

branched adventitious roots (ar) which frequently retain their primary cortex even in the proximal root sections. Scale = 2 cm. **d**) Root of *Monnina xalapensis* with abundant root hair (rh) expression; arrowheads = white inclusions within the hyaline root cortex indicating mycorrhizal colonisations (arrowhead). Scale = 1 mm. **e**) Root of *Polygala ramosa* with a tuft of root hairs (trh). eh = external hyphae that give rise to a whitish appearing nest of mycorrhizal colonisation. Scale = 500 μm . **f**) *Polygala setacea*. arrowheads = cells off the inner cortex parenchyma (ICP) are frequently obliterated. Scale = 100 μm . **g**) *Polygala ramosa*, **h**) *Salomonina ciliata* and **i**) *S. kradungensis* show intact ICP and TL cells, occasionally even with vital arbuscule-like structures (arrowhead) in case of early (**h**) to late (**i**) stages of secondary thickening; la = lacunes; * = endodermis. Scales (g,i) = 100 μm ; Scale (h) = 50 μm .

Fig. S-2 (page 268): **a,b**) Longitudinal root section of *Xanthophyllum* cf. *flavescens*. **a**) ICP = double layered (I1+I2) inner cortex parenchyma filled with amorphous degenerated arbuscule like structures (ALS, see arrowheads); hc = residuals of hyphal coils in the transitional layer (TL); en = endodermis; ep = epidermis. Scale = 50 μm . **b**) single layered ICP (I1) filled with degenerated ALS (arrowheads); ph = penetration hyphae. Scale = 50 μm . **c**) Macroscopic view of a vital ALS in *Xanthophyllum lanceatum* composed of a basal, thick coiled (ch) and hardly visible fine hyphae (fh). Scale = 50 μm . **d,e**) Longitudinal root sections of *Moutabea longifolia*. **d**) Confocal microscopic based 3-D projection. The double layered ICP (I1+I2) is filled with ALS (arrowheads). Degenerated ALS and the host tissue are depicted in grey whereas vital ALS are shown in orange. Hyphal coils in the TL depending on their vitality are grey to orange. Scale = 120 μm . **e**) Single layered ICP (I1) filled with degenerated and vital ALS (arrowhead). Scale = 50 μm . **f-j**) Longitudinal root sections of *Monnina* spp.. **f+g**) Confocal microscopic based 3-D projections (fungus depicted in orange, host tissue in grey). ca = hyphal cascade (ca) within the outer cortex parenchyma (OCP) in *Monnina costaricensis* which projects multiple hyphae into the TL; pe = penetration. Scale = 100 μm . **g**) *Monnina xalapensis*. ph = penetration hyphae running through a root hair (arrowhead); ve = vesicle in the ICP. Scale = 42 μm . **h**) *Monnina xalapensis*. rc = repetitive radial colonisations of a single OCP-cell by hyphae from the same hyphal system during formation of the hyphal cascade. The multilayered ICP (I1+I2) is filled with ALS (arrowheads). Hyphal coils within the TL can laterally bear ALS. ih = intercellular hyphae which are abundant within the ICP. Scale = 50 μm . **i**) ALS within the ICP (I1+I2) of *Monnina xalapensis* with multiple hyphal transitions into the adjoining ICP where new ALS are formed. Scale = 50 μm . **j**) Single layered ICP (I1) in *Monnina* spec. showing degenerated and vital ALS (arrowhead) together in the same cell. hc = hyphal coils in the TL which together with intercellular hyphae (ih) give rise to the ALS in the ICP cells. Scale = 50 μm . **k-m**) Confocal microscopic based 3-D animated longitudinal root sections of *Securidaca* spp.. **k**) Multilayered ICP in *Securidaca inappendiculata*. Finely branched ALS (in orange) within the ICP (in grey) are indicated by arrowheads. Scale = 46 μm . **l**) *Securidaca diversifolia*. Predominant intracellular spread by hyphal coils within the TL (I2) in a single layered ICP (I1; upper half of the picture) and in a mixed, single to double layered ICP (°; lower half of the picture). ALS in layer 1 respectively layer 2, are degenerated to amorphous clumps (arrowheads). ih = less frequently occurring intercellular hyphae do also contribute to ICP colonisation; # = TL. Scale = 80 μm . **m**) ALS of *Securidaca inappendiculata* (the fungus in orange, the host cells in grey) composed of multiple fine hyphae (fh) inserting on thick walled, branched and coiled trunk hyphae (th). Scale = 10 μm . **n-p**) *Polygala paniculata*. Confocal microscopic based 3-D projections of the mycorrhiza (fungus in orange, host tissue in grey scale). **n**) Tangential view on the formation of the distinct hyphal cascade of the herbs. The first penetration shows five hyphal branches and the second penetration two hyphal branches adhering to the pattern of avoiding repetitive radial colonizations of host cells

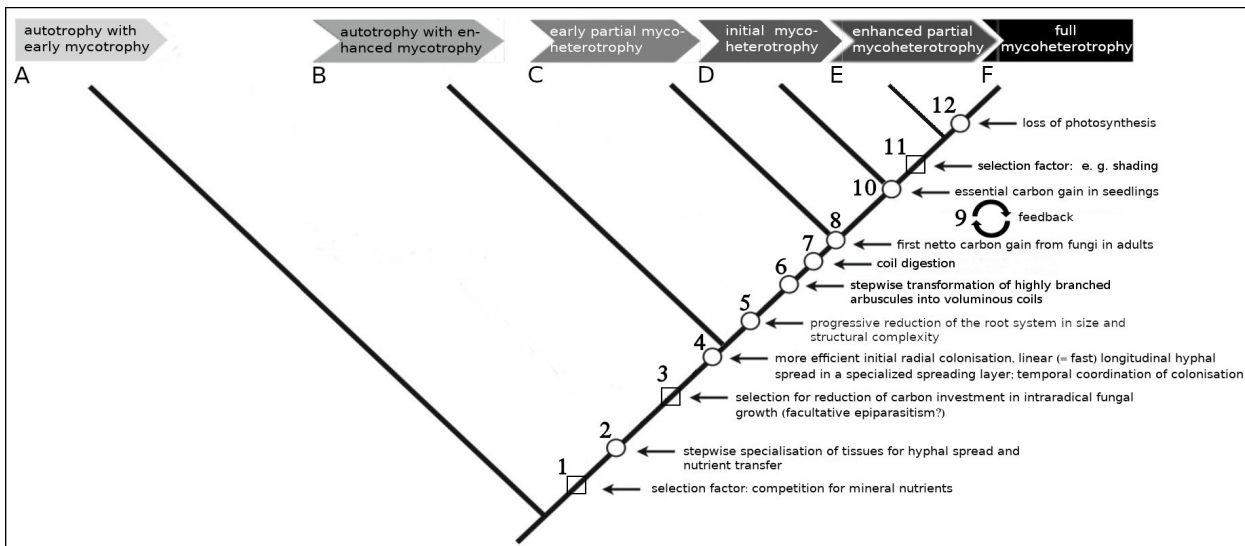
above the *ICP*. Scale = 40 μm . **o**) Longitudinal view on the highly structured mycorrhizal colonization pattern in the herbs. arrowhead = vital *ALS* in the anatomical distinct, single layered *ICP* (I1) originate from linear creeping spreading hyphae (lch) in the *TL*. Scale = 36 μm . **p**) Macroscopic view on the *ALS* showing already reductions of the branched fine hyphae (fh) in favour of more voluminous coiled hyphae (ch). sh = spreading hyphae within the *TL*. Scale = 8 μm .





Graph S-3: Statistical analyses of the adherence (blue bars) and violation (maroon coloured bars) of the strategy to avoid more than one radial penetration of root cells in the epidermis, the *OCP*-layers and in the *TL*. Ordinate = sum of radial hyphal passages into subjacent root cells counted from the epidermis layer up to the transitional layer (i.e. epidermis + *OCP* + *TL*). Blue bars = sum of hyphae radially passing into uncolonized cells vs. maroon coloured bars = sum of hyphae radially passing into cells which were precolonized already by fungal hyphae from the same hyphal system before (i.e. repetitive radial colonisation events). *p*-values in red indicate very low data sizes and should thus be considered with caution. Overall number of analyzed initial colonization events (rhizodermal penetrations): *Polygala* spp. = 33, *Salomonina* spp. = 11, *Asemeia grandiflora* = 2, *Securidaca* spp. = 18, *Monnina* spp. = 22, *Moutabea* = 2, *Xanthophyllum* spp. = 4.

Fig. S-4 (page 270): Model of stepwise evolution of mycoheterotrophy in Polygalaceae starting with A (autotrophy with early mycotrophy; light grey background) to F (full mycoheterotrophy; black background). Squares indicate the proposed selection factors in the evolution of mycoheterotrophy. Circles indicates steps in evolution of mycoheterotrophy on the basis of morpho-anatomical data found in this study and their presumed evolutionary order based on phylogenetic considerations of the investigated plant species. A: autotrophy with early mycotrophy. B: autotrophy with enhanced mycotrophy. C: early partial mycoheterotrophy. D: initial mycoheterotrophy. E: enhanced partial mycoheterotrophy. F: full mycoheterotrophy. 1: selection factor: competition for mineral nutrients. 2: stepwise specialisation of tissues for hyphal spread and nutrient transfer. 3: selection for reduction of carbon investment in intraradical fungal growth (facultative epiparasitism?). 4: more efficient initial radial colonisation, linear (= fast) longitudinal hyphal spread in a specialized spreading layer; temporal coordination of colonization. 5: progressive reduction of the root system in size and complexity. 6: stepwise transformation of highly branched arbuscules into voluminous coils. 7: coil digestion. 8: first netto carbon gain. 9: feedback (loop). 10: essential carbon gain in seedlings. 11: selection factor: e. g. shading. 12: loss of photosynthesis.



Tomographic animations S-A1 – S-A4 (siehe die mp4-videos auf dem dieser Arbeit beiliegenden USB Stick)

Animation **S-A1**: Tomographic animation of the confocal microscopic based data stack of a longitudinal root section of *Monnina costaricensis* showing a dense mycorrhizal colonisation. The typical aspects of *Type I* morphotype of the woody Polygalaceae are depicted. ep = epidermis; ca = hyphal cascade between the epidermis and the transitional layer (TL) spanning the layers of the outer cortex parenchyma (OCP); 1. pe = first penetration of the epidermis originating from an appressorium (ap) formed by external hyphae (eh) at the root surface; hp = hyphal passage from the innermost layer of the outer cortex parenchyma into the TL; ALS = arbuscule like structures formed within the inner cortex parenchyma (ICP) beneath the TL; lh = linear intracellular spreading hyphae in the TL; ve = intracellular vesicle within the TL and the outermost layer of the ICP; 2. pe = second penetration of the root; ich = intercellular hyphae within the ICP; en = endodermis; ch = creeping hyphae at the inner tangential cell walls as part of the initial hyphal cascade; rc = repetitive colonization of a cell in the outer cortex parenchyma although the cell has already been colonized by hyphae from the same hyphal system; if = intracellular formation of an ALS from the TL into a cell of the outermost ICP layer; icv = intercellular vesicle within the ICP; icf = intercellular formation of an ALS into a cell of the outermost layer of the ICP. Scale = 50 µm.

Animation **S-A2**: Tomographic animation of the confocal microscopic based data stack of a longitudinal root section from *Polygala baldunii* with the typical aspects of *Type II* morphotype in the herbaceous Polygalaceae. ep = epidermis; en = endodermis; ALS = arbuscule like structures within the anatomically distinct single layered inner cortex parenchyma (ICP); lch = intracellular linear creeping hyphae at the inner tangential cell walls of the transitional layer (TL); ph = straight ingrowing penetration hyphae; ca = distinct hyphal cascade spanning the the outer cortex parenchyma and the TL; pe = penetration of the root by external hyphae. Scale = 100 µm.

Animation **S-A3**: Detailed tomographic animation of the confocal microscopic based data stack of a longitudinal root section from herbaceous *Polygala ramosa* (*Type II*). Arrowheads = locally branched and coiled hyphae in the

transitional layer (TL) as seen from a tangential point of view. In later stages of mycorrhizal colonisation, hyphae become more branched and form coils, which nevertheless stay preferentially attached to the inner tangential cellwall; ALS = arbuscule like structures in the inner cortex parenchyma as seen from a tangential point of view; eh = external hyphae which give rise to several penetrations (pe) resulting in a densely colonized root section; ep = epidermis; en = endodermis; ph = straight ingrowing penetration hyphae which give rise to a wide roaming, distinct hyphal cascade (ca); lch = linear creeping hyphae which are frequently found in the TL. Scale = 50 μm .

Animation S-A4: Tomographic animation of the confocal microscopic based data stack of a longitudinal root section from herbaceous *Salomonina ciliata* (Type II) in late stage of mycorrhizal colonisation. On the left side the tomographic projection depicts the longitudinal and on the right side the transversal view of the mycorrhizal colonisation pattern. ALS = arbuscule like structures which are not only formed within the innermost layer of the cortex parenchyma (ICP) but delayed also within the TL and in the layer above; ep = epidermis; en = endodermis; 1.hp – 7.hp = seven hyphal passages into subjacent cells of the outer cortex parenchyma and the transitional layer (TL) beneath the epidermis originate from a single penetration (pe) of an external hyphae (eh). By restricting the number of radial hyphal passages to one single transition per host cell, a wide cascadios spread into TL is accomplished; la = regularly arranged lacunes separate the cortex layers above the TL; hc = intracellular hyphal coils in the late stages of colonisation are still preferentially located closely to the inner tangential walls of the TL cells. Scale = 30 μm .

EVOLUTION OF MYCOHETEROTROPHY IN POLYGALACEAE: THE CASE OF *EPIRIXANTHES*¹

CONSTANTIJN B. MENNES^{2,5}, MICHELANGELO S. MOERLAND², MAGNUS RATH⁴, ERIK F. SMETS^{2,3},
AND VINCENT S. F. T. MERCKX²

²Naturalis Biodiversity Center, Leiden University, P.O. Box 9517, Leiden, the Netherlands; ³Section Ecology, Evolution and Biodiversity Conservation, KU Leuven, Kasteelpark Arenberg 31, P.O. Box 2437, BE-3001 Leuven, Belgium; and ⁴Spezielle Botanik und Mykologie, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg 35032 Marburg, Germany

- *Premise of the study:* The mycoheterotrophic lifestyle has enabled some plant lineages to obtain carbon from their mycorrhizal symbionts. The mycoheterotrophic genus *Epirixanthes* (Polygalaceae) consists of six species from tropical Asia. Although it is probably closely related to the chlorophyllous genus *Salomonina* and linked to arbuscular mycorrhizal fungi, lack of DNA sequence data has thus far prevented these hypotheses from being tested. Therefore, the evolutionary history of *Epirixanthes* remains largely unknown.
- *Methods:* We reconstructed the phylogenetic relationships of *Epirixanthes* based on nuclear ITS and plastid *matK* data. Divergence times were inferred using a Bayesian relaxed clock approach, and we phylogenetically analyzed its mycorrhizal symbionts. We furthermore assigned these symbionts to operational taxonomic units, compared them with symbionts of other Polygalaceae, and measured their phylogenetic diversity.
- *Key results:* We found that *Epirixanthes* is placed in tribe Polygaleae as sister to *Salomonina*. *Epirixanthes* has a Miocene-Oligocene stem age and grows exclusively in symbiosis with fungi of Glomeraceae. *Salomonina* and some *Polygala* species are linked to both Glomeraceae and Acaulosporaceae, resulting in higher phylogenetic diversity values. The majority of the symbionts of *Epirixanthes* are not found in *Salomonina* or *Polygala*, although a few shared fungal taxa are found.
- *Conclusions:* *Epirixanthes* forms a relatively young mycoheterotrophic lineage. The Oligocene-Miocene origin suggests its evolution was influenced by the environmental dynamics in Southeast Asia during this time. Although comparison of fungi from *Epirixanthes* with those from *Salomonina* and *Polygala* suggests some specialization, many other mycoheterotrophic plants are linked to a more narrow set of Glomeraceae.

Key words: arbuscular mycorrhizal fungi; *Epirixanthes*; Glomeraceae; mycoheterotrophy; Polygalaceae.

Several plant lineages have developed ways to obtain carbon from their mycorrhizal symbionts, a mode of life known as mycoheterotrophy (Leake, 1994). This symbiotic interaction evolved from the common mutualistic interactions between plants and mycorrhizal fungi. While most autotrophic plants are mycorrhizal generalists and interact with multiple fungi at the same time, many mycoheterotrophs are specialists and associate with a narrow range of fungi only (Bidartondo, 2005). The majority of mycoheterotrophic lineages are monocots, both in

species diversity and number of independent origins (Merckx et al., 2013a). Within the eudicots, the mycoheterotrophic lifestyle only occurs in three families: Gentianaceae, Ericaceae, and Polygalaceae (Merckx and Freudenstein, 2010). Whereas the phylogenetic position of the mycoheterotrophic Gentianaceae, and Ericaceae, and the identity of their fungal symbionts were studied recently (Bidartondo and Bruns, 2002; Merckx et al., 2012, 2013b), such data are lacking for the mycoheterotrophic representatives of Polygalaceae (Fabales). Furthermore, Polygalaceae are the last angiosperm family for which no sequence data are available for its mycoheterotrophic representatives.

The genus *Epirixanthes* Blume is the only fully mycoheterotrophic lineage in Polygalaceae and contains the only mycoheterotrophic representatives of the rosids (Stevens, 2001 onward; Merckx et al., 2013a). *Epirixanthes* consists of six species (*Epirixanthes compressa* Pendry, *E. cylindrica* Blume, *E. elongata* Blume, *E. kinabaluensis* Wendt, *E. pallida* Wendt, and *E. papuana* J.J.Smith), all from tropical Asia (Van der Meijden, 1988; Pendry, 2010). The species' distributions overlap and range from eastern India and China throughout Malesia to the Solomon Islands: *Epirixanthes compressa* was recently described from Thailand (Pendry, 2010); *Epirixanthes elongata* has a wide distribution and is found in eastern India, southern

¹Manuscript received 17 December 2014; revision accepted 25 March 2015.

The authors thank M. Schilthuizen, M. Lakim, R. Repin, and S. Sasirat for help and assistance in obtaining plant material and M. Eurlings and Y. Sirichamom for technical support. They also thank the Alberta Mennega Foundation and the Schure Beijerinck Popping Foundation (now KNAW Fonds Ecologie, Dutch Academy of Sciences) for financial support of the fieldtrip to Malaysian Borneo to collect the *Epirixanthes* material. V.S.F.T.M. is financially supported by NWO (Veni fellowship 863.11.018).

⁵Author of correspondence (e-mail: constantijn.mennes@naturalis.nl); phone number: +31 71 7517262

doi:10.3732/ajb.1400549

Myanmar, northern Vietnam, southern China, Peninsular Malaysia, Sumatra, western Java, Borneo, and Moluccas (Van der Meijden, 1988); *Epirixanthes papuana* grows in northern Sumatra, western Java, Borneo, Philippines, Moluccas, New Guinea, and the Solomon Islands (Van der Meijden, 1988); *Epirixanthes cylindrica* occurs in Myanmar, Sumatra, western Java, Borneo, and New Guinea (Van der Meijden, 1988); *Epirixanthes kinabaluensis* is only found in Borneo and Sumatra (Van der Meijden, 1988); and *Epirixanthes pallida* has a relatively narrow distribution restricted to Borneo and Sulawesi (Van der Meijden, 1988). Borneo is the center of diversity of *Epirixanthes*, with five of the six species present. Some authors (e.g., Chodat, 1896; Hutchinson, 1967) suggested *Epirixanthes* to be congeneric with *Salomonina* Lour., a genus of two (Van der Meijden, 1988) to five (Pendry, 2001) species of autotrophic herbs. Van der Meijden (1988) separated these two genera on the basis of differences in several morphological characters (*Epirixanthes* vs. *Salomonina*: mycoheterotrophic vs. autotrophic; indehiscent vs. dehiscent fruits; disk present vs. absent; straight or short style with anthers not enclosing the stigma vs. strongly curved style with anthers tightly enclosing the stigma). The classification in two separate genera is used by many subsequent authors (Eriksen, 1993a, b; Forest et al., 2007; Imhof, 2007; Bello et al., 2009, 2010, 2012; Pendry, 2010), though it is not used in the review on mycoheterotrophy by Leake (1994). By identifying a few morphological synapomorphies for the tribe Polygaleae (arrested lateral petals) and the genera *Epirixanthes* and *Salomonina* (three antepetalous stamen primordia), the results of Bello et al. (2012) indicated a close relationship between the genera, as well as placement in the tribe Polygaleae. *Salomonina* has been consistently placed in Polygaleae in molecular phylogenetic reconstructions of Polygalaceae (Persson, 2001; Forest et al., 2007; Bello et al., 2009, 2012). The lack of sequence data of *Epirixanthes*, however, has prevented testing its proposed close relationship with *Salomonina*.

Fungal symbionts of *Epirixanthes* have been identified as arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) of the *Paris* type (Imhof, 2007), but no family-level identification based on DNA sequence data has been carried out thus far. Imhof (2007) suggested a degree of adaptation to these fungi and reported similarities in AMF features with unrelated mycoheterotrophic plants and with published drawings of mycorrhizal symbionts of *Polygala amara* (Marcuse, 1902). Within Polygalaceae, the chlorophyllous genus *Polygala* was found to grow in symbiosis with several clades of AMF of the family Glomeraceae, based on DNA sequence data (Rath et al., 2013). Moreover, a single fungal sequence from Acaulosporaceae was extracted from *P. myrtifolia*. This confirms the expected low specificity of the arbuscular mycorrhizal symbiosis in autotrophic species. For mycoheterotrophic groups, however, specialization on narrow lineages of AMF is often observed and thus expected (Merckx et al., 2009, 2010). *Petrosavia sakurarii*, for example, is found to grow in symbiosis with a small subset of the mycorrhizal symbionts found in the sister group of *Petrosavia*, *Japonolirion osense* (Yamato et al., 2014). However, some groups (i.e., *Sciaphila* [Triuridaceae] and *Campylosiphon* [Burmanniaceae]) appear to be less specialized as they were found to grow in symbiosis with a relatively wide range of AMF (Merckx et al., 2012). These different patterns of specialization raise the question of whether *Epirixanthes* is specialized on narrow lineages of AMF as compared with its autotrophic relatives and other mycoheterotrophic lineages.

The major goal of this study is to evaluate the phylogenetic position of *Epirixanthes* in Polygalaceae and to infer the divergence age of the group. Subsequently, fungal symbionts are identified and analyzed in a phylogenetic framework of AMF. We use this framework to compare the fungal specificity between *Epirixanthes* and its close relatives in *Salomonina* and *Polygala* by measuring the phylogenetic diversity (PD; Faith, 1992) of the associated AMF. The results were compared with published insights on AMF of Polygalaceae (Imhof, 2007; Rath et al., 2013) as well as to recent studies of mycoheterotrophic specificity (Hynson and Bruns, 2009; Merckx et al., 2009, 2010, 2012; Roy et al., 2009).

MATERIALS AND METHODS

Taxon information—Plant material and root tips containing endophytic fungal material of *Epirixanthes* were collected at three localities in Kinabalu National Park and Crocker Range National Park in Sabah, Malaysian Borneo. Collections were made during the collaborative 2012 Kinabalu-Crocker Range scientific expedition organized by Sabah Parks (Malaysia) and Naturalis Biodiversity Center (the Netherlands). Plant identifications followed the key of Van der Meijden (1988). Flowering specimens of the species *Epirixanthes pallida*, *E. papuana*, *E. kinabaluensis*, and *E. elongata* were collected. Additional Polygalaceae sequence data were obtained from the collections of Naturalis (L), Royal Botanic Gardens, Kew (K), and GenBank. Appendix S1 includes a full list of included specimens; see Supplemental Data with the online version of this article. Two species of *Salomonina* were collected at two localities in Thailand, identified using the key by Pendry (2001), cleaned with water and dried with silica gel for subsequent molecular analyses of the fungal symbionts. Two individuals of *Salomonina longiciliata* (i1 and i2) were collected in 2011 in a dipterocarp forest in Saloung subdistrict, Mae Rim district in Chiang Mai province. Two individuals of *Salomonina cantoniensis* (i1 and i2) were collected in a dipterocarp forest near Ban Moug Soi village, Pai district in Mae Hong Son province. All plants of *Salomonina* were flowering and additionally bore mature fruits. Additional fungal sequence data represented virtual taxa (i.e., fungal phylogroups based on 97% sequence similarity and bootstrap support) from the MaarjAM database (Öpik et al., 2010), as well as mycorrhizal symbionts of *Polygala* from Rath et al. (2013).

Amplification of plant loci—DNA was extracted using the Qiagen DNEasy Plant Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands), according to the manufacturer's protocol. The nuclear internal transcribed spacer (ITS) region was amplified, as well as the plastid maturase K gene (*matK*). For ITS, primers ITS1 (White et al., 1990) and ITS4 (Wojciechowski et al., 1993) were used. The reaction mixture contained 1 μ L of undiluted DNA, 1 μ L of every primer (0.2 μ M), 2.5 μ L dNTP, 2.5 μ L 10 \times NH₄ reaction buffer (Bioline, Luckenwalde, Germany), 1 μ L MgCl₂ (2 μ M) and 0.2 μ L BioTaq DNA Polymerase (Qiagen) and 15.8 μ L milliQ water, to a total of 25 μ L. The PCR procedure consisted of 4–5 min of initial denaturation at 95°C followed by 30 cycles of 30 s at 95°C for denaturation, 30 s at 44°C for annealing and 30 s at 72°C for primer extension, followed by a final extension of 7 min at 72°C. The PCR for samples from the Kew DNA Bank (see Appendix S1a) consisted of 4 min of initial denaturation at 94°C; followed by 40 cycles of 45 s at 94°C for denaturation, 60 s at 48°C for annealing, and 90 s at 72°C for primer extension; and a final extension of 7 min at 72°C. For *matK*, primers *trnK685F* (Hu et al., 2000) and *matK1777R* (Hu et al., 2000) were used at a concentration of 1 μ M. The remaining reaction mixture was identical to the one used for ITS. The PCR procedure was based on Hu et al. (2000) and Sirichamorn et al. (2012) and consisted of 4 min of initial denaturation at 94°C; followed by 40 cycles of 45 s at 94°C for denaturation, 90 s at 48°C for annealing, and 90 s at 72°C for primer extension; and a final extension of 7 min at 72°C.

Amplification and cloning of AMF loci—Fungal DNA was extracted from *Epirixanthes* root tips stored in 2% cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) buffer. Extraction followed the DNA Plant Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. A 500-bp fragment of the nuclear 18S rDNA region was amplified using the primer combination NS31 (Simon, 1996) and AM1 (Helgason et al., 1998). The reaction mixture was identical to the one used for PCR of plant DNA as described above, using primer concentrations of 5 μ M.

The PCR procedure consisted of 5 min of initial denaturation at 94°C; 30 cycles of 30 s at 94°C for denaturation, 30 s at 57°C for annealing, and 1 min at 72°C for primer extension; and a final extension of 7 min at 72°C.

Eight PCR sequencing products of poor quality (<50% high-quality bases) were selected for cloning. Four of those were amplified using primer combination NS31 and AM1, and four were amplified using primer combination NS1 (White et al., 1990) and EF3 (Smit et al., 1999). The first four were amplified as described above; the last four were amplified using internal sequencing primers NS2, NS3, NS4, NS5 (White et al., 1990). The PCR procedure of this primer combination consisted of 2 min of initial denaturation at 94°C; 35 cycles of 40 s at 94°C for denaturation, 30 s at 54°C for annealing, and 105 s at 72°C for primer extension; and a final extension of 7 min at 72°C. The resulting PCR products were cloned using the TOPO TA Cloning Kit for sequencing, with One Shot Mach 1 T1^R Chemically Competent *E. coli*, according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, Life Technologies, San Diego, California, USA). Eight white colonies were selected from each plate corresponding to the cloned PCR product. These colonies (~0.3 µL) were used as the DNA template in a PCR reaction mixture, consisting of 0.5 µL of every vector-associated primer (M13F and M13R), 1 µL dNTP (Qiagen, 2.5 mM), 3 µL CoralLoad reaction buffer (Qiagen), 2 µL MgCl₂ (25 mM), and 0.2 µL BioTaq DNA polymerase (Qiagen, 5 U/µL), and 23.1 µL milliQ water, to a total of roughly 30 µL. The PCR procedure consisted of 3 min of initial denaturation at 95°C; 35 cycles of 20 s at 95°C for denaturation, 20 s at 50°C for annealing, and 2 min at 72°C for primer extension; and a final extension of 10 min at 72°C.

Fungal DNA from the species of *Salomonina* was extracted and amplified as follows. From each plant of the two species a single root fragment (1–3 cm) was used for molecular identification of the mycorrhizal symbionts. The PCR procedure for the 18S rDNA region of the fungal symbionts basically followed the DNA extraction protocol described in Rath et al. (2013), although here we used dried root material instead of CTAB fixed material. Amplification of fungal DNA was done using a nested PCR approach. The first primer combination of GeoA1 and ART4 (Schwarzott and Schüßler, 2001) was used for initial amplification of 18S rDNA to obtain an initial PCR product, which increases the quality and quantity of the subsequent PCR reactions. These subsequent reactions were conducted by nested PCR using the AMF-specific primer combination AM1 and NS31 (Simon, 1996; Helgason et al., 1998). The first PCR mixture consisted of 15.5 µL sterile double-distilled water, 2.5 µL 10× PCR buffer, 1 µL of each primer (10 µM), 2.5 µL of dNTP (5 mM), 0.5 µL Pfu polymerase (Promega, Madison, Wisconsin, USA), and 2.0 µL DNA extract as a template. The PCR procedure, adapted from Schwarzott and Schüßler (2001), consisted of 2 min for initial denaturation at 95°C followed by 30 cycles of 30 s at 95°C for denaturation, 30 s at 60°C for annealing and 4 min at 73°C for primer extension, followed by a final extension of 10 min at 73°C. The second PCR mixture consisted of 35.5 µL sterile double-distilled water, 5 µL 10× PCR buffer, 2 µL of each primer (10 µmol/L), 2.5 µL of dNTP (5 mM), 0.5 µL Pfu polymerase, and 2.5 µL of the amplification of the first PCR as a template. The PCR procedure consisted of 2 min for initial denaturation at 95°C; 35 cycles of 30 s at 95°C for denaturation, 30 s at 60°C for annealing, and 1.5 min at 73°C for primer extension; and a final extension of 5 min at 73°C. In case of only weak amplification, up to four additional nested PCR reactions were done using the primer combination AM 1 and NS31, and the resulting products were pooled. Resulting sequences were compared with sequences from GenBank using the BLAST algorithm and selected for direct further analysis if high similarity to AMF could be observed. In only two cases (*S. longiciliata* i2 and *S. cantoniensis* i1), initial sequencing of the PCR product with primer AM1 resulted in high sequence quality, which allowed immediate use for the alignment. The remaining PCR products of *S. longiciliata* i1 and i2 and *S. cantoniensis* i2 were used for cloning and subsequent sequencing (see Rath et al. [2013] for detailed information on DNA processing).

Phylogenetic reconstruction of plant data—Sequences were assembled, aligned, and manually edited using the program Geneious Pro version 6.1.7 (Drummond et al., 2013). Sequences were aligned using the program MUSCLE (Edgar, 2004) method as incorporated in the program Geneious Pro (default settings). Appendix S2a (see online Supplemental Data) contains the alignment of the combined plant data set. The combined plant data set was analyzed using a model-based maximum likelihood (ML) as optimality criterion, as well as model-based Bayesian posterior probabilities (PP). Both plant data sets were also analyzed separately using these methods. The fungal data set was analyzed using only the ML approach, supplemented by additional diversity measurements (see further). The best substitution model for each data set under the Akaike information criterion (AIC) was found using the program jModeltest version 2.1.4 (Guindon and Gascuel, 2003; Darriba et al., 2012). For the ITS

data set, the GTR+I+G substitution model was selected. For the *matK* data set, TVM+G was suggested as best fit, but GTR+G was selected as the best model incorporated in the phylogenetic analysis packages. The complete data set was partitioned into two subsets, each corresponding to the two genetic regions and analyzed with the selected substitution model. The ML analyses were conducted using the program Garli version 2.0 (Zwickl, 2006), supplemented by the bootstrap support method (BS; Felsenstein, 1985) to evaluate branch support (500 replications). Majority rule consensus trees were constructed using the Tree Builder plugin in Geneious Pro (Drummond et al., 2013). The Bayesian inference (BI) analyses were carried out using MrBayes version 3.2.2 (Ronquist et al., 2012). The Markov chain Monte Carlo (MCMC; Geyer, 1991) analyses were performed with two runs of four chains and terminated after 4000000 generations if the standard deviation of split frequencies was 0.01 or lower. A burn-in of 25% was discarded. Results were evaluated using the program Tracer version 1.6 (Rambaut et al., 2013), by checking the distribution and stability of the likelihood values (normally distributed values were considered sufficient). The effective sample size (ESS) was also evaluated; a minimum value of 200 was considered sufficient. Clades were considered well supported when receiving over 85% BS or 95% PP. The resulting trees from the BI analyses were visualized using FigTree version 1.4 (Rambaut, 2012) and presented with both PP values and BS values resulting from the ML analyses plotted on the nodes. Only support values at the genus level were given, although additional values were given for the species of *Epirixanthes* and for some clades of *Polygala*.

Divergence time estimation—Divergence times of the taxa in Polygalaceae were estimated by using an uncorrelated log normal relaxed clock method using BEAST v2.1.3 (Bouckaert et al., 2014). The ITS and *matK* data sets used in the phylogenetic analyses were used for this purpose. Only a single specimen per species was used, resulting in a data set containing 31 Polygalaceae taxa. *Xanthophyllum* was set as outgroup (Forest et al., 2007). The data set was partitioned in two subsets, corresponding to the two loci. The ITS data set was analyzed using the GTR+I+G substitution model and the *matK* data set was analyzed using the GTR+G substitution model, as selected with jModeltest version 2.1.4 (Guindon and Gascuel, 2003; Darriba et al., 2012) (see section “Phylogenetic reconstruction of plant data”). The Yule birth rate prior (Gernhard, 2008) was set with a flat prior on the birth rate. A single tree model and a single clock model were used. For the clock model, an exponential prior was set for both the mean (uclid.mean; mean = 10.0) and the standard deviation (uclid.stdev; mean = 0.33). The mean substitution rates of both data sets were fixed. Only limited calibration information was available for Polygalaceae. A secondary calibration point prior was set on the root of the tree (i.e., the crown node of Polygalaceae). This prior was modeled as normal distribution with a mean of 60.4 Ma and a standard deviation of 10.0 Ma and was based on the estimated crown age of Polygalaceae resulting from Forest et al. (2007). All other prior settings were kept to the default settings. Approximation of posterior distributions was done using the Markov chain Monte Carlo (MCMC; Geyer, 1991) procedure and was run with a chain length of 50000000 generations. A single run was conducted, and one tree in every 5000 generations was sampled, discarding a burn-in of 10%. The maximum clade credibility tree was constructed using the program TreeAnnotator v1.7.5 (Drummond et al., 2012). Results were visualized using the program Tracer v1.6 (Rambaut et al., 2013) by evaluating ESS values for parameters (see section *Phylogenetic reconstruction of plant data*) as well as the stability and distribution of the obtained likelihood scores (the prior distribution of the scores was considered sufficient). Finally, the resulting tree was visualized using FigTree v1.4 (Rambaut, 2012).

Phylogenetic reconstruction and diversity measurements of AMF—The diversity of arbuscular mycorrhizal symbionts of *Epirixanthes* was assessed by (1) assigning the 500-bp fragment of 18S rDNA of all AMF sequences to operational taxonomic units (OTUs) based on 97% sequence similarity, which is the same percentage as used in defining the virtual taxa in the MaarjAM database, although these were also based on bootstrap support values (Öpik et al., 2010), (2) reconstructing the phylogeny of these AMF in a Glomeromycota framework using the MaarjAM database and (3) by measuring Faith's phylogenetic diversity (PD) values (Faith, 1992) for the AMF of *Epirixanthes* and comparing them with PD values of AMF of *Salomonina* and *Polygala*. First, an alignment was made using the MUSCLE (Edgar, 2004) method, containing fungal sequences from *Epirixanthes*, *Salomonina*, and *Polygala*, as well as virtual taxa from the MaarjAM database (Öpik et al., 2010) representing Glomeraceae, Acaulosporaceae, Gigasporaceae, Diversisporaceae, Claroideoglomerales, and Paraglomeraceae. This alignment was manually trimmed. Appendix S2b

contains the alignment of the fungal data set. A subset containing the AMF from *Epirixanthes*, *Salomonina*, and *Polygala* was extracted. The OTUs were assigned using the UPARSE-OTU algorithm (Edgar, 2013) as implemented in Usearch version 7.0 (Edgar, 2010), discarding full-length identical sequences. Chimeric sequences were detected automatically by the UPARSE-OUT algorithm (Edgar, 2013), as sequences that could not be assigned a single OTU. Phylogenetic analysis of the 18S rDNA sequence data from the AMF was similar to the ML analysis of the plant material as described above. The substitution model GTR+I+G was selected as best fit. A highest likelihood ML tree was reconstructed, and 800 bootstrap replicates were performed using the Message Passing Interface (MPI) version of Garli. Support values (60% BS and higher) were given for clades containing either fungal symbionts of *Epirixanthes*, *Salomonina*, or *Polygala*. To calculate PD values of the fungal communities in the roots, the resulting ML tree was combined with a “community data matrix”, which linked each amplified fungal sequence to its host species. The Picante package (Kembel et al., 2010) as incorporated in R (R Core Team, 2014) was used to calculate PD values of each species. The standardized effect sizes (SES) of the PD values were furthermore calculated to correct for the sampling size, by testing the extent to which communities of fungi are more (or less) related to each other than expected based on randomization. This randomization was performed using the “richness” null model as incorporated in the Picante package (Kembel et al., 2010), which randomized abundances of fungi per plant species, while maintaining “species richness” and phylogenetic relations of these fungi.

RESULTS

Phylogeny of *Epirixanthes*—The phylogeny based on the combined nuclear ITS (805 bp) and chloroplast *matK* (1160 bp) data set indicates *Epirixanthes* is monophyletic (100% BS and 100% PP) and sister to the monophyletic genus *Salomonina* (100% BS and 100% PP) at the current taxon sampling. Both genera form a clade (100% BS and 100% PP) that is sister to two species of *Polygala* (*P. chamaebuxus* and *P. pauciflora*). Our results furthermore indicate that within *Epirixanthes*, *E. pallida*, and *E. elongata* form monophyletic groups (both 100% BS and 100% PP). *Epirixanthes papuana* and *E. kinabaluensis* are each represented by a single specimen and form a clade (77% BS and 98% PP). *Epirixanthes pallida*, *E. papuana*, and *E. kinabaluensis* form a clade (100% BS and 100% PP) that is sister to *E. elongata*. The separate analyses of each marker indicate slight topological differences within *Epirixanthes* and more pronounced differences in the rest of the tree, but these conflicting clades never receive strong support (see online Appendix S3). The position of *E. papuana* and *E. kinabaluensis* among the other species is better resolved in the results from the ITS data set (i.e., the early diversification events in *Epirixanthes*), whereas the monophyly of the clade consisting of the two species is only recovered in the *matK* data set. These complementary signals have resulted in well-supported relationships among *Epirixanthes* species based on the combined data set (Fig. 1). Only the clade formed by *E. papuana* and *E. kinabaluensis* receives moderate bootstrap support, probably resulting from the ITS data.

The clade containing *Epirixanthes*, *Salomonina*, and *Polygala* (96% BS and 100% PP) forms a polytomy with two clades of *Polygala* (96% BS and 100% PP, and 100% BS and 100% PP, respectively) and a clade consisting of *Nylandtia* and *Muraltia* (100% BS and 100% PP). Thus, *Polygala* is paraphyletic. Moreover, the genus *Securidaca* is monophyletic (100% BS and 100% PP), and the tribe furthermore consists of the genera *Comesperma* and *Monnina* (both represented by a single specimen). The tribes Polygaleae (27 spp. included in this study, 70% BS and 95% PP) and Carpolobieae (2 spp. included in this study, 97% BS and 100% PP) are recovered as monophyletic groups in the current study, whereas Xanthophylleae and

Moutabaeae are each represented by a single specimen. Carpolobieae and Moutabaeae are sister to each other at the current limited taxon sampling but weakly supported (55% BS and 80% PP), and both are sister to Polygaleae at very weak support (53% BS and 75% PP). The clade consisting of Carpolobieae, Moutabaeae, and Polygaleae is well supported and sister to Xanthophylleae (100% BS and 100% PP), providing strong support for the crown group of Polygalaceae, excluding the outgroups from Fabaceae.

Estimation of divergence times—The divergence time estimation of the Polygalaceae data set has resulted in a stem age for *Epirixanthes* of 20 Ma with a 95% confidence interval between 9 and 30 Ma and a crown age of 14 Ma with a 95% confidence interval between 6 and 22 Ma (Fig. 2).

Phylogenetic reconstruction and diversity measurements of AMF—Figure 3 shows the highest likelihood tree resulting from the analysis of partial 18S rDNA extracted from the roots of *Epirixanthes* and amplified using both direct Sanger sequencing and cloning ($-\ln L = 15\,325.3815$). For a total of eight plant collections representing all *Epirixanthes* species, several fungal 18S rDNA sequences were obtained by direct sequencing from root tip extractions: 11 for *E. pallida* (obtained from four specimens); two for *E. papuana* (obtained from a single specimen); one for *E. kinabaluensis*; and four for *E. elongata* (obtained from two specimens). For a subset of these accessions, additional 18S rDNA sequences were obtained by cloning; four for *Epirixanthes pallida*, five for *E. papuana*, one for *E. kinabaluensis*, and five for *E. elongata*. For the latter species, two different DNA extractions from the same specimen were used for cloning, resulting in two and three sequences, respectively. For each of the other species, all cloning products result from a single DNA extraction. Two of the obtained fungal sequences of *E. elongata* resulted from the cloning products amplified using the primer combination NS1-EF3 (*E. elongata* symbionts 1 and 3, see Appendix S1b); the rest of the sequences were obtained from the four cloning products using primer combination NS31/AM1. The remaining three of the eight cloning products yielded either poor quality or Ascomycota and/or Basidiomycota data. These sequences all resulted from primer combination NS1 and EF3 (results not shown). The described 18S rDNA data set excluded five full-length duplicates, one of which was extracted from a different species. Six clones of *Salomonina longiciliata* (i1) were obtained, two of which showed 100% sequence similarity. Only a single additional clone was obtained from *Salomonina longiciliata* (i2). DNA extraction of *Salomonina cantoniensis* (i2) yielded five clones, two of which showed 100% sequence similarity.

The arbuscular mycorrhizal symbionts of *Epirixanthes* cluster in 14 OTUs (Fig. 3, OTUs 1–14), of which a single OTU also contains AMF of *Salomonina* and two OTUs also contain AMF of *Polygala*. (See Appendix S4 for full details on OTU assignment). One of the latter OTUs (OTU 13) contains a single AMF of *Epirixanthes* with a sequence length of only 250 bp, and another OTU of *Epirixanthes* (OTU 14) consists of a single fungal sequence with a length of 372 bp. All other mycorrhizal symbionts obtained from Polygalaceae have sequence lengths between 417 bp and 506 bp. Fourteen of these OTUs have >97% sequence similarity with Virtual Taxa from the MaarjAM database (Öpik et al., 2010), as resulting from BLAST searches of the target sequences of each OTU (Table 1). The remaining

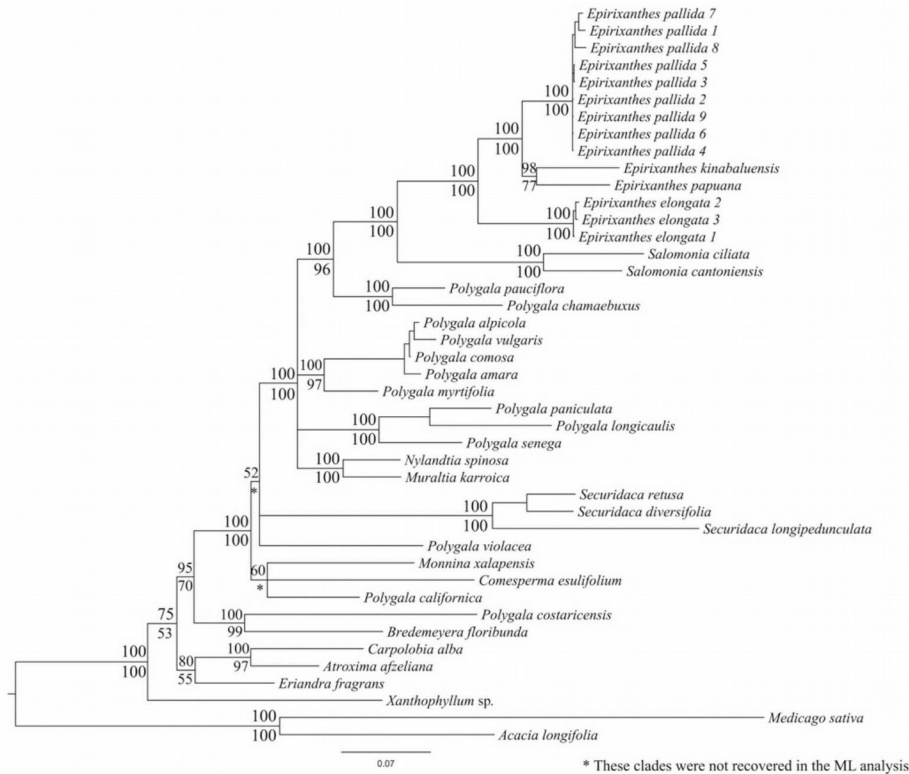


Fig. 1. Phylogeny of Polygalaceae based on a Bayesian inference (BI) analysis of the combined ITS and *matK* data sets. Values above branches are posterior probabilities resulting from the BI analysis; those below branches are bootstrap support percentages resulting from the maximum likelihood (ML) analysis. The scale bar indicates the number of substitutions per site.

eight OTUs have lower sequence similarities and form potential new Virtual Taxa. Although most OTUs consist of AMF obtained from a single species, some contain AMF from several species. Moreover, many OTUs contain fungal sequences from *Epirixanthes* resulting from both direct sequencing and cloning. Furthermore, the remaining AMF of *Salomonina* and *Polygala* cluster in four OTUs, all of them exclusively containing AMF either obtained from *Salomonina* or *Polygala*. Two chimeric AMF sequences (C 1 and C 2) were obtained from *Polygala*, which could not be assigned to a single OTU.

The phylogenetic reconstruction of these fungi in a Glomeromycota framework based on the MaarjAM database (Öpik et al., 2010) indicates that all AMF obtained from *Epirixanthes* belong to Glomeraceae (the former *Glomus* Group A) (Fig. 3). The majority of the analyzed mycorrhizal symbionts of *Polygala* also belong to Glomeraceae, though a single fungal sequence was found to belong to Acaulosporaceae. For *Salomonina longiciliata*, however, the majority of the AMF are recovered in Acaulosporaceae, with only a single exception from Glomeraceae. However, most AMF of *S. cantoniensis* emerge in Glomeraceae, and a single fungal sequence from this species belongs to Acaulosporaceae. Support values are given for clades containing mycorrhizal symbionts from either of the studied genera and receiving over 60% BS. These are generally very low; only a single clade of AMF of *Epirixanthes* (consisting of AMF of *E. elongata*) is well supported, as well as the Claroideoglomerales, Gigasporaceae, and some clades consisting of AMF of

Polygala, mostly together with virtual taxa. However, although all non-Glomeraceae families/orders are recovered as clades, their position is nested within Glomeraceae (except the outgroup of Paraglomeraceae). Furthermore, the recovered OTUs roughly coincide with the clades in this phylogeny. Fungi obtained from *Polygala* show a pattern highly similar to the findings of Rath et al. (2013), with a single fungal sequence belonging to Acaulosporaceae (a symbiont of *P. myrtifolia*).

Phylogenetic diversity measurements of AMF—Phylogenetic diversity values and their standardized effect size values (SES_{PD}) are summarized in Table 2. Fungi of *Epirixanthes* have a PD of 0.48 (*E. elongata*), 0.09 (*E. kinabaluensis*), 0.63 (*E. pallida*), and 0.13 (*E. papuana*). However, all except *E. kinabaluensis* have significantly negative SES_{PD} values; -2.38 ($P = 0.013$) for *E. elongata*, -3.25 ($P = 0.002$) for *E. pallida*, and -4.08 ($P = 0.001$) for *E. papuana*. These results suggest the AMF recovered within each of these species are more closely related to each other than expected under the applied null-model based randomization. Fungi of both *Salomonina cantoniensis* and *S. longiciliata* have a PD of 0.52. In the former species, predominantly AMF of Glomeraceae are found, with only a single exception from Acaulosporaceae. The opposite pattern is found in the latter species, which grows predominantly in symbiosis with Acaulosporaceae, with a single exception from Glomeraceae. Exclusion of these exceptional fungal sequences results in a strong drop in PD values in both species,

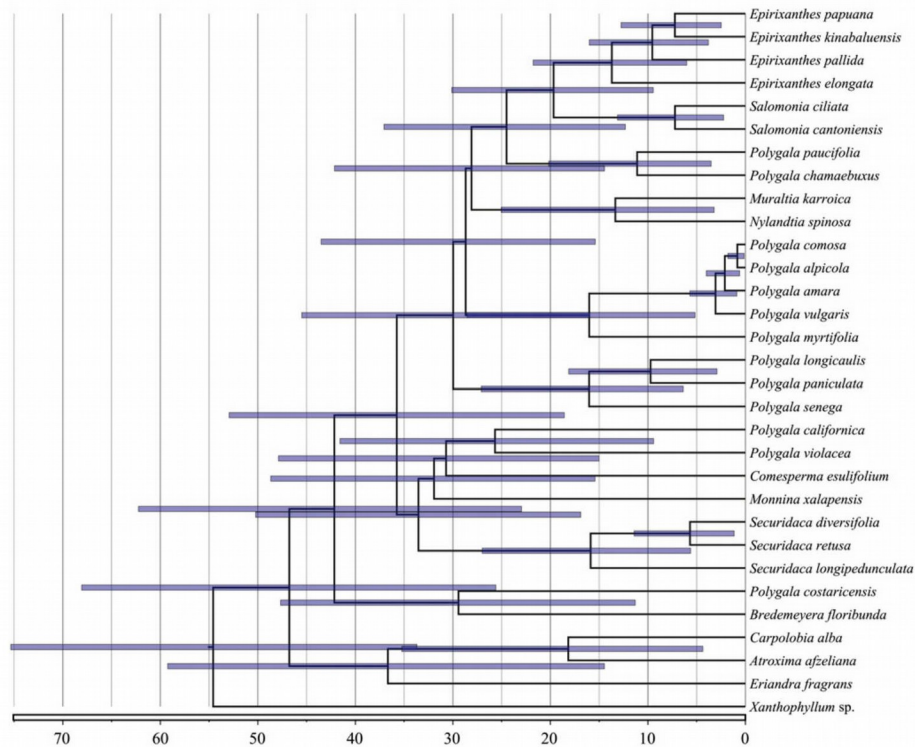


Fig. 2. Maximum clade credibility tree resulting from the divergence time estimation of Polygalaceae inferred using the uncorrelated lognormal relaxed clock method, based on the combined ITS and *matK* data sets. A single secondary calibration point was used to constrain the root of the tree, assuming a Yule process of speciation (see text). The scale bar and values in the figure, represent time (million years ago; Ma), bars around nodes represent 95% confidence intervals.

0.24 in *S. cantoniensis* and 0.06 in *S. longiciliata*. The latter value has a significantly negative SES_{PD} of -3.86 ($P = 0.001$), also indicating these fungi are more closely related to each other than expected under the performed randomization. The AMF of the nine species of *Polygala* have PD values varying between 0.02 for AMF of *P. amarella* and 0.54 for AMF of *P. myrtifolia*. This high PD value for AMF of *P. myrtifolia* results from a single Acaulosporaceae sequence (the only one found in *Polygala*), and removal of it results in a drop of the PD value to 0.30. Only in *P. vulgaris* a significantly negative SES_{PD} value is recovered (-2.71 , $P = 0.001$), also indicating a closer relationship than expected under randomization. For three species (*P. alpestris*, *P. comosa*, and *P. rupestris*) only a single fungal sequence was included, which implies no PD values could be calculated. Although no significantly positive SES_{PD} values are recovered, the number of fungal sequences per species was mostly lower in *Polygala* as compared with *Epirixanthes* and *Salomonina*. Therefore, the PD values in *Polygala* may be (slightly) underestimated, suggesting that most phylogenetic diversity (i.e., all values above 0.50 without significant SES_{PD} values) is found in *Salomonina* due to the recovery of both Glomeraceae and Acaulosporaceae from both its species. The same is found in *P. myrtifolia*, but not in other species of *Polygala*.

DISCUSSION

Phylogeny of *Epirixanthes*—*Epirixanthes* forms a strongly supported monophyletic genus at current taxon sampling. The

placement of the genus in tribe Polygaleae is in accordance with earlier observations and suggestions (e.g., Van der Meijden, 1988; Bello et al., 2012). The sister-group relation with *Salomonina* (of which both accepted species by Van der Meijden (1988) are included in this study) supports the proposed close affinity of the genera (Chodat, 1896; Hutchinson, 1967; Van der Meijden, 1988). Although they form a monophyletic group, recognition of two separate genera is warranted, because each genus is monophyletic. Moreover, clear differences in habit (as a result of the different modes of life of the genera; mycoheterotrophic vs. autotrophic) and floral morphology are reported (Van der Meijden, 1988).

The intrageneric relationships of *Epirixanthes* are in accordance with the species delimitations, suggesting that the used DNA markers are effective DNA barcodes for species identification in this genus. The phylogenetic relationships between the species show remarkable geographic structure: all specimens of *E. pallida*, *E. kinabaluensis*, and *E. papuana* were found in Kinabalu National Park and form a clade (see Fig. 4). The former species is sister to the rest and was exclusively found in one locality at the northern slope of Mount Kinabalu, whereas *E. kinabaluensis* and *E. papuana*, each represented by a single specimen, form a moderately supported clade corresponding to a locality on the eastern slope. *Epirixanthes elongata* forms a monophyletic group as sister to the rest of the genus and was the only species found in Crocker Range National Park. A single specimen from Sumatra, represented solely by an ITS sequence, is confidently placed in the clade forming *E. elongata*. This evidence suggests that the found

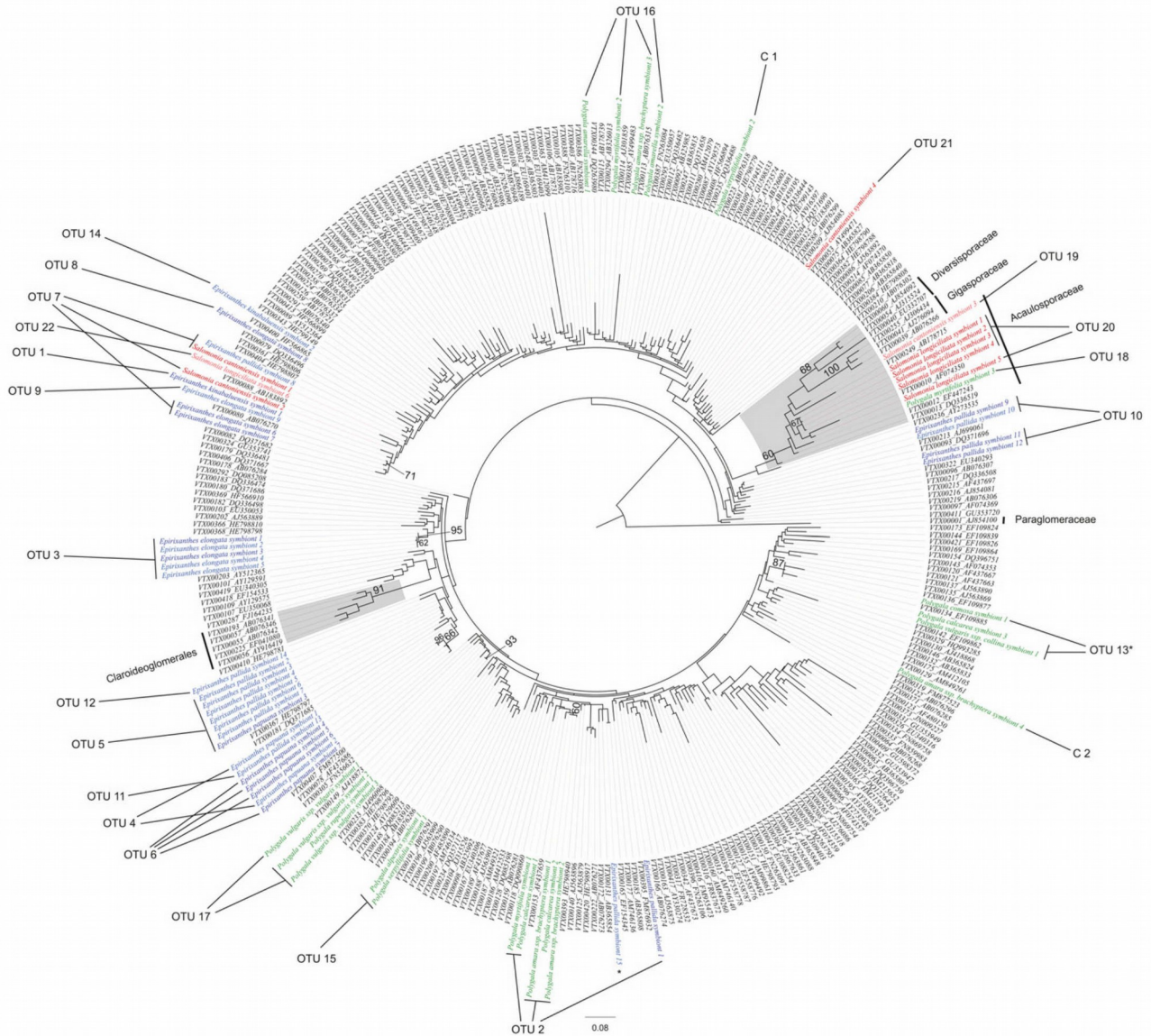


Fig. 3. Phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi based on a maximum likelihood (ML) analysis of a data set consisting of a 500-bp fragment 18S rDNA. Most data are from Glomeraceae, the gray-shaded areas indicate different families. New fungal sequence data for symbionts of *Epirixanthes* (blue) and *Salomonina* (red) are included. Dark colors indicate fungal sequences obtained using cloning; light colors indicate fungal sequences obtained from direct Sanger sequencing. The remaining sequences were obtained from Rath et al. (2013) (*Polygala*) and the MaarjAM database (Öpik et al., 2010). Virtual taxon numbers and GenBank accession numbers are given for the latter. GenBank accession numbers for the remaining fungal sequences can be found in Appendix S1b. Only bootstrap support values of 60% or higher were given for clades containing symbionts of *Epirixanthes*, *Salomonina*, or *Polygala*. Corresponding operational taxonomic units (OTUs) are indicated for each fungal sequence, C 1 and C 2 form chimeric sequences that could not be assigned to a single OTU unambiguously. The scale bar indicates the number of substitutions per site.

geographical structure is a sampling artifact, possibly due to different microclimates at each site resulting in different species occurrence (or abundance) at the time of collecting. It is unlikely that the found species diversity resulted from local speciation in Kinabalu National Park or Crocker Range National Park, as the studied species all have wider distributions in Southeast Asia. Inclusion of more specimens of the same species from elsewhere in Southeast Asia will probably result in monophyletic species rather than geographically structured

clades. The observation of four *Epirixanthes* species from only two adjacent National Parks in Sabah, Borneo, supports that Borneo is a hotspot of *Epirixanthes* diversity. However, including more specimens from different areas throughout the distribution range of *Epirixanthes* would be informative.

The close relationship between *Epirixanthes* and *Salomonina* is supported by a synapomorphy (i.e., three antesealous stamens primordia) as well as some additional morphological similarities, such as a spike-like terminal inflorescence (Van der

TABLE 1. Operational taxonomic unit (OTU), target sequences and VTX affinities.

OTU	Target sequence	Closest hit	Max. % identity (>97%)
1	<i>Epirixanthes kinabaluensis</i> symbiont 1	VTX00080	98
2	<i>Epirixanthes pallida</i> symbiont 1	VTX00163	98
3	<i>Epirixanthes elongata</i> symbiont 5	VTX00368	97
4	<i>Epirixanthes papuana</i> symbiont 1	None	
5	<i>Epirixanthes pallida</i> symbiont 6	None	
6	<i>Epirixanthes papuana</i> symbiont 6	None	
7	<i>Epirixanthes pallida</i> symbiont 8	VTX00080	99
8	<i>Epirixanthes elongata</i> symbiont 8	None	
9	<i>Epirixanthes elongata</i> symbiont 9	VTX00080	97
10	<i>Epirixanthes pallida</i> symbiont 12	VTX00093/VTX00096	97
11	<i>Epirixanthes pallida</i> symbiont 13	None	
12	<i>Epirixanthes pallida</i> symbiont 14	None	
13	<i>Polygala comosa</i> symbiont 1	VTX00135	99
14	<i>Epirixanthes kinabaluensis</i> symbiont 2	None	
15	<i>Polygala alpestris</i> symbiont 1	VTX00194	100
16	<i>Polygala amarella</i> symbiont 1	VTX00115	100
17	<i>Polygala rupestris</i> symbiont 1	VTX00149	99
18	<i>Polygala myrtifolia</i> symbiont 3	VTX00228	99
19	<i>Salomonina cantoniensis</i> symbiont 3	VTX00227	99
20	<i>Salomonina longiciliata</i> symbiont 3	VTX00231	99
21	<i>Salomonina cantoniensis</i> symbiont 4	VTX00219	98
22	<i>Salomonina longiciliata</i> symbiont 6	None	

Meijden, 1988). Both genera are confidently placed in Polygalaceae, but our data provides limited resolution in the rest of the family (Fig. 1; Appendix S3). Other studies (e.g., Persson, 2001; Forest et al., 2007; Bello et al., 2009, 2012) address phylogenetic relationships at the family and order levels in more detail.

Estimation of divergence times—The divergence time estimation of *Epirixanthes* suggests a Miocene-Oligocene stem age

and a Miocene crown age of the genus. Diversification of *Epirixanthes* coincides with much tectonic activity and climatic changes in Southeast Asia (Hall, 2009; De Bruyn et al., 2014). These complex environmental dynamics may have triggered speciation in the genus. In particular, the mid-Miocene Climatic Optimum, when Asian rainforests reached their maximum northward extent (Böhme, 2003; De Bruyn et al., 2014), is likely to have had a major influence on *Epirixanthes* evolution. The current wide and partly overlapping distribution of many of the species of *Epirixanthes* might be the result of the many possible land connections between Borneo, the Southeast Asian mainland and other parts of the region during the last 30 Ma (Hall, 2009; De Bruyn et al., 2014). Dispersal over water is a less likely mechanism, as seed morphology of *Epirixanthes* suggests dispersal by ants (Van der Meijden, 1988). Inclusion of conspecific *Epirixanthes* specimens from elsewhere in Asia would be highly informative to describe the biogeographic history of *Epirixanthes* in more detail. Moreover, our divergence time estimation is only based on four of the six described species of *Epirixanthes*. The species that were not sampled, however, are not likely to have a profound effect on the divergence age estimates, as both species are thought to be very closely related to the species represented here (Van der Meijden, 1988; Pendry, 2010). Another limitation of the presented divergence time estimation is the limited calibration information available. Although we assume the secondary calibration point from Forest et al. (2007) provides a reliable crown age of Polygalaceae, the lack of primary (fossil) calibration points used in this study implies that the result should be interpreted as a rough approximation of the actual divergence times.

Phylogeny of AMF—AMF extracted from the roots of *Epirixanthes* species are all from Glomeraceae (the former *Glomus* Group A). On the basis of morphology, Imhof (2007) also found AMF in the roots of *Epirixanthes elongata* and *E. papuana*, which he interpreted as *Paris*-type AMF (Gallaud, 1905). Although this type is formed by Glomeromycota (Smith and Read, 2008) its presence was not assessed in this study. In all species of *Epirixanthes*, more than one OTU of AMF was

TABLE 2. Faith's phylogenetic diversity (PD) scores and their standardized effect sizes (ses.pd) with corresponding *P* values.

Host taxon	No. of AMF sequences	PD	ses.pd	<i>P</i>
<i>Epirixanthes elongata</i>	9	0.48366942	-2.38390807	0.013
<i>Epirixanthes kinabaluensis</i>	2	0.09214911	-1.229551031	0.105
<i>Epirixanthes pallida</i>	15	0.63235641	-3.252918263	0.002
<i>Epirixanthes papuana</i>	7	0.13364764	-4.083472002	0.001
<i>Epirixanthes</i> Total	33	0.98121605	-5.132670632	0.001
<i>Salomonina cantoniensis</i>	4	0.51746465	0.288151921	0.623
<i>Salomonina cantoniensis</i> (Glomeraceae only)	3	0.23563546	-1.172437438	0.178
<i>Salomonina longiciliata</i>	6	0.51530733	-0.888843296	0.184
<i>Salomonina longiciliata</i> (Acaulosporaceae only)	5	0.06487209	-3.864454058	0.001
<i>Salomonina</i> Total	10	0.66123171	-1.594799903	0.084
<i>Polygala alpestris</i>	1	NA	NA	NA
<i>Polygala amara</i>	4	0.36493948	-0.804598192	0.207
<i>Polygala amarella</i>	2	0.02183137	-1.751870053	0.033
<i>Polygala calcarea</i>	3	0.12432341	-1.875023012	0.032
<i>Polygala comosa</i>	1	NA	NA	NA
<i>Polygala myrtifolia</i>	3	0.5373421	1.24807715	0.915
<i>Polygala myrtifolia</i> (Glomeraceae only)	2	0.30147603	0.410710796	0.6015
<i>Polygala rupestris</i>	1	NA	NA	NA
<i>Polygala serpyllifolia</i>	2	0.3776225	0.947202035	0.7365
<i>Polygala vulgaris</i>	4	0.10125083	-2.71228029	0.001
<i>Polygala</i> Total	21	0.92460998	-2.545471824	0.02

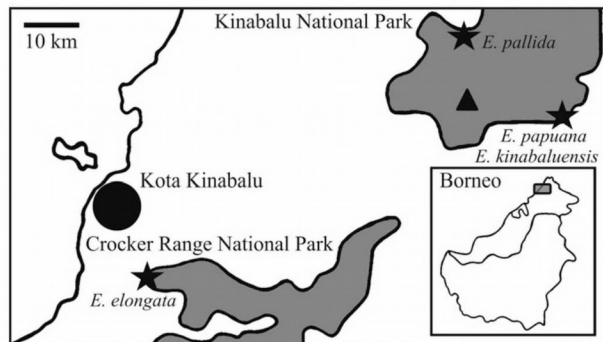


Fig. 4. Map of the collection sites in Sabah, Malaysian Borneo. Gray areas indicate Kinabalu National Park (top) and Crocker Range National Park (bottom), where the plants were collected. Black stars indicate collection sites for each species; black triangle indicates the summit of Mount Kinabalu; black dot indicates the urban area of Kota Kinabalu.

amplified, and distinct species were often found to grow on the same AMF. This pattern of symbiotic AMF diversity suggests that species of *Epirixanthes* do not grow on species-specific clades of AMF. Fungi of Ascomycota and Basidiomycota were amplified from the roots of *Epirixanthes* as well, but these resulted from amplifications with primer combination NS1 and EF3, none of which is specific for Glomeromycota (White et al., 1990; Smit et al., 1999). The BLAST search revealed those fungi are plant pathogens and/or other symbionts that were assumed to be no part of the mycorrhizal interaction and therefore not further analyzed. We assume that the mycorrhizal symbionts of *Epirixanthes* only consist of the amplified AMF.

This study confidently indicates a close relationship between *Epirixanthes*, *Salomonina*, and *Polygala*. Due to their different type of symbiosis with their mycorrhizal fungi (i.e., supposedly parasitic in *Epirixanthes* and mutualistic in *Salomonina* and *Polygala*), the comparison between AMF from the roots of the genera provides information on the evolution of mycoheterotrophy in Polygalaceae. About half of the plants from which AMF were isolated by Rath et al. (2013) were also included in the phylogenetic reconstruction presented above. The study of Rath et al. (2013) indicates these closely related *Polygala* species are predominantly symbiotically connected to AMF of Glomeraceae. Comparison between the symbiotic AMF from the roots of Bornean *Epirixanthes* and the AMF from the roots of Thai *Salomonina* and the European *Polygala* species from Rath et al. (2013) indicates the genera are symbiotically linked to a similar and slightly overlapping range of AMF of Glomeraceae (Fig. 2). Three distantly related Glomeraceae OTUs (OTU 7, OTU 21, and OTU 22) were recovered from the roots of *Salomonina* species, one of which (OTU 7) also contains AMF of *Epirixanthes pallida* and *E. elongata*. This suggests some overlap in symbiotic fungi, though in general *Epirixanthes* and *Salomonina* are linked to a different set of AMF. Moreover, two OTUs (OTU 2 and OTU 13) containing several AMF sequences from *Polygala* species also contain a single fungal sequence from *Epirixanthes pallida*. However, one of those sequences from *Epirixanthes* (*E. pallida* symbiont 15) is rather short (see Appendix S4) and its OTU clustering is therefore less reliable. However, a single fungal sequence of Acaulosporaceae was obtained from both *Polygala myrtifolia* and *Salomonina cantoniensis*. *Salomonina longiciliata* is predominantly associated with

this family of AMF, despite its close relationship with *Epirixanthes*. Apart from some overlapping AMF between *Epirixanthes* and the other genera, 11 OTUs are unique for *Epirixanthes*, four are unique for *Salomonina* and four are unique for *Polygala*. These results suggest that *Epirixanthes* is symbiotically linked to a wide range of AMF, exclusively from Glomeraceae, many of which are not associated to either *Salomonina* or *Polygala*. However, due to limited taxon sampling and low support values in the AMF phylogeny, the patterns emerging from these data should be interpreted with care. Moreover, as the AMF amplification workflow was different between the two studied plant genera, as well as the polymerase and primer combinations used, the resulting patterns might be biased. This may also affect the comparison to previous studies (e.g., Rath et al., 2013; Merckx et al., 2012). However, primers designed specifically for AMF were used in both genera (NS31 [Simon, 1996] and AM1 [Helgason et al., 1998]), supplemented by less-specific primers (NS1 [White et al., 1990] and EF3 [Smit et al., 1999] for *Epirixanthes*; GeoA1 and ART4 [Schwarzott and Schüßler, 2001] for *Salomonina*) to compensate a potential bias by NS31 and AM1. We therefore assume that a careful comparison can be made despite the different approaches and that the obtained sequences of mycorrhizal symbionts of both genera provide a representative sample of the actual mycorrhizal community in the roots of these plants. Moreover, comparisons with different studies should also be made carefully, under the assumption that these studies provide a similar representative sample of AMF.

Phylogenetic diversity measurements of AMF—The wider range of AMF symbionts of *Salomonina* and *Polygala* as compared with *Epirixanthes* indicated by the phylogeny of the AMF is corroborated by higher PD values for the fungi from these genera, particularly from *Salomonina*. SES_{PD} values were calculated to account for the sampling differences between the species (see Table 2). The significantly negative SES_{PD} values for most of the AMF of the *Epirixanthes* species and to a lesser extent for those of *Salomonina* (the Acaulosporaceae fungi of *S. longiciliata*) and *Polygala* (*P. vulgaris*) suggest oversampling, probably leading to an overestimated PD value. These SES_{PD} values suggest the actual PD of these taxa is lower, which particularly supports the finding of a low PD of the AMF from the *Epirixanthes* species as compared with the PD of the AMF of *Salomonina*. Comparison between AMF of *Epirixanthes* and *Polygala* is difficult due to the different number of species and fungal sequences per species. Moreover, sampling of AMF of *Polygala* was done over a relatively large surface area (i.e., Germany and two islands in the Mediterranean Sea) in a temperate region, as compared with the two Bornean rainforest areas where *Epirixanthes* was collected. However, the finding of Acaulosporaceae in a single species of *Polygalaceae* also indicates higher diversity in this genus as compared with *Epirixanthes*. The results indicate the high PD values in *Salomonina* and *Polygala* are largely the result of their symbiosis with both Glomeraceae and Acaulosporaceae, whereas *Epirixanthes* is only linked to Glomeraceae.

This raises the question of whether species of *Epirixanthes* are specialized on AMF. As *Polygala* species were interpreted as being not relatively selective on AMF (i.e., symbiotically linked to five distinct clades; Rath et al., 2013), the results from this study do not provide a straightforward answer. *Epirixanthes* species could be interpreted as being more selective than those of *Salomonina* and *Polygala*, given the lack of Acaulospo-

raceae fungi found in its roots and its lower PD value. However, given the wide range of symbiotic fungi extracted from the roots (i.e., 14 OTUs scattered across Glomeraceae) and the limited distribution of the sampled *Epirixanthes* specimens, the results tend to suggest species of *Epirixanthes* are not highly specialized on specific clades of Glomeraceae. As the majority of AMF engaged in mycoheterotrophic interactions are Glomeraceae (Merckx et al., 2012), only plants with a restricted clade of symbiotic Glomeraceae are interpreted as having high levels of specialization (e.g., *Arachnitis uniflora*, Corsiaceae [Bidartondo et al., 2002]; *Afrothismia* spp., Thismiaceae [Merckx and Bidartondo, 2008]). Lack of specificity however, is not a rare phenomenon in mycoheterotrophic plants as it is found in species of *Aphyllorchis* (Orchidaceae), *Cephalanthera* (Orchidaceae), *Pyrola* (Ericaceae), *Sciaphila* (Triuridaceae) and *Campylosiphon* (Burmanniaceae) (Hynson and Bruns, 2009; Roy et al., 2009; Merckx et al., 2012). Concluding, our results suggest that species of *Epirixanthes* are more specialized than their chlorophyllous relatives, but the species are not highly specialized as compared with many other mycoheterotrophic plants. More research, however, is needed to elucidate specificity in Polygalaceae further, especially using uniform sampling and molecular methods.

Epirixanthes appears to have evolved relatively recently toward mycoheterotrophy, as many groups of mycoheterotrophic plants are much older; e.g., Triuridaceae have an estimated mean stem age of 84 Ma (Mennes et al., 2013), and Corsiaceae have an estimated mean stem age of 70 Ma (Mennes et al., 2015). The relatively wide range of AMF the genus is symbiotically linked to possibly represents a relic of a more generalistic ancestral fungal symbiosis, similar to that of *Polygala* (Rath et al., 2013) or *Salomonina*. However, generalistic fungal symbioses are also observed in other mycoheterotrophic lineages (e.g., *Sciaphila* and *Campylosiphon*; Merckx et al., 2012), suggesting this type of symbiosis might not necessarily represent such an ancestral state. Moreover, the strong morphological similarity to its closest chlorophyllous relative (*Salomonina*) and the relatively short branch lengths, suggest that *Epirixanthes* might not have undergone the same degree of evolutionary change as many other clades of mycoheterotrophic genera, e.g., *Petrosavia*, *Afrothismia*, and *Voyria*. Last, the functional reading frame in the *matK* region for at least some *Epirixanthes* specimens might indicate this plastid region is still functional. As this region is believed to be one of the last to lose its functionality in the transition toward mycoheterotrophy (Barrett and Davis, 2012), this observation further suggests the evolutionary shift toward mycoheterotrophy in *Epirixanthes* is a relatively recent one. These results support the hypothesis that loss of photosynthetic ability in mycoheterotrophic plants is not necessarily correlated with specialization to narrow lineages of fungi (Hynson and Bruns, 2009). The current study shows that *Epirixanthes* forms an excellent system to study the evolution of mycoheterotrophy.

LITERATURE CITED

- BARRETT, C. F., AND J. I. DAVIS. 2012. The plastid genome of the mycoheterotrophic *Corallorhiza striata* (Orchidaceae) is in the relatively early stages of degradation. *American Journal of Botany* 99: 1513–1523.
- BELLO, M. A., A. BRUNEAU, F. FOREST, AND J. A. HAWKINS. 2009. Elusive relationships within order Fabales: Phylogenetic analyses using *matK* and *rbcL* sequence data. *Systematic Botany* 34: 102–114.
- BELLO, M. A., J. A. HAWKINS, AND P. J. RUDALL. 2010. Floral ontogeny in Polygalaceae and its bearing on the homologies of keeled flowers in Fabales. *International Journal of Plant Sciences* 171: 482–498.
- BELLO, M. A., P. J. RUDALL, AND J. A. HAWKINS. 2012. Combined phylogenetic analyses reveal interfamilial relationships and patterns of floral evolution in the eudicot order Fabales. *Cladistics* 28: 393–421.
- BIDARTONDO, M. I. 2005. The evolutionary ecology of myco-heterotrophy. *New Phytologist* 167: 335–352.
- BIDARTONDO, M. I., AND T. D. BRUNS. 2002. Fine-level mycorrhizal specificity in the Monotropideae (Ericaceae): Specificity for fungal species groups. *Molecular Ecology* 11: 557–569.
- BIDARTONDO, M. I., D. REDECKER, I. HJRI, A. WIEMKEN, T. D. BRUNS, L. DOMÍNGUEZ, A. SÉRSIC, ET AL. 2002. Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 419: 389–392.
- BÖHME, M. 2003. The Miocene Climatic Optimum: Evidence from ectothermic vertebrates of Central Europe. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 195: 389–401.
- BOUCKAERT, R., J. HELED, D. KÜHNERT, T. G. VAUGHAN, C.-H. WU, D. XIE, M. A. SUCHARD, ET AL. 2014. BEAST2: A software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology* 10: e1003537 10.1371/journal.pcbi.1003537.
- CHODAT, R. 1896. Polygalaceae. In A. Engler and K. Prantl, *Natürliche Pflanzenfamilien*, vol. 3, 323–345. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig, Germany.
- DARRIBA, D., G. L. TABOADA, R. DOALLO, AND D. POSADA. 2012. JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.
- DE BRUYN, M., B. STELBRINK, R. J. MORLEY, R. HALL, G. R. CARVALHO, C. H. CANNON, G. VAN DEN BERGH, ET AL. 2014. Borneo and Indochina are major evolutionary hotspots for Southeast Asian biodiversity. *Systematic Biology* 63: 879–901.
- DRUMMOND, A. J., B. ASHTON, S. BUXTON, M. CHEUNG, A. COOPER, C. DURAN, M. FIELD, ET AL. 2013. Geneious Pro v6.1.7 [computer program]. Available from <http://www.geneious.com/> [accessed 19 February 2014].
- DRUMMOND, A. J., M. A. SUCHARD, D. XIE, AND A. RAMBAUT. 2012. Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969–1973.
- EDGAR, R. C. 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792–1797.
- EDGAR, R. C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26: 2460–2461.
- EDGAR, R. C. 2013. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods* 10: 996–998.
- ERIKSEN, B. 1993a. Floral anatomy and morphology in the Polygalaceae. *Plant Systematics and Evolution* 186: 17–32.
- ERIKSEN, B. 1993b. Phylogeny of the Polygalaceae and its taxonomic implications. *Plant Systematics and Evolution* 186: 33–55.
- FAITH, D. P. 1992. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation* 61: 1–10.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the Bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- FOREST, F., M. W. CHASE, C. PERSSON, P. R. CRANE, AND J. A. HAWKINS. 2007. The role of biotic and abiotic factors in evolution of ant dispersal in the milkwort family (Polygalaceae). *Evolution* 61: 1675–1694.
- GALLAUD, I. 1905. Études sur les mycorrhizes endotrophes. *Revue Générale de Botanique* 17: 5–48, 66–83, 123–135, 223–239, 313–325, 425–433, 479–500.
- GERNHARD, T. 2008. The conditioned reconstructed process. *Journal of Theoretical Biology* 253: 769–778.
- GEYER, C. J. 1991. Markov chain Monte Carlo maximum likelihood. In E. M. Keramidas [ed.], *Computing science and statistics: Proceedings of the 23rd symposium on the interface*, 156–163. Fairfax: Interface Foundation of North America, Fairfax Station, Virginia, USA.
- GUINDON, S., AND O. GASCUEL. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology* 52: 696–704.
- HALL, R. 2009. Southeast Asia's changing palaeogeography. *Blumea* 54: 148–161.

- HELGASON, T., T. J. DANIELL, R. HUSBAND, A. H. FITTER, AND J. P. W. YOUNG. 1998. Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 394: 431.
- HU, J.-M., M. LAVIN, M. F. WOJCIECHOWSKI, AND M. J. SANDERSON. 2000. Phylogenetic systematics of the tribe Millettieae (Leguminosae) based on chloroplast *trnK/matK* sequences and its implications for evolutionary patterns in Papilionoideae. *American Journal of Botany* 87: 418–430.
- HUTCHINSON, J. 1967. The genera of flowering plants (Angiospermae): Dicotyledons, vol. II, 659. Oxford University Press, Oxford, UK.
- HYNSON, N. A., AND T. D. BRUNS. 2009. Evidence of a myco-heterotroph in the plant family Ericaceae that lacks mycorrhizal specificity. *Proceedings of the Royal Society, B, Biological Sciences* 276: 4053–4059.
- IMHOF, S. 2007. Specialized mycorrhizal colonization pattern in achlorophyllous *Epirixanthes* spp. (Polygalaceae). *Plant Biology* 9: 786–792.
- KEMBEL, S. W., P. D. COWAN, M. R. HELMUS, W. K. CORNWELL, H. MORLON, D. D. ACKERLY, S. P. BLOMBERG, AND C. O. WEBB. 2010. Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics* 26: 1463–1464.
- LEAKE, J. R. 1994. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist* 127: 171–216.
- MARCUSE, M. 1902. Anatomisch-biologischer Beitrag zur Mycorrhizenfrage. Ph.D. dissertation, Jena University, Jena, Germany. Available at <http://www.worldcat.org/title/anatomisch-biologischer-beitrag-zur-mycorrhizenfrage/oclc/16769339>
- MENNES, C. B., V. K. Y. LAM, P. J. RUDALL, S. P. LYON, S. W. GRAHAM, E. F. SMETS, AND V. S. F. T. MERCKX. 2015. Ancient Gondwana break-up explains the distribution of the mycoheterotrophic family Corsiaceae (Liliales). *Journal of Biogeography* [Epub ahead of print] 10.1111/jbi.12486.
- MENNES, C. B., E. F. SMETS, S. N. MOSES, AND V. S. F. T. MERCKX. 2013. New insights in the long-debated evolutionary history of Triuridaceae (Pandanales). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 994–1004.
- MERCKX, V. S. F. T., AND M. I. BIDARTONDO. 2008. Breakdown and delayed cospeciation in the arbuscular mycorrhizal mutualism. *Proceedings of the Royal Society, B, Biological Sciences* 275: 1029–1035.
- MERCKX, V. S. F. T., M. I. BIDARTONDO, AND N. A. HYNSON. 2009. Myco-heterotrophy: When fungi host plants. *Annals of Botany* 104: 1255–1261.
- MERCKX, V. S. F. T., AND J. V. FREUDENSTEIN. 2010. Evolution of myco-heterotrophy in plants: A phylogenetic perspective. *New Phytologist* 185: 605–609.
- MERCKX, V. S. F. T., J. V. FREUDENSTEIN, J. KISSLING, M. J. M. CHRISTENHUSZ, R. E. STOTLER, B. CRANDALL-STOTLER, N. WICKETT, ET AL. 2013a. Chapter 2: Taxonomy and classification. In V. S. F. T. Merckx [ed.], *Mycoheterotrophy: The biology of plants living on fungi*, 19–102, Springer, New York, New York, USA.
- MERCKX, V. S. F. T., S. B. JANSSENS, N. A. HYNSON, C. D. SPECHT, T. D. BRUNS, AND E. F. SMETS. 2012. Mycoheterotrophic interactions are not limited to a narrow phylogenetic range of arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Ecology* 21: 1524–1532.
- MERCKX, V. S. F. T., J. KISSLING, H. HENTRICH, S. B. JANSSENS, C. B. MENNES, C. D. SPECHT, AND E. F. SMETS. 2013b. Phylogenetic relationships of the mycoheterotrophic genus *Voyria* and the implications for the biogeographic history of Gentianaceae. *American Journal of Botany* 100: 712–721.
- MERCKX, V. S. F. T., M. STÖCKEL, A. FLEISCHMANN, T. D. BRUNS, AND G. GEBAUER. 2010. ¹⁵N and ¹³C natural abundance of two mycoheterotrophic and a putative partially mycoheterotrophic species associated with arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 188: 590–596.
- ÖPIK, M., A. VANATOA, E. VANATOA, M. MOORA, J. DAVISON, J. M. KALWIJ, Ü. REIER, AND M. ZOBEL. 2010. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist* 188: 223–241.
- PENDRY, C. A. 2001. Polygalaceae. In T. Santisuk and K. Larsen [eds.], *Flora of Thailand*, vol. 7, part 3, 498–538, Royal Forest Department, Bangkok, Thailand.
- PENDRY, C. A. 2010. *Epirixanthes compressa* Pendry, a new mycoheterotrophic species of Polygalaceae from Thailand. *Thai Forest Bulletin* 38: 184–186.
- PERSSON, C. 2001. Phylogenetic relationships in Polygalaceae based on plastid DNA sequences from the *trnL-F* region. *Taxon* 50: 763–779.
- R CORE TEAM. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from <http://www.R-project.org/> [accessed 05 June 2014].
- RAMBAUT, A. 2012. FigTree v1.4 [computer program]. Available from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> [accessed 28 April 2014].
- RAMBAUT, A., M. A. SUCHARD, W. XIE, AND A. J. DRUMMOND. 2013. Tracer v1.6 [computer program]. Available from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/> [accessed 28 April 2014].
- RATH, M., H. C. WEBER, AND S. IMHOF. 2013. Morpho-anatomical and molecular characterization of the mycorrhizas of European *Polygala* species. *Plant Biology* 15: 548–557.
- RONQUIST, F., M. TESLENKO, P. VAN DER MARK, D. L. AYRES, A. DARLING, S. HÖHNA, B. LARGET, ET AL. 2012. MyBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542.
- ROY, M., S. WATTHANA, A. STIER, F. RICHARD, S. VESSABUTR, AND M.-A. SELOSSE. 2009. Two mycoheterotrophic orchids from Thailand tropical dipterocarpacean forests associate with a broad diversity of ectomycorrhizal fungi. *BMC Biology* 7: 51.
- SCHWARZOTT, D., AND A. SCHÜBLER. 2001. A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA extraction, amplification, and cloning from single AM fungal spores. *Mycorrhiza* 10: 203–207.
- SIMON, L. 1996. Phylogeny of the Glomales: Deciphering the past to understand the future. *New Phytologist* 133: 95–101.
- SIRICHAMORN, Y., F. A. C. B. ADEMA, B. GRAVENDEEL, AND P. C. VAN WELZEN. 2012. Phylogeny of palaeotropical Derris-like taxa (Fabaceae) based on chloroplast and nuclear DNA sequences shows reorganization of (infra)generic classifications is needed. *American Journal of Botany* 99: 1793–1808.
- SMIT, E., P. LEEFLANG, B. GLANDORF, J. D. VAN ELSAS, AND K. WERNARS. 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rDNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2614–2621.
- SMITH, S. E., AND D. READ. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd ed. Academic, London, UK.
- STEVENS, P. F. 2001 onward. Angiosperm Phylogeny Website, version 12, July 2012 [and more or less continuously updated since], available at <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> [accessed 29 October 2014].
- VAN DER MEIJDEN, R. 1988. Polygalaceae. In C. G. G. J. van Steenis and W. J. J. O. de Wilde [eds.], *Flora Malesiana*, vol. 10, 455–539, Kluwer, Dordrecht, Netherlands.
- WHITE, T. J., T. BRUNS, S. LEE, AND J. W. TAYLOR. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innes, D. J. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White [eds.], *PCR protocol: A guide to methods and applications*, 315–322, Academic Press, San Diego, California, USA.
- WOJCIECHOWSKI, M. F., M. J. SANDERSON, B. G. BALDWIN, AND M. J. DONOGHUE. 1993. Monophyly of aneuploid *Astragalus* (Fabaceae). Evidence from nuclear ribosomal RNA genes for phylogenetics. *American Journal of Botany* 80: 711–722.
- YAMATO, M., Y. OGURA-TSUJITA, H. TAKAHASHI, AND T. YUKAWA. 2014. Significant difference in mycorrhizal specificity between an autotrophic and its sister mycoheterotrophic plant species of Petrosaviaceae. *Journal of Plant Research* 127: 685–693.
- ZWICKL, D. J. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion, Ph.D. dissertation, University of Texas at Austin, Austin, Texas, USA.

Systematic analysis of arbuscular mycorrhizal symbionts of Polygalaceae from America, Southeast Asia and Europe - clues for functional constraints of partner choice in the evolution of mycoheterotrophy?

Magnus Rath*, Sawitree Sasirat[♦], Stephan Imhof*

*Spezielle Botanik und Mykologie
Fachbereich Biologie
Philipps-Universität Marburg
35032 Marburg/Germany

[♦]Queen Sirikit Botanic Garden 50180 Chiang Mai, Thailand

Emails:

rath@biologie.uni-marburg.de

sawitree@qsbg.mail.go.th

imhof@biologie.uni-marburg.de

Phone: +4964212823488

Fax: +4964212823351

Keywords: Polygalaceae, Glomeromycota, mycorrhiza, specificity, symbiotic function, evolution, mycoheterotrophy

Abstract

Partial 18S rDNA of arbuscular mycorrhizal fungi from roots of 17 species representing 7 genera of chlorophyllous Polygalaceae from North-, Meso- and South America, Southeast Asia and Europe were isolated to infer their phylogenetic positions. Species from Polygalaceae are predominantly associated with symbionts from Glomeraceae but also with Acaulosporaceae and, to a lesser extent, with Gigasporaceae as well as Archaeosporaceae. Symbionts from different species and genera in Polygalaceae strongly tend to cluster phylogenetically with each other corroborating earlier studies on symbionts from chlorophyllous and mycoheterotrophic species of Polygalaceae from Europe and Southeast Asia. Most of the clades constituted by symbionts from Polygalaceae are also targeted by symbionts from non-Polygalaceae-mycoheterotrophic plants. Analyses of the phylogenetic distance (SES.PD) show a lesser degree of phylogenetic relatedness of symbionts in species of chlorophyllous Polygalaceae compared to symbionts of most of the investigated mycoheterotrophic species in Polygalaceae (*Epirixanthes* spp.). However, the genus *Polygala* reveals a similarly high degree of symbiont relatedness as *Epirixanthes* on genus level. Moreover, PD-values of clades (OTUs) constituted by symbionts from different species and genera of Polygalaceae do not allow to distinguish between chlorophyllous or of mycoheterotrophic species in this family. Chlorophyllous and mycoheterotrophic species of Polygalaceae thus show a very similar pattern of symbiont choice. This can be interpreted as a kind of a preadaptation-advantage for the evolution of mycoheterotrophic lifestyle in *Epirixanthes*. In light of these results, the authors also argue for a functionally based model to explain the distinct association-pattern in Polygalaceae. This model is based on the assumption of overlapping ecophysiological interests towards the targeted fungal symbionts in the mycoheterotrophic species of *Epirixanthes*, in the species in chlorophyllous Polygalaceae and in the autotrophic donor-plants as well as the ability of fungi and autotrophic host plants to discriminate against an unequal symbiotic performance of their respective symbiotic partners.

Introduction

In many mycorrhizal symbiosis specificities between the symbiotic partners has been regarded as weak or even absent (Smith & Read 1997, Hoeksema 1999). In arbuscular mycorrhiza (AM) this assumption was mainly based on the difference between the few species of arbuscular mycorrhizal

fungi (AMF, Glomeromycota) compared to a large number of colonizable plant species, high susceptibility of plants to successful inoculation by AMF from almost every taxon under artificial conditions and but also on more general considerations arguing against selective pressure for specialisation in mutualistic symbiosis as well as on the unpredictability of host plant occurrence over space and time (e.g. Hoeksema 1999, Sanders 2002, Helgason & Fitter 2005, Helgason et al. 2007, Smith & Read 2008). However, molecular-based tools have shed new light on the aspect of specificity in many mycorrhizal associations and were especially helpful for the investigation of specificity in the morphologically hard to distinguish AMF (Stürmer 2012). Despite the fact that some of these analyses indeed support the general evaluation of low taxonomic specificity in the AM-symbiosis (e.g. Helgason et al. 1998, 1999; Gomes et al. 2017), other studies confirm various degrees of specificity in this mycorrhiza as well. For example, high taxonomic specificity is present in *Acer pseudoplatanus* which was found to be colonized by *Glomus hoi* exclusively (Helgason et al. 2002). Appelhans et al. (2008) found preferences for a clade comprising *Funneliformes mosseae* in some species of *Rutaceae*. Other analyses described presumably ecologically based differences in AMF guild composition between different host species (e.g. Vandenkoornhuysen et al. 2002, 2003; Scheublin et al. 2004, Öpik et al. 2003). Moreover, since the early molecular based investigations on fungal symbionts of Glomeromycota-associated mycoheterotrophic plants there has been multiple evidence for a high degree of taxonomic specificity in arbuscular mycorrhiza (e.g. Bidartondo et al. 2002, Yamato et al. 2011b, Waterman et al. 2013, Yamato et al. 2014, Gomes et al. 2017; 2019b). These mycoheterotrophic plants meet their metabolic demands mainly by means of their mycorrhizal associations (Leake 1994, Merckx 2013). Since such plants completely depend on their fungus for catabolic and anabolic carbon supply, they should, in theory, be more prone to adaptation on small sets of fungi that are especially able to meet their ecophysiological demands best. However, despite Glomeraceae 1 (formerly known as *Glomus*-Group A and comprising the species rich genera *Rhizophagus* and *Funneliformis*; Schwarzott et al. 2001), which has now emerged as especially rich in fungal partners for mycoheterotrophic plants, there seems to be no exclusive mycoheterotrophic fungal clade (e.g. Merckx et al. 2012, Suetsugu et al. 2014). Additionally, not all mycoheterotrophic plants show the same degree of specificity. For example, an exceptional high degree of taxonomic specificity has been found in species of *Afrothismia* (Thismaceae), *Voyria*, *Voyriella* (Gentianaceae) and *Petrosavia* (Petrosaviaceae), whereas some species in Burmanniaceae, Triuridaceae as well as mycoheterotrophic gametophytes of some ferns (*Botrychium*, *Psilotum*) and the only mycoheterotrophic species in Polygalaceae, *Epirixanthes*, rather show specificity towards a restricted set of not necessarily closely related fungal clades

(Bidartondo et al. 2002, Merckx & Bidartondo 2008, Winther & Friedman 2007, 2009; Yamato et al. 2011a; Mennes et al. 2015). The latter raises the question, whether very narrow taxonomic specificity in the sense of a symbiotic association towards a single clade of fungal symbionts is the final stage or merely one possible scenario in the evolution of mycoheterotrophy? This question can only be addressed if we gain more knowledge on what might be the functional reasons behind specificities in mycoheterotrophic associations. In this regard, it seems plausible to extend the analysis to the chlorophyllous relatives of mycoheterotrophic plants. However, so far there are only four analyses on arbuscular mycorrhizal chlorophyllous relatives of mycoheterotrophic species that also account for their fungal symbionts. In all of them, the chlorophyllous relatives (*Gentiana verna*, *Gentiana acaulis*, *Burmannia capitata*, *Japonolirion osense*, *Polygala* spp. and *Salomonina* spp.) showed no (*G. verna*, *G. acaulis*, *B. capitata*, *J. osense*) or a less elaborate degree of specificity (*Polygala* spp., *Salomonina* spp.) compared to its mycoheterotrophic relatives. These data have been interpreted as a result of stepwise evolution towards increasing specificity in the fully mycoheterotrophic members in these lineages (e.g. Sýkorová et al. 2007, Yamato et al. 2014, Mennes et al. 2015). Despite their value, all studies could only use a very restricted set of chlorophyllous species making the generalisation of their findings difficult. A fourth study, in fact, investigated significant more chlorophyllous species (all from European species in the genus *Polygala*) but lacked the crucial mycoheterotrophic species (Rath et al. 2013). Nevertheless, in the latter, all species showed a basic pattern of specificity towards a set of closely related fungi, which is very similar to what is found in many mycoheterotrophic species. However, we tried to resolve this rather unsatisfying situation by adding many new chlorophyllous host species in Polygalaceae from various genera and lifeforms like trees, shrubs, lianas and herbs to the datasets of Rath et al. (2013) and Mennes et al. (2015). In light of our model on mycoheterotrophic evolution in Polygalaceae basing on morphological considerations of the mycorrhizal structures (Imhof 2007, Rath et al. 2013, Rath et al. manuscript A), this analysis might give us the chance to better evaluate specificity in mycoheterotrophic plants and what functional constraints may underlie symbiont choice in Polygalaceae.

Material and methods

Plant material

17 species in the Polygalaceae were collected from 22 sites comprising locations in Ecuador, Panama, Costa Rica, USA (Florida), Thailand and Europe (Germany). The samples included root material from one tree in *Xanthophyllum* (*X. lanceatum*), one large woody liana in *Moutabea* (*M. longifolia*), two large woody lianas in *Securidaca* (*S. diversifolia*, *S. inappendiculata*), five small trees or shrubs respectively, in *Monnina* (*M. parasytvatica*, *M. xalapensis*, *M. crepinii*, *M. costaricensis*, *M. spec.*), one subshrub in *Polygaloides*, one herb in *Asemeia* and 8 herbs in *Polygala* s. str (*P. balduinii*, *P. nana*, *P. paniculata*, *P. ramosa*, *P. setacea*; *P. chinensis*; *A. grandiflora*, *Polygaloides chamaebuxus*). Data on the collecting sites, the date of collecting and number of the investigated plant individuals are summarized in Table S-1 (see p. 317).

DNA Extraction

Fungal DNA from the investigated species was extracted and amplified by PCR as follows: From each plant, a single root fragment (length = 1 - 3 cm) was used for molecular identification of the mycorrhizal symbionts. DNA of the fungal symbionts were extracted following the DNA extraction protocol described in Rath et al. 2013. Amplification of fungal 18S rDNA was done using a nested PCR approach. The first primer combination, GeoA1 and ART4 (Schwarzott & Schüßler 2001), was used for initial amplification of 18S rDNA followed by nested PCR using the AMF-specific primer combination AM1 and NS31 (Simon 1992; Helgason et al., 1998). In some cases (see table 1) the primer-set AMLI and AMLII (Lee et al. 2008) were used instead of AM1 and NS31. This was done to check for AMF species in the Archaeosporaceae, Ambisporaceae and Paraglomeraceae which are known to show only a weak amplification with AM1 and NS31 (Redecker et al. 2000, Daniell et al. 2001, Lee et al. 2008). However, the majority of the successful amplifications were obtained with AM1/NS31 eventually. This was due to the insufficient discrimination against host plant 18S rDNA by AMLI/AMLII. The first PCR mixture consisted of 15,5 µl sterile aqua bidest., 2.5 µl 10x PCR buffer, 1 µl of each primer (diluted 1:10), 2.5 µl of dNTP (5 mM), 0.5 µl Pfu polymerase (PROMEGA) and 2.0 µl DNA extract as a template. The first PCR regime (GeoA1/ART4)

consisted of 2 min. for initial denaturation at 95°C followed by 30 cycles of 30 sec. at 95 °C for denaturation, 30 sec. at 60 °C for annealing and 4 min. at 73 °C for primer extension, followed by a final extension of 10 min. at 73 °C. The second PCR mixture consisted of 35,5 µl sterile aqua bidest., 5 µl 10x PCR buffer, 2 µl of each primer (diluted 1:10), 2,5 µl of dNTP (5 mM), 0.5 µl Pfu polymerase and 2.5 µl of the amplification of the first PCR as a template. The second (nested) PCR regime (AM1/NS31 or AMLI/AMLII) consisted of 2 min. for initial denaturation at 95°C followed by 35 cycles of 30 sec. at 95 °C for denaturation, 30 sec. at 60 °C for annealing and 1.5 min. at 73 °C for primer extension, followed by a final extension of 5 min. at 73 °C. In case of only weak amplification, up to four additional nested PCR steps were done and the resulting products were pooled. Resulting partial 18S rDNA sequences were compared with sequences from NCBI GenBank using the BLAST-algorithm (Altschul et al. 1990) and selected for further analysis if high similarity to AMF could be observed. The remaining PCR products were used for cloning and subsequent sequencing only in case of low sequence quality of the directly sequenced PCR-product (see Rath et al. 2013 for detailed information on DNA processing for cloning). All in all, 47 sequences were obtained. See table S-2 (p. 318) in the supplementary material for details on the number of root samples per individual, the sequence abbreviations and the primers used in this study.

Phylogenetic reconstruction and diversity measurements of AMF

The phylogenetic diversity of AMF symbionts in the roots of the investigated species was assessed by *i*) reconstructing their phylogenetic position in a Glomeromycota framework using already published sequences of AMF from chlorophyllous host species in *Polygala* (9 species and 1 subspecies from Europe; Rath et al. 2013), in *Salomonina* (two species from Thailand; Mennes et al. 2015) and in mycoheterotrophic *Epirixanthes* (four species from Malaysian Borneo; Mennes et al. 2015), as well as a multitude of published AMF sequences from various autotrophic and mycoheterotrophic host species, *ii*) assigning the symbiont sequences to operational taxonomic units (OTUs) and *iii*) calculating the standardized effect size phylogenetic diversity index (SES.PD) after Faith (1992) on level of host genera, of host species and of OTUs.

i) Reconstruction of the phylogenetic tree.

First, symbiont sequences from roots of the investigated Polygalaceae and the sequences from the NCBI or EMBL database (including symbiont sequences from species of *Polygala* spp., *Epirixanthes* spp. and *Salomonina* spp. from previous publications) were aligned using MUSCLE (Edgar 2004). In the final alignment, multiple members of the Glomeraceae, Acaulosporaceae, Gigasporaceae, Diversisporaceae, Claroideoglomerales, Paraglomeraceae and Archaeosporaceae were included thus representing the majority of families in the Glomeromycota. Besides, most sequences of AMF associated with mycoheterotrophic plants from studies of the last 16 years were incorporated. From the final alignment, a subset of fungal symbionts from all Polygalaceae was extracted and the UPARSE-OTU algorithm as implemented in Usearch version 7.0 (Edgar 2010) were used to discard full-length identical sequences. Most Likelihood (ML) Analysis analysis of the AMF 18S rDNA sequence data was done using the GTRGAMMA nucleotide substitution model for computation implemented in RAxML (Stamatakis 2014). The ML tree was reconstructed and 1000 bootstrap replicates were chosen for the final computation. The best fitting tree of the ML analysis was chosen for further analytic processing and support values of at least 0.60 were given for all clades or OTUs respectively, containing symbionts from Polygalaceae or non-Polygalaceae-mycoheterotrophic plants.

ii) First assessment of phylogenetic distances between the fungal symbionts

After the computation of the phylogenetic tree, OTUs [criterion monophyly and/or at least 97 % sequence similarity (determined by BLAST) towards reference sequences of symbionts from Polygalaceae (indicated by asterisk, circle or hash) to symbionts from other Polygalaceae or, alternatively, to symbionts from non-Polygalaceae-mycoheterotrophic plants] were plotted into the tree as Arabic numbers (1 - 31.⁷). Additionally, we measured the sequence similarity between

⁷Note that OTU 10, 12, 20, 20.2, 22, 26, 27, 28, 31 are deliberately set to contain a maximum of sequences. Despite representing monophyletic clades, they do often include sequences with low BLAST similarity. Although still being informative for the main premise of this study they are mainly incorporated for the evaluation of SES.PD as a valid measure for sequences relatedness (see the amendment in the supplementary material for a critical reflection on this topic).

symbionts from hosts of special interest to this study (i.e. non-Polygalaceae-mycoheterotrophic plants; OTUs A - I). With few exceptions very high BLAST similarity of $\geq 97\%$ also indicated monophyly of the respective symbionts, but we decided to incorporate three paraphyletic groups (OTU 1, OTU 20.3, OTU 20.7), which were signified by especially high sequence similarity, also into our subsequent analysis. OTUs from chlorophyllous Polygalaceae were indicated in green colour and BLAST values for the similarity of sequence between symbionts of Polygalaceae were annotated inside or on the left side of the clade if the value was $\geq 97\%$. Additionally, BLAST-values were given on the right side of each clade if the respective symbionts were of special interest to this study (red annotations were used if the reference sequence came from a mycoheterotrophic plant). Clades comprising solely symbionts from chlorophyllous species of Polygalaceae were marked in green, clades comprising symbionts from chlorophyllous Polygalaceae and from mycoheterotrophic non-Polygalaceae or *Epirixanthes* were marked in green with a red frame. Clades containing only symbionts from mycoheterotrophic Polygalaceae (i.e. *Epirixanthes* spp.) were indicated in red with a green frame. The single clade (OTU 30) containing symbionts from chlorophyllous and mycoheterotrophic species in Polygalaceae is marked in yellow. To further facilitate the visualization of the tree, names of the host species were given for all fungal sequences of special interest to this study and marked in green if they were obtained from chlorophyllous herbs in Polygalaceae, in blue if they were amplified from woody Polygalaceae and in red if they were obtained from mycoheterotrophic hosts (including *Epirixanthes* spp.).

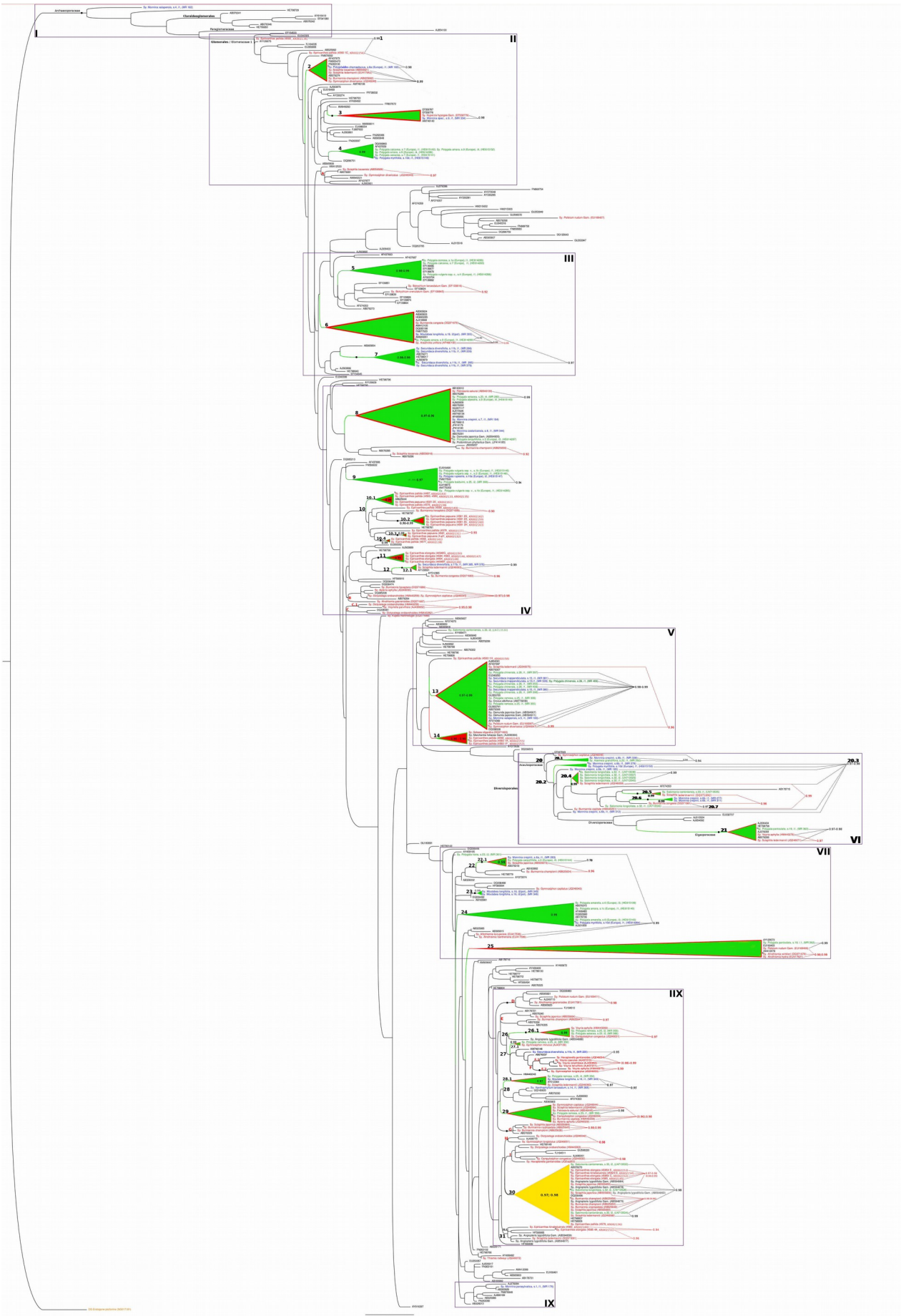
iii) Calculating phylogenetic distances of the fungal symbionts

To access the degree of phylogenetic relatedness within each OTU we computed the phylogenetic distance (PD, Faith 1992) for each OTU using the R-package Picante (Kembel et al. 2010). PD values provide a reliable measure of phylogenetic relatedness only in the combination with a valid phylogenetic background (here our ML-tree) where PD sums up the computed phylogenetic distances of a set of chosen taxa in the phylogenetic tree (see Faith et al. 1992 for details). Hence, the smaller the PD-value the smaller the phylogenetic distance within the OTU and therefore the larger the relatedness of the taxa within the respective clade. Without stochastic correction, the high correlation of PD with species richness prevents direct comparison of PD values from OTUs with different species number. However, to allow comparison of PD values between OTUs, we calculated the standardized effect size (SES) for PD applying the null-model "richness" and 999 runs. The resulting SES.PD values were plotted in form of a net-diagram to allow for a more

convenient comparison between OTUs. Additionally, we calculated the SES.PD for symbionts on the level of host genus as well as host species for all members of Polygalaceae that are incorporated in this study and plotted these values in form of bar diagrams. SES.PD values below zero indicate a higher degree of relatedness between the symbionts and hence decreased phylogenetic diversity of symbionts subsumed in the respective unit (here OTU, host genus, host species) than can be expected on basis of the application of the randomization algorithm implemented in our applied null-model. Values very near, or exactly at zero show no increased symbiont relatedness while values above zero indicate a phylogenetically more dispersed (i.e. overdispersed) fungal community than would be expected after the applied null-model.

Results and Discussion

Fig. 1 (page 292): Phylogenetic tree (ML) of the isolated arbuscular mycorrhiza symbiont sequences (partial 18S rDNA) from host roots of various chlorophyllous species and genera of Polygalaceae from South-, Meso- and North America respectively, Southeast Asia [all sequences with MR... ID-No.; hostnames are marked in green (chlorophyllous herbs) or blue (woody lifeforms)] combined with already published sequences of symbionts from roots of European species of *Polygala* [all sequences with EMBL-accession no. HE614... and HE615...; hostnames are marked in green (herbs) or blue (woody lifeforms)], Southeast Asian species of *Salomonina* (all sequences with EMBL-accession no. LN7135...; hostnames in green), mycoheterotrophic species of *Epirixanthes* (all seqs. with EMBL-accession no. KR0021...; hostnames in red) and multiple sequences of symbionts from autotrophic as well as non-Polygalaceae-mycoheterotrophic plants (the latter of which are also marked in red). OTUs are numbered from 1 - 31.1. BLAST similarity values are plotted into the clade or on the left side of the respective clade if they are 97% or larger. Additionally, BLAST-values of special interest are plotted in black or in red (mycoheterotrophic hosts) on the right side of the tree. OTUs comprising only symbionts from chlorophyllous hosts in Polygalaceae are marked in green. OTUs comprising also non- Polygalaceae-mycoheterotrophic host plants are marked in green with a red frame. OTUs comprising predominantly symbionts from *Epirixanthes* are red with a green frame. The single OTU comprising symbionts from chlorophyllous and mycoheterotrophic Polygalaceae as well as from non-Polygalaceae-mycoheterotrophic host plants is marked in yellow (OTU 30). Clades (OTUs) with conspicuous phylogenetic clustering of symbiont sequences from non-Polygalaceae-mycoheterotrophic plants are marked in red capital letters. Clades of special interest for this study are marked with a black dot if the bootstrap value of the respective branches is ≥ 0.60 . See the appendix (p. 312 pp.) for an enlarged version of the phylogenetic tree.



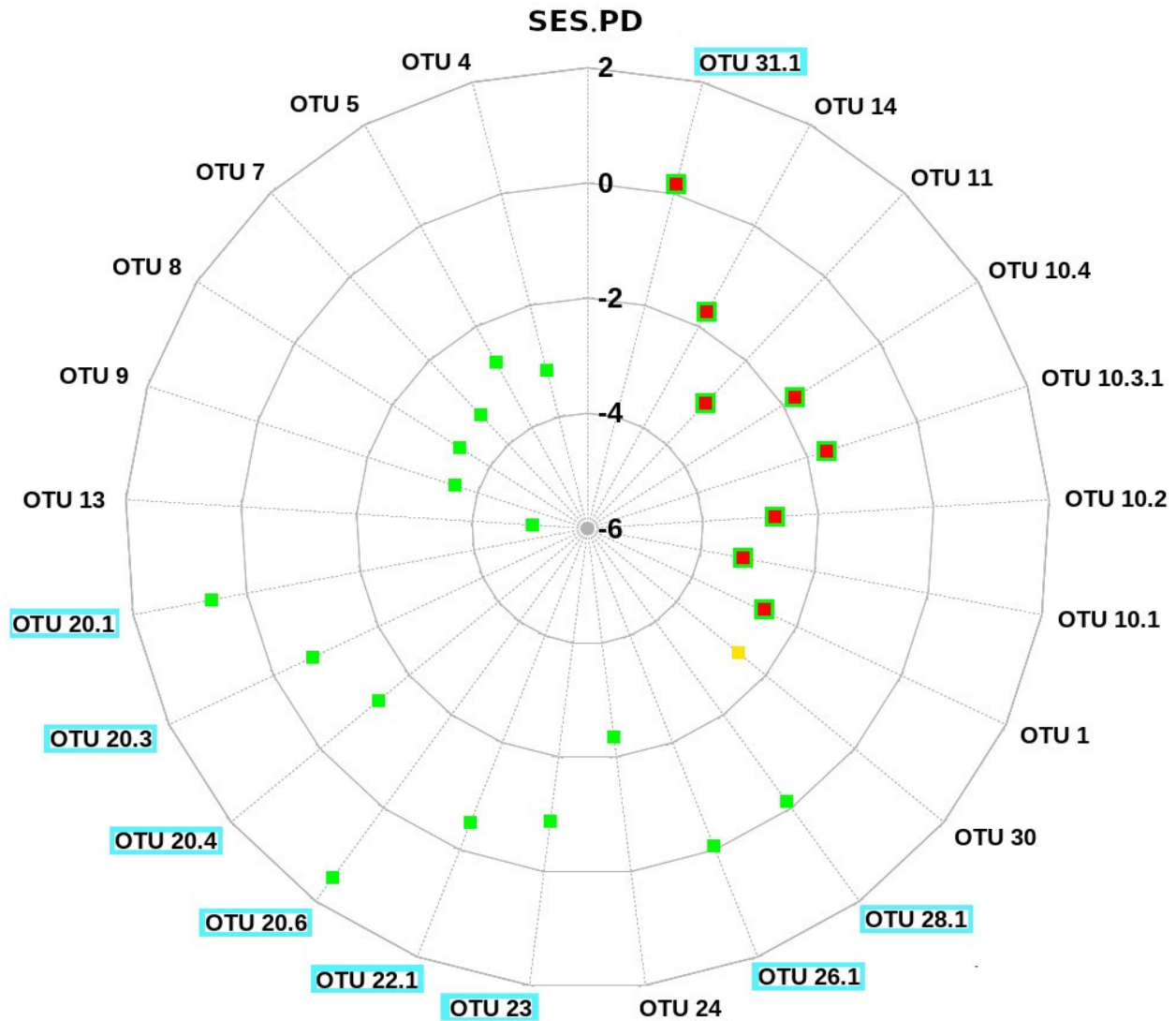


Fig. 2: SES.PD values for all OTUs comprising more than one individual sequence of symbionts from species in the Polygalaceae. In case of the OTUs 7, 20.6 & 23 the respective sequences were isolated from one single root sample only. OTUs comprising only fungal symbionts from chlorophyllous Polygalaceae are marked in green, OTUs comprising only fungal symbionts from mycoheterotrophic Polygalaceae are marked in red with green frame, one single OTU (OTU 30, yellow) includes fungal symbionts from Polygalaceae of both trophic strategies as well as from non-Polygalaceae-mycoheterotrophic plants. OTUs which have higher p -value than 0.05 are marked in turquoise. See table S-3 (p. 319) in the supplementary material for SES.PD raw data.

Our phylogenetic results indicate three characteristic association patterns between Polygalaceae and their mycorrhizal fungi:

1.) All mycorrhizal symbionts of the investigated Polygalaceae fall into the phylum Glomeromycota. They are not restricted to a single fungal genus but are members of the families Glomeraceae, Acaulosporaceae, Gigasporaceae and Archaeosporaceae. However, most of the sequences fall into the family Glomeraceae (formerly *Glomus* Group A) and, although to a lesser extent, into the Acaulosporaceae.

> This result was already anticipated by the results of our previous study on the fungal symbionts in European Polygalaceae (Rath et al. 2013) as well as the study by Mennes et al. (2015) on the fungal symbionts in the mycoheterotrophic genus *Epirixanthes* and its chlorophyllous sister taxon *Salomonina*. The combined data of all three studies, therefore, provides a solid proof that presumably all members of Polygalaceae are able to form a symbiosis with a wide range of arbuscular mycorrhizal fungi. Nevertheless, we observed a preferential association with members of the Glomeraceae and, to a lesser extent, Acaulosporaceae while members of the Gigasporaceae and Archaeosporaceae are only found very seldom as mycorrhizal partners in the investigated species. Remarkably, such a preference for Glomeraceae can also be observed in most mycoheterotrophic plant lineages (Franke et al. 2006, Yamato et al. 2011a,b; 2014, Waterman et al. 2013, Suetsugu et al. 2014, Merckx et al. 2017). In this regard, Franke et al. (2006) argued with the more vigorous intraradical growth of Glomeraceae (as defined by Schüßler et al. 2001) compared to members of the Acaulosporaceae and Gigasporaceae (Hart & Reader 2001). However, although this argument is plausible in chlorophyllous species, too, where a high density of vital intraradical fungal structures (i.e. arbuscules, hyphal coils) means more transfer of nutrients into the host, it seems more valid for mycoheterotrophic plants which should especially benefit from the accumulation of fungal biomass inside their roots by means of fungal digestion for carbon gain. Moreover, the detection of fungi from less vigorous colonisers Acaulosporaceae and Gigasporaceae in many mycoheterotrophic plants (Merckx et al. 2012) contradicts this "Glomeraceae-centric" view also in the field of mycoheterotrophic plants.

2.) Despite their wide phylogenetic origin, the targeted fungal symbionts in the roots of the investigated Polygalaceae are far from being arbitrarily spread throughout the entire system of Glomeromycota. Sequences from the investigated host species tend to cluster together with each

other or with sequences from already published symbionts of Polygalaceae from Europe and Southeast Asia (Rath et al. 2013, Mennes et al. 2015) in monophyletic clades (see p. 292>Fig. 1 III, IV, V, VI, VII, IIX: OTUs 6, 7, 8, 9, 13, 20.1, 20.6, 22.1, 23, 26.1, 28.1). Many of these clades constitute operational taxonomic units (OTUs) with a high BLAST derived sequence similarity of 97 % or higher towards a specified reference sequence (Fig. 1 III, IV, V, VI, VII, IIX: OTUs 7, 8, 9, 13, 20.6, 22.1, 23, 26.1, 28.1). Ten clades comprise solely sequences from European species of *Polygala* or, respectively, Southeast Asian members of *Salomonina* and mycoheterotrophic *Epirixanthes* (Fig. 1 II, III, IV, V, VI, VII, IIX: OTUs 4, 5, 10.1, 10.2, 10.3, 10.4, 11, 14, 20.4, 24, 30, 31.1). However, these clades have already been found in Rath et al. (2013) or Mennes et al. (2015), respectively.

3.) Usually, high sequence similarity of more than 97 % corresponds with the monophyly of the respective clade. In some cases, despite high sequence similarity values though, OTUs describe paraphyletic groups (OTU 1, OTU 20.3 & OTU 20.7).

4.) OTUs comprising only symbionts from chlorophyllous Polygalaceae can show similar or even smaller SES.PD values than OTUs including only sequences from mycoheterotrophic Polygalaceae or OTU 30 which comprises hosts of both trophic strategies (p. 293>Fig. 2). Hence, mycoheterotrophic species of Polygalaceae seem not to prefer more closely related fungi than most of the chlorophyllous members of the family do.

> Due to the findings in previous studies, the characteristic clustering of fungal symbionts from the host species analysed in this study could be expected (Rath et al. 2013, Mennes et al. 2015). However, this observation is still very remarkable considering the enlarged species plot of our study. In any case, these results contradict the long-held view on the unspecific nature of the arbuscular mycorrhiza (Smith & Read 1997, Hoeksema 1999). Recent findings hint to an unequal species distribution of arbuscular mycorrhizal fungi at least on a local scale (e.g. Öpik et al. 2003, 2013; Davison et al. 2015). On first sight, this could support the notion of availability of fungal symbionts in the respective habitat as a decisive factor for shaping the fungal community within the roots of Polygalaceae. However, in light of the geographic dimensions covered by this study and our observation that OTUs in many cases describe clades comprising symbionts from host taxa of very different ecosystems, habitat filtering seems very unlikely to be the reason for the conspicuous phylogenetic clustering of symbionts in roots of Polygalaceae [but see Davison et al. (2011) and

Gomes et al. (2017) for more information regarding this topic]. Our data rather supports the idea of specificity as a phylogenetically fixed trait in this plant family (Rath et al. 2013). Since previous studies strongly support a progressive stage of mycotrophy in the phylogenetic more advanced lineages of this family (Rath et al. 2013, Rath et al. manuscript A), it is tempting to refer to this trait as the underlying reason for the obvious degree of specificity in the Polygalaceae. Hence, the increased mycotrophy in this plant family might very likely have restricted the set of compatible fungal symbionts over the course of evolution - a notion which we will pick up in detail later but was already shown for several basidiomycetous- and glomeromycetous-associated plant lineages that comprise mycoheterotrophic species (Waterman et al. 2013, Yamato et al. 2014, Mennes et al. 2015).

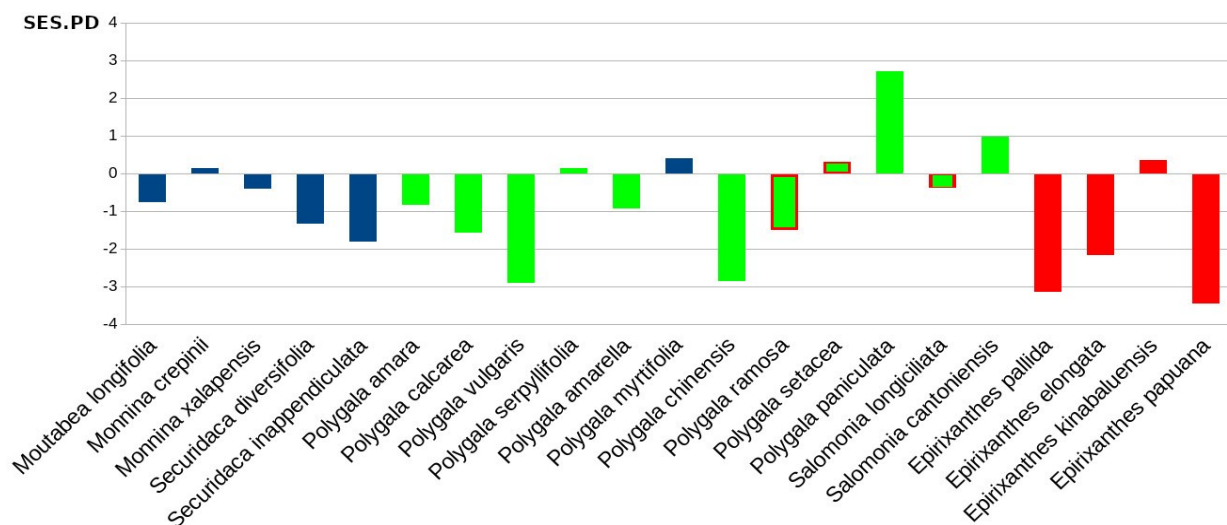


Fig. 3: SES.PD values of symbiont sequences calculated on species level of the respective host from all chlorophyllous species of Polygalaceae of this and of two previous analyses (Rath et al. 2013, Mennes et al. 2015). Blue bars = woody lifeforms; green bars = chlorophyllous herbs; green bars with red frame = presumably partial mycoheterotrophic herbs; red bars = mycoheterotrophic species in *Epirixanthes*. *p*-values for all species except *Securidaca inappendiculata*, *Polygala calcarea*, *P. vulgaris*, *P. chinensis*, *Epirixanthes pallida*, *E. elongata*, *E. papuana* are below 0.05, *Securidaca diversifolia*, *P. ramosa* are slightly above 0.05. *p*-values of all other species are significantly above 0.05. For raw data of SES.PD values see table S-4 (p. 319) in the supplementary material.

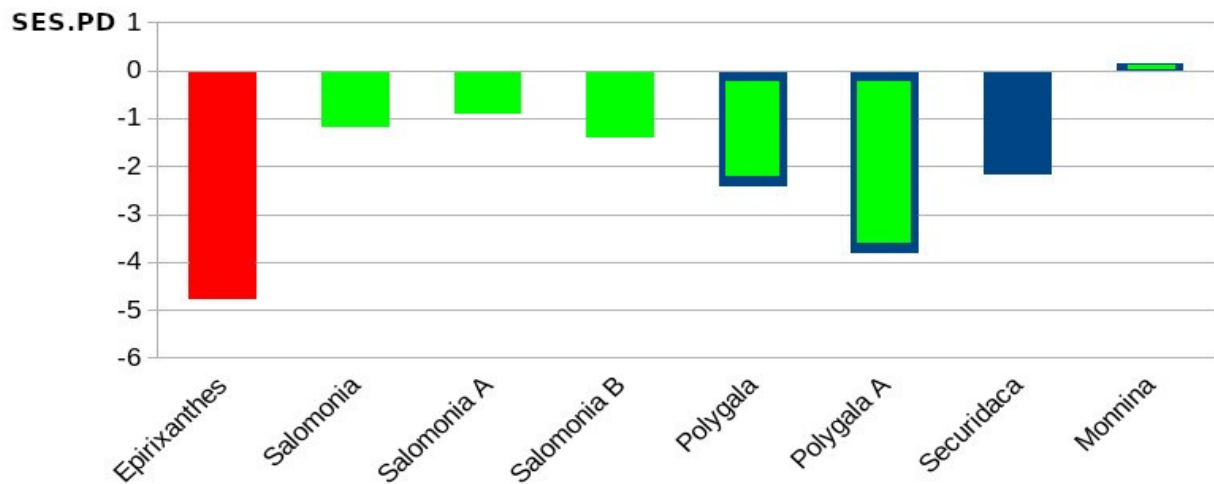


Fig. 4: SES.PD values of fungal symbionts on genus level of host plants. All fungal symbionts of Polygalaceae found in this and in two previous studies (Rath et al. 2013, Mennes et al. 2015) were used for the computation of SES.PD values. red bar = mycoheterotrophic plant genus; green bars = genus comprises only chlorophyllous herbs; green bars with blue frame = genus comprises chlorophyllous herbs and woody species; blue bars = genus consists of woody species; blue with green frame = genus comprises many woody species. Salomonina = SES.PD values for all symbiont sequences from hosts in *Salomonina*; Salomonina A = SES.PD values of symbionts from hosts in *Salomonina* that fall into the Glomeraceae; Salomonina B = SES.PD values of symbionts from hosts in *Salomonina* that fall into the Acaulosporaceae; Polygala = SES.PD values of symbionts from all hosts in *Polygala*; Polygala A = SES.PD value of all symbionts from hosts in *Polygala* except one single symbiont in Gigasporaceae from *P. paniculata* (MR 363, see Fig. 1 F). *p*-values for *Epirixanthes*, *Polygala*, *Polygala A* and *Securidaca* are below 0.05. Those for *Salomonina*, *Salomonina A* & B as well as *Monnina* are above 0.05. For raw data of SES.PD values see table S-5 (p. 320) in the supplementary material.

5.) Sequences of the investigated chlorophyllous Polygalaceae (*Polygala* spp., *Monnina* spp., *Securidacea* spp., *Moutabea*, *Xanthophyllum*) did not show a close phylogenetic relationship with sequences from chlorophyllous *Salomonina* spp. or mycoheterotrophic species of *Epirixanthes* [except one sequence from *Polygaloides chamaebuxus* (MR163) - a european species which due to methodical problems could not be included in Rath et al. (2013) that showed 98 % sequence similarity to one cloned sequence from *Epirixanthes pallida* (KR002156) although it did not form a monophyletic group with this sequence (Fig. 1 B: OTU 2)]. As already described in Mennes et al. (2015), sequences from the closely related genera *Salomonina* and *Epirixanthes* usually formed clades of their own and were found together in a common clade only once (see OTU 30).

> The frequent clustering of symbiont sequences from chlorophyllous Polygalaceae in a set of phylogenetically distinct clades which in most cases do not comprise sequences from mycoheterotrophic *Epirixanthes* spp. (except OTU 30) strongly argues against a selection of a

subset of symbionts from a supposable common set of Polygalaceae symbionts in course of the evolution of mycoheterotrophy (see Yamato et al. 2014 for a case study in *Petrosavia* where a subset of symbionts is targeted in course of the evolution of mycoheterotrophy in Petrosaviaceae).

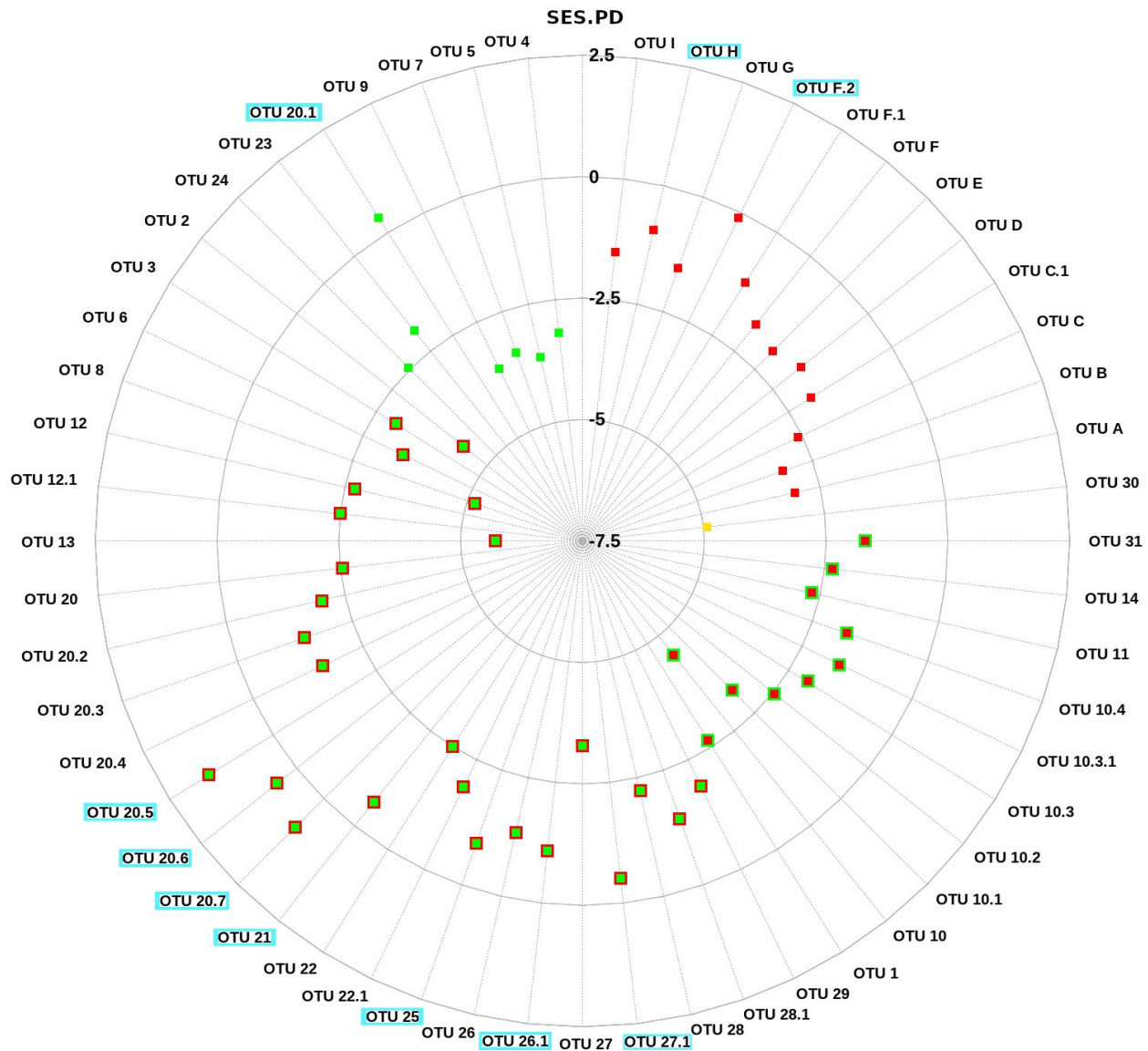
6.) We combined our data with those of Rath et al. (2013) and Mennes et al. (2015) and calculated the degree of relatedness of the symbiont sequences on host species and host genus level (p. 296 & 297>Figs. 3 & 4). On species level, all chlorophyllous Polygalaceae show less phylogenetic relatedness of their associated fungal symbionts than *Epirixanthes* (except *E. kinabaluensis* which does not show an increased relatedness of its associated symbiont community). Even if we have to act with caution in case of *P. chinensis*, *Securidaca inappendiculata* and *Moutabea longifolia*, of which only one single root sample per species could be used for rDNA-amplification, the finding of a markedly increased relatedness of symbionts from many herbal species like *P. vulgaris*, *P. amara*, *P. calcarea*, *P. ramosa* and *Salomonina longiciliata*, blurs the differences of mycoheterotrophic and autotrophic life strategies in Polygalaceae regarding specificity. This impression becomes even more obvious if we compare SES.PD values on host genus level. In that approach symbionts of genus *Polygala* also express a considerable high degree of relatedness in their symbionts. If we remove the single symbiont sequence from *Polygala paniculata* in the Gigasporaceae, this value increases even further (Fig. 4, Polygala A). Solely herbal genus *Salomonina* however, despite its close phylogenetic relation to *Epirixanthes* and morphological traits arguing for progressive mycotrophy or even partial mycoheterotrophy in some species (e.g. *S. longiciliata*; Rath et al. manuscript A), shows the lowest degree of relatedness in its associated symbionts from all herbal genera in this study even in case of splitting the sequences into *Salomonina A* which comprises all sequences from Glomeraceae and *Salomonina B* which comprises only those of Acaulosporaceae. Regarding the more ancestral host lineages in our plot, the genus *Securidaca* also shows a comparatively high degree of symbiont relatedness although we still have to consider the small sample plot in case of this genus. However, the increased symbiont relatedness in woody *Securidaca* is in strong contrast to positive values for SES.PD of the closely related genus *Monnina*. *p*-values for SES.PD values on host species and host genus level are frequently above 0.05 which is very likely due to the small number of available symbiont sequences in some of the investigated host taxa. Nevertheless, on species level *P. chinensis*, *P. vulgaris*, *Polygala ramosa* and *Securidaca* spp. show *p*-values below or very slightly above 0.05 (*P. ramosa*) which is also true for *Polygala*, *Polygala A* and *Securidaca* on genus level. Since *Epirixanthes* spp. (except *E. kinabaluensis*) do also show very low *p*-values, we can at least safely compare SES.PD values in these 8 species.

> Considering the SES.PD values on the species level, our broadened analysis basically confirms the findings by Mennes et al. 2015. Most species of *Epirixanthes* seems to be more “picky“ in their symbiont choice than most chlorophyllous autotrophs in *Polygala* and, quite interesting, considerably more selective than species of its sister taxon *Salomonina*. However, despite the fact that *E. kinabaluensis* is also rather unspecifically associated, our finding that *Polygala chinensis* and *P. vulgaris* are similar specific as *E. papuana* underlines the notion of Mennes et al. (2015) that in *Polygala* spp. specificity might be more pronounced than might be expected in chlorophyllous plants. Our enlarged species plot stresses this notion by proving an unexpectedly high level of phylogenetic relatedness of symbionts in many of the investigated species of *Polygala*. This is of special significance if we consider the far larger phylogenetic and geographic sample plot of *Polygala* compared to *Salomonina* and *Epirixanthes*. In this regard of interest might also be the relatively high degree of symbiont relatedness in the autotroph species of *Securidaca* compared to the likewise woody species in *Monnina* and *Moutabea*. Maybe, the slightly closer phylogenetic relation to *Polygala* (Forest et al. 2007, Mennes et al. 2015) can serve as an explanation for the higher degree of specificity in *Securidaca* compared to *Monnina* and *Moutabea*. However, these observations could also be explained by less sophisticated mycorrhizal structures in *Moutabea* and *Monnina* which might indicate a less progressive stage of mycotrophy in this genera, whereas *Securidaca*, despite having still many primitive features regarding its mycorrhiza, is closer in its mycorrhizal adaptations to the highly advanced herbs in *Polygala*, *Salomonina* and *Epirixanthes* (Imhof 2007, Rath et al 2013, Rath et al. manuscript A). However, in case of *Moutabea* the small sample plot (two individuals, collected in close proximity and represented only by one root sample per individual) has to be taken into consideration when interpreting our results. Summing up, the comparably high degree of symbiont relatedness in some green Polygalaceae on genus level (*Polygala*, *Securidaca*), as well as the lack of increased relatedness in symbionts from *E. kinabaluensis*, make differences in partner choice between autotrophic and mycoheterotrophic members in the family become more blurry. Hence, our results give support to Mennes et al. (2015) which compared the specificity in *Epirixanthes* spp. to phylogenetically older mycoheterotrophic lineages (e.g. *Afrothismia*; Merckx et al. 2008) and classified specificity in *Epirixanthes* spp. as less pronounced. Moreover, since even morphologically far derived, presumably partial mycoheterotrophic species in *Salomonina* (*S. longiciliata*) and *Polygala* (*P. ramosa*, *P. setacea*) are also found to associate with fungi from quite various phylogenetic positions, our approach supports the notion that specificity in a very narrow sense is no prerequisite for the evolution of mycoheterotrophy (Merckx et al. 2012, Mennes et al. 2015). However, Mennes et al. (2015) also

argued with the relatively young evolutionary age of *Epirixanthes* as a possible explanation for the lack of absolute taxonomic specificity in mycoheterotrophic Polygalaceae. This is indeed a reasonable explanation. However, this notion is based on the still widespread opinion of high taxonomic specificity as an inherent feature of mycoheterotrophic evolution (e.g. Smith & Read 2008, Yamato et al. 2011b, Waterman et al. 2013, Yamato et al. 2014). Beside the evidence for low specificity also in some phylogenetic old mycoheterotrophic lineages (e.g. Merckx et al. 2012, Suetsugu et al. 2014), this "mycoheterotrophy-centric" view can lead to an underestimation of the comparably high level of specificity in the chlorophyllous relatives of mycoheterotrophic *Epirixanthes*. Moreover, by focussing on the mycoheterotrophic "particularities" in fungal partner choice we might easily give away the chance to learn more about possible functional (i.e. ecophysiological) constraints for the evolution of specificity in chlorophyllous ancestors of mycoheterotrophic plants.

7. Most OTUs of the investigated symbionts of Polygalaceae comprise symbionts from non-Polygalaceae-mycoheterotrophic host plants or, vice versa, OTUs established by symbionts from such mycoheterotrophic plants comprise sequences of symbionts from chlorophyllous Polygalaceae (Fig. 1 II - IIX). This pattern is most obvious in the OTUs 2, 13, 25, 26.1, 29, 30 where symbionts from multiple species and/or genera of mycoheterotrophic hosts (including *Epirixanthes*) cluster together with symbionts from chlorophyllous hosts in Polygalaceae. SES.PD values of such "mixed clades" are of special interest since, in some cases (Fig. 5, OTU 2, 8, 13), they show a more significant within-clade-relatedness (i.e. lower SES.PD value) of their symbionts than many clades comprising symbionts from *Epirixanthes* or those comprising multiple symbionts from various non-Polygalaceae-mycoheterotrophic hosts alone.

Fig. 5 (p. 301): SES.PD values for all OTUs comprising at least one single fungal symbiont sequence from species in Polygalaceae [similarity threshold $\geq 97\%$ to a reference sequence]. Clades with symbionts from *Epirixanthes* are marked in red with green frame. Clades comprising solely fungal symbionts from chlorophyllous Polygalaceae are marked in green. Clades comprising symbionts from chlorophyllous Polygalaceae as well as mycoheterotrophic non-Polygalaceae are marked in green with a red circle. Clades with fungal symbionts from chlorophyllous Polygalaceae, *Epirixanthes* and non-Polygalaceae-mycoheterotrophic hosts are marked in yellow (OTU 30). Clades comprising symbiont sequences from multiple different hosts of non-Polygalaceae-mycoheterotrophic plants are marked in red. OTUs which have higher p -value than 0.05 are marked in turquoise. For raw data of SES.PD values see table S-6 (p.320) in the supplementary material.



> Especially these findings draw our interest because such a conspicuous phylogenetic overlapping of symbionts seems highly unlikely just by chance and argues most convincingly against the view of unique functional properties in fungal associates of green autotrophic Polygalaceae compared to the mycoheterotrophic species in this family. Even though it is hard to formulate a hypothesis on the exact symbiotic properties of the fungal symbionts lacking physiological experiments, the conspicuous overlapping of symbionts from chlorophyllous and mycoheterotrophic hosts might give us some clues in this regard. However, before we can follow this approach any further, some background information should be given:

i) Arbuscular mycorrhizal fungi are not identical in their symbiotic performance. Physiological experiments have convincingly shown the dependency of the symbiotic outcome on the actual host-fungus-combination (e.g. Klironomos 2003, Helgason et al. 2002, Smith & Smith 2011). Thus some fungi support the host more than others do (Bever et al. 2009), and sometimes the fungal symbiont even suppresses the host plant growth (Crush 1976, Kiernan et al. 1983). Furthermore, at the local scale, the abiotic context like for example soil nutrient availability and nutrient ratios (e.g. P : N : K) and other edaphic constraints do influence the actual outcome of the symbiotic relationship between arbuscular fungi and autotrophic plants (e.g. mutualistic, commensalistic or even parasitic) within a habitat (so called “*local environmental drivers*“; Johnson 2010, Sheldrake et al. 2017, Gomes et al 2019b). Hence, the view of a continuum of mutualistic fungal abilities ranging from positive over neutral to negative effects on host plant growth in terms of biomass increase is becoming ever more accepted (Johnson et al. 1997).

ii) Host plants are able to discriminate the more beneficial fungi within their roots and transfer carbohydrates preferentially to such better performing fungal strains (Kiers et al. 2011) which might be the underlying principle of how the host plant can actually influence the composition of its fungal community and for example avoid being colonized by less beneficial fungal strains (e.g. Zhang et al. 2010). The other way around, Fellbaum et al. (2012, 2014) showed arbuscular fungi to be able to reward superior donors of assimilates by allocating more mineral nutrients to the respective host plants.

iii) Judging from the mere existence of fully mycoheterotrophic species in Polygalaceae, as well as the various morphological characteristics within the many herbal members in the family (e.g. reduced shoot and leaf size, simplified root system and advanced intraradical mycorrhizal structures; compare Imhof 2007, Rath et al. 2013, Rath et al. manuscript A), some lineages in Polygalaceae seems to display a strong tendency towards increased mycotrophy and should be thus regarded as mycorrhizal specialists. Moreover, in some species of the chlorophyllous genera *Polygala* and *Salomonina*, morpho-anatomical data strongly support the notion of an especially progressive stage of mycotrophy which might very likely have already crossed the line to partial mycoheterotrophy in some of these chlorophyllous species (Rath et al. 2013 & manuscript A).

Keeping these informations in mind we might ask what kind of fungal traits would be favourable not only for *Epirixanthes* and other mycoheterotrophic hosts but at the same time also for the

investigated chlorophyllous Polygalaceae? Here, we do not try to address differences of very specific traits like for example variation in hyphal growth rates or colonization strategies between fungal clades (e.g. Hart & Reader 2001, Franke et al. 2006) but focus only on fundamental demands specified by the nutritional strategy of the plant host. Hence, we should ask what seems to be the most important constraint in the ontogeny of a mycoheterotrophic plant? Obviously, this has to be the insurance of the carbon supply by the fungal symbiont. Since arbuscular mycorrhizal fungi are strictly biotrophic, the ultimate source for carbon are the surrounding autotrophic plants (“donor-plants”) in which roots the fungal symbiont of the mycoheterotrophic plants has to be established at the same time to ensure the carbon transfer from the donor-plants to the mycoheterotrophic “acceptor-plant”. Thus the most critical condition for the mycoheterotrophic way of nutrition seems to be the adaptation to fungi that are also accepted as fungal symbionts in the neighbouring autotrophs. Evidence for such an adaptation of mycoheterotrophic plants towards fungal symbionts that are also established in nearby autotrophs was found in *Voyria*, *Voyriella*, *Petrosavia* and *Sciaphila* (Bidartondo et al. 2002, Yamato et al. 2011b, Sheldrake et al. 2017). However, being established in the neighbouring autotrophs is just one, allowedly very obvious part of the constraints mycoheterotrophic plants “demand“ of their fungal symbionts. In theory, another important trait of such fungi should be their establishment not only in a few but in a multitude of the surrounding autotrophs. The latter point is especially important not only because it secures a sufficient amount of carbon is transferred into the achlorophyllous “parasite” but also because the arbuscular fungi itself is able to discriminate against less beneficial hosts. Hence, provided the mycoheterotrophic plant offers no equally “valuable” symbiotic compensation, the fungus should, in theory, select against such an obviously non-beneficial plant associate. This discrimination, however, should be less pronounced the more autotrophic plants are connected with the respective fungal individual at the same time. Hence, masking its “parasitic footprint” by choosing fungi which are well established in many surrounding autotrophs, might be essential for the fully mycoheterotrophic plants. In the world of mycoheterotrophic associations, however, such a diffuse symbiotic scenario might even allow for the mycoheterotrophic plant to take carbon in excess and give back a fraction of the that carbon to “reward” the fungal symbionts. This could have also be an additional factor stabilizing this special kind of symbiosis on evolutionary scale. Although there is no direct ecophysiological data supporting our hypothesis in the field of mycoheterotrophic plants, we can find a very similar phenomenon in nature where nonbeneficial (i.e. parasitic) strains of arbuscular mycorrhizal fungi avoid being sanctioned by their autotrophic host plant by “hiding in a crowd” of their mutualistic fungal counterparts within the same host plant (Hart et al. 2013). Returning to the

premise of our own study, the distinct trait(s) that has finally led to the establishment of the respective fungus in many of the surrounding autotrophs cannot be addressed exactly so far. Nevertheless, since solely non-beneficial fungi would also get counterselected by the autotrophic donor-plants, the idea of the respective fungi being rather beneficial symbionts in these autotrophs seems not to be far fetched. For example, such beneficial fungi might be especially good suppliers of phosphate or efficient mediators of resistance against soilborne pathogens (Smith & Read 2008). In any case, if these fungi are widespread, they have to be able to implement their mutualistic capabilities in a multitude of systematically different hosts and should thus be considered as generalists. However, such generalists might not be the only preferred targets for mycoheterotrophic species. In case of mycoheterotrophic plants growing in sites with less plant biodiversity but with a few plant species dominating the habitat instead, it would also be beneficial for the mycoheterotrophic plant to target fungal symbionts which in turn are specific to such dominant autotrophs. In line with our previous argumentation, this would also mask the parasitic impact by the mycoheterotrophic plant. In this regard, the finding of more than 40 % shared symbiont identities between a dominant autotroph (*Chamaecyparis obtusa*) and the sympatric mycoheterotrophic *Petrosavia sakurarii* is quite interesting (Yamato et al. 2011b). Finally, the specific association to fungi which are in turn specifically associated with very potent C-donors, like for example large trees, could equally diminish the parasitic outcome for the fungus by the mycoheterotrophic association (compare Roy et al. 2009 for a case study in Orchidaceae). In all scenarios, fungi that combine these properties (i. d. the ability for generalistic symbiosis, specificity towards a dominant autotrophic plant or towards a very potent C-donor among the surrounding photosynthetic plant species) might be not ubiquitous within the Glomeromycota and may thus represent only a subset of the fungal assemblage at a given location. This could explain the frequent targeting of the same or closely related fungi by phylogenetically very different taxa of mycoheterotrophic plants (e.g. Merckx et al. 2012, Merckx et al. 2017) and give an indication why mycoheterotrophic plants are not always grow in otherwise seemingly suitable habitats or, the other way around, even different taxa of them do frequently found together at local hot spots (as for example described in Gomes et al. 2019a). However, due to the physiological advantage for the fungi to interact with many different host plants, especially strong C-donors or the dominant autotrophic plants at a given site, these traits might have evolved more than once within the arbuscular mycorrhizal fungi. The latter could explain why fungi targeted by mycoheterotrophic plants are not limited to only a few taxa but found along a broad phylogenetic spectrum (see Merckx et al. 2012 and Waterman et al. 2013 for a synopsis on the phylogenetic range of symbionts

in mycoheterotrophic plants). Would these ideas also explain the very similar association patterns in the chlorophyllous Polygalaceae? As already mentioned, some herbs in *Polygala* and *Salomonina* might already have evolved partial mycoheterotrophy. In that case the respective species would benefit from fungal symbionts which are established in many surrounding plants the same way fully mycoheterotrophic species do. However, considering the morphological signs for an increased mycotrophic status especially in the herbs of *Polygala* and *Salomonina*, adaptation to a set of especially beneficial fungi (e.g. in terms of nutrient transfer) seems to be a reasonable evolutionary step advanced mycotrophic species. Apart from this, we might argue with the stepwise shift from more erratic fungal growth patterns in the more ancestral woody species to highly sophisticated hyphal growth patterns (morphotypes) in the herbal lineages of *Polygala*, *Salomonina*, *Asemeia* and *Polygaloides* (Rath et al. manuscript A). In these species the more efficiently structured mycorrhiza could result in an improved cost/benefit ratio in comparison to other autotrophic host plants at the specific site [where "cost" means the mycorrhizal biomass (= fungal hyphae + colonizable host tissue) which is to be sustained by the host in order to benefit from the association in terms of mineral nutrients]. In this scenario, the derived lineages in Polygalaceae might be seen as extreme mycorrhizal specialist that already employ a specific kind of "facultative epiparasitism" (Molina 1992, Bruns et al. 2002) by nesting into a common mycorrhizal network to which sustaining they provide fewer resources than other, less elaborated mycorrhizal plants (while still benefiting equally or even more from this association due to their more efficiently structured mycorrhiza). Hence, similar to mycoheterotrophic plants, chlorophyllous Polygalaceae would benefit from a specific association with fungal symbionts that are established in many of the surrounding autotrophs to ensure to link into a resourceful hyphal network in which they can afford to „give“ less without being sanctioned by the fungal symbionts. Such a strategy can also be seen as a preadaptation for the evolution of mycoheterotrophy.

Finally, this study does not exclude the possibility of ongoing specialisation even in cases where preferential associations, like in Polygalaceae, do provide an evolutionary stable strategy. However, this would only be favoured in habitats which are stable for a long period of time in terms of their abiotic and biotic environmental conditions (Hoeksema 1999, Mennes et al 2015). In such habitats, in theory, no significant change in species composition of autotrophic donor-plants and their mycorrhizal fungi, respectively would occur and hence no selective force on the mycoheterotrophic plant to switch its fungal symbionts. In the long run, this would allow for ongoing adaptation on a very small set of physiologically suitable fungi by the mycoheterotrophic plant (Merckx et al. 2009).

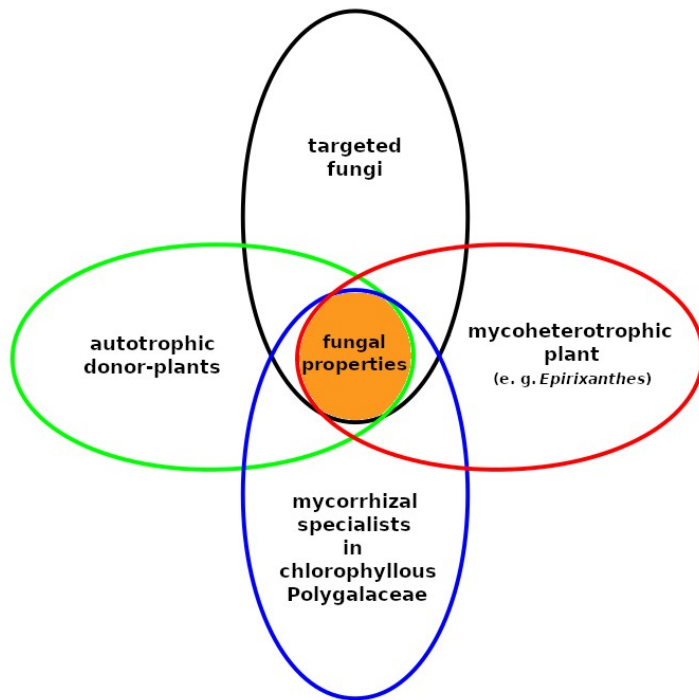


Fig. 6: Model based on symbiotic function (here with focus on ecophysiology) for evaluation of underlying reasons for specificity in mycoheterotrophic plants and their chlorophyllous relatives in Polygalaceae. By regarding the common "interests" of the mycorrhizal specialists of chlorophyllous Polygalaceae, of the autotrophic donor-plants as the ultimate source of fungal-derived C in mycoheterotrophic plants (e.g. *Epirixanthes*) and of the autotrophic donor-plants, functional constraints for specificity towards the respective fungi might be elucidated. Basic ecophysiological traits of AM-fungi are also considered in this model.

Conclusions

In Polygalaceae, the view of mycoheterotrophic lifeforms as being especially distinct in their association with fungal symbionts is only supported by the SES.PD values on species level (with the exception of *E. kinabaluensis*) whereas the majority of our data does not allow to distinguish clearly between chlorophyllous and mycoheterotrophic species in this plant family. Since chlorophyllous species frequently target fungal clades which also comprise symbionts from various mycoheterotrophic species, our data rather support the notion that autotrophic ancestors of mycoheterotrophic species might have already preselected fungi which are also compatible with the mycoheterotrophic lifestyle. Furthermore, our findings might give support to the already published notion that lack of absolute specificity in *Epirixanthes* could be due to its rather young evolutionary age. However, in light of the finding of low specificity even in more ancestral mycoheterotrophic lineages, this study argues for an additional explanation. Our hypothesis judges absolute taxonomic specificity not as the ultimate adaptation in fully mycoheterotrophic plants but only as one of two alternative scenarios. The alternative scenario, which might be implemented in Polygalaceae, is a preferential association towards a set of phylogenetically distinct fungi (preferential association) as

a dedicated evolutionary strategy which has already been realized in the chlorophyllous ancestors of mycoheterotrophic species in this family. Finally, we strongly argue for a functional-based evaluation of specificity and fungal partner choice in mycoheterotrophic plants, which integrates the ecophysiological needs of all participants in the mycorrhizal symbiosis and may help to better understand the functional reasons behind preferences towards specific fungal clades in mycoheterotrophic plant lineages.

Final notes

We are aware that our model is largely based on circumstantial evidence although it integrates current knowledge from many scientific disciplines like morphology, ecophysiology, ecology and of course molecular systematic data from this study itself. However, it is tempting to use our functional based model for evaluation of preferences or even high degrees of specificity towards fungal symbionts because

- our model does not focus solely on the specific needs of mycoheterotrophic plants, but integrates the symbiotic "interests" of the autotrophic donor-plants, of their co-associated fungi and of the chlorophyllous relatives of the mycoheterotrophic species and, in doing so, setting the evaluation of specificity in an evolutionary framework which is based on symbiotic function as well as phylogenetic considerations regarding the investigated Polygalaceae.
- it does not depend on assumptions of very specific functional traits in the targeted fungi. In contrast, it only argues on the base of fundamental notions on the ecophysiological needs of the symbiotic fungi, the autotrophic donor-plants and mycorrhizal specialists in Polygalaceae.
- it favours the evolution of specificity towards a set of symbiont lineages, which is close to actual findings in several mycoheterotrophic plant lineages.
- it does not exclude the possibility of ongoing specialisation towards fungal symbionts.
- it does not contradict the latest findings on the role of other factors like general habitat type and local nutrient ratios (e.g. *local environmental drivers*) for the distribution of mycoheterotrophic plants but fits consistently into the framework of these new scientific datasets.

Acknowledgements

We would like to thank Colin Pendry from the University of Edinburgh, Jack Fisher from Fairchild Botanical Garden in Miami, Rainaldo Arguilar from the biological station “Los Charcos de Osa” (Costa Rica, Puntarenas), Narumol Piwpuan from Kohn Kaeng University in Thailand, Pitak Panyachan from the Queen Sirikit Botanical Garden in Thailand and my good fellows Frank Bonacker and Sebastian Zoll for information and help while collecting the plant material. Neela Enke, Petra Happel, Evelyn Vollmeister, Janine Koepke and all the nice people from the Boelker Lab for their part in realizing this study.

References

- Appelhans M., H. C. Weber, Imhof S. 2008** Rutaceae sampled from Germany, Malta, and Mallorca (Spain) are associated with AMF clustering with *Glomus hoi* Berch & Trappe. *Mycorrhizaa* 18: 263 - 268
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. 1990** Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 215: 403 - 410
- Bever J. D., Richardson S. C., Lawrence B. M., Holmes J., Watson M. 2009** Preferential allocation to beneficial symbiont with spatial structure maintains mycorrhizal mutualism. *Ecology letters* 12: 13 - 21
- Bidartondo M., Redecker D., Hijri I., Wiemken A., Bruns T. D., Dominguez L., Sérsic A., Leake J. R., Read J. R. 2002** Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 419: 389 – 392
- Bruns T. D., Bidartondo M. I., Taylor D. L. 2002** Host specificity in ectomycorrhizal communities: what do the exceptions tell us? *Integrative and Comparative Biology* 42: 352 - 359
- Crush J. R. 1976** Endomycorrhizas and legume growth in some soils of the Mackenzie Basin, Canterbury, New Zealand. *New Zealand journal of agricultural research* 19: 473 - 476
- Daniell T. J., Husband R., Fitter A. H., Young J. P. W. 2001** Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiology Ecology* 36: 203 - 209
- Davison J., Öpik M., Daniell T. J., Moora M., Zobel M. 2011** Arbuscular mycorrhizal fungal communities in plant roots are not random assemblages. *FEMS Microbiology Ecology* 78: 103 - 115
- Davison J., Moora M., Öpik M., Adholeya A., Ainsaar L., Bâ A., ... & Johnson N. C. 2015** Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science* 349: 970 - 973
- Edgar R. C. 2004** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32: 1792 – 1797
- Edgar R. C. 2010** Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26: 2460 - 2461
- Faith D. P. 1992** "Conservation evaluation and phylogenetic diversity." *Biological conservation* 61: 1 - 10.
- Fellbaum C. R., Gachomo E. W., Beesetty Y., Choudhari S., Strahan G. D., Pfeffer P. E., ... & Bücking H. 2012a** Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 2666 - 2671
- Fellbaum C. R., Mensah J. A., Cloos A. J., Strahan G. E., Pfeffer P. E., Kiers E. T., Bücking H. 2014** Fungal nutrient

allocation in common mycorrhizal networks is regulated by the carbon source strength of individual host plants. *New Phytologist* 203: 646 – 656

Forest F., Chase M.W., Persson C., Crane P.R., Hawkins J.A. 2007 The role of biotic and abiotic factors in evolution of ant dispersal in the milkwort family (Polygalaceae). *Evolution: International Journal of Organic Evolution*. 61: 1675 - 1694

Franke T., Beenken L., Döring M., Kocyan A., Agerer R. 2006 Arbuscular mycorrhizal fungi of the *Glomus*-group A lineage (Glomerales; Glomeromycota) detected in myco-heterotrophic plants from tropical Africa. *Mycological Progress* 5: 24 - 31

Gomes S. I., Aguirre Gutiérrez J., Bidartondo M. I., Merckx V. S. 2017 Arbuscular mycorrhizal interactions of mycoheterotrophic *Thesium* are more specialized than in autotrophic plants. *New Phytologist* 213: 1418 - 1427

Gomes S. I., van Bodegom P. M., Merckx V. S., Soudzilovskaia N. A. 2019a Global distribution patterns of mycoheterotrophy. *Global Ecology and Biogeography*. 1 - 13 (Advance online publication)

Gomes S. I., van Bodegom P. M., Merckx V. S., Soudzilovskaia N. A. 2019b Environmental drivers for cheaters of arbuscular mycorrhizal symbiosis in tropical rainforests. *New Phytologist*. (Advance online publication)

Hart M. M., Reader R. J. 2002 Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 153: 335 – 344

Hart M. M., Forsythe J., Oshowski B., Bücking H., Jansa J., Kiers E. T. 2013 "Hiding in a crowd - does diversity facilitate persistence of a low-quality fungal partner in the mycorrhizal symbiosis?." *Symbiosis* 59: 47 - 56

Helgason T., Daniell T. J., Husband R., Fitter A. H., Young J. P. W. 1998 Ploughing up the wood-wide web?. *Nature* 394: 431 - 431

Helgason T., Fitter A. H., Young J. P. W. 1999 Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising *Hyacinthoides non scripta* (bluebell) in a seminatural woodland. *Molecular ecology* 8: 659 - 666

Helgason T., Merryweather J. W., Denison J., Wilson P., Young J. P. W., Fitter, A. H. 2002 Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology* 90: 371 - 384

Helgason T., Fitter A. 2005 The ecology and evolution of the arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologist* 19: 96 - 101

Helgason T., Merryweather J. W., Young J. P. W., Fitter A. H. 2007 Specificity and resilience in the arbuscular mycorrhizal fungi of a natural woodland community. *Journal of Ecology* 95: 623 - 630

Hoeksema J. D. 1999 Investigating the disparity in host specificity between AM and EM fungi: lessons from theory and better-studied systems. *Oikos* 327 - 332

Imhof S. 2007 Specialized mycorrhizal colonization pattern in achlorophyllous *Epirixanthes* spp.(Polygalaceae). *Plant Biology*: 9: 786 - 792.

Johnson N. C., Graham J. H., Smith F. A. 1997 Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum. *New phytologist* 135: 575 - 585

Johnson N. C. 2010 Resource stoichiometry elucidates the structure and function of arbuscular mycorrhizas across scales. *New Phytologist* 185: 631 - 647

Kembel S. W., Cowan P. D., Helmus M. R., Cornwell W. K., Morlon H., Ackerly D. D., Blomberg S. P., and Webb C. O. 2010 Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics* 26: 1463 - 1464

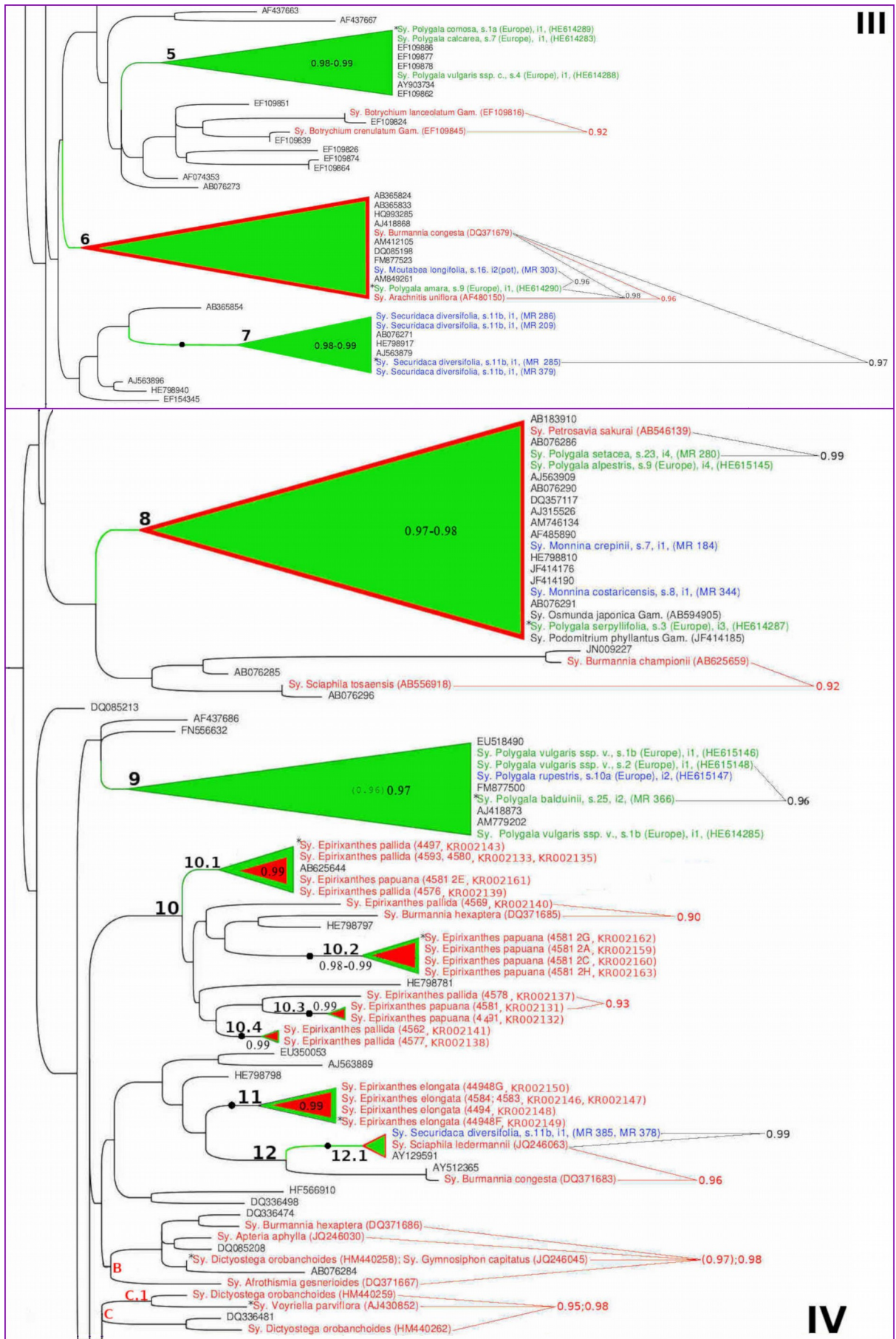
Kiernan J. M., Hendrix J. W., Maronek D. M. 1983 Fertilizer-induced pathogenicity of mycorrhizal fungi to sweetgum seedlings. *Soil Biology and Biochemistry* 15: 257 - 262

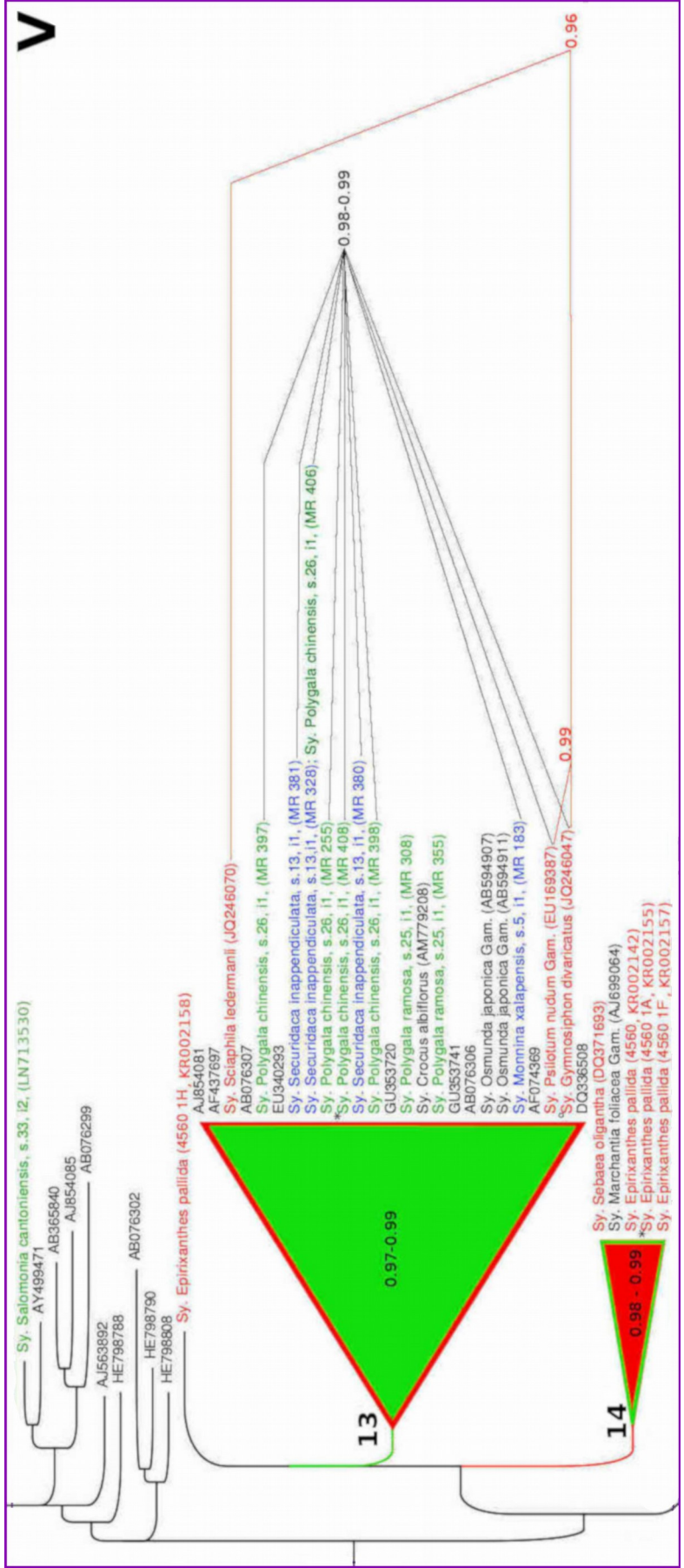
Kiers E. T., Duhamel M., Beesetty Y., Mensah J. A., Franken O., Verbruggen E., ... & Palmer T. M. 2011 Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 333: 880 - 882

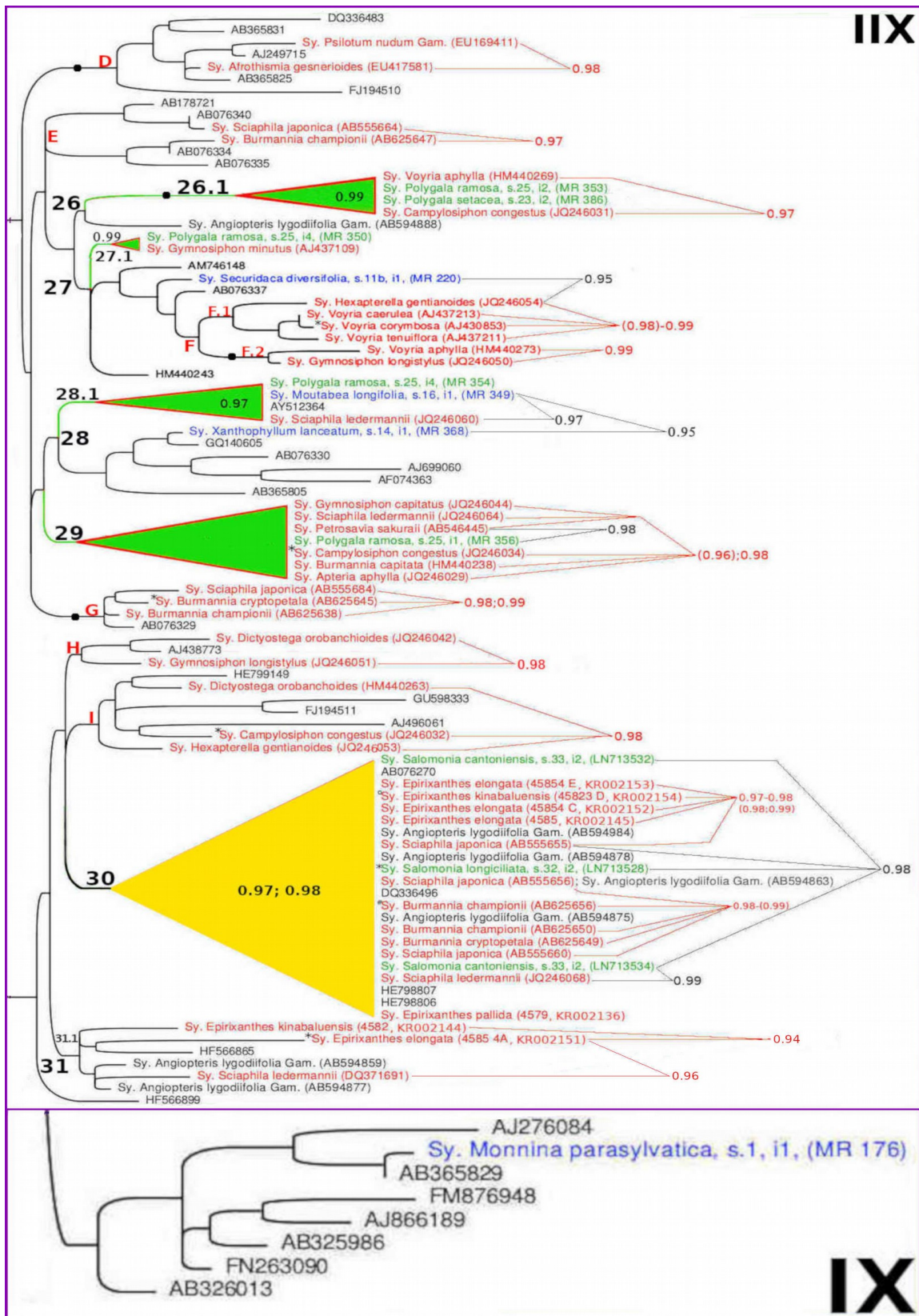
Klironomos J. N. 2003 Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi *Ecology* 84: 2292 - 2301

- Leake, J. R. 1994** The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist* 127: 171 - 216
- Lee J., Lee S., Young J. P. W. 2008** Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 65: 339 - 349
- Mennes C. B., Moerland M. S., Rath M., Smets E. F., Merckx V. S. F. T. 2015b** Evolution of mycoheterotrophy in Polygalaceae: the case of *Epirixanthes*. *American Journal of Botany* 102: 598 - 608
- Merckx V., Bidartondo M. I. 2008** Breakdown and delayed cospeciation in the arbuscular mycorrhizal mutualism. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 275: 1029 - 1035
- Merckx V., Bidartondo M. I., Hynson N. A. 2009** Myco-heterotrophy: when fungi host plants. *Annals of Botany* 104: 1255 - 1261
- Merckx V. S., Janssens S. B., Hynson N. A., Specht C. D., Bruns T. D., Smets E. F. 2012** Mycoheterotrophic interactions are not limited to a narrow phylogenetic range of arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Ecology*, 21: 1524 - 1532
- Merckx V. S. F. T. (ed). 2013** Mycoheterotrophy - The Biology of Plants Living on Fungi. Springer New York, Heidelberg, Dordrecht, London.
- Merckx V. S., Gomes S. I., Wapstra M., Hunt, C., Steenbeeke G., Mennes C. B., ... & Bidartondo M. I. 2017** The biogeographical history of the interaction between mycoheterotrophic *Thismia* (Thismiaceae) plants and mycorrhizal Rhizophagus (Glomeraceae) fungi. *Journal of Biogeography* 44: 1869 - 1879
- Molina R., Massicotte H., Trappe J. M. 1992** Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: Community-ecological consequences and practical implications. In: Allen M. F. (ed.) *Mycorrhizal functioning: An integrative plant-fungal process*. pp. 357 - 423, Chapman and Hall, New York.
- Öpik M., Moora M., Liira J., Kõljalg U., Zobel M., Sen R. 2003** Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of *Pulsatilla* spp. in boreal Scots pine forest and grassland soils. *New Phytologist* 160: 581 - 593
- Öpik M., Zobel M., Cantero J. J., Davison J., Facelli J. M., Hiiesalu I., ..., Liira J. 2013** Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 23: 411 - 430
- Rath M., Weber H. C., Imhof S. 2013** Morpho-anatomical and molecular characterization of the mycorrhizas of European *Polygala* species. *Plant Biology* 15: 548 - 557
- Redecker D., Morton J. B., Bruns T. D. 2000** Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Molecular phylogenetics and evolution* 14: 276 - 284
- Roy M., Watthana S., Stier A., Richard F., Vessabutr S., Selosse M. A. 2009** Two mycoheterotrophic orchids from Thailand tropical dipterocarpacean forests associate with a broad diversity of ectomycorrhizal fungi. *BMC Biology* 7: 51.
- Sanders I. R. 2002** Specificity in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. In: Van der Heijden M. G. A., Sanders I. R. (eds.) *Mycorrhizal Ecology*. pp. 425 - 437, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Scheublin T. R., Ridgway K. P., Young J. P. W., Van der Heijden M. G. 2004** Nonlegumes, legumes, and root nodules harbor different arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 6240 - 6246
- Schüßler A., Schwarzott D., Walker C. 2001** A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105: 1413 - 1421
- Schwarzott D., Schüßler A. 2001** A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA extraction, amplification, and cloning from single AM fungal spores. *Mycorrhiza* 10: 203 - 207
- Schwarzott D., Walker C., Schüßler A. 2001** *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is non-monophyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21: 190 - 197

- Sheldrake M., Rosenstock N. P., Revillini D., Olsson P. A., Wright S. J., Turner B. L. 2017** A phosphorus threshold for mycoheterotrophic plants in tropical forests. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284: 20162093
- Simon L., Lalonde M., Bruns T. D. 1992** Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 291 - 295
- Smith S. E., Read D. J. 1997** *Mycorrhizal Symbiosis*. 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA.
- Smith S. E., Read D. J. 2008** *Mycorrhizal symbiosis* 3rd ed.. Academic press
- Smith S. E., Smith F. A. 2011** Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual review of plant biology* 62: 227 - 250
- Stamatakis A. 2014** "RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies". *Bioinformatics* 30: 1312 - 1313
- Suetsugu K., Kawakita A., Kato M. 2014** Evidence for specificity to *Glomus* group Ab in two Asian mycoheterotrophic *Burmmania* species. *Plant species biology* 29: 57 - 64
- Stürmer S. L. 2012** A history of the taxonomy and systematics of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the phylum Glomeromycota. *Mycorrhiza* 22: 247 – 258
- Sýkorová Z., Wiemken A., Redecker D. 2007** Cooccurring *Gentiana verna* and *Gentiana acaulis* and their neighboring plants in two Swiss upper montane meadows harbor distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Applied and environmental microbiology* 73: 5426 - 5434
- Vandenkoornhuysen P., Husband R., Daniell T. J., Watson I. J., Duck J. M., Fitter A. H., Young J. P. W. 2002** Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Molecular Ecology* 11: 1555 - 1564
- Vandenkoornhuysen P., Ridgway K. P., Watson I. J., Fitter A. H., Young J. P. W. 2003** Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology* 12: 3085 - 3095
- Waterman R. J., Klooster M. R., Hentrich H., Bidartondo M. I. 2013** Species interactions of mycoheterotrophic plants: specialization and its potential consequences. In: Merckx V. S. F. T. (ed.) *Mycoheterotrophy – The biology of Plants feeding on fungi*. pp. 267 - 296, Springer New York.
- Winther J. L., Friedman W. E. 2007** Arbuscular mycorrhizal symbionts in *Botrychium* (Ophioglossaceae). *American Journal of Botany* 94: 1248 - 1255
- Winther J. L., Friedman W. E. 2009** Phylogenetic affinity of arbuscular mycorrhizal symbionts in *Psilotum nudum*. *Journal of plant research* 122: 485 – 496
- Yamato M., Yagame T., Iwase K. 2011a** Arbuscular mycorrhizal fungi in roots of non-photosynthetic plants, *Sciaphila japonica* and *Sciaphila tosaensis* (Triuridaceae). *Mycoscience* 52: 217 - 223
- Yamato M., Yagame T., Shimomura N., Iwase K., Takahashi H., Ogura-Tsujita Y., Yukawa T. 2011b** Specific arbuscular mycorrhizal fungi associated with non-photosynthetic *Petrosavia sakuraii* (Petrosaviaceae). *Mycorrhiza* 21:631 - 639
- Yamato M., Ogura-Tsujita Y., Takahashi H., Yukawa T. 2014** Significant difference in mycorrhizal specificity between an autotrophic and its sister mycoheterotrophic plant species of Petrosaviaceae. *Journal of plant research* 127: 685 - 693
- Zhang Q., Yang R., Tang J., Yang H., Hu S., Chen X. 2010** Positive feedback between mycorrhizal fungi and plants influences plant invasion success and resistance to invasion. *PLoS one* 5: e12380.







Supplementary material

Table S-1

species	location	site number	date of collecting	individual
<i>Monnina parasylvatica</i>	Costa Rica (Alajuela): N 10°53'29.8" W 085°23'00.9"	1	03.10.2008	i1
<i>Monnina xalapensis</i>	Costa Rica (San Jose): N 09°44'18.9" W 083°57'33.6"	4	03.15.2008	i1
<i>Monnina xalapensis</i>	Costa Rica (San Jose): N 09°41'03.8" W 083°55'18.1"	5	03.21.2008	i1
<i>Monnina crepinii</i>	Costa Rica (San Jose): N 09°33'22.5" W 083°42'52.4"	6a	03.15.2008	i1
<i>Monnina crepinii</i>	Costa Rica (San Jose): N 09°33'14.9" W 83°42'15.4"	6b	03.20.2008	i1
<i>Monnina crepinii</i>	Costa Rica (San Jose): N 09°37'09.7" W 083°49'35.8"	7	03.21.2008	i1
<i>Monnina costaricensis</i>	Costa Rica (San Jose): N 09°40'05.3" W 083°52'12.3"	8	03.15.2008	i1
<i>Monnina spec.</i>	Ecuador (Loja): Near street No. 35 between Loja and Catamayo	9	09.27.2008	i1
<i>Securidaca diversifolia</i>	Costa Rica (Guanacaste): N 10°51'47,6" W085°34'24,0"	11b	03.10.2008	i1
<i>Securidaca inappendiculata</i>	Thailand (Chiang Mai): N 18°53.58' E 98°53.1'	13	04.05.2010	i1
<i>Xanthophyllum lanceatum</i>	Thailand (Chiang Mai): N 18°53'29.7" E 098°51'48.1"	14	04.02.2010	i1
<i>Moutabea longifolifa</i>	Costa Rica (Puntarenas): N 08°40'19.8" W 083°30'01.42'	16	03.19.2008	i1 i2
<i>Polygala paniculata</i>	Costa Rica (Guanacaste): N 10°21'58.2" W 084°51'11.0	18	03.13.2008	i1
	Panama (Chiriqui): N 08°52'57.1" W 082°45'33.1"	19	03.16.2008	i1
<i>Polygala setacea</i>	USA (Florida): N 27°39'46.0" W 081°24'01.7"	21	03.26.2008	i4
	USA (Florida): N 27°54'42.2" W 080°37'19.2"	23	03.27.2008	i2
<i>Polygala nana</i>	USA (Florida): N 27°54'42.2" W 080°37'19.2"	23	03.27.2008	i2
<i>Polygala ramosa</i>	USA (Florida): N 27°46'17.9" W 081°22'05.3"	25	03.26.2008	i1 i2 i4
<i>Polygala baldunii</i>	USA (Florida): N 27°46'17.9" W 081°22'05.3"	25	03.26.2008	i2
<i>Polygala chinensis</i>	Thailand (Chiang Mai): N 18°53'40.5" E 98°51'32.3"	26	04.07.2010	i1
<i>Polygaloides chamaebuxus</i>	Germany, Bavaria, Forchheim (Tüchersfeld)	8a (Europe)	05.21.2007	i1
<i>Asemeia grandiflora</i>	USA (Florida): N 25°52'01.6" W 081°09'18.7"	22	03.28.2008	i1

Table S-1: Data of collection sites, site numbers, date of collecting and number of the investigated individuals of Polygalaceae used for molecular systematic analyses of their arbuscular mycorrhizal fungal symbionts.

Table S-2

species	number of root samples	sequences of fungal symbiont obtained from root sample	used primer set
<i>Monnina parasylvatica</i>	1	MR 176	AM1/NS31
<i>Monnina xalapensis</i>	1	MR 182	AM1/NS31
<i>Monnina xalapensis</i>	1	MR 183	AM1/NS31
<i>Monnina crepinii</i>	1	MR 283	AML1/AMLII
<i>Monnina crepinii</i>	1	MR 185, MR 277, MR 278, MR 311, MR 312, MR 338	AM1/NS31
<i>Monnina crepinii</i>	1	MR 184	AM1/NS31
<i>Monnina costaricensis</i>	1	MR 344	AM1/NS31
<i>Monnina spec.</i>	1	MR 334	AM1/NS31
<i>Securidaca diversifolia</i>	3	MR 209, MR 220, MR 285, MR 286, MR 385, MR 378, MR 379	AM1/NS31
<i>Securidaca inappendiculata</i>	1	MR 328, MR 380, MR 381	AM1/NS31
<i>Xanthophyllum lanceatum</i>	1	MR 368	AM1/NS31
<i>Moutabea longifolia</i>	1	MR 349	AM1/NS31
	1	MR 303, MR 345, MR 346	AM1/NS31
<i>Polygala paniculata</i>	1	MR 362	AM1/NS31
	1	MR 363	AM1/NS31
<i>Polygala setacea</i>	1	MR 280	AML1/AMLII
	1	MR 386	AM1/NS31
<i>Polygala nana</i>	1	MR 361	AM1/NS31
<i>Polygala ramosa</i>	1	MR 308, MR 355, MR 356	AM1/NS31
	1	MR 353	AM1/NS31
	1	MR 350, MR 354	AM1/NS31
<i>Polygala baldunii</i>	1	MR 366	AM1/NS31
<i>Polygala chinensis</i>	1	MR 255, MR 397, MR 398, MR 406, MR 408	AM1/NS31
<i>Polygaloides chamaebuxus</i>	1	MR 163	AM1/NS31
<i>Asemeia grandiflora</i>	1	MR 392	AM1/NS31
		orange = 18S rDNA derived directly from PCR-product	
		black = 18S rDNA derived from cloned PCR-product	

Table S-2: Information on the number the analysed root samples of each host species, on the fungal symbiont sequences and on the primer sets used in this study.

Table S-3

Fig. 2		
SES.PD-values calculated only for Glomeromycota sequences from species in Polygalaceae (i. e. at least two sequences from Polygalaceae have to be included in the respective OTU).		
OTU	SES.PD-values	p-values
OTU 4	-3.17105709399011	0.001
OTU 5	-2.7031977289546	0.001
OTU 6	-1.93622502211051	0.007
OTU 7	-3.30327338993579	0.001
OTU 8	-3.38431367203104	0.001
OTU 9	-3.59535793399921	0.001
OTU 10.1	-3.23636646290647	0.001
OTU 10.2	-2.79900756239353	0.002
OTU 10.3.1	-1.68060565850323	0.026
OTU 10.4	-1.7588769175393	0.017
OTU 11	-3.02060863267855	0.001
OTU 13	-5.03721371214011	0.001
OTU 14	-1.73029168282635	0.033
OTU 20.1	0.629425182586546	0.734
OTU 20.3	-0.741949411906828	0.233
OTU 20.4	-1.30900490239581	0.09
OTU 20.6	1.48561158425327	0.915
OTU 22.1	-0.503148548787298	0.337
OTU 23	-0.884127520539002	0.208
OTU 24	-2.35121939430952	0.007
OTU 26.1	-0.055876516556265	0.478
OTU 28.1	-0.143141183262129	0.45
OTU 30	-2.61012665891565	0.004
OTU 31.1	0.166758066336993	0.5425

Table S-4

Fig. 3		
SES.PD-values for Glomeromycota sequences from Polygalaceae on species level of the host plants.		
Species	SES.PD	p-values
<i>Moutabea longifolia</i>	-0.766754739217909	0.237
<i>Monnina crepinii</i>	0.141782444414283	0.549
<i>Monnina xalapensis</i>	-0.412441333415862	0.372
<i>Securidaca diversifolia</i>	-1.33945244312751	0.072
<i>Securidaca inappendiculata</i>	-1.81928689833121	0.024
<i>Polygala amara</i>	-0.844387815926752	0.193
<i>Polygala calcarea</i>	-1.5927378893438	0.031
<i>Polygala vulgaris</i>	-2.92633995101711	0.001
<i>Polygala serpyllifolia</i>	0.12756485416204	0.56
<i>Polygala amarella</i>	-0.949304350550607	0.192
<i>Polygala myrtifolia</i>	0.402277679871048	0.715
<i>Polygala chinensis</i>	-2.87885544478687	0.001
<i>Polygala ramosa</i>	-1.49582847585204	0.053
<i>Polygala setacea</i>	0.301397842476203	0.6265
<i>Polygala paniculata</i>	2.705810594563	0.994
<i>Salomonina longiciliata</i>	-0.390831091414482	0.364
<i>Salomonina cantoniensis</i>	0.973468169855769	0.828
<i>Epirixanthes pallida</i>	-3.1624804670355	0.002
<i>Epirixanthes elongata</i>	-2.16498588551175	0.008
<i>Epirixanthes kinabaluensis</i>	0.343757149560853	0.664
<i>Epirixanthes papuana</i>	-3.47070945992738	0.001

Table S-5

Fig. 4		SES.PD-values for Glomeromycota sequences from Polygalaceae on genus level of the host plants.	
Genus	SES.PD		p-values
<i>Epirixanthes</i>	-4.77286592333374		0.001
<i>Salomonina</i>	-1.18205728485381		0.135
<i>Salomonina A</i>	-0.901708879080246		0.181
<i>Salomonina B</i>	-1.41635755972621		0.076
<i>Polygala</i>	-2.42937529600751		0.004
<i>Polygala A</i>	-3.82386445551579		0.001
<i>Securidaca</i>	-2.18449034707275		0.015
<i>Monnina</i>	0.150025124612481		0.561

Table S-6

Fig. 5		SES.PD-values for OTUs comprising at least one Glomeromycota sequence from species in Polygalaceae and/or non-Polygalaceae-mycoheterotrophic plants plus OTUs constituted by Glomeromycota found in non-Polygalaceae-mycoheterotrophic plants (OTU A-I).	
OTU	SES.PD		p-values
OTU 1		-2.63891925918025	0.001
OTU 2		-4.36050837275581	0.001
OTU 3		-2.99033443076675	0.001
OTU 4		-3.18949310240637	0.001
OTU 5		-3.61474531276116	0.001
OTU 6		-3.40951107608816	0.001
OTU 7		-3.39114956647674	0.001
OTU 8		-5.13438371386449	0.001
OTU 9		-3.55754135912955	0.001
OTU 10		-4.48162626946357	0.001
OTU 10.1		-3.14358209464123	0.001
OTU 10.2		-2.46945736384555	0.001
OTU 10.3		-2.02198413090197	0.007
OTU 10.3.1		-1.63886429793239	0.043
OTU 10.4		-1.73861058317746	0.025
OTU 11		-2.67930974633047	0.001
OTU 12		-2.70641505258404	0.001
OTU 12.1		-2.50974633417197	0.003
OTU 13		-5.71157181020425	0.001
OTU 14		-2.35080275333877	0.002
OTU 20		-2.55620046170448	0.002
OTU 20.1		0.353772178349023	0.71
OTU 20.2		-2.02067266382343	0.012
OTU 20.3		-1.46489017165352	0.023
OTU 20.4		-1.60425272091935	0.022
OTU 20.5		1.57139320398337	0.9
OTU 20.6		0.514017363246901	0.779
OTU 20.7		0.828657236084124	0.857
OTU 21		-0.631530245584862	0.309
OTU 22		-2.50561089890705	0.003
OTU 22.1		-1.85936149320655	0.012
OTU 23		-1.96351047652893	0.007
OTU 24		-2.45496535688302	0.001
OTU 25		-0.907665493684559	0.215
OTU 26		-1.36029771468596	0.039
OTU 26.1		-1.09003348288413	0.087
OTU 27		-3.25822774196272	0.001
OTU 27.1		-0.529194362358375	0.272
OTU 28		-2.24060306479827	0.002
OTU 28.1		-1.44133796939883	0.026
OTU 29		-1.90949548256149	0.001
OTU 30		-4.92686164381106	0.001
OTU 31		-1.70423930360031	0.008
OTU A		-3.02503401852711	0.001
OTU B		-3.14381833181567	0.001
OTU C		-2.59102631533926	0.001
OTU C.1		-1.95294094440661	0.018
OTU D		-1.76503181263734	0.007
OTU E		-1.97436943202731	0.001
OTU F		-1.79784318704197	0.005
OTU F.1		-1.22679449699159	0.049
OTU F.2		-0.113379165042521	0.476
OTU G		-1.54408728351624	0.024
OTU H		-0.934736984113478	0.114
OTU I		-1.51180515922006	0.021

Table S-3 - S-6: SES.PD raw values plotted in graphs of Fig. 2, 3, 4 and 5.

Amendment:

Critical consideration of SES.PD as a measure of sequence relatedness in this study

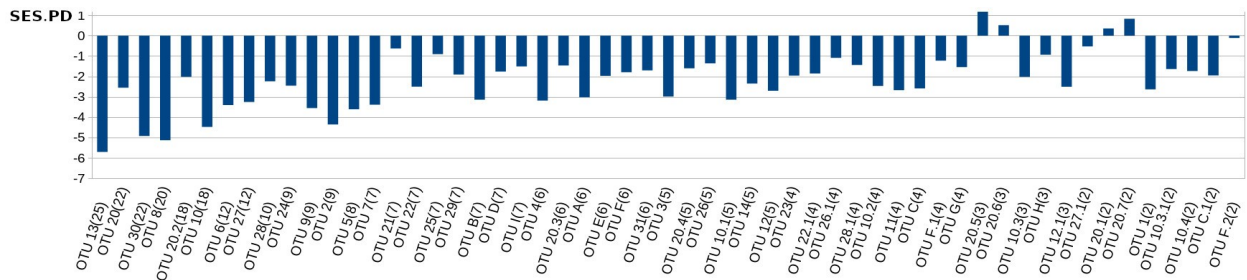


Fig. A-1: SES.PD values for OTUs including symbionts from members of Polygalaceae and/or mycoheterotrophic species in other plant families sorted after the number of included sequences (in parentheses).

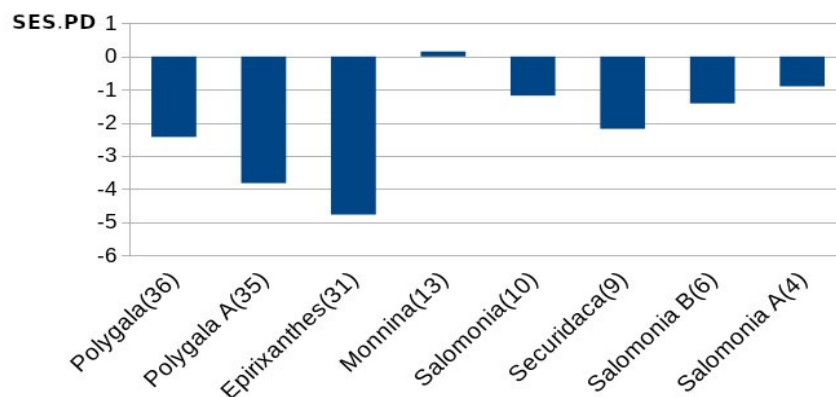


Fig. A-2: SES.PD values for symbionts from members of Polygalaceae on host genus level sorted after the number of included sequences (in parantheses).

In course of our statistical analyses, we observed some influence of sequence number on the value of the SES.PD. Especially SES.PD values on the level of OTUs (Figs. 2 & 5) showed a significant reduction of the SES.PD value the more sequence were subsumed within each unit. This phenomenon attracted our attention while comparing OTUs with high BLAST similarity values (e.g. 98 % - 99 %) and only a few (2 - 4) sequences, that nevertheless showed larger SES.PD values than OTUs comprising much more (10 - 25) sequences even if these OTUs united sequences with lower BLAST-similarity (compare for example Fig. 5, OTU 23 and OTU 13). Our first interpretation of this problem was therefore that SES.PD in clades with high sequence number (i.e. roughly more than 10) SES.PD tends to overestimate the true relatedness of the respective symbionts while SES.PD in clades with very low sequence numbers (between 2 and 4) tends to underestimate the relatedness of symbionts. Therefore, we put this problem to the test by combining

some of our previously constituted OTUs, forming new clades with less BLAST similarity but higher sequence number (OTUs 10, 12, 20, 20.2, 22, 26, 27, 28, 31). After plotting SES.PD values of all OTUs including the newly constituted ones against the number of sequences, the phenomena of biased SES.PD becomes visible confirming our first impression (Fig. A-1). However, it is also obvious that sequence numbers between 4 and 10 - 12 pretty much resemble our first assessment of sequence similarity by BLAST. Moreover, even those OTUs with an especially high sequence number (e.g. OTU 13, OTU 30) do show high BLAST similarities to the reference sequence supporting the SES.PD-based indications for an elevated symbiont relatedness also in case of these clades (albeit still slightly biased by sequence number). Additionally, the sequence number is fairly even distributed amongst all trophic strategies of the hosts, thus any kind of bias is likely to affect OTUs comprising symbionts from autotrophic and mycoheterotrophic hosts pretty much the same. On the level of host genus and host species, the bias effect is also visible (Fig. A-2 for bias on host genus level). However, its effect seems less significant since higher species number does not that obviously correlate with lower SES. PD values. For example, *Epirixanthes* show a markedly lower SES.PD compared to *Polygala* although the latter genus comprises the largest set of symbiont sequences in this study. One explanation for the smaller bias in SES.PD on genus and species level compared to OTU level might be that in the latter close phylogenetic relations (and therefore low genetic distance) is already preset and thus possible bias due to differences in sequence number becomes more prevalent despite stochastic correction methods like the SES-approach. To sum up, despite the observed bias, SES.PD still seems to be a valid approximation of symbiont relatedness in this study especially on the level of host genus and host species but also on the level of OTUs, if we keep in mind the already mentioned restrictions.

Combining microtomy and confocal laser scanning microscopy for structural analyses of plant–fungus associations

Magnus Rath · Franz Grolig · Janine Haueisen ·
Stephan Imhof

Received: 8 July 2013 / Accepted: 23 September 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract The serious problem of extended tissue thickness in the analysis of plant–fungus associations was overcome using a new method that combines physical and optical sectioning of the resin-embedded sample by microtomy and confocal microscopy. Improved tissue infiltration of the fungal-specific, high molecular weight fluorescent probe wheat germ agglutinin conjugated to Alexa Fluor® 633 resulted in high fungus-specific fluorescence even in deeper tissue sections. If autofluorescence was insufficient, additional counterstaining with Calcofluor White M2R or propidium iodide was applied in order to visualise the host plant tissues. Alternatively, the non-specific fluorochrome acid fuchsin was used for rapid staining of both, the plant and the fungal cells. The intricate spatial arrangements of the plant and fungal cells were preserved by immobilization in the hydrophilic resin Unicryl™. Microtomy was used to section the resin-embedded roots or leaves until the desired plane was reached. The data sets generated by confocal laser scanning microscopy of the remaining resin stubs allowed

the precise spatial reconstruction of complex structures in the plant–fungus associations of interest. This approach was successfully tested on tissues from ectomycorrhiza (*Betula pendula*), arbuscular mycorrhiza (*Galium aparine*; *Polygala paniculata*, *Polygala rupestris*), ericoid mycorrhiza (*Calluna vulgaris*), orchid mycorrhiza (*Limodorum abortivum*, *Serapias parviflora*) and on one leaf–fungus association (*Zymoseptoria tritici* on *Triticum aestivum*). The method provides an efficient visualisation protocol applicable with a wide range of plant–fungus symbioses.

Keywords Confocal laser scanning microscopy · Microtomy · Three-dimensional structural analysis · Mycorrhiza

Introduction

Starting in the 1990s, confocal laser scanning microscopy (CLSM) became an important tool in the research of mutualistic and parasitic plant–fungus associations. This new type of microscopy allowed documentation of stacks of very thin optical slices even from deeper levels of the material with extraordinary sensitive detection of fluorescence. In mycorrhizal research, the new technique enabled the spatial resolution of delicate fungal structures such as the ectomycorrhizal hyphal sheath with associated bacteria (Schelkle et al. 1996), fine arbuscule branches (Melville et al. 1998; Domínguez et al. 2009; Zhang et al. 2010), volume measurements of fungal arbuscules or coils (Dickson and Kolesik 1999) and the detection of the growth mode of hyphae (Marcel et al. 2010). In most studies, the plant material was simply placed on a glass slide, mounted in water or some kind of viscous media, covered with a cover slip and scanned by the CLSM as deep as possible. Although many informative analyses were performed this way (e.g. Schelkle et al. 1996; Gao et al. 2001; Ormsby et al. 2007; Fester et al. 2008; Marcel et al. 2010;

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00572-013-0530-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Rath (✉) · S. Imhof
Spezielle Botanik und Mykologie, Fachbereich Biologie,
Philipps-Universität Marburg, 35032 Marburg, Germany
e-mail: rath@biologie.uni-marburg.de

S. Imhof
e-mail: imhof@biologie.uni-marburg.de

F. Grolig
Pflanzenphysiologie und Photobiologie, Fachbereich Biologie,
Philipps-Universität Marburg, 35032 Marburg, Germany
e-mail: grolig@biologie.uni-marburg.de

J. Haueisen
Max Planck Research Group Fungal Biodiversity, Max Planck
Institut für Terrestrische Mikrobiologie, 35034 Marburg, Germany
e-mail: janine.haueisen@mpi-marburg.mpg.de

Peters et al. 2011; Diagne et al. 2011; Sørensen et al. 2012), this technique of sample preparation runs the risk of disturbing the original spatial arrangement of the plant and fungal cells by compressing the material. The procedure may also cause blurring due to unintended movements of the material during the CLSM scan. Moreover, this approach was hardly applicable to trace the fungal colonisation within thicker parts of plant tissue, such as whole root or leaf fragments, due to the significant decrease of fluorescence in deeper regions of the plant tissue. Melville and colleagues were the first to solve some of these problems by scanning whole resin-embedded roots. However, due to the limited penetration of the non-specific dyes into the resin, fluorescence detection reached only up to 100 µm in depth (Melville et al. 1998). Therefore, the laborious and difficult method of conventional resin embedding, microtomy and subsequent analysis of serial sections is still the most common for the spatial tracing and three-dimensional reconstruction of mycorrhizal colonisation patterns (e.g. Blasius et al. 1986; Massicotte et al. 1993; Schmid and Oberwinkler 1993; Brun et al. 1995; Imhof 1999a, b, c; Read et al. 2000; Gutiérrez et al. 2003; Domínguez and Sérsic 2004; Haug et al. 2005; Rath et al. 2013). However, the method makes the visual documentation of the results difficult, since only two-dimensional images are obtained.

Our report describes an advanced method which combines microtomy and confocal microscopy to overcome these limitations. The new approach comprises all the advantages of the preceding method (Melville et al. 1998), as it reduces physical forces on the material and fixes the tissue to avoid blurring. However, by specific staining prior to embedding in resin and by using precise microtomy, our technique overcomes the limitations of scanning the sample in depth. It thus allows the detection of fluorescence signals from deeper parts of root or leaf sections that can be specifically assigned to fungal or host plant structures, respectively.

Materials and methods

Plant material used in this study

Primary roots of *Polygala rupestris* Pourr., *Polygala paniculata* L., *Galium aparine* L., *Betula pendula* Roth, *Limodorum abortivum* (L.) Sw., *Serapias parviflora* Parl. and *Calluna vulgaris* Salisb. were carefully excavated, cleaned with water and, together with leaves of *Triticum aestivum* L., inoculated with *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvlieg & Crous., subsequently fixed in FPA [formalin (37 %)/propionic acid (>99 %)/ethanol (50 %); 5/5/90] for 2 weeks. Finally, the plant material was stored in ethanol (70 %) for further use. For more information on the material, see Table 1 in the supplementary files.

Preparation of plant material

Selected root segments were cut into pieces of approximately 3 to 5 mm in length. The ectomycorrhizal and the smaller orchid roots (*S. parviflora*) were additionally sliced longitudinally; the large orchid root pieces (*L. abortivum*) were quartered. Leaf material of *T. aestivum* showing fungus-induced necrosis was cut into pieces of 2×3 mm. Depending on the size, up to 20 of each root and leaf fragments were stored in the Eppendorf tube (1.5 ml) filled with 70 % ethanol. Careless handling of the plant material may cause artefacts. To minimize damage to the material, only new razor blades were used for sectioning, and the transfer of the material was done with a wide-mouthed pipette or featherweight forceps.

Fluorescence staining

Tissue permeabilisation

Roots and leaf fragments of *T. aestivum* were transferred into 500 µl of 10 % KOH (w/v) solution and prepared for staining by heating in a water bath (90–94 °C). The resulting slight maceration of the tissue is necessary for the dye to reach the interior of the tissue and was adapted from the staining protocol by Phillips and Hayman (1970). Depending on the size and constitution of the material, the heating time varied as follows: *B. pendula* (diameter of the intact roots, 240 µm), 4 min; *C. vulgaris* (50 µm), 30 s; *L. abortivum* (9 mm), 4 min; *S. parviflora* (2 mm), 4 min and 10 s; *G. aparine* (180 µm), 1 min and 30 s; *P. paniculata* (290 µm), 2 min; and leaves of *T. aestivum* infested with *Z. tritici* (140–170 µm), 2 min and 30 s. After heating, a fine glass pipette was used to thoroughly remove the KOH solution. For neutralization, the tissue was washed twice for 10 min in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4). To accelerate PBS infiltration, the material was gently inverted (10 times per min) on a test tube rotator (L28, A. Hartenstein, Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH, Würzburg, Germany). To minimize any physical force imposed on the fragile plant material, the tubes were completely filled with PBS. Even so, the large and soft root tissue of *L. abortivum* was particularly sensitive to physical stress and was destroyed by mechanical rotation. For such material, longer PBS incubation (1 h) and careful single inversions (every 10 min) were done by hand. The times given for KOH treatment yielded good results for the material tested in this study but may have to be adapted for other species. Detergents for additional permeabilisation such as Tween® 20 (e.g. Doehleman et al. 2007) were not used but might be helpful if maceration alone does not result in sufficient dye infiltration.

Specific staining of fungi and plant cells

After removal of PBS, 1 ml of a 1:200 and 1:100 (for root and leaf material, respectively) dilution (in PBS, pH 7.4) of wheat germ agglutinin (WGA) (Robin et al. 1986; Bonfante-Fasolo et al. 1990) conjugated to Alexa Fluor® 633 dye stock solution [1 mg WGA Alexa Fluor® 633 (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA) dissolved in 1 ml PBS; pH 7.4] was added to specifically stain the fungal hyphae. Subsequently, samples were incubated inside a vacuum desiccator driven by the HP 40 B2 (pump) and CVC 3000 (control unit, both from Vacuubrand GmbH+CO KG, Wertheim, Germany) for 2 h at low pressure (800 mbar) to remove air from the roots and accelerate initial dye infiltration. Then, the samples were inverted slowly (see above) overnight. Again, fragile material like the large root fragments of *L. abortivum* was not inverted with the rotator. Instead, it was transferred into a small test tube (e.g. a closed 1.5-ml Eppendorf tube, the bottom of which had been cut off before it was turned upside down) and placed inside a glass vessel. Staining solution was added into the prepared Eppendorf tubes until the material was entirely covered. The glass vessel containing the tubes was sealed with Parafilm® M laboratory film (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany) and placed onto the Bio-Dancer laboratory shaker (New Brunswick Scientific, Enfield, USA) overnight. The shaker (adjusted to the minimum setting) caused a very slight vibration that did not damage the plant material but still improved dye infiltration during incubation. Subsequent to incubation, the WGA Alexa Fluor® 633 solution was removed, and the samples were washed twice in 1.2 ml PBS (pH 7.4) for 1 h using the rotator. Roots of *L. abortivum* were washed on the shaker for 1 h. The dye was cross-linked to the N-acetyl-D-glucosamine (chitin) epitope by replacing the washing buffer with 1.5 ml of a 0.3 % glutaraldehyde solution (diluted in PBS; pH 7.4) and was inverted or shaken for another hour. Up to this stage, the staining procedure was identical for all roots. If, as in *G. aparine* (Fig. 2d), autofluorescence was expected to be high enough for confocal microscopy, no staining of the host cell walls was required. In order to check autofluorescence, after KOH treatment, a PBS-neutralized sample was placed on a glass slide, covered with a cover slip and viewed with a confocal microscope using a 488-nm argon laser for excitation and fluorescence detection between 500 and 620 nm. For plant material lacking sufficient autofluorescence, additional staining with Calcofluor White M2R (Monheit et al. 1984) or propidium iodide (Truernit et al. 2006; Rounds et al. 2011; both dyes from Sigma-Aldrich, Seelze, Germany) was necessary. Calcofluor White M2R was applied to the material from *C. vulgaris*, *L. abortivum* and *T. aestivum*. Propidium iodide was used for roots of

B. pendula, *P. paniculata* and *S. parviflora*. After removal of the glutaraldehyde solution, 1 ml of a 5 mM Tris solution (diluted in PBS; pH 7.4) was added to each sample to block free aldehyde groups by amino groups (incubation for 1 h under inversion or shaking). This step avoids non-specific cross linking of dyes containing amino groups like e.g. propidium iodide to unsaturated aldehyde groups, thus keeping propidium iodide background staining to a minimum. Blocking was not necessary when Calcofluor White M2R or autofluorescence was used for host plant tissue visualisation. Glutaraldehyde or Tris solution, respectively, was each replaced by 1 ml of the staining solutions Calcofluor White M2R [1 % (w/v) Calcofluor White M2R in 0.2 M Tris (pH 8.0), diluted 1:100 in 0.2 M Tris (pH 8.0)] or propidium iodide [2 % (w/v) in PBS; pH 7.4] and incubated using the rotator or shaker overnight. After final removal of Calcofluor White M2R or propidium iodide, the roots were dehydrated in an ascending ethanol series (30, 50, 60, 70, 80, 90 and 96 % ethanol, 1 h each step without inversion or shaking), infiltrated in 0.5 ml of a 1:2 mixture of 96 % ethanol and Unicryl™ (British Biocell International, Cardiff, UK) overnight (at 4 °C) and, subsequently, in 0.5 ml pure Unicryl™ for at least 3 days (at 4 °C).

Non-specific staining with acid fuchsin

For staining with acid fuchsin (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany), the roots of *P. rupestris* were incubated in a vacuum desiccator for 30 min, subsequently dehydrated in ethanol (80, 90 and 96 %) and transferred into 0.5 ml of a 1:2 infiltration mixture of 96 % ethanol and 100 % Unicryl™. Usually, acid fuchsin is soluted in a mixture of lactic acid, glycerol and distilled water for staining fungus-colonised plant material (e.g. Kormanik and McGraw 1982; Dickson and Kolesik 1999). In this protocol, an acid fuchsin stock solution was prepared by adding pure dye to a small volume (e.g. 1 ml) of a 1:2 ethanol (96 %)/Unicryl™ (100 %) infiltration solution up to saturation. Thirty microlitres of the supernatant was given to the 0.5 ml of the 96 % ethanol/Unicryl™ (100 %) infiltration mixture and stored at 4 °C for a minimum of 3 days. This assured that the plant tissue was stained and infiltrated by resin simultaneously. Depending on the root diameter, the staining may take longer in thick and lignified roots. When the plant material appeared homogeneously reddish, it was transferred into 100 % Unicryl™ resin and stored for at least three more days at 4 °C. Due to self-quenching (Vierheilg et al. 2005), too high concentrations of acid fuchsin reduced the fluorescence yield significantly. Therefore, the dye concentration must be tested specifically for each type of plant material in order to obtain optimal results.

Microtomy

Using a wide-mouthed pipette or featherweight forceps, the stained roots were carefully transferred into gelatine capsules (\varnothing 5 mm, Plano GmbH, Wetzlar). Depending on sample size, one or several pieces of plant material were placed in a single capsule. For the large root fragments of *L. abortivum*, larger capsules (\varnothing 7 mm) were used. A rack with upright open capsules was viewed with a stereomicroscope, and the plant material inside the capsules was adjusted to the desired orientation using a curved needle (Fig. 1a, b). CLSM scans of roots oriented horizontally reached deeper tissue levels, compared to scans of vertically embedded material. After adjustment, the capsules were filled to the rim with pure Unicryl™, closed with a gelatine cap and carefully transferred into an oven (60 °C, for 3 days). Subsequent to polymerisation, the gelatine casing was removed, and the tip of the resin block containing the objects was sectioned with a microtome (Leica 2065 Supercut, Leica Instruments, Nussloch Germany) down to the plant tissue (Fig. 1c). This way, the tissue level of interest could be chosen, and after laser scanning, more sections could be removed from the resin block for a further, deeper view into the sample.

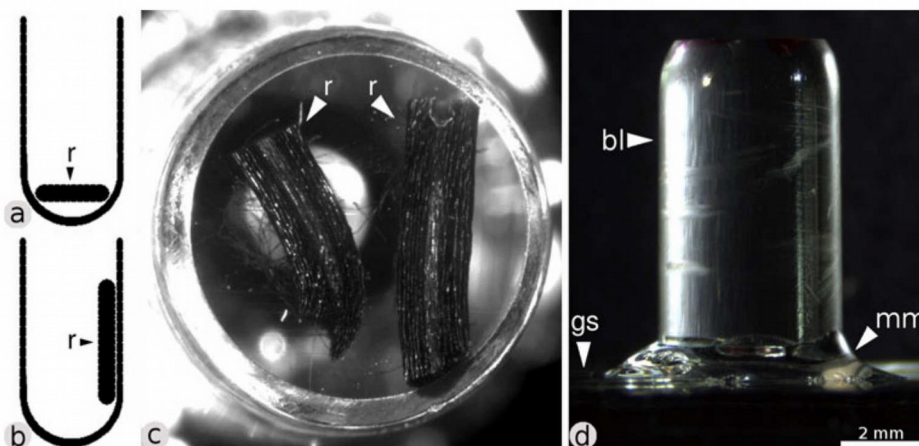
For laser scanning microscopy, the resin block was trimmed by filing its base to ensure parallel orientation of the cut surface and the objective front lens and was glued upright to a glass slide (Fig. 1d) using a mounting medium (Eukitt®, Sigma-Aldrich, Seelze, Germany). The mounting medium was hardened in a heat cabinet (40 °C) for 1 day. For the microscopy, a drop of immersion medium (Leica Type N immersion liquid, $n=1.518$) was placed directly on the tip of the resin block. As no cover slip was required, the full working distance of the objectives could be exploited.

Confocal microscopy

For plant material with sufficient autofluorescence (in particular, *G. aparine*), an argon laser (488 nm) was used to excite the host cell wall autofluorescence, which was detected between 500 nm and 620 nm. If autofluorescence was too weak, additional staining with Calcofluor White M2R (excited with a 405-nm UV laser, fluorescence detected between 415 nm and 600 nm) or propidium iodide [excited with an argon laser (488 nm or, alternatively, 514 nm), fluorescence detected between 500 nm or 530 nm, respectively, and 680 nm] yielded higher fluorescence intensities and in case of propidium iodide nuclear staining in addition. As the fluorescence of propidium iodide overlapped with the fluorescence of Alexa Fluor® 633, sequential scanning was preferred for better channel separation. Generally, the fungi showed considerable autofluorescence upon excitation with blue (488 nm) or green light (514 nm), and Calcofluor White M2R as well as propidium iodide also bound to chitin. Therefore, the fungal structures were also present in the plant tissue detection channel. However, this signal could be reduced by software-based computing and was overlaid by the fungal channel anyway.

A HeNe laser (633 nm) was used to excite Alexa Fluor® 633, and the fluorescence was detected between 640 and 780 nm. WGA Alexa Fluor® 633 occasionally showed a weak binding to plant cell walls, too, in particular to epidermal, hypodermal and endodermal cells, and to the lignified tissues of the central cylinder. Fortunately, these signals from the root cortex parenchyma were minimal and much weaker than the strong fungal fluorescence. Therefore, they could be easily suppressed by a slight reduction of the gain voltage of the photomultiplier.

Fig. 1 Horizontal (a) and vertical (b) spatial orientation of roots (*r*) inside the gelatine capsules as applied in this study. c Resin block after cutting off its front tip by the use of a microtome. The embedded roots (*r*) now lie in the desired plane of interest and are ready for final mounting. d Mounting of the resin block for confocal microscopy. The resin block (*bl*) is glued on a glass slide (*gs*) using mounting media (*mm*)



An argon laser (488 nm) or, alternatively, a HeNe laser (543 nm) was used to excite acid fuchsin. Fluorescence was detected between 500 nm (argon laser) or 550 nm (HeNe laser) and 700 nm.

Image stacks were obtained by either the Leica TCS SP2 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) equipped with the objectives HC PL APO $\times 20/0.70$ Imm Corr CS (Figs. S4a–c) and HCX PL APO $\times 40/1.25-0.75$ Oil CS (Figs. 2a, d, f–h; S3a, b; S5) or by the Leica TCS SP5 using the objectives HCX PL APO $\times 20/0.70$ Imm Corr Lbd. bl. (Fig. 2c) and HCX PL APO $\times 40/1.25-0.75$ Oil Lbd. bl. (Fig. 2b, e). All samples were scanned at a x/y scanning resolution of $1,024 \times 1,024$ pixels. Step size in z direction was $1 \mu\text{m}$ (Figs. 2a–e and S5) or $2 \mu\text{m}$ (Figs. 2f–h, S3 and S4). The image stacks were visualised and processed using the software AMIRA® (FEI™ Visualization Sciences Group, Düsseldorf, Germany) or the Leica Confocal Software (LCS, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). The two channels for the detection of the fluorescence from the plant cells and from the fungal cells, respectively, were assigned to different false colour tables to allow discrimination between the two tissues. Animated tomographic documentation was generated using AMIRA®. The resulting files were saved in mpg format, which can be displayed with standard imaging software.

Results and discussion

In the early stage of structural analysis of plant–fungus associations by confocal microscopy, Melville and colleagues (1998) introduced a simple but remarkable technique to avoid artefacts induced during tissue preparation and scanning (e.g. compressing and blurring), as they scanned resin-embedded mycorrhizal roots directly inside the resin block. Although their method allowed high quality reconstruction of mycorrhizal fine structures, it was limited by three crucial aspects that could be overcome by the method presented here.

1. Scanning limitation in depth

To ensure sufficient staining inside the root and leaf material, KOH maceration of the material was applied to facilitate the infiltration of the considerably large dye molecule WGA Alexa Fluor® 633 (MW=approx. 38 kDa). Staining prior to resin embedding proved to be superior to staining after resin embedding (Melville et al. 1998), as it allowed scanning up to $380 \mu\text{m}$ (*S. parviflora*, Fig. S4a–c) in depth in one single scan without significant loss of quality. This approach allows the analysis of hyphal details like the Hartig net in *B. pendula* (Fig. 2a), the hyphal coils in *L. abortivum* (Fig. 2c) and the arbuscule fine structure in *P. paniculata* at high resolution (Fig. S3a, b). The new procedure provides equally

high quality confocal data as other confocal based methods (Schelkle et al. 1996; Melville et al. 1998; Sørensen et al. 2012). In contrast to other protocols using KOH or alternative agents like NaOH (Bonfante-Fasolo et al. 1990; Lum et al. 2002; Diagne et al. 2011), our approach reduces KOH impact to a minimum to retain the original spatial constitution of the plant material as a whole (Figs. 2a, b, d–f and S4a, b, c), the root-attached hyphal networks (Figs. 2a, b and S4b, d), the constitution of the intraradical tissues and the host cell and fungal hyphae in detail (Figs. 2a inset, b–e; S3a, b; and S4).

2. No application of microtomy

This publication is the first to use precise microtomy on fungus-colonised plant material stained for fluorescence microscopy prior to resin embedding. Microtomy provides two significant advantages. First, cutting off the tip of the resin block with a microtome produces a smooth surface of the resin, thus avoiding optical artefacts due to the refraction of the incoming laser beam and the outgoing fluorescence light. Second, which is the most important, microtomy allows defining an exact starting plane for the scan; this permits the reconstruction of roots with large volumes by alternating scanning and microtomy.

3. Non-specific staining of the plant material

Use of specific dyes enabled efficient discrimination between host plant and fungal borne structures. In many cases, this eased the precise localization of hyphae inside the host plant tissue and—in combination with tomographic software (Fig. 2h, Animations S6 and S7)—allowed to trace the hyphae on their inter- and intracellular spread throughout the host plant. Specific staining thus significantly facilitates the structural classification even of very complex mycorrhizal morphotypes (Fig. 2g) in existing categories (e.g. Gallaud 1905; Dickson 2004) and may also be helpful in mycorrhizal physiology to clearly separate host from fungal structures, in order to estimate volumes and surfaces, which are more difficult to obtain without this quality (e.g. Alexander et al. 1988; Alexander et al. 1989; Dickson and Kolesik 1999).

The detailed specifications for specific staining and resin embedding for a variety of samples allow an easy adaptation of the protocol to other kinds of material. Specific staining, however, is relatively laborious. For that reason, non-specific staining using acid fuchsin as a widely used fluorescent dye for mycorrhizal analysis (Kormanik and McGraw 1982; Merryweather and Fitter 1991; Gao et al. 2001; Lum et al. 2002; Domínguez et al. 2009) provides a rapid procedure to analyse multiple aspects on plant–fungus associations if the plant and fungal tissue are discernible by structural features (Fig. S5).

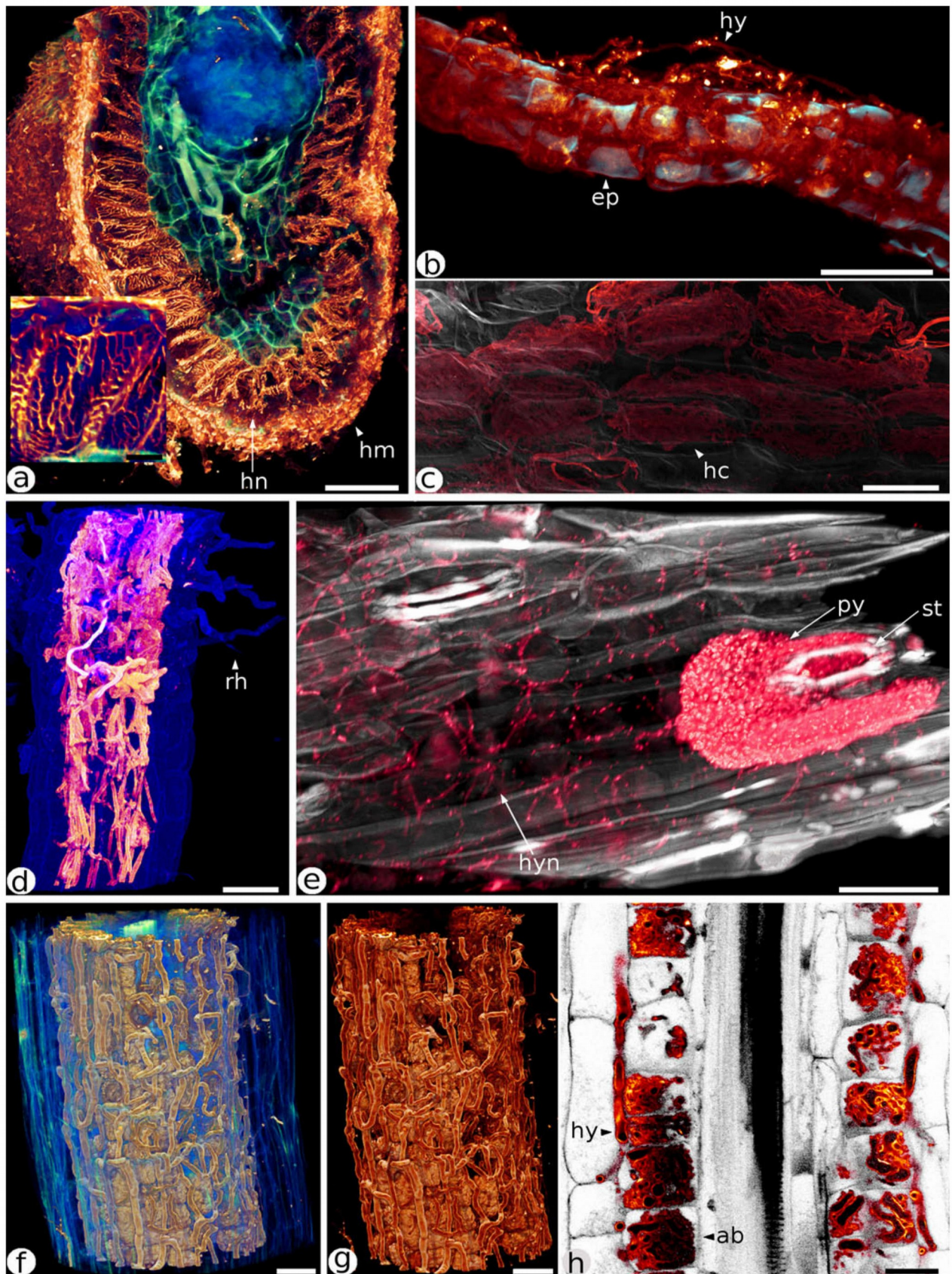


Fig. 2 **a** Transverse view of a young root of *B. pendula*. The plant tissue is displayed in *bluish green*, and the fungal tissue is in *orange* (3D projection, AMIRA™). Scale (general view), 50 μm; (inlet), 10 μm. **b** Hair root of *C. vulgaris*. The plant tissue is shown in *cyan* and the fungus, in *red*. Fine hyphae (*hy*) surround the epidermal cells (*ep*), and hyphal coils are apparent through the transparent epidermal cell walls (3D projection, LCS). Scale, 50 μm. **c** Transverse view of a part of a *L. abortivum* root. The cortex parenchyma is displayed in *grey*, and the intracellular hyphal coils (*hc*) in *reddish to orange* (3D projection, LCS). Scale, 95 μm. **d** Root of *G. aparine* colonised by an arbuscular mycorrhizal fungus. The plant tissue is displayed in *blue*, and the fungus, in *orange*. The natural spatial arrangement of the root hairs (*rh*) remains intact (3D projection, LCS). Scale, 50 μm. **e** Oblique transverse view of a *T. aestivum* leaf heavily infested by *Z. tritici*. The leaf tissue is displayed in *grey*, and the fungus, in *red*. The dense hyphal network (*hyn*) inside the leaf mesophyll and the fungal pycnidium (*py*) beneath the stomata (*st*) are visible (3D projection, AMIRA™). Scale, 40 μm. **f** Root of *P. paniculata* showing intensive colonisation with an arbuscular mycorrhizal fungus. The plant tissue is displayed in *blue*, and the fungus, in *orange* (3D projection, AMIRA™). Scale, 40 μm. **g** The same image stack as in Fig. 2f, but displaying the fungus alone. Note the complex spatial arrangement of the hyphal network (3D projection, AMIRA™). Scale, 40 μm. **h** The same image stack as in Fig. 2f, g. A single layer of the z stack is shown with the plant tissue in *dark grey on white background*, and the fungus, in *orange*. The tomographic visualisation allows the analysis of critical positions of hyphae (*hy*), cell walls or even arbuscular branches (*ab*) in a three-dimensional image (AMIRA™). Scale, 30 μm

Conclusion

The technique presented here, involving selective staining of plant and fungal tissues prior to resin embedding, followed by microtomy and subsequent confocal laser scanning microscopy, can generate image stacks with extended depth and high resolution of three-dimensional plant and fungal structures. In combination with software-based analytical tools, the new method improves and accelerates the morpho-anatomical analysis of a variety of mycorrhizal, biotrophic or parasitic plant–fungus interactions.

Acknowledgments We thank all participants of the last 3 years of confocal microscopy courses who helped to test this method on various kinds of material, thus helping to improve the method to its present practicable stage; Florian Lemmer and Julian Walther for kindly providing the plant material of *S. parviflora* and *L. abortivum*; Friedemann Brauer (Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada) and the anonymous referees for their valuable comments on the manuscript.

References

- Alexander T, Meier R, Toth R, Weber HC (1988) Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with references to *Zea mays* L. *New Phytol* 110:363–370
- Alexander T, Toth R, Meier R, Weber HC (1989) Dynamics of arbuscule development and degeneration in onion, bean and tomato with reference to vesicular-arbuscular mycorrhizae with grasses. *Can J Bot* 67:2505–2513
- Blasius D, Feil W, Kottke I, Oberwinkler F (1986) Hartig net structure and formation in fully ensheathed ectomycorrhizas. *Nord J Bot* 6: 837–842
- Bonfante-Fasolo P, Faccio A, Perotto S, Schubert A (1990) Correlation between chitin distribution and cell wall morphology in the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Mycol Res* 94:157–165
- Brun A, Chalot M, Finlay RD, Söderström B (1995) Structure and function of the ectomycorrhizal association between *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. and *Betula pendula* Roth. I. Dynamics of mycorrhiza formation. *New Phytol* 129:487–493
- Diagne N, Escoute J, Lartaud M, Verdeil JL, Franche C, Kane A, Bogusz D, Diouf D, Duponnois R, Svistoonoff S (2011) Uvitex2B: a rapid and efficient stain for detection of arbuscular mycorrhizal fungi within plant roots. *Mycorrhiza* 21:315–321
- Dickson S (2004) The Arum–Paris continuum of mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 163:187–200
- Dickson S, Kolesik P (1999) Visualisation of mycorrhizal fungal structures and quantification of their surface area and volume using laser scanning confocal microscopy. *Mycorrhiza* 9:205–213
- Doehleman G, Wahl R, Vranes M, de Vries RP, Kämper J, Kahmann R (2007) Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *J Plant Physiol* 165:29–40
- Domínguez LS, Sérsic A (2004) The southernmost myco-heterotrophic plant, *Arachnitis uniflora*: root morphology and anatomy. *Mycologia* 96:1143–1151
- Domínguez LS, Melville L, Sérsic A, Faccio A, Peterson RL (2009) The mycoheterotroph *Arachnitis uniflora* has a unique association with arbuscular mycorrhizal fungi. *Botany* 87:1198–1208
- Fester T, Berg RH, Taylor CG (2008) An easy method using glutaraldehyde-introduced fluorescence for the microscopic analysis of plant biotrophic interactions. *J Microsc* 231:342–348
- Gallaud I. (1905). Etudes sur les mycorhizes endotrophes. *Rev Gén Bot* 17: 7–48, 66–83, 123–136, 223–239, 313–325, 425–433, 479–500.
- Gao L-L, Delp G, Smith SE (2001) Colonization patterns in a mycorrhiza-defective mutant tomato vary with different arbuscular-mycorrhizal fungi. *New Phytol* 151:477–491
- Gutiérrez A, Morte A, Honrubia M (2003) Morphological characterization of the mycorrhiza formed by *Helianthemum almeriense* Pau with *Terfezia clavervyi* Chatin and *Picoa lefebvrei* (Pat.) Maire. *Mycorrhiza* 13:299–307
- Haug I, Weiß M, Homeier J, Oberwinkler F, Kottke I (2005) Russulaceae and Thelephoraceae form ectomycorrhizas with members of the Nyctaginaceae (Caryophyllales) in the tropical mountain rain forest of southern Ecuador. *New Phytol* 165:923–936
- Imhof S (1999a) Anatomy and mycotrophy of the achlorophyllous *Afrothismia winkleri* (Engl.) Schltr. (Burmanniaceae). *New Phytol* 144:533–540
- Imhof S (1999b) Subterranean structures and mycorrhiza of the achlorophyllous *Burmannia tenella* Benth. (Burmanniaceae). *Can J Bot* 77:637–643
- Imhof S (1999c) Root morphology, anatomy and mycotrophy of the achlorophyllous *Voyria aphylla* (Jacq.) Pers. (Gentianaceae). *Mycorrhiza* 9:33–39
- Kormanik PP, McGraw AC (1982) Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. In: Schenck NC (ed) *Methods and principles of mycorrhizal research*. The American Phytopathological Society, St. Paul, pp 37–45
- Lum MR, Li Y, LaRue TA, David-Schwartz R, Kapulnik Y, Hirsch AM (2002) Investigation of four classes of non-nodulating white sweetclover (*Melilotus alba* annua Desr.) mutants and their responses to arbuscular-mycorrhizal fungi. *Integ and Comp Biol* 42: 295–303
- Marcel S, Sawers R, Oakeley E, Angliker H, Paszkowski U (2010) Tissue-adapted invasion strategies of the rice blast *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell* 22:3177–3187

- Massicotte HB, Melville LH, Molina R, Peterson RL (1993) Structure and histochemistry of mycorrhizae synthesized between *Arbutus menziesii* (Ericaceae) and two basidiomycetes, *Pisolithus tinctorius* (Pisolithaceae) and *Piloderma bicolor* (Corticaceae). *Mycorrhiza* 3: 1–11
- Melville L, Dickson S, Farquhar ML, Smith SE, Peterson RL (1998) Visualization of mycorrhizal fungal structures in resin embedded tissues with xanthene dyes using laser scanning confocal microscopy. *Can J Bot* 76:174–178
- Merryweather JW, Fitter AH (1991) A modified method for elucidating the structure of the fungal partner in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Mycol Res* 95:1435–1437
- Monheit JE, Cowan DF, Moore DG (1984) Rapid detection of fungi in tissues using calcofluor white and fluorescence microscopy. *Arch Pathol Lab Med* 108:616–618
- Ormsby A, Hodson E, Li Y, Basinger J, Kaminskyj S (2007) Quantitation of endorhizal fungi in high Arctic tundra ecosystems through space and time: the value of herbarium archives. *Can J Bot* 85:599–606
- Peters C, Basinger JF, Kaminsky SGW (2011) Endorhizal fungi associated with vascular plants on Trueland Lowland, Devon Island, Nunavut, Canadian High Arctic. *Arc Antarct Alp Res* 43:73–81
- Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* 55:158–160
- Rath M, Weber HC, Imhof S (2013) Morpho-anatomical and molecular characterization of the mycorrhizas of European *Polygala* species. *Plant Biol* 15:548–557
- Read DJ, Duckett JG, Francis R, Ligrone R, Russell A (2000) Symbiotic fungal associations in ‘lower’ land plants. *Phil Trans R Soc Lond B* 355:815–831
- Robin JB, Arffa RC, Avni I, Rao NA (1986) Rapid visualization of three common fungi using fluorescein-conjugated lectins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27:500–506
- Rounds CM, Lubeck E, Hepler PK, Winship LJ (2011) Propidium iodide competes with Ca^{2+} to label pectin in pollen tubes and *Arabidopsis* root hairs. *Plant Physiol* 157:175–187
- Schelkle M, Ursic M, Farquhar M, Peterson RL (1996) The use of laser scanning confocal microscopy to characterize mycorrhizas of *Pinus strobus* L. and to localize associated bacteria. *Mycorrhiza* 6:431–440
- Schmid E, Oberwinkler F (1993) Mycorrhiza-like interaction between the achlorophyllous gametophyte of *Lycopodium clavatum* L. and its fungal endophyte studied by light and electron microscopy. *New Phytol* 124:69–81
- Sørensen CK, Justesen AF, Hovmøller MS (2012) 3-D imaging of temporal and spatial development of *Puccinia striiformis* haustoria in wheat. *Mycologia* 104:1381–1389
- Truernit E, Siemerling KR, Hodge S, Grbic V, Haseloff J (2006) A map of KNAT gene expression in the *Arabidopsis* root. *Plant Mol Biol* 60: 1–20
- Vierheilig H, Schweiger P, Brundrett M (2005) An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. *Physiol Plant* 125:393–404
- Zhang Q, Blaylock LA, Harrison MJ (2010) Two *Medicago truncatula* half-ABC transporters are essential for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Cell* 22:1483–1497

XVI Erklärung zur Vergabe des Themas und des Betreuungsverhältnisses während der Promotion

Die Vergabe des Promotionsthemas erfolgte durch Dr. Stephan Imhof. Prof. Dr. Hans Christian Weber und später Prof. Dr. Paul Galland übernahmen die offizielle Betreuung der Promotion.

XVII Angabe zum Eigenanteil an den Publikationen

Rath M., Weber H. C., Imhof S. 2013:

Konzeption des systematischen Rahmens der Arbeit, Materialbeschaffung [mit Ausnahme von *Polygala monspeliaca* (Dr. B. Kendzior) bzw. *P. myrtifolia* (Dr. S. Imhof)] und Finanzierung der Forschungsreisen: M. Rath. Datenerhebung, Analyse und Diskussion: M. Rath. Verfassen der Publikation: M. Rath. Finanzierung der Verbrauchsmittel und Laborausstattung: Prof. Dr. H. C. Weber und Dr. S. Imhof. Unterstützung bei der Erstellung des Manuskripts: Dr. S. Imhof. Korrespondierender Autor: M. Rath

Rath M., Grolig F., Haueisen J., Imhof S. 2014:

Konzeption des Verfahrens: M. Rath. Unterstützung bei der Optimierung der Methodik: Dr. F. Grolig und Dr. J. Haueisen. Finanzierung der Verbrauchsmittel und Laborausstattung: Dr. F. Grolig, Dr. S. Imhof. Verfassen der Publikation: M. Rath. Unterstützung bei der Erstellung des Manuskripts: Dr. F. Grolig und Dr. S. Imhof. Korrespondierender Autor: M. Rath

Mennes C. B., Moerland M. S., Rath M., Smets, E. F., Merckx, V. S. 2015:

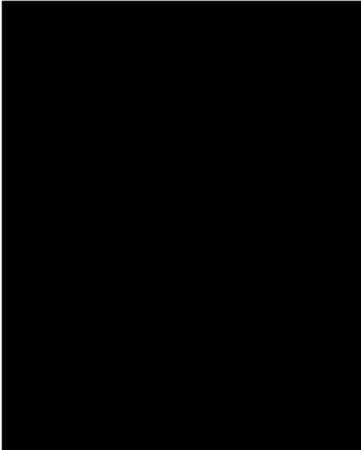
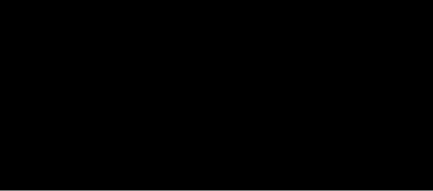
Anteil M. Rath: Organisation des Pflanzenmaterials von *Salomonina* spp., Isolation der Sequenzen der pilzlichen Mykorrhizasymbionten von *Salomonina* spp.. Verfassen des entsprechenden Abschnitts im Methodenteil und Mitsprache in der Diskussion im Spezifitätskapitel der Publikation.

Rath M., Sasirat S., H. C. Weber, Imhof S. (Manuskript A, eingereicht):

Konzeption des systematischen Rahmens der bearbeiteten Arten und Materialbeschaffung mit Ausnahme von *Monnina* spec. (Dr. S. Imhof): M. Rath. Finanzierung der Forschungsreise: M. Rath und Dr. S. Imhof. Datenerhebung, Analyse und Diskussion: M. Rath. Verfassen der Publikation: M. Rath. Finanzierung der Verbrauchsmittel und Laborausstattung: Dr. S. Imhof und Prof. Dr. H. C. Weber. Kooperationspartner in Thailand: S. Sasirat. Unterstützung bei der Erstellung des Manuskripts: Dr. S. Imhof. Korrespondierender Autor: M. Rath

Rath M., Sasirat S., Imhof S. (Manuskript B):

Konzeption des systematischen Rahmens der bearbeiteten Arten und Materialbeschaffung mit Ausnahme von *Monnina* spec. (Dr. S. Imhof): M. Rath. Finanzierung der Forschungsreise: M. Rath und Dr. S. Imhof. Datenerhebung, Analyse und Diskussion: M. Rath. Verfassen der Publikation: M. Rath. Finanzierung der Verbrauchsmittel: Dr. S. Imhof. Kooperationspartner während der Materialbeschaffung in Thailand: S. Sasirat und Narumol Piwpuan. Korrespondierender Autor: M. Rath





XIX Weitere Forschungstätigkeiten

Rath M., Dümmer M., Galland P., Forreiter C. Unequal gravity effects on EHB1 and AGD12, two effector proteins of root gravitropism in outer columella cells of *Arabidopsis thaliana*. (eingereicht)

Dümmer M., Michalski C., Essen L.-O., Rath M., Galland P., Forreiter C. 2016 EHB1 and AGD12, two calcium-dependent proteins affect gravitropism antagonistically in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* 206: 114 - 124

Lahrman U., Ding Y., Banhara A., Rath M., Hajirezaei M. R., Döhlemann S., von Wirén N., Parniske M., Zuccaro A. 2013 Host-related metabolic cues affect colonization strategies of a root endophyte. *PNAS Early Edition*.

Zahiri A., Heimel K., Wahl R., Rath M., Kämper J. 2010 The *Ustilago maydis* forkhead transcription factor fox1 is involved in the regulation of genes required for the attenuation of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 1118 - 1129

Rath M. 2005 Morphologisch / anatomische Untersuchung von *Sabatia grandiflora* (Gray) Small und *Eustoma exaltatum* (L.) Salisb. (Gentianaceae) unter besonderer Berücksichtigung ihrer Mykorrhiza. (Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg)