Inonotus hastifer, *Inonotus nodulosus* und *Inonotus radiatus*: drei nahe verwandte Vertreter der Schillerporlinge

MICHAEL FISCHER & TOBIAS WAGNER

Institut für Botanik, Universität Regensburg, D-93040 Regensburg

Eingereicht am 31. 12. 1997

Fischer, M. & T. Wagner (1999) - *Inonotus hastifer*, *Inonotus nodulosus* und *Inonotus radiatus*: drei nahe verwandte Vertreter der Schillerporlinge. Myc. Bav. **3:** 16 – 23.

Key Words: Hymenochaetales, *Inonotus* microscopy, culture behavior, pairing tests, restriction analysis.

Summary: A synopsis of distinctive characters is provided for the closely related species *Inonotus hastifer*, *I. nodulosus* and *I. radiatus*. A reliable differentiation between the taxa can be obtained by combination of data based on microscopy, ecology, culture behavior, pairing tests and restriction analysis. *Inonotus radiatus* seems somewhat less related when compared with *I. hastifer* and *I. nodulosus*.

Zusammenfassung: Es wird eine Zusammenfassung der kennzeichnenden Merkmale der drei nahverwandten Arten *I. hastifer*, *I. nodulosus* und *I. radiatus* gegeben. Unter Kombination von Daten beruhend auf den Bereichen Mikroskopie, Ökologie, Kulturverhalten, Paarungstests und Restriktionsanalyse kann eine sehr zuverlässige Differenzierung zwischen den Sippen erreicht werden. *Inonotus radiatus* scheint verwandtschaftlich etwas entfernt von den beiden anderen Sippen zu stehen.

Einleitung

Die oft recht lebhaft gefärbten Fruchtkörper der Schillerporlinge, *Inonotus* P. Karst., gehören wohl zu den schönsten unter den holzbewohnenden Pilzen. Sie finden sich an einer ganzen Reihe verschiedener Wirte, überwiegend an Laub-, vereinzelt auch an Nadelbäumen.

Verglichen mit den Fruchtkörpern der nahverwandten Gattung der Feuerschwämme, *Phellinus* Quél., sind *Inonotus*-Fruchtkörper eher kurzlebig; sie erscheinen etwa im Sommer-Spätsommer und sterben mit den ersten Frösten wieder ab. Dessen ungeachtet lassen sie sich oft über viele Jahre hinweg am gleichen Standort finden; das im Holz des Wirtes eine Weißfäule verursachende Mycel bringt alljährlich frische Fruchtkörper hervor.

RYVARDEN & GILBERTSON (1993) geben in ihrer zusammenfassenden Darstellung der europäischen Porlinge 18 *Inonotus*-Arten an, von denen sich immerhin 15 auch in Deutschland nachweisen lassen. Ähnlich wie die umfangreiche Gattung *Phellinus* können auch die Schillerporlinge (weltweit einige Dutzend Arten; s. PEGLER 1964; GILBERTSON & RYVARDEN 1986) in eine Reihe mehr oder weniger gut differenzierbarer Gruppierungen untergliedert werden (DONK 1969; PARMASTO 1973; FIASSON & NIEMELÄ 1984). Inwieweit diesen Gruppierungen möglicherweise ein eigener Gattungsstatus zugeordnet werden sollte, ist bislang nicht geklärt. Auf den klassischen Unter-

suchungsbereichen beruhende Aussagen konnten hier bislang keine endgültige Klarheit bringen und weiterreichende Hinweise werden sich wohl erst mittels der modernen DNA-Analytik gewinnen lassen.

Eine der für *Inonotus* diskutierten Gruppen steht im Mittelpunkt der nachfolgend vorgestellten Bearbeitung; sie umfaßt in Mitteleuropa die heute weitgehend zweifelsfrei anerkannten Sippen *I. hastifer* Pouz., den Vielgestaltigen Schillerporling, *I. nodulosus* (Fr.) P. Karst., den Knotenförmigen Schillerporling, und *I. radiatus* (Sow.: Fr.) P. Karst., den Erlen-Schillerporling. Bis in die sechziger Jahre hinein bestand über den Status dieser Sippen keine allgemeine Übereinkunft, verdeutlicht beispielsweise in den Anmerkungen von JAHN (1963) zu *I. radiatus* und *I. nodulosus* (s. auch PEGLER 1964).

Ausschließlich basierend auf morphologischen Merkmalen ist eine zweifelsfreie Identifizierung von *I. hastifer, I. nodulosus* und *I. radiatus* nicht immer möglich. In besonderem Maße gilt dies für gänzlich resupinate Fruchtkörper, die unter liegenden Stämmen oder Ästen gefunden werden (JAHN 1979, 1981). Wichtigstes Differenzierungsmerkmal sind in solchen Fällen die Seten. Während *I. radiatus* gekrümmte Hymenialseten aufweist, sind diese bei *I. nodulosus* und *I. hastifer* gerade; zumindest die letztgenannte Art verfügt außerdem über eingebettete Tramaseten, deren Nachweis aber nicht immer leicht zu führen ist. Ein weiteres Indiz hinsichtlich der Artzugehörigkeit läßt sich aus der Identifizierung der Wirtsbäume gewinnen: *I. radiatus* findet sich sehr weitgehend an Erlen, *I. nodulosus* und *I. hastifer* an Buchen. Überschneidungen zwischen den Arten sind hier aber nicht ausgeschlossen.

Basierend auf überwiegend in Bayern gesammeltem Material soll im folgenden eine Zusammenstellung der kennzeichnenden Merkmale der drei Arten *I. hastifer, I. nodulosus* und *I. radiatus* geboten werden. Aus den obigen Ausführungen mag deutlich werden, daß der morphologisch-anatomische Merkmalsbereich insgesamt recht gut untersucht ist. Nichtsdestotrotz wurden auch die uns zur Verfügung stehenden Aufsammlungen einer mikroskopischen Analyse unterzogen. Die eigentlichen Schwerpunkte lagen aber etwas anders, verdeutlicht in den nachfolgend aufgeführten Themenkomplexen:

1. Inwieweit lassen sich die Sippen kultivieren und daraus resultierend möglicherweise charakterisieren?
2. Wie steht es um den Fortpflanzungsmechanismus der einbezogenen Aufsammlungen? Damit eng verbunden ist zwangsläufig die Frage nach den Kreuzungsbeziehungen zwischen den einzelnen Sippen.
3. Der Bereich der DNA-Analytik erlangt in diesen Tagen zunehmende Bedeutung im Zusammenhang mit Identifizierung und phylogenetischer Einordnung von Arten oder auch taxonomisch übergeordneter Einheiten. Lassen sich Stämme einer Art, unabhängig von Morphologie, Substrat oder geographischer Herkunft, auf diese Weise zuverlässig einordnen bzw. von Stämmen anderer Arten differenzieren?

Die bisherigen Daten zu diesen drei Bereichen sind sehr sparsam. Bezüglich der Kultivierung finden sich immerhin einzelne Angaben bei STALPERS (1978) und FISCHER (1987). Für den Bereich Kreuzungsverhalten wurden erste Befunde von FISCHER (1987) erarbeitet. DNA-analytische Angaben fehlen in der bisherigen Literatur vollständig.

Material & Methoden:

Die Felddaten der untersuchten Stämme sind in der folgenden Tab. 1 zusammengefaßt.

Tab. 1: Felddaten der untersuchten Stämme von *Inonotus hastifer*, *I. nodulosus* und *I. radiatus*

Art	Stamm	Herkunft	Substrat	leg./det.
I. hastifer	1194	Bayern	*Fagus sylvatica*	Luschka
I. hastifer	588	Bayern	*Fagus sylvatica*	Luschka
I. hastifer	84-1023a	Bayern	*Fagus sylvatica*	Nuß
I. nodulosus	84-1023b	Bayern	*Fagus sylvatica*	Nuß
I. nodulosus	H158	Bayern	*Fagus sylvatica*	Hilgartner
I. nodulosus	H167	Bayern	*Fagus sylvatica*	Hilgartner
I. nodulosus	TW 442	Bayern	*Fagus sylvatica*	Wagner
I. nodulosus	87-115	Bayern	*Fagus sylvatica*	Fischer
I. radiatus	10-85	Bayern	*Alnus incana*	Luschka
I. radiatus	TW 702	Bayern	*Betula* sp.	Wagner
I. radiatus	TW 703	Bayern	*Alnus incana*	Wagner
I. radiatus	TW 704	Bayern	*Alnus glutinosa*	Wagner
I. radiatus	2728	Finnland	*Corylus avellana*	Dai

Mikroskopie:

Frischmaterial wurde jeweils in H_2O_{bid}, in Melzer's Reagenz und Lactophenolbaumwollblau, getrocknetes Material zusätzlich in 3% KOH beobachtet. Die gewählten Vergrößerungen waren 500 x oder 1250 x. Zur Feststellung der Sporen- und Setenmaße wurden je Stamm 10-20 Messungen durchgeführt.

Kultivierung:

Die Stämme wurden auf Malzextrakt-Medium (ME; 2% Malzextrakt, 2% Agar, 0.05% Hefeextrakt in H_2O_{bid}) kultiviert. Die routinemäßige Kultivierung erfolgte bei 23° C im Dauerdunkel, daneben wurden Tests bei 15° C und 27° C durchgeführt.

Paarungstests:

Von ausgewählten Stämmen jeder Art wurden Sporenabwurfpräparate hergestellt und nachfolgend Einspor-Mycelien gewonnen. Innerstammpaarungen dieser Mycelien führten zur Bestimmung des Fortpflanzungsmusters der Arten, Interstammpaarungen dienten der Bestimmung eventueller Kreuzungsbarrieren.

DNA-Isolierung und Polymerasen-Kettenreaktion (PCR):

DNA wurde aus frisch angezogenen Mycelkulturen isoliert; die Isolierung folgte im wesentlichen der Vorschrift von LEE & TAYLOR (1990), weitere Angaben finden sich bei FISCHER (1995). Mit Hilfe der PCR wurde ein Bereich der kerncodierten ribosomalen DNA (rDNA) amplifiziert. Dieser durch die Primer ITS1 und ITS4 definierte Abschnitt umfaßt die ITS I-Region, das 5.8S rRNA-Gen sowie die ITS II-Region. Die verwendeten Amplifizierungsparameter waren wie in früheren Arbeiten beschrieben (FISCHER 1995; FISCHER et al. 1997).

Restriktionsanalysen:

Die gewonnenen PCR-Produkte wurden gemäß den Anleitungen der Hersteller (MBI, Boehringer) mit den Restriktionsendonucleasen *Alu* I, *Csp6* I und *Hae* III verdaut. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte auf 3.4%igen Agarose-Gelen.

Ergebnisse und Diskussion:

Mikroskopie:

Die Sporenmessungen ergaben eine zumindest tendenzielle Differenzierung zwischen *I. radiatus* auf der einen und *I. hastifer* sowie *I. nodulosus* auf der anderen Seite. Die Sporen waren 4-6 x 3-4.5 µm bei *I. radiatus*, 4-5 x 2.5-4 µm bei *I. hastifer* und 4-5 x 2.5-3.5 µm bei *I. nodulosus*. Diese Werte stehen in prinzipieller Übereinstimmung mit den Angaben bei BREITENBACH & KRÄNZLIN (1986) und RYVARDEN & GILBERTSON (1993), die ebenfalls *I. radiatus* die im Mittel etwas größeren Sporen zuweisen. Wie aus unseren Daten ersichtlich, kommt es jedoch zu Überlappungen zwischen den Arten und nicht jeder untersuchte Stamm von *I. radiatus* war alleine aufgrund seiner Sporengröße eindeutig zuzuordnen. Die Sporen waren fast durchwegs farblos hyalin; nur in älteren Teilen der Röhren fanden sich vereinzelt Sporen mit z.T. recht ausgeprägter gelbbrauner Pigmentierung. Die Sporen aller drei Arten waren cyanophil (Blaufärbung in Baumwollblau) und zumindest tendenziell dextrinoid (gelbbraune Färbung in Melzer's Reagenz).

Während die Sporen der Mehrheit der *Inonotus*-Arten typischerweise eine deutliche gelbbraune Pigmentierung zeigen, sind die hier besprochenen Sippen demnach durch gar nicht oder höchstens vereinzelt pigmentierte Sporen gekennzeichnet. Dies war ein Hauptargument DONK's (1969), zumindest *I. radiatus* und *I. nodulosus* (seinerzeit noch als fa. *nodulosus* zu *I. radiatus* gestellt) zur Sektion *Inoderma* zusammenzufassen.

Das diagnostische Merkmal von *I. radiatus*, die gekrümmten Hymenialseten, waren in fast allen daraufhin untersuchten Aufsammlungen der Art problemlos festzustellen. Problematischer gestaltete sich die Suche nach den vor allem bei *I. hastifer* zu erwartenden Tramaseten; sie waren zwar in allen daraufhin untersuchten Stämmen nachzuweisen, dabei aber immer selten. In einem Fall traten Tramaseten auch bei *I. radiatus* (Stamm TW 702 von *Betula*) auf. *Inonotus hastifer* und *I. nodulosus* zeigten keine Unterschiede hinsichtlich der Maße der Hymenialseten; diese waren 12-32 x 4-7 µm im ersten, 12-28 x 5-8 µm im zweiten Fall.

Kulturverhalten:

Entsprechend der Mehrzahl der holzbewohnenden Pilze war auch bei den hier einbezogenen *Inonotus*-Arten eine problemlose Kultivierung möglich. Die Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Arten war bei den angebotenen Bedingungen von 23° C unterschiedlich. Im Falle von *I. radiatus* waren etwa 6 Wochen notwendig, um eine Petrischale mit einem Durchmesser von 8.5 cm vollständig zu bewachsen, bei *I. hastifer* und *I. nodulosus* waren etwa 4 Wochen ausreichend. Unter den von uns bearbeiteten Stämmen fanden sich zwei verschiedene Wachstumstypen; der eine gekennzeichnet durch eine reichliche Ausbildung von Luftmycel, wobei es nur zu einer geringen Anfärbung des Mediums kam (Luftmyceltyp), der andere charakterisiert durch nur sehr schwach ausgeprägtes Luftmycel, verbunden aber mit einer starken Anfärbung des Mediums (Substratmyceltyp).

Abb. 1: *Inonotus hastifer* (links oben), *I. nodulosus* (rechts oben), *I. radiatus* (unten); Mycelwachstum auf Malzextrakt Medium bei 23° C; Luftmyceltyp bei *I. hastifer* und *I. nodulosus*, Substratmyceltyp bei *I. radiatus*.

Alle Stämme der Arten *I. hastifer* und *I. nodulosus* waren dem ersten, schnelleren, Luftmyceltyp, alle Stämme von *I. radiatus* dem zweiten, langsameren, Substratmyceltyp zuzuordnen (Abb. 1). Ähnliche Phänomene sind von einzelnen *Phellinus*-Arten bekannt (NIEMELÄ 1977; FISCHER 1987). NIEMELÄ (1977) konnte eine Temperaturabhängigkeit dieses Phänomens wahrscheinlich machen; demnach wäre der Luftmyceltyp beim Temperaturoptimum, der Substratmyceltyp außerhalb davon dominierend. Eine Anzucht der Mycelien bei 15° C bzw. 27° C führte bei unseren Stämmen aber zu einem höchstens unwesentlich veränderten Wachstumsbild und ein eindeutiger Bezug Myceltyp – Temperatur war demnach nicht nachzuweisen.

Paarungstests:

Von allen drei Arten konnten repräsentativ Einspor-Mycelien gewonnen werden. Die Sporen begannen meist bereits nach wenigen Tagen mit der Keimung, der Prozentsatz der keimenden Sporen war dabei gleichmäßig hoch (dies im Unterschied beispielsweise zu *I. rheades*, dessen Sporen nur schwer unter Kulturbedingungen auskeimen).

Die Innerstammpaarungen ergaben für alle Arten ein bipolares Kreuzungsmuster. Demnach lassen sich die Sporen eines jeden Stammes in zwei Gruppen einteilen. Innerhalb der Gruppen kommt es bei Paarungen zur Ausbildung einer schwach pigmentierten Trennlinie zwischen den Mycelien. Bei Paarungen von Einspor-Mycelien verschiedener Gruppen entwickelt sich hingegen ein mehr oder weniger deutliches Mycel in der Kontaktzone, hervorgegangen aus der Kombination der beiden Partner.

Die Interstammpaarungen zwischen den verschiedenen Arten führten in allen Fällen zur Ausbildung einer pigmentierten Linie zwischen den Mycelien; die Sterilitätsbarrieren waren demnach vollständig. Dem biologischen Artkonzept folgend, ließen sich die Arten mittels der durchgeführten Paarungstests eindeutig definieren.

DNA-Amplifizierung und Restriktionsanalyse:

Bei allen daraufhin untersuchten Stämmen war eine enzymatische Vervielfältigung des definierten rDNA-Abschnittes möglich. Es ergaben sich dabei keine Größenunterschiede zwischen den Arten. Das durch die Primerkombination ITSI und ITS4 definierte Fragment war durchwegs etwa 690 Basenpaare (bp) lang.

Beruhend auf sechs untersuchten Stämmen ergab die Restriktionsanalyse dieses Fragments für jedes der drei einbezogenen Enzyme zwei verschiedene Phänotypen (Abb. 2). Nach Ansatz mit *Alu* I und *Csp6* I zeigten *I. hastifer* und *I. radiatus*, nach Ansatz mit *Hae* III *I. hastifer* und *I. nodulosus* identische Bandenmuster. Wie bei nahverwandten Sippen nicht ungewöhnlich, war eine Differenzierung demnach erst nach einer Kombination der gewonnenen Ergebnisse möglich. Stämme gleicher Artzugehörigkeit waren nicht voneinander zu unterscheiden. Eine Zusammenstellung der Restriktionsdaten findet sich in der folgenden Tab. 2.

Tab 2: Fragmentgrößen der durch die Primerkombination ITS1 und ITS4 definierten Region der ribosomalen DNA nach Ansatz mit ausgewählten Restriktionsenzymen

Restriktionsenzym	*Alu* I	*Csp6* I	*Hae* III
Inonotus hastifer	530[a] 160	690	590 80
Inonotus nodulosus	370 160[b]	320 180[b]	590 80
Inonotus radiatus	530 160	690	400 200 80

[a] Fragmentgröße in Basenpaaren [b] Doppelbanden

Unsere Ergebnisse stützen die bisherigen Erkenntnisse, denen zufolge die durch ITS1 und ITS4 definierte Region der ribosomalen DNA einen relativ variablen Genomabschnitt darstellt, der gut geeignet ist für Fragestellungen auf der Ebene nahverwandter Taxa.

Zusammenfassung:

Inonotus hastifer, I. nodulosus und *I. radiatus* sind ohne Zweifel sehr eng miteinander verwandte Arten. Eine auf morphologischen Merkmalen beruhende Zuordnung im Gelände wird nicht immer zweifelsfrei möglich sein. Trotz aller Ähnlichkeiten steht aber eine Reihe von Merkmalen zur Verfügung, die letztendlich eine eindeutige Trennung der drei Taxa ermöglichen:

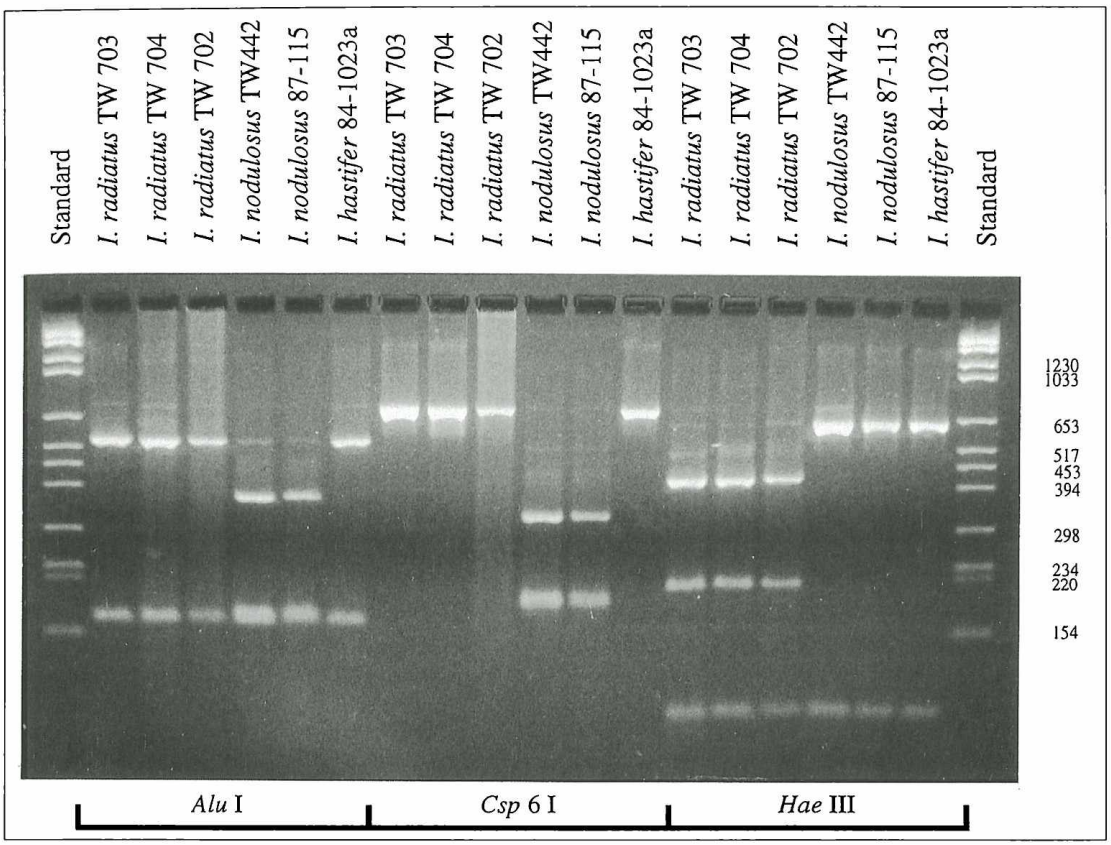

Abb. 2: Ausgewählte Stämme von *Inonotus radiatus*, *I. nodulosus* und *I. hastifer*; Restriktionsanalyse des ITS1 - ITS4 Produktes mit den Endonucleasen Alu I, Csp6 I Und Hae III.

Hinsichtlich der Substratansprüche werden Funde von Erle in aller Regel *I. radiatus* zuzuordnen sein, auch wenn die Art mitunter an anderen Substraten (z.B. Birke, Hasel, auch Buche) vorkommt. Funde von Buche sprechen für eine Zugehörigkeit zu *I. nodulosus* oder *I. hastifer*.

Mikroskopisch läßt sich *I. radiatus* sehr zuverlässig durch das Vorhandensein gekrümmter Seten, tendenziell auch durch die im Mittel etwas größeren Sporen ansprechen; eine entsprechende Identifizierung von *I. hastifer* bzw. *I. nodulosus* ist hingegen problematischer, das Merkmal der setalen Hyphen nicht uneingeschränkt anwendbar.

In Kultur werden die Mycelien von *I. radiatus* in der Regel etwas langsamer und unter nur sehr sparsamer Ausbildung von Luftmycel wachsen.

Mittels Paarungstests sind die drei Arten eindeutig voneinander trennbar; in allen untersuchten Fällen zeigt sich zwischen den Arten eine deutliche antagonistische Reaktion. Ebenso eindeutig ist die Differenzierung auf DNA-Ebene.

Nicht jeder der genannten Merkmalsbereiche wird für den Bearbeiter verfügbar sein und so mag die Zuordnung einzelner Aufsammlungen immer wieder zweifelhaft bleiben. Die kennzeichnenden Merkmale in ihrer Gesamtheit zeigen aber jedenfalls sehr deutlich den spezifischen Charakter der vorgestellten Taxa. Dies gilt wohl besonders für *I. radiatus*, der verwandtschaftlich etwas abgesetzt von den beiden anderen Sippen zu stehen scheint.

Danksagung:

Unser herzlicher Dank gilt all denen, die uns Material für diese Untersuchungen zur Verfügung gestellt haben (siehe Tab. 1).

Literatur

BREITENBACH, J. & F. KRÄNZLIN (1986) - Pilze der Schweiz. Bd. 2 (Nichtblätterpilze). Luzern.

DONK, M. A. (1969) - Revision der Niederländischen Heterobasidiomycetidae und Homobasidiomycetidae - *Aphyllophoraceae*. Lehre.

FIASSON, J.-L. & T. NIEMELÄ (1984) - The Hymenochaetales: a revision of the European poroid taxa. Karstenia **24**: 14-28.

FISCHER, M. (1987) - Biosystematische Untersuchungen an den Porlingsgattungen *Phellinus* Quél. und *Inonotus* Karst. Berlin/Stuttgart.

– (1995) - Zur Systematik der Boletales: Isolierung und Kennzeichnung von DNA aus Fruchtkörpern und Mycelkulturen. Z. Mykol. **61**: 245-260.

FISCHER, M., M. JAROSCH, M. BINDER & H. BESL (1997) - Zur Systematik der Boletales: *Suillus* und verwandte Gattungen. Z. Mykol. **63**: 173-188.

GILBERTSON, R. L. & L. RYVARDEN (1986) - North American Polypores. Vol. 1. Oslo.

JAHN, H. (1963) - Mitteleuropäische Porlinge (*Polyporaceae* ss. lato) und ihr Vorkommen in Westfalen. Westf. Pilzb. **4**: 1-144.

– (1979) - Pilze die an Holz wachsen. Herford.

– (1981) - Die resupinaten *Phellinus*-Arten in Mitteleuropa mit Hinweisen auf die resupinaten *Inonotus*-Arten und *Poria expansa* (Desm.) [= *Polyporus megaloporus* Pers.]. Vaduz.

LEE, S.B. & J. W. TAYLOR (1990) - Isolation of DNA from fungal mycelia and single cells. In: PCR protocols. 282-287. San Diego.

NIEMELÄ, T. (1977) - The effects of temperature on two culture types of *Phellinus tremulae* (Fungi, *Hymenochaetaceae*). Ann. Bot. Fennici **14**: 21-24.

PARMASTO, E. (1973) - Novyi rod *Inonotopsis* Parm. (sem. *Hymenochaetaceae*). Folia Crypt. Estonica **2**: 11-13.

PEGLER, D. N. (1964) - A survey of the genus *Inonotus* (*Polyporaceae*). Trans. Brit. mycol. Soc. **47**: 175-195.

RYVARDEN, L. & R. L. GILBERTSON (1993) - European Polypores. Vol. 1. Oslo.

STALPERS, J. A. (1978) - Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. Studies in Mycology **16**.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Mycologia Bavarica

Jahr/Year: 1999

Band/Volume: 3

Autor(en)/Author(s): Fischer M., Wagner T.

Artikel/Article: Inonotus hastifer , Inonotus naodulosus und Inonotus radiatus : drei nahe verwandte Vertreter der Schillerporlinge 16-23