

Sind *Amanita muscaria* und *Amanita caesarea* eindeutig anhand von Herbarmaterial zu trennen?

C. HAHN, S. RAIDL & L. BEENKEN

Hahn, C., S. Raidl & L. Beenken (2000) – Is it possible to distinguish dried herbarium material of *Amanita muscaria* and *Amanita caesarea*? *Z. Mykol.* 66/2: 173–180.

Key Words: *Amanita muscaria*, *Amanita caesarea*, PCR/RFLP, anatomy.

Summary: A red capped *Amanita*-fruitbody was found between *Boletus* fruitbodies offered for sale on a mushroom market in Munich. So this red *Amanita* has to be determined on species level without any doubt, but only based on this single, dried fruitbody. The only possible result could be *Amanita muscaria* or *A. caesarea*, the two European species with red cap. The material for determination was compared with surely determined collections of *A. muscaria* and *A. caesarea* concerning the anatomy of the universal veil and the marginal cells, and by PCR and RFLP of the ITS-region of the ribosomal DNA. Both methods, anatomy and molecular biology, allowed to distinguish *A. caesarea* and *A. muscaria*. The questionable fruitbody could be determined as *A. muscaria*.

Zusammenfassung: Auf einem Münchner Pilzmarkt befand sich ein rothütiger *Amanita*-Fruchtkörper unter Röhrlingen (*Boletus edulis* agg.). Es musste nun untersucht werden, ob dieser unbestimmte *Amanita*-Fruchtkörper nur anhand von Herbarmaterial und ohne Information über die Frischmerkmale unzweifelhaft *Amanita muscaria* oder *Amanita caesarea* zugeordnet werden kann. Hierzu wurde das fragliche Material mit sicher bestimmten Herbarbelegen mittels PCR und RFLP der ITS-Region der ribosomalen DNA molekular verglichen. Weiterhin wurde die Anatomie des Velum universale und der Marginalzellen beider Arten untersucht und mit dem zu bestimmenden Beleg verglichen. Sowohl mit der molekularbiologischen als auch der anatomischen Methode ließen sich beide Arten eindeutig unterscheiden und der fragliche Beleg als *A. muscaria* bestimmen.

Einführung

Der Kaiserling, *Amanita caesarea* (Scop.: Fr.) Pers., und Vertreter der Steinpilze (z. B. *Boletus aereus* Bull.: Fr.) werden in Südeuropa in größerem Umfang aus kommerziellen Gründen gesammelt. Da diese Pilze in den selben Arealen fruktifizieren können, besteht die Möglichkeit, dass auf Märkten zwischen Steinpilzen versehentlich auch der eine oder andere Fruchtkörper von *A. caesarea* beigemischt sein kann. Bei einem aktuellen Fall befand sich ein Exemplar eines rothütigen Lamellenpilzes zwischen zum Verkauf angebotenen Steinpilzen. Nun galt es aus ju-

ristischen Gründen zu klären, ob es sich dabei um eine giftige oder essbare Art handelt. Im Interesse des Händlers musste diese Entscheidung und damit die genaue Determination völlig abgesichert werden. Das zu untersuchende Material des rothütigen Lamellenpilzes lag in Form des einen getrockneten Fruchtkörpers vor; Frischmerkmale konnten also nicht für die Bestimmung herangezogen werden.

Die Zugehörigkeit zur Gattung *Amanita* war bereits makroskopisch eindeutig zu erkennen. Aufgrund der blassgelben Lamellen und des gelblichen Stieles lag weiterhin der Verdacht nahe, dass es sich um einen Kaiserling (*A. caesarea*) handeln könnte, jedoch war auch der Fliegenpilz [*A. muscaria* (L.: Fr.) Hooker] nicht auszuschließen. In der gängigen Bestimmungsliteratur werden *A. caesarea* und *A. muscaria* aufgrund makroskopischer Merkmale unterschieden. So trennt z. B. MOSER (1983: 222) *A. caesarea* aufgrund der freien, gut entwickelten Volva von *A. muscaria* und verwandten Arten ab. Die am fraglichen Beleg etwas sackartig abgesetzt erscheinende Volva und die relativ großen Hüllreste am Hut sprachen somit für *A. caesarea*. Dagegen sprach wiederum, dass die Volva nicht farblich vom Stiel abgesetzt war (bei *A. caesarea* ist diese weiss, der Stiel dagegen deutlich gelb). Es war also nicht eindeutig möglich, diese im Frischzustand u. a. aufgrund des bei *A. caesarea* intensiv gelben Stieles (*A. muscaria* mit weissem Stiel) und der großen, sackartigen Volva (bei *A. muscaria* fehlend, nur flockige Warzen vorhanden) völlig problemlos zu trennenden Arten am Herbarbeleg zu unterscheiden. Auch makroskopische Vergleiche mit anderen Herbarbelegen dieser beiden Arten befriedigten nicht, auch wenn sich der Verdacht mehr in Richtung *A. muscaria* verschob, da die Volva von *A. caesarea* farblich doch meist deutlich vom Stiel abgesetzt ist. Wie eingangs erwähnt, überraschte, wie stark Belege von *A. muscaria* beim Trocknen in den Lamellen und am Stiel gilben können.

Um eine sichere Entscheidung treffen zu können, wurde von dem betreffenden Fruchtkörper sowie von eindeutig bestimmtem Material von *A. caesarea* und *A. muscaria* DNA extrahiert und mittels PCR amplifiziert. Die durch die RFLP erhaltenen Bandenmuster wurden verglichen.

Auch wurde anhand anatomischer Merkmale in der vorliegenden Studie eine Unterscheidung versucht. Nach BREITENBACH & KRÄNZLIN (1995) finden sich geringe Unterschiede in der Form der Marginalzellen und größere im Aufbau des Velum universale. Die Verlässlichkeit dieser beiden Merkmale musste zunächst geprüft werden, um das Bestimmungsergebnis abzusichern.

Leider zeigen die Sporen beider Arten weitgehend ähnliche Gestalt, die Sporenmaße überlappen weitgehend und sind nicht aussagekräftig: MOSER (1983) gibt für *A. muscaria* zwar etwas kürzere, breiter elliptische Sporen als bei *A. caesarea* an, PHILLIPS' (1990) Angaben widersprechen dem jedoch, demnach sollen die Sporen von *A. caesarea* breiter als die von *A. muscaria* sein. BREITENBACH & KRÄNZLIN (1995) deuten, wie auch Moser (l. c.) etwas breitere Sporen für *A. muscaria* an, jedoch sind sich die Maße wie auch die abgebildeten Sporen sehr ähnlich.

Material und Methoden:

Material:

***Amanita muscaria*:** Deutschland, Bayern, Regierungsbezirk Oberbayern, Landkreis Kelheim, Dürnbucher Forst, ca. 1 km westlich von Siegenburg, Kiefernwald auf Sand (Leucobryo-Pinetum), ca. 380 m, 8. 10. 1997, leg. et det. S. Raidl, SR 434, in M.

Deutschland, Bayern, Regierungsbezirk Oberpfalz, Landkreis Regensburg, Rabenzipfel bei Forstmühle, Mischbestand aus Fichten und Kiefern, ca. 500 m, 13. 10. 1998, leg. et det. S. Raidl, SR 655, in M.

***Amanita caesarea*: Italien**, Region Emilia Romagna, Provinz Parma, Borgo Val di Taro, Eichen-Kastanien-Wald an der Straße von Borgo Val di Taro nach Coregliana, ca. 530 m, 30. 9. 1998, det. S. Raidl, SR 578, in M.

Fraglicher Fruchtkörper: Fundort und Sammler unbekannt, Registriernummer 6063/98A, Giftnotzentrale München.

Methoden

Für die DNA-Isolierung wurden von den getrockneten Fruchtkörpern Lamellenstücke von ca. 2 x 2 mm entnommen und, wie bei AGERER et al. (1996) beschrieben, weiter behandelt (mit dem Unterschied, dass die Lamellenstücke bei Zimmertemperatur mit dem Isolationspuffer zerrieben wurden).

Für die PCR wurden die Primer ITS 1 und ITS 4 (WHITE et al. 1990, GARDES & BRUNS 1993) und für die RFLP-Analyse die Restriktionsenzyme *Alu I*, *Eco RI*, *Hinf I* und *Taq I* gewählt (PCR- und RFLP-Bedingungen siehe AGERER et al. 1996).

In einem dreiprozentigen Agarosegel wurden die Restriktionsansätze und ein Marker (100 bp DNA Ladder Plus, MBI Fermentas) nebeneinander aufgetragen und nach dem Lauf die Bandenmuster verglichen (Abb. 5). Bei der Auswertung der Gele wurden die Fragmentlängen auf 5 Basenpaare genau errechnet (Tab. 1), wobei eine Toleranz der Werte von 5% zu berücksichtigen ist.

Die anatomischen Untersuchungen wurden an Herbarmaterial mit Hilfe eines Zeiss Standard 14 Nomarski-Interferenzkontrastmikroskopes ausgeführt. Die Schnitte wurden mit einer scharfen Rasierklinge per Hand gewonnen und in Leitungswasser nach Zugabe eines Tropfens KOH 5% untersucht. Für die Herstellung von Dauerpräparaten wurde Milchsäure (90 %) verwendet. Zur Untersuchung der Marginalzellen wurden an einem Gefriermikrotom (Leitz 1321, in Verbindung mit dem Leitz Kryomat 1700) Tangentialschnitte der Lamellen angefertigt und in Milchsäure aufgenommen; die Schnittdicke lag zwischen 25 und 40 µm.

Die Zeichnungen wurden mit einem Zeichenspiegel bei 2000facher Vergrößerung erstellt und nachträglich verkleinert.

Ergebnisse

Amanita caesarea und *A. muscaria* lassen sich sowohl anatomisch als auch molekularbiologisch eindeutig voneinander trennen.

1. Anatomie

***Amanita muscaria*:** Velum universale im Bereich der Oberkante der Stielvolva (Abb. 1) neben gewöhnlichen dünnwandigen Hyphen von etwa (2)2,5–5(6) µm Durchmesser auch mit zahlreichen deutlich aufgeblähten Hyphenabschnitten bis hin zu fast kugelförmigen Zellen (Sphaerocysten), dabei alle Übergangsformen der Lumenerweiterung auftretend; Sphaerocysten in der Regel (falls erkennbar) terminal an Hyphenenden, meist bis 45 µm im Durchmesser, in Einzelfällen bis 55 µm, mit verdickter Zellwand (bis 1,5 µm), stellenweise nestartig zu mehreren gehäuft auftretend; Schnallen an den Hyphen vereinzelt auftretend.

Marginalzellen (Abb. 4a) meist undifferenziert, zylindrisch, bisweilen apikal breiter und basidiolenartig oder keulig, jedoch nicht mit deutlich abgesetztem Kopfteil, bis 10 µm Durchmesser am Apex, häufig mit einem großen oder mehreren Öltropfen, aus kanderlaberartig verzweigten Trägerhyphen hervorgehend.

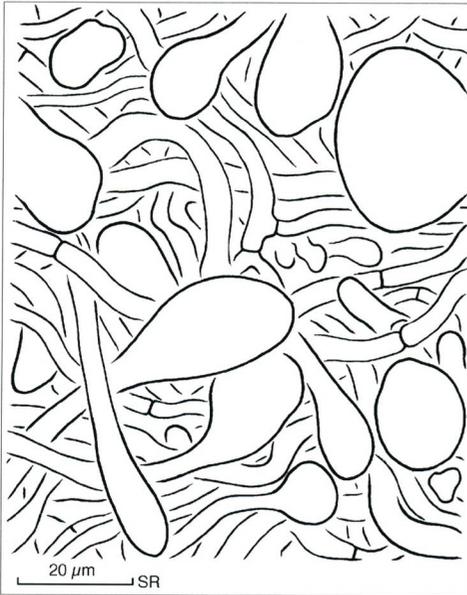


Abb. 1: *Amanita muscaria* – Ausschnitt aus dem Velum universale (Oberkante der Stielvolva), mit aufgeblähten Hyphenelementen und Sphaerocysten, von SR 434

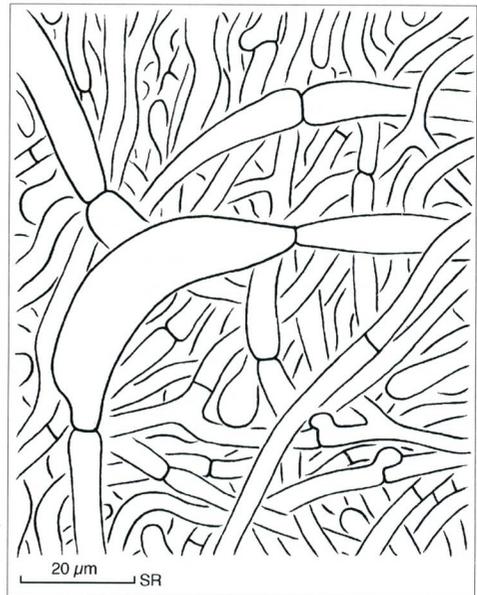


Abb. 2: *Amanita caesarea* – Ausschnitt aus dem Velum universale (Oberkante der Stielvolva), ohne Sphaerocysten, von SR 578



Abb. 3: fraglicher Pilz 6063/98A

- a. Ausschnitt aus dem Velum universale (Oberkante der Stielvolva), mit aufgeblähten Hyphenelementen und Sphaerocysten
- b. Anatomie der Hutschuppen, ebenfalls mit aufgeblähten Hyphenelementen und Sphaerocysten

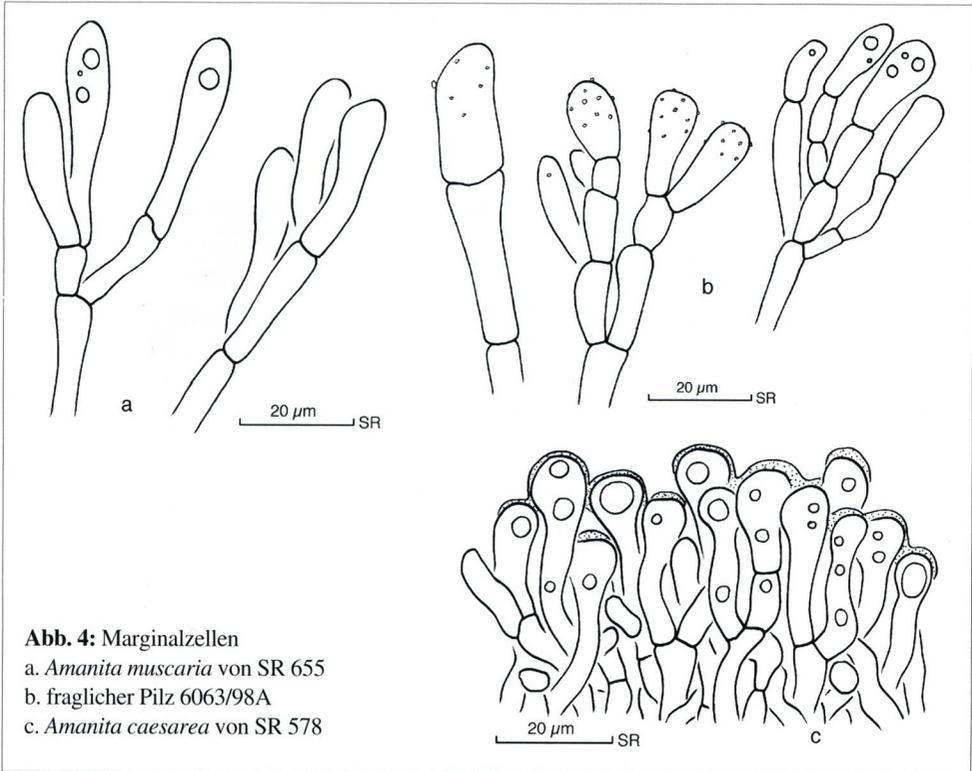


Abb. 4: Marginalzellen

a. *Amanita muscaria* von SR 655

b. fraglicher Pilz 6063/98A

c. *Amanita caesarea* von SR 578

***Amanita caesarea*:** Velum universale im Bereich der Oberkante der Stielvolva (Abb. 2) überwiegend aus undifferenzierten, dünnwandigen Hyphen von 2,5–5 µm Durchmesser aufgebaut, darin eingestreut einzelne intercalar deutlich vergrößerte Hyphen, diese bis zu 12 µm dick werdend, jedoch keine breit ellipsoiden Zellen oder gar Sphaerocysten vorkommend; Schnallen an den Hyphen vereinzelt auftretend.

Marginalzellen (Abb. 4c) in dichter Reihe stehend, meist deutlich keulig bis ausgeprägt kopfig, bis zu 40 µm lang, basal 3,5–5(6) µm im Durchmesser, terminal bis zu 12 µm breit, häufig mit Öltropfen und mit gallertigem Aufsatz am Apex.

Fraglicher Pilz 6063/98A: Velum universale im Bereich der Oberkante der Stielvolva (Abb. 3a) und in den Hutschuppen (Abb. 3b) mit deutlich aufgetriebenen Hyphenelementen und z. T. nest-artig gehäuften Sphaerocysten; Marginalzellen (Abb. 4b) undifferenziert, kaum keulig oder kopfig ausgeprägt.

2. PCR/RFLP:

Die amplifizierte DNA von *Amanita muscaria* und *A. caesarea* zeigt nach der Restriktion mit jeweils einem der vier Enzyme ein deutlich unterscheidbares Bandenmuster (Abb. 5, Tab. 1). Die Bandenmuster des fraglichen, zu bestimmenden Fruchtkörpers stimmen in allen Banden mit denen von *Amanita muscaria* überein (Abb. 5, Tab. 1), der Beleg kann somit zweifelsfrei *A. muscaria* zugeordnet werden.

Tab. 1: Fragmentlängen nach Verdau mit den Enzymen *Alu I*, *Eco RI*, *Hinf I*, *Taq I*

	<i>Amanita muscaria</i>	<i>Amanita Test</i>	<i>Amanita caesarea</i>
Alu I	400 BP 200 BP 65 BP	400 BP 200 BP 65 BP	510 BP 145 BP
	$\Sigma = 665 \text{ BP}$	$\Sigma = 665 \text{ BP}$	$\Sigma = 665 \text{ BP}$
Eco RI	380 BP 300 BP	380 BP 300 BP	380 BP 280 BP
	$\Sigma = 680 \text{ BP}$	$\Sigma = 680 \text{ BP}$	$\Sigma = 660 \text{ BP}$
Hinf I	340 BP 310 BP	340 BP 310 BP	390 BP 170 BP 100 BP
	$\Sigma = 650 \text{ BP}$	$\Sigma = 650 \text{ BP}$	$\Sigma = 660 \text{ BP}$
Taq I	350 BP 250 BP 60 BP	350 BP 250 BP 60 BP	260 BP 190 BP 125 BP 60 BP
	$\Sigma = 660 \text{ BP}$	$\Sigma = 660 \text{ BP}$	$\Sigma = 635 \text{ BP}$

Die molekularbiologischen Untersuchungen wurden unabhängig voneinander wiederholt durchgeführt.

Diskussion

Die hier erfolgten Studien bestätigen die von BREITENBACH & KRÄNZLIN (1995) gezeigten Trennungsmerkmale (Anatomie des Velum universale und Gestalt der Marginalzellen). Besonders der Aufbau des Velums (oberer Volvarand) eignet sich sehr gut zur Trennung, da dieser mit verhältnismäßig geringem Aufwand untersucht werden kann. Die Marginalzellen sind aufwendiger zu präparieren. Im vorliegenden Fall wurden die Lamellen mit Hilfe eines Kryotoms geschnitten, da die Ergebnisse so befriedigender sind als bei Handschnitten.

Die Verlässlichkeit dieser beiden Merkmale wurde anhand eindeutig bestimmten Materials von *A. muscaria* und *A. caesarea* geprüft. Erst anschließend wurden die anatomischen Merkmale der zu bestimmenden Probe erhoben, um eine unvoreingenommene Zuordnung gewährleisten zu können. Demnach handelt es sich hierbei zweifelsfrei um *A. muscaria*. Die parallel durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen (PCR/RFLP) bestätigten ebenfalls völlig eindeutig die Bestimmung als *A. muscaria* (siehe Abb. 5, Tab. 1).

Im Nachhinein kann aufgrund der untersuchten Herbarbelege meist auch makroskopisch am Trockenbeleg eine Zuordnung erfolgen. Bei *A. caesarea* kontrastiert die auch trocken weiße Volva zum gelben Stiel, während bei *A. muscaria* trocken sowohl der Stiel als auch die Velumreste der Stielbasis gewöhnlich gelb sind. Die Art des Trocknungsprozesses spielt jedoch eine gewichtige Rolle, da *A. muscaria* bisweilen sehr deutlich vergilben kann. Dies betrifft auch die im Gegensatz zum Kaiserling weißen Lamellen, die im Trockenzustand auch deutlich gelb gefärbt sein können. Eine Trennung aufgrund der Fruchtkörperfärbung des Trockenbeleges ist somit nicht

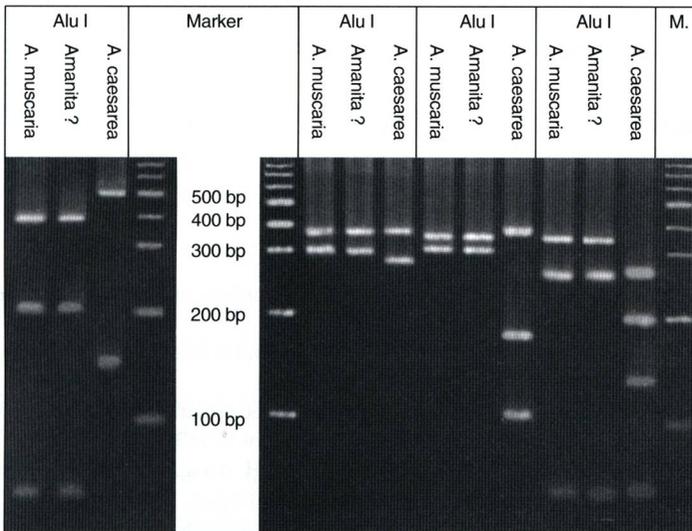


Abb. 5: Bandenmuster nach Restriktion mit den Enzymen *Alu I*, *Eco RI*, *Hinf I* und *Taq I*. Die fragliche Kollektion (*Amanita* ?) kann durch jedes Enzym eindeutig *A. muscaria* zugeordnet werden

zweifelsfrei möglich. Ebenso wurde beobachtet, dass während des Trocknens durch die Schrumpfung des Stieles bei *A. muscaria* eine abstehende Volva suggeriert werden kann (so wie dies auch beim untersuchten Beleg der Fall war). Dieses Merkmal ist also im Trockenzustand nicht mehr eindeutig. Auch die Größe der Hüllreste am Hut ist sehr variabel. So kann *A. muscaria* gelegentlich wenige, größere Velumreste aufweisen. Häufig wird des Velum vom Hut (z. B. bei Regen) völlig abgewaschen.

Besonders typische und zudem schonend getrocknete Belege können auch makroskopisch am Herbarbeleg bestimmt werden, jedoch ist diese Trennung insgesamt nicht zu empfehlen. Völlig eindeutig sind die hier beschriebenen anatomischen Merkmale und die PCR/RFLP der ITS-Region mit den angegebenen Enzymen.

Festzuhalten ist, dass *A. muscaria* ohne großen Zeitaufwand mit Hilfe eines Mikroskops anhand der auftretenden Sphaerocysten im Velum universale sowie der wenig differenzierten Marginalzellen sofort zu erkennen ist. Hierfür muss aber eine mykologisch vorgebildete Person zur Verfügung stehen, die diese anatomischen Daten erheben und auswerten kann.

Die Anwendung der molekularbiologischen Untersuchungen beinhaltet zwar den Nachteil, dass sie zum einen deutlich längere Zeit (1–2 Tage) in Anspruch nimmt und zum anderen erheblich höhere Untersuchungskosten mit sich bringt. Diese Untersuchungen können jedoch auch von mykologisch ungeschultem Personal an kleinsten Mengen ausgeführt und interpretiert werden, da sich die erhaltenen Schnittmuster eindeutig unterscheiden lassen.

Ähnlich geartete, juristisch oder medizinisch bedeutsame Problemstellungen, wie im hier geschilderten Fall, sind auch in Zukunft durchaus zu erwarten. Gerade die Möglichkeit, dass beim gewerblichen Sammeln von Steinpilzen im mediterranen Raum auch *Amanita caesarea* (oder

A. muscaria) beigemischt werden kann, macht es wahrscheinlich, dass auch in Zukunft Belege von getrockneten, rothütigen Lamellenpilzen nachträglich am Herbarbeleg bestimmt werden müssen.

Das Bestimmungsergebnis *Amanita muscaria* im vorliegenden Fall wirft letztlich die Frage auf, wie der Giftpilz unter die auf dem Markt angebotenen Steinpilze geriet. Dies kann jedoch kaum geklärt werden, zudem ist diese Problemstellung für andere Behörden von Interesse.

Literatur

- AGERER, R., W.R. MÜLLER & G. BAHNWEIG (1996): Ectomycorrhiza of *Rhizopogon subcaerulescens* on *Tsuga heterophylla*. *Nova Hedwigia* **63**: 397-415.
- BREITENBACH, J. & F. KRÄNZLIN (1995): Pilze der Schweiz. Band 4. Blätterpilze 2. Teil. 371 pp., Mykologia, Luzern.
- GARDES, M.T. & T.D. BRUNS (1993): ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes, application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molec. Ecol.* **2**: 113-118.
- MOSER, M. (1983): Die Röhrlinge und Blätterpilze. In: GAMS, H. (Hrsg.) Kleine Kryptogamenflora, Band IIb/2. Basidiomyceten 2. Teil. 533 pp., Gustav Fischer, Stuttgart.
- PHILLIPS, R. (1990): Der Kosmos-PilzAtlas. 2. Aufl., 288 pp., Franckh-Kosmos, Stuttgart.
- WHITE, M.T., T.D. BRUNS, S. LEE & J. TAYLOR (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: A guide to methods and applications, pp. 315-322, Academic Press Inc.

Eingegangen am 29. Juli 2000



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 Hefreihe 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. Freigibiger 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: 2000

Band/Volume: [66_2000](#)

Autor(en)/Author(s): Hahn Christoph, Raidl S., Beenken Ludwig

Artikel/Article: [Sind Amanita muscaria und Amanita caesarea eindeutig anhand von Herbarmaterial zu trennen? 173-180](#)