

Zur Systematik der Boletales: Isolierung und Kennzeichnung von DNA aus Fruchtkörpern und Mycelkulturen

MICHAEL FISCHER

Institut für Botanik, Universität Regensburg,
Postfach 101042, D-93040 Regensburg

Eingegangen am 3. August 1995

Fischer, M. (1995): On the order Boletales: Isolation and characterization of DNA from fruiting bodies and mycelia. *Z. Mykol.* 61(2): 245-260.

Key words: Boletales, DNA isolation, PCR, restriction fragment length polymorphism, cluster analysis, UPGMA.

Summary: Total DNA was successfully isolated from fresh and lyophilized fruiting bodies and mycelia from six taxa of *Boletus*, five taxa of *Leccinum*, four taxa of *Paxillus*, and one taxon each of *Leucogyrophana*, *Scleroderma*, and *Strobilomyces*. By means of the polymerase chain reaction (PCR) a region of the nuclear encoded 28S rDNA was amplified, which was 2.35 kb long in *Boletus*, *Leccinum*, *Leucogyrophana*, *P. involutus*, *P. filamentosus*, and *Sc. citrinum*, 2.32 kb long in *P. atrotomentosus* and *P. panuoides*, and 2.29 kb long in *St. floccopus*. No intraspecific length heterogeneity was observed.

The amplified region was digested with eight restriction endonucleases and a distance matrix was calculated from the RFLP (restriction fragment length polymorphism) phenotypes. Based on this a cluster analysis with UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) was performed to construct two unrooted networks, the first one comprising *Boletus* and *Leccinum*, the second one comprising *Paxillus*, *Leucogyrophana*, *Scleroderma* and *Strobilomyces*.

In the *Boletus*-*Leccinum* dendrogram three distinct clusters were formed. *Boletus* was divided into two groups, the first one composed of *B. calopus*, *B. splendidus* var. *moseri*, *B. fechtneri*, and *B. satanas*. This cluster was more closely positioned to the *Leccinum* cluster containing *L. aurantiacum*, *L. quercinum*, *L. piceinum*, *L. versipelle* and *L. scabrum* (distance $D = 52\%$) than to the second *Boletus* cluster formed by *B. edulis* and *B. pinophilus* ($D = 56\%$). No differentiation was possible between *L. aurantiacum*, *L. quercinum* and *L. piceinum*.

In the *Paxillus*-*Leucogyrophana*-*Scleroderma*-*Strobilomyces* dendrogram three clusters were distinguished at a distance level over 50%, the most distant clusters represented by *Scleroderma* and *Strobilomyces* ($D = 64\%$ and 54% respectively). Within the biggest cluster the *Paxillus* species were placed into two groups, separated by *L. olivascens*. This is in agreement with the idea of a close affinity between the Coniophoraceae and the Paxillaceae. According to the data obtained in this study *Paxillus* is a paraphyletic group.

The possibility of isolating and characterizing DNA from fruiting bodies should prove especially suitable for mycorrhiza forming fungi. In this way more reliable data about the systematics and taxonomy of problematical taxa should be obtained.

Zusammenfassung: Gesamt-DNA wurde isoliert aus frischen und lyophilisierten Fruchtkörpern bzw. Mycelien von sechs Sippen von *Boletus*, fünf Sippen von *Leccinum*, vier Sippen von *Paxillus* und je einer Sippe von *Leucogyrophana*, *Scleroderma* und *Strobilomyces*. Mittels der Polymerase-Kettenreaktion

wurde ein Abschnitt der 28S rDNA amplifiziert, der 2.35 kb lang war bei *Boletus*, *Leccinum*, *Leucogyrophana*, *P. involutus*, *P. filamentosus* und *Sc. citrinum*, 2.32 kb lang war bei *P. atrotomentosus* und *P. panuoides* und 2.29 kb lang war bei *St. floccopus*. Es war keine intraspezifische Längenvariabilität zu beobachten.

Der amplifizierte Abschnitt wurde mit acht Restriktionsendonucleasen verdaut und auf Grundlage der Restriktionsfragmente eine Distanzmatrix erstellt. Darauf basierend wurde eine Clusteranalyse mittels UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) einerseits für die *Boletus*- und *Leccinum*-Sippen, andererseits für *Paxillus*, *Leucogyrophana*, *Scleroderma* und *Strobilomyces* durchgeführt.

Im *Boletus*-*Leccinum*-Phänogramm ergab sich eine Aufteilung der Sippen in drei Cluster: der erste gebildet aus *B. calopus*, *B. splendidus* var. *moseri*, *B. fechtneri* und *B. satanas*. Dieser Cluster stand dem von *L. aurantiacum*, *L. quercinum*, *L. piceinum*, *L. versipelle* und *L. scabrum* gebildeten Cluster näher (Distanz $D = 52\%$) als dem von *B. edulis* und *B. pinophilus* gebildeten zweiten *Boletus*-Cluster ($D = 56\%$). Zwischen *L. aurantiacum*, *L. quercinum* und *L. piceinum* war keine Unterscheidung möglich.

Im *Paxillus*-*Leucogyrophana*-*Scleroderma*-*Strobilomyces*-Phänogramm ergaben sich bei einer Distanz von über 50% drei Cluster. Am meisten abseits stehend ($D = 64\%$ bzw. 54%) waren dabei die Gattungen *Scleroderma* und *Strobilomyces*; die *Paxillus*-Arten waren innerhalb des größten Clusters in zwei Gruppen aufgeteilt und waren getrennt durch *L. olivascens*. Dies bestätigt die Auffassungen, die einen engen Bezug zwischen den Coniophoraceae und den Paxillaceae sehen. Gemäß den Aussagen des Phänogramms stellt *Paxillus* eine paraphyletische Gruppe dar.

Die Möglichkeit der Isolierung und Charakterisierung von DNA aus Fruchtkörpern eröffnet weite Anwendungsbereiche für nicht oder nur schwer kultivierbare Pilze, insbesondere Mykorrhiza-Pilze. Die systematisch/taxonomische Beurteilung problematischer Sippen sollte so erleichtert werden können.

Einleitung

Die Identifizierung und damit verbunden die Systematik und Taxonomie zahlreicher Sippen innerhalb der Boletales gründet sich hauptsächlich auf Befunde aus den Merkmalsbereichen Morphologie, Anatomie und Ökologie. In jüngerer Zeit haben zunehmend auch andere Charakterisierungsmöglichkeiten Einzug gehalten, als deren vielleicht wichtigste die Pigmentchemie zu nennen ist (BESL & BRESINSKY 1977; BESL ET AL. 1986; BRESINSKY 1974, 1977; STEGLICH 1975, 1980).

Aufgrund ihrer überwiegend symbiotischen Verbindung mit Wirtspflanzen lassen sich Boletales-Arten oft nur unter sehr erheblichen Problemen (Zeitaufwand!), wenn überhaupt, im Labor kultivieren. Dies führt dazu, daß eine Anzahl von Merkmalsbereichen keine Berücksichtigung bei der systematischen Bearbeitung dieser Pilzgruppe finden kann.

Die moderne DNA-Analytik wird in den letzten Jahren zunehmend zur Klärung von Fragen in der Evolutions- und Verwandtschaftsforschung sowie in der Taxonomie auch bei Pilzen eingesetzt (BRUNS & PALMER 1989; BRUNS ET AL. 1990; GOTTSCHALK & BLANZ 1985). Dabei erlaubt die Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR; entwickelt von MULLIS & FALOONA 1987) mit ihrer Möglichkeit der gezielten Vervielfältigung von DNA-Bereichen *in vitro* eine vergleichende Analyse verschiedenster Organismen. Idealerweise sollte bei Anwendung der PCR von lebenden Reinkulturen ausgegangen werden, jedoch finden sich auch einige Beispiele einer erfolgreichen Amplifizierung von DNA aus abgestorbenen Gewebestrukturen (PÄÄBO ET AL. 1989). Im Bereich der Pilze sind derartige Versuche bisher selten und zwar für herbarisiertes Material, vornehmlich aus dem Bereich der Boletales, durch BRUNS ET AL. (1990), sowie für *Ceratocystis adiposa* durch WINGFIELD & WINGFIELD (1993). Allgemeine Hinweise, jedoch ohne Bezugnahme auf bestimmte Taxa, finden sich bei LEE & TAYLOR (1990).

Im vorliegenden Fall sollte eine Anzahl schwer oder nicht kultivierbarer Sippen aus dem Bereich der Boletales auf die Möglichkeit einer Isolierung von Gesamt-DNA mit nachfolgender Amplifizierung eines bestimmten kerncodierten ribosomalen DNA-Bereiches hin untersucht werden. Ausgangspunkt waren einerseits frisch gesammelte, andererseits gefriergetrocknete (lyophilisierte) Fruchtkörper sowie frische bzw. lyophilisierte Mycelkulturen. Durch eine gezielte Auswahl der in die Untersuchung einbezogenen Sippen sollte mit Hilfe von Restriktionsanalysen eine Reihe nicht restlos geklärter systematischer Fragestellungen in Bezug auf die Boletales geklärt werden:

- 1) Für die Gattung *Leccinum* S.F. Gray beispielsweise wird eine Reihe offenbar substratspezifischer Sippen diskutiert, deren Identifizierung nicht immer einfach und deren Eigenständigkeit teilweise umstritten ist (ENGEL ET AL. 1983; MOSER 1983; BREITENBACH & KRÄNZLIN 1986).
- 2) Für *Boletus* Fr. sollte anhand sechs ausgewählter Taxa neben deren möglicher Einordnung in die verschiedenen Sektionen innerhalb der Gattung auch die Möglichkeit einer Trennung nahverwandter Arten überprüft werden.
- 3) Die Frage der Beziehung zwischen den Coniophoraceae und den Boletales, insbesondere der Familie der Paxillaceae, wird verschieden beantwortet: Die Coniophoraceen werden einerseits immer noch zu den Aphyllophorales gestellt bei PEGLER & YOUNG (1981) sowie bei SINGER (1981). Andererseits wird ein Anschluß zu den Boletales vermutet von BRESINSKY (1974) und JÜLICH (1982). Dies wird gestützt durch auffällige Parallelen zwischen den Coniophoraceae und Paxillaceae hinsichtlich Pigmentproduktion und Holzabautypus (BESL ET AL. 1986; NILSSON & GINNS 1979). Nach Anwendung phylogenetischer Analysen (Parsimonie) sieht HOILAND (1987) die Coniophoraceae und die Paxillaceae aus der gleichen Ahnengruppe herrührend.

Die Ergebnisse DNA-analytischer Untersuchungen - in der vorliegenden Arbeit Restriktionsanalysen an einem rDNA-Abschnitt - werden oft in Dendrogrammen dargestellt (Abb. 6, 7). Der mit Hilfe von Rechenprogrammen ermittelte Grad der Ähnlichkeit bzw. Unähnlichkeit zwischen Taxa oder Taxagruppen wird dabei in verschiedenen großen Distanzen anhand einer Skala dargestellt (Abb. 6, 7; s. auch Tab. II, III). Je tiefer das gemeinsame Verzweigungsniveau zweier Taxa oder Taxagruppen ansetzt, desto größer ist ihre Unähnlichkeit oder Distanz. Dabei entspricht die abzulesende Distanz dem Zweifachen der Tiefe des Knotenpunktes, der die beiden Taxa bzw. Taxagruppen verbindet.

Material und Methoden

Die verwendeten Pilzstämme sind in Tab. I aufgelistet.

Kulturbedingungen: Alle kultivierbaren Stämme wurden auf Moser b-Medium (0.05 g Inosit, 0.2 g Hefeextrakt, 0.5 g KH_2PO_4 , 0.5 g MgSO_4 , 2 g Pepton, 10 g Glucose, 20 g Maltose, 20 g Agar, in 1l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$) bei 23 °C und 65% Luftfeuchte im Dunkeln angezogen.

DNA-Isolierung aus *Boletus* und *Leccinum*: DNA wurde für alle Aufsammlungen sowohl aus frisch gesammelten als auch aus lyophilisierten Fruchtkörpern isoliert. Die Fruchtkörper wurden dazu zunächst von Laub- und Nadelspreu befreit und der Länge nach halbiert. Unter weitgehend sterilen Bedingungen wurde dann mit Hilfe von Pinzette und Skalpell möglichst unbeschädigtes Material aus dem Hut entnommen. Für die DNA-Isolierung aus frischen

Tab. 1: Felddaten der verwendeten Stämme

Art	Stamm	Fundort	Funddatum	leg./det.
<i>Boletus calopus</i> Fr.	Bc 1	Bayern	7.9.1994	Arnold
<i>Boletus edulis</i> Bull. : Fr.	Be 1	Bayern	17.9.1994	Binder
<i>Boletus fechtneri</i> Vel.	Bf 1	Bayern	11.9.1994	Beisenherz
<i>Boletus pinophilus</i> Pil. & Dermek	Bp 1	Österreich	14.9.1994	Binder/Besl
<i>Boletus satanas</i> Lenz	Bs 1	Bayern	12.9.1994	Besl
<i>Boletus splendidus</i> ssp. <i>moseri</i> Sing. & Kuthan	Bsp 1	Bayern	8.9.1994	Beisenherz
<i>Leccinum aurantiacum</i> (Bull.) S.F. Gray (= <i>L. rufum</i> (Schaeff.) Kreisel)	La 1	Bayern	11.9.1994	Beisenherz
<i>Leccinum piceinum</i> Pil. & Dermek	Lp 1	Österreich	14.9.1994	Binder/Besl
<i>Leccinum quercinum</i> Pil.	Lq 1	Bayern	5.9.1994	Reisinger
<i>Leccinum scabrum</i> (Bull. : Fr.) S.F. Gray	Ls 1	Österreich	14.9.1994	Binder
<i>Leccinum versipelle</i> (Fr.) Snell	Lv 1	Bayern	6.9.1994	Besl
<i>Paxillus atrotomentosus</i> (Batsch : Fr.) Fr.	310	Bayern	20.9.1977	unbekannt
<i>Paxillus atrotomentosus</i>	Pa 1	Bayern	6.9.1994	Besl
<i>Paxillus filamentosus</i> (Scop.) Fr.	304	Bayern	31.8.1977	Besl
<i>Paxillus involutus</i> (Batsch : Fr.) Fr.	490	Bayern	28.9.1984	Besl
<i>Paxillus involutus</i>	Pi 1	Bayern	4.9.1994	Schmid
<i>Paxillus panuoides</i> Fr.	318	Bayern	August 1978	unbekannt
<i>Leucogyrophana olivascens</i> (Berk. & Curt.) Ginns & Weresub	397	USA	16.10.1957	McKay
<i>Leucogyrophana olivascens</i>	409	USA	29.10.1960	Davidson
<i>Scleroderma citrinum</i> Pers.	Sc 1	Bayern	6.9.1994	Besl
<i>Strobilomyces floccopus</i> (Vahl: Fr.) Karst.	507	USA	26.10.1984	unbekannt

Fruchtkörpern wurden 300 mg eingesetzt. Die Fruchtkörper wurden anschließend lyophilisiert und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Zur DNA-Isolierung aus lyophilisiertem Material wurden dann möglichst steril jeweils 30 - 50 mg Hutmaterial entnommen.

Die einzelnen Schritte der DNA-Isolierung waren im wesentlichen wie bei LEE & TAYLOR (1990) beschrieben. Die DNA-Pellets wurden jedoch luftgetrocknet und durchwegs in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) aufgenommen. Konzentration und Zustand der DNA wurde auf 1% Agarosegelen (Boehringer, Mannheim) überprüft.

DNA-Isolierung aus *Paxillus* Fr., *Leucogyrophana* Pouz., *Scleroderma* Pers. und *Strobilomyces* Berk.: Für *P. atrotomentosus* (Stamm Pa 1), *P. involutus* (Pi 1) und *Sc. citrinum* (Sc 1) wurde die DNA aus frisch gesammelten Fruchtkörpern isoliert. Die Vorgehensweise war dabei wie oben beschrieben.

Für *P. atrotomentosus* (310), *P. filamentosus* (304), *P. involutus* (490), *P. panuoides* (318) sowie *St. floccopus* (507) wurde die DNA aus kultiviertem Mycel isoliert. Dazu wurde das Mycel mit einer sterilen Pinzette vorsichtig von der Agarplatte abgezupft und im weiteren wie oben beschrieben verarbeitet. Eine definierte Ausgangsmenge war hier nicht gegeben.

Für die schnellwüchsigen Stämme von *L. olivascens* (397 und 409) wurde die DNA aus lyophilisiertem Mycel isoliert. Die Vorgehensweise war wie oben beschrieben. Ausgangsmenge waren hier jeweils etwa 50 mg.

PCR Amplifizierung: Für lyophilisiertes Material (Mycel, Fruchtkörper) wurden die DNA-Proben in dest. Wasser 1:500 bis 1:1000, für frisches Material (Mycel, Fruchtkörper) 1:1000 bis 1:3000 verdünnt. Mit Hilfe der PCR wurde ein Fragment von etwa 2.3 kb innerhalb der kerncodierten 28S rDNA amplifiziert. Die Sequenzen der verwendeten Primer (in 5'-3' Richtung) waren wie folgt (s. auch HOPPLE & VILGALYS 1994; REHNER & SAMUELS 1994):

LR0R: ACC CGC TGA ACT TAA GC

LR9: AGA GCA CTG GGC AGA AA.

Die PCR-Reaktionen wurden in 100 µl Volumen angesetzt und mit zwei Tropfen Nujolöl (Perkin Elmer) überschichtet. Durchwegs wurde die Technik der sogenannten Hot start-PCR angewendet (D'AQUILA ET AL. 1991).

Es wurden 30 Zyklen durchgeführt (Biometra TRIO-Thermoblock), wobei die folgenden Parameter zur Anwendung kamen: 94 °C DNA- Denaturierung (1'), 47 °C Primer-Anlagerung (45''), 72 °C Primer-Verlängerung (3'). Nach dem letzten Zyklus wurde ein abschließender Inkubationsschritt bei 72 °C (7') programmiert. Menge und Qualität der PCR-Produkte wurden durch Auftrag von 3-5 µl des Reaktionsansatzes auf 1% Agarosegelen überprüft. Mit *Hind* III und *Eco* RI verdaute lambda-DNA wurde als Längenstandard verwendet.

Restriktionsanalyse der PCR-Produkte: Das amplifizierte Produkt wurde durch Zugabe von einem Volumen Phenol:Chloroform = 1:1 und Zentrifugieren auf einer Mikrozentrifuge (Eppendorf) für 15' bei 10000 Upm extrahiert. 80 µl der wässrigen Phase wurden abgezogen und die DNA durch Zugabe von 8 µl NaAc (pH 8.0) und 190 µl EtOH_{abs.} gefällt (> 1 h, -20 °C). Die Präzipitate wurden durch Zentrifugation (15', 11000 Upm) gesammelt, 1x gewaschen mit 750 µl EtOH (70%), luftgetrocknet und in 60 µl TE-Puffer aufgenommen.

Für die Restriktionsanalyse wurden normalerweise 10 µl jedes PCR-Produkts in einem 20 µl Volumen verdaut. Verwendete Enzyme waren *Alu* I, *Cfo* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Hpa* II, *Nla* III, *Rsa* I und *Taq* I. Die Bedingungen waren gemäß den Vorschriften der Hersteller (New England Biolabs; Boehringer, Mannheim; Fermentas). Die Restriktionsprodukte wurden auf einem 2.0 % Agarosegel aufgetrennt. Die Größe der Fragmente wurde durch Vergleich mit dem DNA Längenstandard VI abgeschätzt. Die Resultate wurden durch Fotografieren der Gele über einem UV-Transilluminator dokumentiert.

Numerisch-phänetische Auswertung der Restriktionsdaten: Bei allen Stämmen wurde für alle Enzyme die An- oder Abwesenheit der Restriktionsfragmente überprüft. Dies resultierte in zwei binären 1/0 Matrizen, je eine für *Boletus* und *Leccinum* sowie für *Leucogyrophana*, *Paxillus*, *Scleroderma* und *Strobilomyces*. Für alle Artenpaare innerhalb der beiden Matrizen wurden die S_{AB}-Werte als Ausdruck der Ähnlichkeit nach der folgenden Formel berechnet (NEI & LI 1979):

$$S_{AB} = \frac{2(n_{AB})}{n_A + n_B}$$

Dabei entspricht n_{AB} der Anzahl der Restriktionsfragmente, die den Stämmen A und B gemeinsam sind; n_A und n_B entsprechen der Gesamtzahl der Restriktionsfragmente der Stämme A und B.

Unter Anwendung der Beziehung $\text{Unähnlichkeit} = 1 - \text{Ähnlichkeit}$ wurden die S_{AB} -Werte dann in eine Distanzmatrix übertragen. Die Erstellung der beiden phänetischen Dendrogramme erfolgte mit Hilfe einer Cluster-Analyse durch UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages).

Ergebnisse

DNA-Isolierung: Eine erfolgreiche Isolierung von DNA war bei allen Stämmen möglich. Je nach Zustand des Pilzmaterials war das Verfahren allerdings unterschiedlich erfolgreich. Bei Frisch-Material zeigten die DNA-Pellets des öfteren eine ausgeprägt gelatinöse Konsistenz, vermutlich verursacht durch Kohlehydrate und/oder Polysaccharide (BRUNS ET AL. 1990). Das selbe Phänomen, wenngleich weniger häufig, trat auch beim Aufschluß lyophilisierten Materials auf.

Eine Nachreinigung der Proben mit Phenol:Chloroform = 1:1 mit anschließender Fällung der DNA (s. Material & Methoden) erwies sich bei diesen Problemen oft als hilfreich. Gegebenenfalls mußte auch ein neuer Aufschluß durchgeführt werden.

Die Ausbeuten an DNA unterschieden sich nicht wesentlich für frisches bzw. lyophilisiertes Material.

DNA-Amplifizierung: Der gewählte rDNA-Abschnitt konnte bei allen Sippen erfolgreich amplifiziert werden. Dabei erwiesen sich Verdünnungen der DNA im Bereich von 1:500 bis 1:1000 für lyophilisiertes, Verdünnungen von 1:1000 bis 1:3000 für frisches Material als am besten zur Durchführung einer erfolgreichen Amplifizierung geeignet.

Die Gelelektrophorese der unverdauten PCR-Produkte ergab bei allen Sippen der Gattungen *Leccinum* und *Boletus*, unabhängig von der Herkunft des Materials, einheitlich eine Bande von etwa 2.35 kb. Es wurde keine interspezifische Längenheterogenität festgestellt (Abb. 1). Mitunter traten schwach ausgeprägte Sekundärbanden auf (Abb. 1, Stamm Lq 1), die aber kein Problem bei der weiteren Bearbeitung darstellten. Ebenfalls eine Größe von etwa 2.35 kb ergab sich für *L. olivascens*, *P. involutus*, *P. filamentosus* und *Sc. citrinum* (Abb. 2); Abweichungen wurden für *P. atrotomentosus* und *P. panuoides*, mit einer Größe von etwa 2.32 kb, sowie für *St. floccopus*, mit etwa 2.29 kb, festgestellt (Abb. 2). Eine intraspezifische Längenvariabilität war nicht zu beobachten.

Restriktionsanalyse der PCR-Produkte:

1) *Boletus* und *Leccinum*: Die PCR-Produkte der elf Sippen wurden mit jeweils acht Restriktionsenzymen verdaut. Die Restriktionsdaten, die bei der Verwendung von Material aus frischen Fruchtkörpern erhalten wurden, erwiesen sich als völlig identisch mit den Daten aus lyophilisierten Fruchtkörpern. Die Fragmentmuster nach Verdau mit den Enzymen *Alu* I und *Cfo* I sind in den Abb. 3 bzw. 4 gezeigt; die nach Auswertung aller Restriktionsansätze ermittelten Distanzen zwischen den einbezogenen Taxa sind in Tab. 2 zusammengestellt. Insgesamt wurden für die elf Sippen aus zwei Gattungen 144 verschiedene Banden ermittelt. Neun rDNA-

Tab. 2: Distanzmatrix der untersuchten *Leccinum*- und *Boletus*-Arten

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 <i>L. quercinum</i>										
2 <i>L. versipelle</i>	0.06									
3 <i>L. aurantiacum</i>	0.00	0.06								
4 <i>L. piceinum</i>	0.00	0.06	0.00							
5 <i>L. scabrum</i>	0.16	0.18	0.16	0.16						
6 <i>B. edulis</i>	0.54	0.54	0.54	0.54	0.56					
7 <i>B. pinophilus</i>	0.58	0.58	0.58	0.58	0.60	0.10				
8 <i>B. fechtneri</i>	0.55	0.55	0.55	0.55	0.50	0.63	0.68			
9 <i>B. splendidus</i> ^a	0.56	0.52	0.56	0.56	0.52	0.55	0.58	0.41		
10 <i>B. satanas</i>	0.57	0.59	0.57	0.57	0.54	0.58	0.63	0.37	0.38	
11 <i>B. calopus</i>	0.48	0.44	0.48	0.48	0.47	0.46	0.50	0.41	0.25	0.38

^a ssp. *moseri*

Phänotypen wurden für *Cfo* I, sieben Phänotypen für *Alu* I, *Hpa* II, *Nla* III und *Taq* I, sechs Phänotypen für *Hinf* I und *Rsa* I, sowie vier Phänotypen für *Hae* III festgestellt.

Diese insgesamt 53 Phänotypen verteilten sich trotz der fast identischen Anzahl der jeweils einbezogenen Sippen sehr ungleich auf die beiden Gattungen: nur 15 davon entfielen auf *Leccinum*, die verbleibenden 38 auf *Boletus*. Für *Leccinum* konnten beispielsweise die Sippen *L. aurantiacum*, *L. piceinum* und *L. quercinum* mit keinem der acht Enzyme unterschieden werden. Der Phänotyp von *L. versipelle* unterschied sich nur nach Verdau mit *Alu* I und *Cfo* I von diesen drei Sippen. *L. scabrum* hingegen war außer nach Verdau mit *Hae* III und *Nla* III immer verschieden von den anderen *Leccinum*-Arten. Für *Boletus* war eine Unterscheidung aller sechs Arten möglich. Aber auch hier konnten verschiedene Taxa gemeinsame Restriktionsphänotypen aufweisen, wie beispielsweise *B. edulis* und *B. pinophilus* nach Verdau mit *Alu* I, *Hae* III, *Hpa* II und *Taq* I.

Im allgemeinen ergab sich eine befriedigende Übereinstimmung zwischen der Größe des unverdauten PCR-Produkts und der Summe der Einzelfragmente. Tendenziell lag die Summe der Fragmente jedoch etwas unter der Größe des unverdauten Produkts. Ursache dafür können nicht entdeckte Doppelbanden sein und/oder das begrenzte Auflösungsvermögen von Agarosegelen, die die Entdeckung von Banden mit einer Größe unter etwa 50 bp in der Regel unmöglich machen. Hier könnte möglicherweise an den Einsatz von Polyacrylamidgelen gedacht werden.

Partialverdau war ein insgesamt unbedeutendes Problem, die Auswertung wurde dadurch kaum behindert.

2) *Paxillus*, *Leucogyrophana*, *Scleroderma* und *Strobilomyces*: Die Restriktionsdaten für die zehn Stämme aus sieben Arten wurden auf der Basis frischer Fruchtkörper, frischer Mycelien und lyophilisierter Mycelien ermittelt. Die Restriktionsfragmente nach Verdau mit *Nla* III sind in Abb. 5 gezeigt; die nach Auswertung aller Restriktionsansätze ermittelten Distanzen zwischen den einbezogenen Taxa sind in Tab. 3 zusammengestellt. Für die zehn Stämme wurden insgesamt 153 Banden ermittelt. Entsprechend den sieben verschiedenen Arten fanden sich bei den meisten Enzymen sieben verschiedene Phänotypen: bei *Alu* I, *Hae*

Tab. 3: Distanzmatrix der untersuchten *Leucogyrophana*-, *Paxillus*-, *Strobilomyces*- und *Scleroderma*-Arten

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 <i>L. olivascens</i> (397)									
2 <i>L. olivascens</i> (409)	0.00								
3 <i>P. atrotomentosus</i> (310)	0.38	0.38							
4 <i>P. atrotomentosus</i> (Pa 1)	0.38	0.38	0.00						
5 <i>P. panuoides</i>	0.37	0.37	0.24	0.24					
6 <i>P. involutus</i> (490)	0.40	0.40	0.50	0.50	0.52				
7 <i>P. involutus</i> (Pi 1)	0.40	0.40	0.50	0.50	0.52	0.00			
8 <i>P. filamentosus</i>	0.38	0.38	0.44	0.44	0.49	0.16	0.16		
9 <i>St. floccopus</i>	0.62	0.62	0.67	0.67	0.64	0.65	0.65	0.69	
10 <i>Sc. citrinum</i>	0.56	0.56	0.62	0.62	0.57	0.50	0.50	0.50	0.68

III, *Hpa* II, *Nla* III und *Taq* I; sechs Phänotypen fanden sich nach Verdau mit *Cfo* I, *Hinf* I und *Rsa* I. Bei *Cfo* I und *Hinf* I war *P. filamentosus* identisch mit den beiden Stämmen von *P. involutus*, bei *Rsa* I war *P. panuoides* identisch mit den beiden Stämmen von *P. atrotomentosus*. Eine intraspezifische Variabilität war nicht zu beobachten.

Teilweise ergab sich eine beträchtliche Differenz zwischen der Summe der Fragmentgrößen und der Größe des unverdauten PCR-Produktes, beispielsweise nach Verdau mit *Alu* I für *L. olivascens* oder für *P. filamentosus* nach Verdau mit *Hae* III. Die vermutlichen Ursachen wurden oben bereits dargelegt.

Clusteranalyse durch UPGMA:

1) *Boletus* und *Leccinum* (Abb. 6): Die Clusteranalyse resultierte in drei deutlich voneinander getrennten Clustern mit Distanzwerten (D) von jeweils > 50%. Dabei zerfielen die *Boletus*-Arten in zwei getrennte Gruppen (D = 56%). Der Cluster mit den Arten *B. calopus*, *B. splendidus*, *B. fechtneri* und *B. satanas* steht überraschenderweise dem *Leccinum*-Cluster etwas näher (D = 52%) als dem zweiten *Boletus*-Cluster mit den Arten *B. edulis* und *B. pinophilus* (D = 56%).

Bei Betrachtung der einzelnen Cluster zeigt sich der Bereich von *Leccinum* als der mit dem engsten Zusammenhang der zugehörigen Sippen. Wie bereits erwähnt, ist keine Unterscheidung möglich zwischen *L. aurantiacum*, *L. quercinum* und *L. piceinum* (D = 0%); ihnen am nächsten steht *L. versipelle* (D = 6%), etwas abgesetzt davon steht *L. scabrum* (D = 16%). Der größere der beiden *Boletus*-Cluster ist ziemlich heterogen mit Distanzwerten zwischen 24% und 38%, wobei sich ein gewisser Zusammenhang zwischen *B. calopus* und *B. splendidus* einerseits, zwischen *B. fechtneri* und *B. satanas* andererseits zeigt. Der kleinere der *Boletus*-Cluster trennt die Arten *B. edulis* und *B. pinophilus* mit einem Distanzwert von 10%.

2) *Paxillus*, *Leucogyrophana*, *Scleroderma* und *Strobilomyces* (Abb. 7): Bei einem Distanzwert von > 50% läßt sich eine Gliederung in drei Cluster erkennen, wovon der größte - mit *Leucogyrophana* und *Paxillus* - in drei kleinere Gruppen zerfällt. *St. floccopus* steht mit einem Distanzwert von 64% am weitesten entfernt von den anderen Sippen, gefolgt von *Sc. citrinum* mit D = 54%.

Innerhalb des größten Clusters wird *Paxillus* in zwei Gruppen aufgetrennt: die entfernter stehende (D = 44%) umfaßt *P. involutus* und *P. filamentosus* (voneinander getrennt mit D = 16%), die zweite Gruppe umfaßt *P. atrotomentosus* und *P. panuoides* (D = 24%). *L. olivascens* steht zwischen diesen Gruppen, dabei näher zum Artenpaar *P. atrotomentosus* / *P. panuoides* (D = 36%).

Diskussion

Die vorliegende Untersuchung zeigt, daß eine erfolgreiche Isolierung von DNA aus frischen und lyophilisierten Fruchtkörpern möglich ist. Im Idealfall würde somit die Notwendigkeit einer Anzucht von Mycelien entfallen und als Folge könnten auch nicht kultivierbare Pilze auf DNA-Ebene untersucht werden. Diese Annahme ist jedoch mit Vorsicht zu betrachten: Die für die vorliegende Studie einbezogenen Sippen zeichnen sich fast durchwegs durch große, dick- und festfleischige Fruchtkörper aus. Entsprechend ist die Entnahme sterilen Materials aus dem Pilz in der Regel mit keinen besonderen Schwierigkeiten verbunden. Bei dünnfleischigen und/oder sehr kleinen Fruchtkörpern gestalten sich derartige Versuche einer Probenentnahme jedoch deutlich problematischer; eine Isolierung von DNA mit zufriedenstellender Ausbeute und vor allem Qualität ist hier nicht ohne weiteres möglich. Immerhin zeigen derzeit laufende Vorversuche, daß z.B. auch aus verschiedenen Sippen der Gattung *Hygrocybe* (Fr.) Kumm. DNA isoliert werden kann (s. auch FEIBELMAN ET AL. 1994). Dennoch sollte, soweit möglich, auch künftig bevorzugt auf lyophilisiertes Mycel als Ausgangsbasis zurückgegriffen werden; erfahrungsgemäß lassen sich auf dieser Basis die besten Ergebnisse erzielen. Auch unter Berücksichtigung der genannten Einschränkungen eröffnet die gezeigte Methodik ein weites Feld von Anwendungsmöglichkeiten vor allem für den Bereich der Mykorrhiza-Pilze; sie sollte über kurz oder lang eine insgesamt zuverlässigere Einordnung problematischer Taxa ermöglichen.

Die durch die Primer LR0R und LR9 definierte Region der 28S rDNA wurde bislang nur sehr vereinzelt für systematische Untersuchungen auf DNA-Niveau verwendet, beispielsweise innerhalb der holzabbauenden Gattung *Phellinus* Quél. (BECKERT 1995). Die 28S rDNA gilt als konserviert in ihrer Nukleotidabfolge und ist daher vielleicht nicht optimal geeignet zur Untersuchung nahverwandter Sippen. Die festgestellte Identität der RFLP-Phänotypen von *L. aurantiacum*, *L. piceinum* und *L. quercinum* (Tab. 2, Abb. 6) deutet aber jedenfalls auf eine zumindest sehr enge Beziehung zwischen diesen Sippen hin. Auf der anderen Seite erlaubte der gewählte rDNA-Abschnitt eine eindeutige Trennung der zweifellos sehr nahverwandten Sippen *B. edulis* und *B. pinophilus*. Für eine definitive Beurteilung der Verhältnisse innerhalb *Leccinum* sollten noch weitere rDNA-Bereiche, beispielsweise die als variabel erachteten ITS-Regionen, mit in die Untersuchungen einbezogen werden.

Für *Boletus* zeigte sich eine Aufteilung der einbezogenen Sippen in zwei Gruppen (Abb. 6). Die zur Sektion *Boletus* gehörigen Sippen *B. edulis* und *B. pinophilus* stehen in der einen, die zu den Sektionen *Luridi* Fr. und *Calopodes* Fr. gehörigen Sippen *B. satanas* und *B. splendidus* var. *moseri* bzw. *B. calopus* und *B. fechtneri* stehen in der anderen Gruppe. Dabei zeigt sich ein Zusammenhang zwischen den zu verschiedenen Sektionen gehörigen Arten *B. calopus* und *B. splendidus* einerseits sowie *B. satanas* und *B. fechtneri* andererseits.

Die früher bereits geäußerte Vermutung einer näheren Verwandtschaft zwischen den Coniophoraceae und den Paxillaceae (BESL ET AL. 1986; BRESINSKY 1974; HOILAND 1987) wur-

de bestätigt (Abb. 7). *L. olivascens* findet sich inmitten des *Paxillus*-Clusters, gebildet aus den Schwestertaxa *P. atrotomentosus* und *P. panuoides* bzw. *P. involutus* und *P. filamentosus*. Dabei steht das erstgenannte Artenpaar näher zu *L. olivascens* als zum gattungsgleichen Artenpaar *P. involutus* / *P. filamentosus* ($D = 36\%$ bzw. 44%). In diesem Zusammenhang ist jedoch das Auftreten einer geringfügigen Längenmutation in *P. atrotomentosus* und *P. panuoides* zu beachten, deren PCR-Produkt mit 2.32 kb geringfügig kleiner war als das der anderen Arten des Clusters; die ermittelten Distanzwerte können dadurch überproportional hoch ausfallen (zur Problematik von Längenmutationen s. auch BRUNS ET AL. 1990; HIBBETT & VILGALYS 1991). Begründet durch die Stellung von *L. olivascens* inmitten von *Paxillus* wären die Kremplinge in der bisher geübten Auffassung als eine paraphyletische Gruppe zu betrachten. Dies steht in Einklang mit Bestrebungen, die Gattung *Paxillus* zumindest für den mitteleuropäischen Raum möglicherweise auf die Arten *P. involutus* und *P. filamentosus* zu beschränken; *P. atrotomentosus* und *P. panuoides* wären demnach in eine eigene Gattung, *Tapinella* Gilb., zu stellen (KREISEL 1987; SUTARA 1992).

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Kerstin Schmid, die im Rahmen ihrer Zulassungsarbeit einen Großteil der Vorarbeiten erbracht hat. Herrn Prof. Andreas Bresinsky und Herrn Dr. Helmut Besl danke ich für eine Reihe wichtiger Hinweise sowie für ihr anspornendes Interesse am Thema. Und Dank sage ich allen, die Pilzmaterial in der einen oder anderen Form beigebracht haben.

Literatur

- BECKERT, S. (1995) - Die Sippenkomplexe innerhalb der Gattung *Phellinus* Quél. und ihre Charakterisierung auf molekularer Ebene anhand nucleärer DNA. Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- BESL, H. & A. BRESINSKY (1977) - Notizen über Vorkommen und systematische Bewertung von Pigmenten in Höheren Pilzen (2). Z. Pilzk. **43**: 311-322.
- BESL, H., A. BRESINSKY & A. KÄMMERER (1986) - Chemosystematik der Coniophoraceae. Z. Mykol. **52** (2): 277-286.
- BRESINSKY, A. (1974) - Zur Frage der taxonomischen Relevanz chemischer Merkmale bei Höheren Pilzen. Travaux Mycologiques, Numero spécial du Bull. Mens. Soc. Linn. Lyon **43**: 61-84.
- (1977) - Chemotaxonomie der Pilze. - In FREY, W., H. HURKA & F. OBERWINKLER (eds.): Beiträge zur Biologie der niederen Pflanzen, pp. 25-42. Stuttgart, New York.
- BREITENBACH, J. & F. KRÄNZLIN (1986) - Pilze der Schweiz, Band 2. Nichtblätterpilze (Heterobasidiomycetes, Aphyllophorales, Gastromycetes). Luzern.
- BRUNS, T.D., R. FOGEL & J.W. TAYLOR (1990) - Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. Mycologia **82**: 175-184.
- BRUNS, T.D. & J. PALMER (1989) - Evolution of mushroom mitochondrial DNA: *Suillus* and related genera. J. Mol. Evol. **28**: 349-342.
- BRUNS, T.D., T.J. WHITE & J.W. TAYLOR (1991) - Fungal molecular systematics. Annu. Rev. Ecol. Syst. **22**: 525-564.
- D'AQUILA, R.T., L.J. BECHTEL, J.A. VIDELER, J.E. ERON, P. GORCZYCA & J.C. KAPLAN (1991) - Maximizing sensitivity and specificity of PCR by preamplification heating. Nucleic Acids Research **19**: 3749.
- ENGEL, H., A. DERMEK & R. WATLING (1978) - Rauhstielröhrlinge: Die Gattung *Leccinum* in Europa. 1. ed. - Weidhausen.
- FEIBELMAN, T., P. BAYMAN & W.C. CIBULA (1994) - Length variation in the internal transcribed spacer of ribosomal DNA in chanterelles. Mycol. Res. **98**: 614-618.

- GOTTSCHALK, M. & P.A. BLANZ (1985) - Untersuchungen an 5S ribosomalen Ribonukleinsäuren als Beitrag zur Klärung von Systematik und Phylogenie der Basidiomyceten. *Z. Mykol.* **51** (2): 205-243.
- HIBBETT, D.S. & R. VILGALYS (1991) - Evolutionary relationships of *Lentinus* to the Polyporaceae: Evidence from restriction analysis of enzymatically amplified ribosomal DNA. *Mycologia* **83**: 425-439.
- HOPPLE, J.S. & R. VILGALYS (1994) - Phylogenetic relationships among coprinoid taxa and allies based on data from restriction site mapping of nuclear rDNA. *Mycologia* **86**: 96-107.
- HOILAND, K. (1987) - A new approach to the phylogeny of the order Boletales (Basidiomycotina). *Nord. J. Bot.* **7**: 705-718.
- JÜLICH, W. (1982) - Higher taxa of Basidiomycetes. 1. ed. - Vaduz.
- KREISEL, H. (ed.) (1987) - Pilzflora der Deutschen Demokratischen Republik. Jena.
- LEE, S.B. & J.W. TAYLOR (1990) - Isolation of DNA from fungal mycelia and single cells. - In INNIS, M.A., D.H. GELFAND, J.J. SNINSKY & T.J. WHITE (eds.): PCR protocols, a guide to methods and applications, pp. 282-287. San Diego.
- MOSER, M. (1983) - Die Röhrlinge und Blätterpilze. Stuttgart, New York.
- MULLIS, K.B. & F.A. FALOONA (1987) - Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**: 335-350.
- NEL, M. & W.H. LI (1979) - Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **76**: 5269-5273.
- NILSSON, T. & J. GINNS (1979) - Cellulolytic activity and the taxonomic position of selected brown-rot fungi. *Mycologia* **71**: 170-177.
- PÄÄBO, S. (1989) - Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **86**: 1939-1943.
- PEGLER, D.N. & T.W.K. YOUNG (1981) - A natural arrangement of the Boletales, with reference to spore morphology. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **76**: 103-146.
- REHNER, S.A. & G.J. SAMUELS (1994) - Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycol. Res.* **98**: 625-634.
- SINGER, R. (1981) - Notes on bolete taxonomy - III. *Persoonia* **11**: 269-302.
- STEGELICH, W. (1975) - Pilzfarbstoffe. *Chemie in unserer Zeit* **9**: 117-123.
- (1980) - Pigments of Higher Fungi (Macromycetes). - In CZYGAN, F.-C. (ed.): Pigments in plants, pp. 393-412. Stuttgart, New York.
- SUTARA, J. (1992) - The genera *Paxillus* and *Tapinella* in Central Europe. *Ceská Mykol.* **46**: 50-56.
- WHITE, T.J., T. BRUNS, S. LEE & J. TAYLOR (1990) - Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. - In M.A. INNIS, D.H. GELFAND, J.J. SNINSKY & T.J. WHITE (eds.): PCR protocols, a guide to methods and applications, pp. 315-322. San Diego.
- WINGFIELD, B.D. & M.J. WINGFIELD (1993) - The value of dried fungal cultures for taxonomic comparisons using PCR and RFLP analysis. *Mycotaxon* **46**: 429-436.

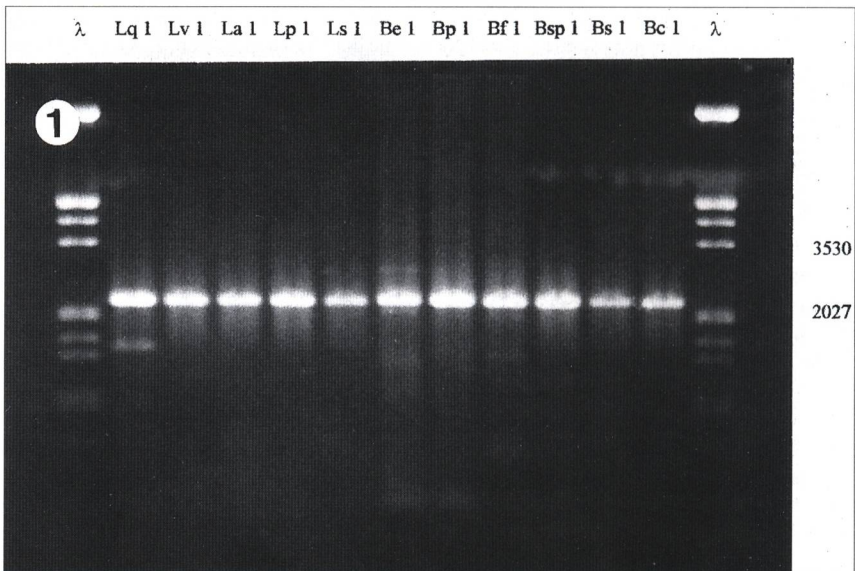


Abb. 1: PCR-Produkte der durch die Primer LR0R und LR9 definierten rDNA-Region. 1 = mit *Eco* RI und *Hind* III verdaute lambda-DNA. Fragmentgrößen in Basenpaaren.

Lq 1 = *L. quercinum*; Lv 1 = *L. versipelle*; La 1 = *L. aurantiacum*; Lp 1 = *L. piceinum*; Ls 1 = *L. scabrum*; Be 1 = *B. edulis*; Bp 1 = *B. pinophilus*; Bf 1 = *B. fechtneri*; Bsp 1 = *B. splendidus* ssp. *moseri*; Bs 1 = *B. satanas*; Bc 1 = *B. calopus*.

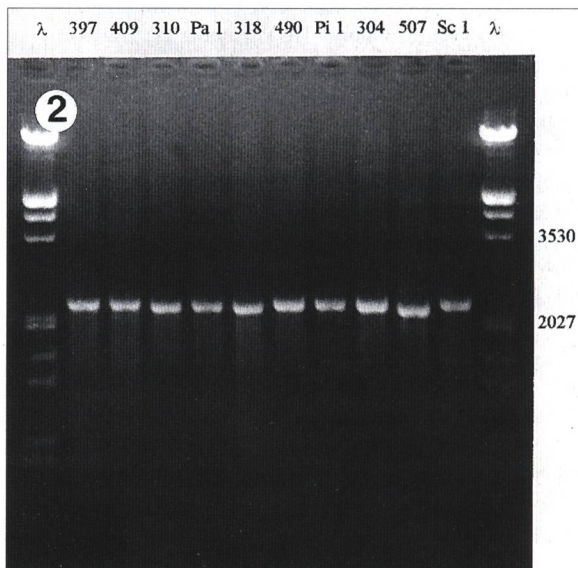


Abb. 2: PCR-Produkte der durch die Primer LR0R und LR9 definierten rDNA-Region. 1 = mit *Eco* RI und *Hind* III verdaute lambda-DNA. Fragmentgrößen in Basenpaaren.

397, 409 = *L. olivascens*; 310, Pa 1 = *P. atrotomentosus*; 318 = *P. panuoides*; 490, Pi 1 = *P. involutus*; 304 = *P. filamentosus*; 507 = *St. floccopus*; Sc 1 = *Sc. citrinum*.

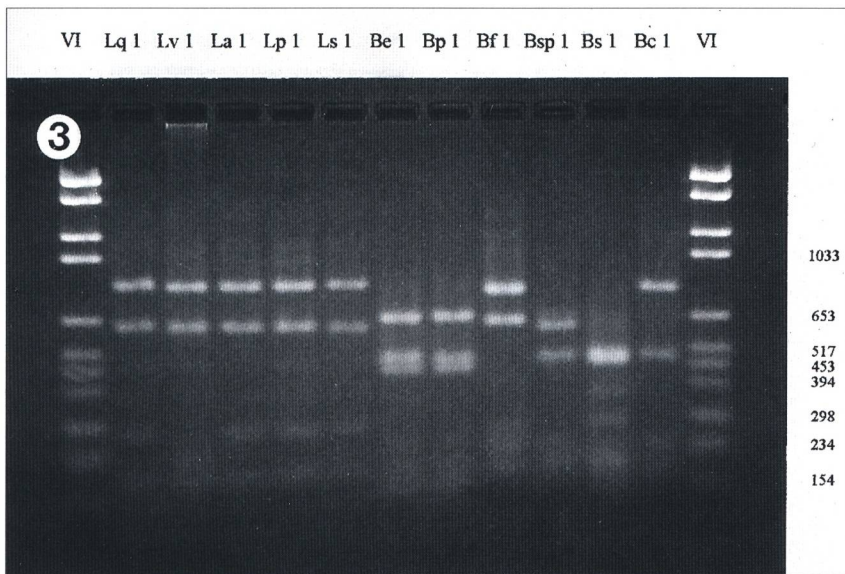


Abb. 3: Restriktionsfragmente nach Verdau mit *Alu* I. VI = DNA Längenstandard. Fragmentgrößen in Basenpaaren.

Lq 1 = *L. quercinum*; Lv 1 = *L. versipelle*; La 1 = *L. aurantiacum*; Lp 1 = *L. piceinum*; Ls 1 = *L. scabrum*; Be 1 = *B. edulis*; Bp 1 = *B. pinophilus*; Bf 1 = *B. fechtneri*; Bsp 1 = *B. splendidus* ssp. *moseri*; Bs 1 = *B. satanas*; Bc 1 = *B. calopus*.

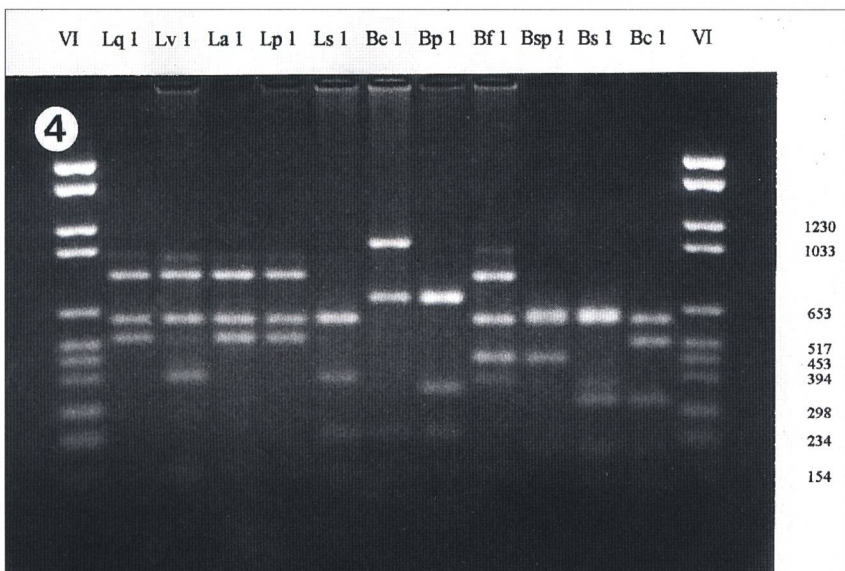


Abb. 4: Restriktionsfragmente nach Verdau mit *Cfo* I. VI = DNA Längenstandard. Fragmentgrößen in Basenpaaren.

Lq 1 = *L. quercinum*; Lv 1 = *L. versipelle*; La 1 = *L. aurantiacum*; Lp 1 = *L. piceinum*; Ls 1 = *L. scabrum*; Be 1 = *B. edulis*; Bp 1 = *B. pinophilus*; Bf 1 = *B. fechtneri*; Bsp 1 = *B. splendidus* ssp. *moseri*; Bs 1 = *B. satanas*; Bc 1 = *B. calopus*.

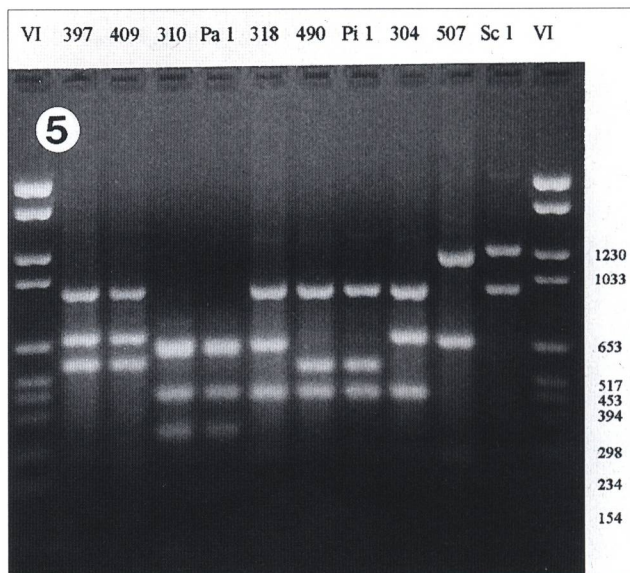


Abb. 5: Restriktionsfragmente nach Verdau mit *Nla*. III = DNA Längenstandard. Fragmentgrößen in Basenpaaren.

397, 409 = *L. olivascens*; 310, Pa 1 = *P. atrotomentosus*; 318 = *P. panuoides*; 490, Pi 1 = *P. involutus*; 304 = *P. filamentosus*; 507 = *St. floccopus*; Sc 1 = *Sc. citrinum*.

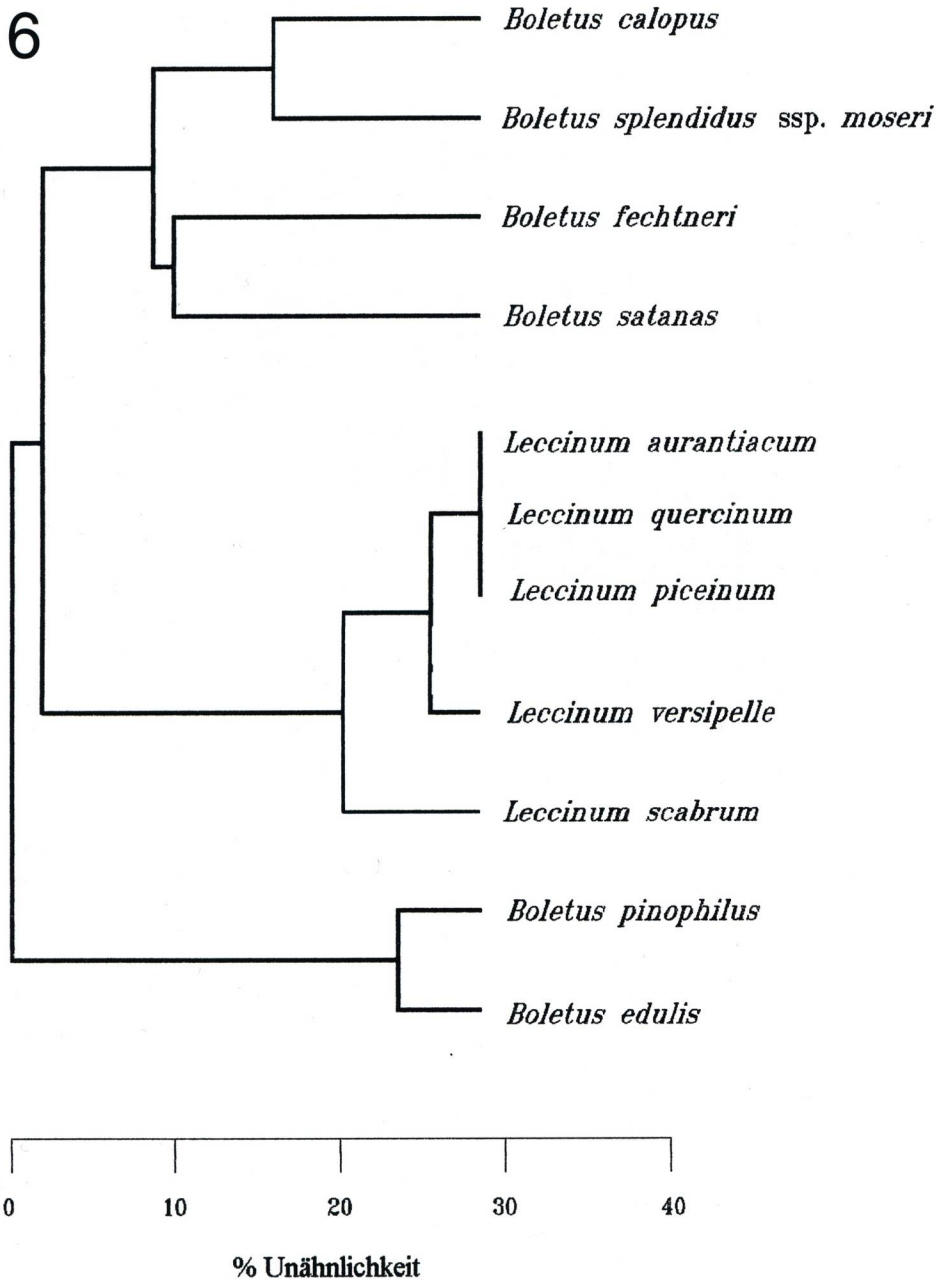


Abb. 6: Numerisch-phänetische Auswertung der Restriktionsdaten der untersuchten *Boletus*- und *Leccinum*-Arten mit UPGMA.

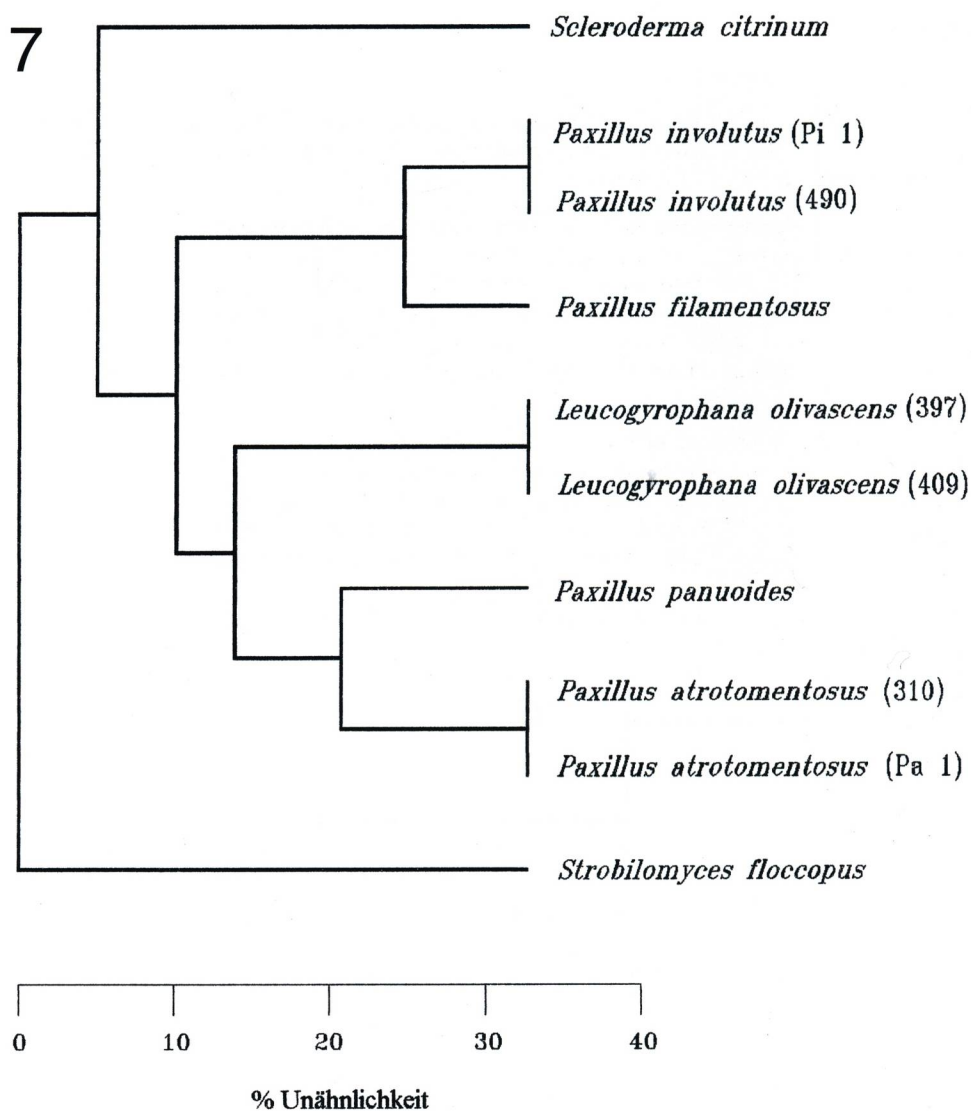


Abb. 7: Numerisch-phänetische Auswertung der Restriktionsdaten der untersuchten *Paxillus*-, *Leucogyrophana*-, *Scleroderma*- und *Strobilomyces*-Arten mit UPGMA.



Deutsche Gesellschaft für Mykologie e.V.
German Mycological Society

Dieses Werk stammt aus einer Publikation der DGfM.

www.dgfm-ev.de

Über [Zobodat](#) werden Artikel aus den Heften der pilzkundlichen Fachgesellschaft kostenfrei als PDF-Dateien zugänglich gemacht:

- **Zeitschrift für Mykologie**
Mykologische Fachartikel (2× jährlich)
- **Zeitschrift für Pilzkunde**
(Name der Heftreihe bis 1977)
- **DGfM-Mitteilungen**
Neues aus dem Vereinsleben (2× jährlich)
- **Beihefte der Zeitschrift für Mykologie**
Artikel zu Themenschwerpunkten (unregelmäßig)

Dieses Werk steht unter der [Creative Commons Namensnennung - Keine Bearbeitungen 4.0 International Lizenz](#) (CC BY-ND 4.0).



- **Teilen:** Sie dürfen das Werk bzw. den Inhalt vervielfältigen, verbreiten und öffentlich zugänglich machen, sogar kommerziell.
- **Namensnennung:** Sie müssen die Namen der Autor/innen bzw. Rechteinhaber/innen in der von ihnen festgelegten Weise nennen.
- **Keine Bearbeitungen:** Das Werk bzw. dieser Inhalt darf nicht bearbeitet, abgewandelt oder in anderer Weise verändert werden.

Es gelten die [vollständigen Lizenzbedingungen](#), wovon eine [offizielle deutsche Übersetzung](#) existiert. Freigegebiger lizenzierte Teile eines Werks (z.B. CC BY-SA) bleiben hiervon unberührt.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Zeitschrift für Mykologie - Journal of the German Mycological Society](#)

Jahr/Year: 1995

Band/Volume: [61_1995](#)

Autor(en)/Author(s): Fischer Michael

Artikel/Article: [Zur Systematik der Boletales: Isolierung und Kennzeichnung von DNA aus Fruchtkörpern und Mycelkulturen 245-260](#)