

Identifizierung von Trockenpilzen durch DNA-Analytik

MARGIT JAROSCH & ANDREAS BRESINSKY

Jarosch, Margit & A. Bresinsky (2000) – Identification of dried fungi through DNA-analysis. Z. Mykol. 66/2: 193 – 200

Key Words: Commercial purposes, *Boletus edulis*, DNA analysis, evaluation

Summary: The study aimed to test molecular methods for the identification of mushrooms. A sequencing analysis of the LR0R-LR5 region lying within the 28S rDNA was carried out to test the identity of dried fungi compared with authentically determined samples. Additionally, RFLP-analysis turned out to be a suitable, fast method to test the identity of dried fungi utilized for commercial or scientific purposes. Two practical examples, the identification of mushrooms related to *Boletus edulis*, respectively *Xerocomus chrysenteron*, have been chosen to show the efficiency of the applied methods.

Zusammenfassung: Molekulare Methoden wurden auf ihre Eignung zur Identifizierung von Speisepilzproben getestet. Durch eine Sequenzanalyse der LR0R-LR5 Region des 28S Gens innerhalb der rDNA wurden Trockenpilze auf Identität zu authentisch bestimmten Vergleichsproben überprüft. Die RFLP-Analyse erwies sich zusätzlich als geeignete, schnelle Methode zur Überprüfung von Trockenpilzen für kommerzielle oder wissenschaftliche Zwecke. Die Effizienz der verwendeten Methoden wird anhand zweier Beispiele aus der Praxis, der Identifizierung von Speisepilzen aus dem Verwandtschaftsbereich von *Boletus edulis* bzw. *Xerocomus chrysenteron* aufgezeigt.

Einleitung

Dank der Tatsache, dass sich DNA in Trockenpilzen längere Zeit erhält (BRUNS et al. 1990), können diese mittels moderner molekularer Verfahren auf Identität oder Nicht-Identität zu authentisch bestimmten Vergleichsproben überprüft werden. Diese Prüfverfahren können angewendet werden bei der Pilzbestimmung für wissenschaftliche und kommerzielle Zwecke. In diesem Beitrag wird dargestellt, wie für den Handel vorgesehene oder vertriebene Trockenpilze, und besonders auch bislang kaum überprüfbares Pilzpulver auf Konformität mit den Leitsätzen für Pilze und Pilzerzeugnisse untersucht werden können (HAUSER 1999). Anhand zweier aus Ostasien (China) stammender Trockenpilzproben A und B einer Pilzfirma, die um Beantwortung der Frage bat, ob beide Proben dem Steinpilz (*Boletus edulis*) zugerechnet werden können, sollen die angewandten Methoden und Ergebnisse aufgezeigt werden. Eine Sequenzanalyse der LR0R-LR5-Region des 28S Gens innerhalb der rDNA konnte zur Klärung dieser Frage beitragen. Zusätzlich wurde ein einfacheres molekularbiologisches Verfahren etabliert, mithilfe dessen Pilzproben aus dem Verwandtschaftsbereich von *Boletus edulis* schnell und sicher identifiziert werden können.

Material und Methoden

Pilzmaterial

Es wurden jeweils drei verschiedene Fruchtkörper der Probensammlungen A (A-a, -b, -c) und B (B-a, -b, -c) untersucht. Die in Tabelle 1 aufgelisteten Pilzstämme wurden als Vergleichsmaterial herangezogen. Folgende Vergleichssequenzen wurden zusätzlich aus GenBank entnommen:

Boletus edulis Bull.: Fr.: AF 050643

Xerocomus chrysenteron (Bull.) Quél.: AF 071537

Isolierung von DNA

Getrocknete Fruchtkörper dienten nach Entfernen der äußeren Schichten mit Hilfe eines Skalpell als Ausgangsmaterial für die DNA-Extraktion. Eine Probenmenge von 50 mg erwies sich als ausreichend.

Das verwendete Verfahren richtete sich im Wesentlichen nach LEE & TAYLOR (1990). Die Konzentration und Qualität der erhaltenen DNA wurde durch Färbung mit Ethidiumbromid auf 1%-igen Agarosegelen abgeschätzt.

DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die DNA-Amplifizierung wurden folgende Primersequenzen verwendet (vergl. VILGALYS 1992):

LR0R: 5`-ACC CGC TGA ACT TAA GC-3`

LR5: 5`-TCC TGA GGG AAA CTT CG-3`

Die DNA-Lösungen wurden zwischen 1:1000 und 1:100 verdünnt. Die Reaktionsansätze enthielten 37 µl verdünnte DNA und 63 µl Mastermix (47,5 µl H₂O bid., 10 µl 10x PCR-Reaktionspuffer (700 mM Tris-HCl, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % Tween 20, pH 9,0), 3 µl MgCl₂ (50 mM), 1,5 µl dNTP-Mix (200 µM je dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 50 pmol der Primer LR0R und LR5, sowie 1 U Taq-Polymerase). Die Schritte Denaturierung, Primeranlagerung (Annealing) und Verlängerung der Primer durch die Taq-Polymerase (Extension) wurden in zyklischer Folge 37 mal wiederholt. Der Thermocycler (Trio TB1, Biometra) wurde für die Amplifizierung des 900 Basen langen Produkts folgendermaßen programmiert: Denaturierung: 94 °C, 1 min; Annealing: 47 °C, 45 sec; Extension: 72 °C, 2 min.

Quantität und Qualität der gewonnenen PCR-Produkte wurden auf 1%-igen, mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen überprüft.

Für nachfolgende Cycle-Sequencing-Reaktionen wurden die PCR-Produkte über QIAquick Zentrifugationssäulchen (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die Aufreinigung der PCR-Produkte für den nachfolgenden Restriktionsverdau erfolgte wie in FISCHER (1995) angegeben.

Sequenzanalyse

Für das Cycle Sequencing wurde der ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) verwendet. Ein Reaktionsansatz (Endvolumen 11 µl) enthielt 3 µl gereinigtes PCR Produkt, 8 pmol LR0R, bzw. LR5 sowie 2 µl Premix (ABI Prism BigDye Terminator Ready Reaction Kit mit AmpliTaq-Polymerase, Perkin Elmer). Der Thermocycler wurde folgendermaßen programmiert: Denaturierung: 96 °C, 2 min; Annealing: 47 °C (LR0R), 49 °C (LR5), Extension: 60 °C, 4 min. Die einzelnen Schritte wurden in einer Schleife 25 mal durchlaufen.

Tab. 1: Verwendetes Pilzmaterial

Art	Stamm	Datum	Fundort	leg. / det.
<i>Boletus edulis</i> ¹⁾	R74/91	17.10.1991	Bayern	Helfer / Reisinger
	R380/88	14.09.1988	Bayern	Reisinger / Besl
	R493/90	22.10.1990	Bayern	Reisinger
	No 14	1988	Türkei	
	No 15	1988	Jugoslawien	
	197/89		China	
<i>Boletus pinophilus</i> ²⁾	No 4	20.07.1992	Bayern	Arnold
	42/93	02.08.1993	Bayern	Besl
<i>Suillus grevillei</i> ³⁾	SgrM2	19.07.1998	Bayern	Jarosch
<i>Suillus viscidus</i> ⁴⁾	SaM1	15.07.1998	Bayern	Besl

1) *Boletus edulis* Bull.: Fr.;

2) *Boletus pinophilus* Pilat & Dermek;

3) *Suillus grevillei* (Klotzsch: Fr.) Singer;

4) *Suillus viscidus* (Fr. & Hök) Rauschert

Zur Reinigung der Ansätze vor dem Gellauf wurde die DNA mit 55 µl EtOH (96 %) unter Zusatz von 2 µl 3 M NaAc (pH 4,6) gefällt und mit 150 µl EtOH (70 %) gewaschen.

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (5,25%-iges Polyacrylamid-Gel, PAGE-Plus, 7 M Urea, Amresco) erfolgte mit dem ABI 373 A oder ABI 377 Automated Sequencer (Perkin Elmer).

Auswertung der Sequenzdaten

Gegenläufige Sequenzen wurden mit SeqEd, Version 1.0.3 (STEIN 1991) revertiert. Das Alignment der Sequenzen erfolgte mit dem Programm ClustalX (THOMPSON et al. 1997) und wurde anschließend mit MacClade, Version 3 (MADDISON & MADDISON 1992) kontrolliert und bearbeitet. Aus den Nucleotidsequenzen wurde mit DNA DIST, Phylip 3.5c Packet (FELSENSTEIN 1993) eine Distanzmatrix erzeugt. Bei der Berechnung war der Kimura-2-Parameter aktiv. Das Verhältnis von Transition zu Transversion wurde mit 2,0 vorgegeben. Das in Abbildung 1 dargestellte Dendrogramm wurde mit NEIGHBOR, Phylip 3.5c Packet (FELSENSTEIN 1993) berechnet. Mit ClustalX (THOMPSON et al. 1997) wurde eine Bootstrap-Analyse mit 1000 Replikaten durchgeführt.

Restriktionsfragment-Analyse der amplifizierten rDNA-Abschnitte

Es wurden Restriktionsfragment-Analysen der innerhalb des 28S Genes gelegenen LR0R-LR5-Region durchgeführt. 10 µl der gereinigten PCR-Produkte ausgewählter Arten wurden mit jeweils 8 – 10 U der Restriktionsendonucleasen *Hae* III, *Hpa* II und *Mbo* I nach Angaben der Hersteller verdaut und einer horizontalen Elektrophorese unterzogen.

Die Restriktionsfragmente wurden auf 3,3%igen Agarosegelen elektrophoretisch getrennt. Als Referenz diente der DNA-Längenstandard pBR 328 (Weight Marker VI, Boehringer). Die Schnittmuster der untersuchten Proben wurden miteinander verglichen.

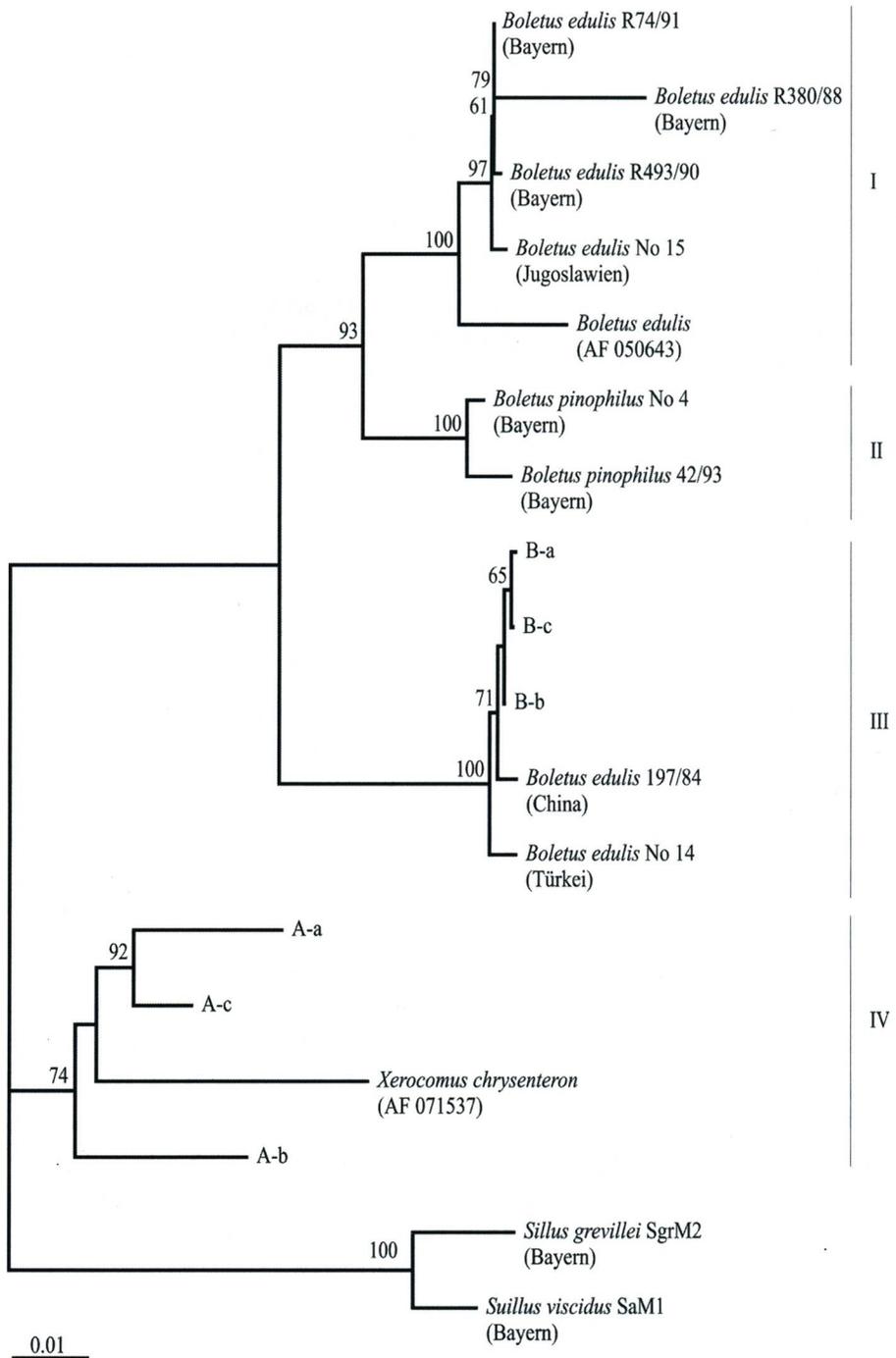


Abb. 1: Neighbor-joining Dendrogramm, basierend auf einer Sequenzanalyse der 28S rDNA. Bootstrapwerte über 50 % sind auf den jeweiligen Ästen angegeben

Ergebnisse

Sequenzanalyse zur Identifizierung der Proben A und B

Das durch Sequenzierung eines 900 Basen langen Abschnitts des 28S Gens erhaltene Neighbor-joining Dendrogramm ist in Abbildung 1 dargestellt. Als Outgroup dienten *Suillus grevillei* SgrM2 und *Suillus viscidus* SaM1.

Das Dendrogramm läßt eine Gliederung in vier Cluster erkennen. Cluster **I** beinhaltet die Aufsammlungen *Boletus edulis* R74/91, R380/88, R493/90 aus Bayern, die Aufsammlung *Boletus edulis* No 15 aus Jugoslawien, sowie die aus GenBank entnommene Sequenz von *Boletus edulis* AF 050643. Cluster **II** beinhaltet zwei Aufsammlungen der eng mit *Boletus edulis* verwandten Art *Boletus pinophilus* (No 4 und 42/93). Cluster **III** enthält neben den aufgrund makroskopischer Merkmale zu *Boletus edulis* gestellten Aufsammlungen aus China (197/84) und der Türkei (No 14) die zu identifizierenden Proben B-a, -b und -c. *Boletus pinophilus* steht den sicher bestimmten Aufsammlungen von *Boletus edulis* aus Cluster **I** näher, als die Pilzproben B-a, -b und c aus Cluster **III**. Cluster **IV** beinhaltet neben *Xerocomus chrysenteron* die Proben A-a, -b und -c. Die Aufsammlungen A weisen nur geringe Distanzwerte zu *Xerocomus chrysenteron* auf und stehen deutlich getrennt von den untersuchten Vertretern aus dem Verwandtschaftskreis von *Boletus edulis* und *B. pinophilus*. Diese deutliche Abgrenzung der Proben wird durch eine makroskopische Betrachtung der Fruchtkörper bereits unterstützt. Das getrocknete Material wies eine für *Boletus edulis* untypische, gelbliche Färbung auf.

RFLP-Analyse – eine schnelle und kostengünstige Methode zur Artunterscheidung

Das 900 Basen lange Produkt der Primer LR0R-LR5 der Aufsammlungen *Boletus edulis* R74/91 (Bayern), B-a, B-b, *Boletus cf. edulis* 197/89 (China), A-a und A-b wurde mit den Restriktionsendonucleasen *Hae* III, *Hpa* II und *Mbo* I verdaut. Die resultierenden Schnittmuster sind in Abbildung 2 dargestellt.

Die jeweils entstehenden RFLP-Phänotypen sind im Folgenden zusammengefaßt:

Hae III

Phänotyp I	Phänotyp II	Phänotyp III	Phänotyp IV
<i>Boletus edulis</i> R74/91	B-a B-b <i>Boletus cf. edulis</i> 197/89 (China)	A-a	A-b

Durch Verdau mit der Restriktionsendonuclease *Hae* III entstehen vier unterschiedliche RFLP-Phänotypen. *Boletus edulis* R74/91, A-a und A-b weisen jeweils eigene Schnittmuster auf. Das resultierende Schnittmuster ist für die Proben B-a, B-b, sowie für *Boletus cf. edulis* 197/89 (China) gleich. Das Produkt der Primer LR0R-LR5 wird hier lediglich einmal geschnitten. Es entsteht ein 720 und ein 220 Basen langes Fragment.

Hpa II

Phänotyp I	Phänotyp II	Phänotyp III	Phänotyp IV
<i>Boletus edulis</i> R74/91	B-a B-b <i>Boletus cf. edulis</i> 197/89 (China)	A-a	A-b

Der Verdau des LR0R-LR5-Produkts mit *Hpa* II liefert ebenfalls vier verschiedene RFLP-Phänotypen. Wieder sind die Proben A-a und A-b deutlich von *Boletus edulis* R74/91, als auch von *Boletus cf. edulis* 197/89 (China) abgegrenzt.

Mbo I

Phänotyp I	Phänotyp II	Phänotyp III
<i>Boletus edulis</i> R74/91 B-a B-b <i>Boletus cf. edulis</i> 197/89 (China)	A-a	A-b

Der Restriktionsverdau mit der Endonuclease *Mbo* I führt zu drei unterschiedlichen Restriktions-Schnittmustern. Das LR0R-LR5-Produkt von *Boletus edulis* R74/91, *Boletus cf. edulis* 197/89 (China) und der Proben B-a, B-b wird jeweils zweimal geschnitten. In allen Fällen entstehen drei Fragmente mit einer Länge von 680 Basen, 120 Basen und 100 Basen. Deutlich abweichend von dieser Gruppe sind die unterschiedlichen RFLP-Phänotypen von A-a und A-b.

Diskussion der Ergebnisse und Ausblick

Das untersuchte Beispiel aus der Praxis zeigt die Leistungsfähigkeit der angewandten Methoden auf. Die Ergebnisse der RFLP-Analysen lassen sich gut mit dem durch Sequenzanalyse erhaltenen Dendrogramm in Einklang bringen. Die Probenaufsammlung B läßt sich durch die Enzyme *Hae* II und *Hpa* II von *Boletus edulis* abgrenzen, ist aber in den näheren Verwandtschaftskreis von *Boletus edulis* und *Boletus pinophilus* Pilát & Dermek zu stellen. Die Proben A-a und A-b gehören verschiedenen Arten an. Keine der untersuchten Aufsammlungen A-a, -b und -c kann jedoch in den näheren Verwandtschaftskreis von *Boletus edulis* gestellt werden. Kleinarten aus dem Artenkomplex rund um den Steinpilz werden erkannt und in ihrem zueinander bestehenden Verwandtschaftsgrad gekennzeichnet. Die asiatischen Herkünfte von Proben, die am Trockenmaterial makroskopisch und mikroskopisch von typischem Steinpilz aus Europa kaum zu unterscheiden sind, fallen laut den Ergebnissen der Sequenzierung zwar in die Steinpilzgruppe, sind aber andererseits wieder von *Boletus edulis* s. str. (aus Europa) verschiedener als die dem typischen Steinpilz genäherte Kleinart des Kiefern-Steinpilzes (*Boletus pinophilus*). Besondere Beachtung verdient hierbei die Probe aus der Türkei, die uns von einem Pilzhändler als Trockenware zur Verfügung gestellt wurde. Die an Identität gehende Ähnlichkeit zu Proben aus China überrascht etwas. Zwei Erklärungsmöglichkeiten kommen hierfür in Betracht: Die Pilze aus Kleinasien und Ostasien gehören zur gleichen, gesamtasiatischen Sippe, oder der Pilz aus der Türkei wurde letztlich aus Ostasien bezogen. Die lebensmittelrechtliche Bewertung der „Steinpilze aus China“ stellt

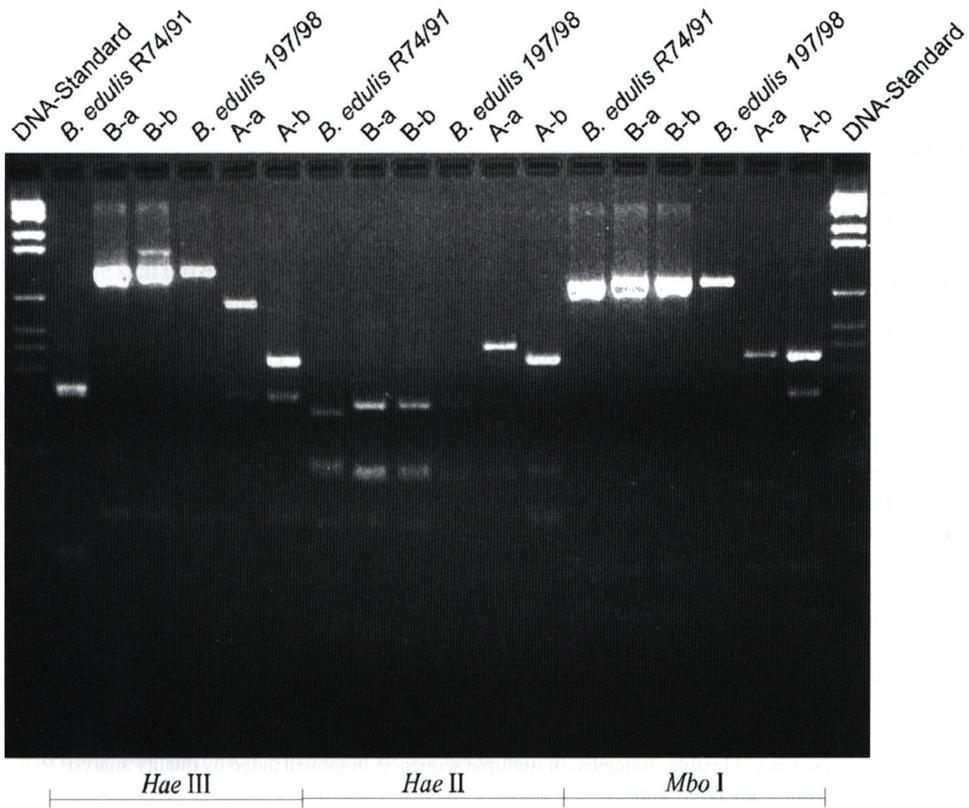


Abb. 2: Verdau des LROR-LR5 Produktes der angegebenen Proben mit den Restriktionsenzymen *Hae III*, *Hpa II* und *Mbo I*

sich wie folgt dar: Die Leitsätze für Pilze und Pilzerzeugnisse der Bundesrepublik Deutschland erlauben die Verwendung des Steinpilzes und seiner nächstverwandten Kleinarten. Die geringe genetische Distanz der „Steinpilze aus China“ zu typischem europäischem Steinpilz erlaubt es, die Konformität mit den Leitsätzen festzustellen. Anders verhält es sich mit leicht gelblich eingefärbten Proben, die aus China, ebenfalls als Steinpilze, bezogen worden waren. In diesem Falle wies die makroskopische Beurteilung bereits darauf hin, dass hier keinesfalls Stücke vom Steinpilz vorliegen. Diese Einschätzung wurde durch Sequenzierung als auch durch RFLP-Analysen voll bestätigt. Die dabei festgestellte Nähe zu *Xerocomus chrysenteron* ist dabei allerdings nicht so groß, dass von einer Identität ausgegangen werden kann. Vielmehr muss angenommen werden, dass hier ein in den Leitsätzen nicht aufgeführter ostasiatischer Röhrling vorliegt.

Das angewandte RFLP-Verfahren als kostengünstiger Schnelltest ist auch geeignet, die Artenzusammensetzung von Pilzpulver zu untersuchen. Die mikroskopische Kontrolle erlaubte bisher lediglich ungenaue Bewertungen. Steinpilzpulver beispielsweise konnte bislang mikroskopisch lediglich daraufhin untersucht werden, ob außer Röhrlingssporen im weitesten Sinne andere Pilzsporen auf Fremddanteile hinwies. Die einzelnen Röhrlingsarten konnten jedoch anhand von

Pilzpulver kaum voneinander getrennt werden. Mit Hilfe der RFLP-Analyse kann nunmehr festgestellt werden, ob außer den für *Boletus edulis* typischen Signalen auch andere, auf beigemengte Fremdkomponenten schließen lassende Signale auftreten.

Dank

Für die Bereitstellung von Pilzmaterial danken wir A. REISINGER, Dr. N. ARNOLD, Dr. H. BESL und Dr. W. HELFER.

Literatur

- BRUNS, T. D., R. FOGEL & J. W. TAYLOR (1990) – Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. *Mycologia* **82**: 175-184.
- FELSENSTEIN, J. (1993) – Phylip (Phylogeny Inference Package) Version 3.5c., distributed by the University of Washington, Seattle.
- FISCHER, M. (1995) – Zur Systematik der *Boletales*: Isolierung und Kennzeichnung von DNA aus Fruchtkörpern und Mycelkulturen. *Z. Mykol.* **61** (2): 245-260.
- HAUSER, H. (1999) – Deutsches Lebensmittelbuch, Leitsätze 2000. Verkehrsbezeichnung, Qualität und Zusammensetzung. Leitsätze für Pilze und Pilzerzeugnisse. Bundesanzeiger Verlag. Köln, p. 283.
- 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. Academic press, San Diego, USA.
- MADDISON, W. P. & D. R. MADDISON (1992) – Mac Clade: Analysis of phylogeny and character evolution. Version 3.0.1. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts USA.
- STEIN, J. (1991) – SeqEd Version 1.0.1. Reference Tutorial. Applied Biosystems, Inc.
- THOMPSON, J. D., T. J. GIBSON, F. PLEWNIAK, F. JEANMOUGIN & D. B. HIGGINS (1997) – The CLUSTAL X windows interface. Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* **25**: 8476-4882.
- VILGALYS, R. (1992) – Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA, distributed by the author, Botany Dept., Duke University, Durham.

Eingereicht am 25. 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 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. Freigebiger 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): Jarosch Margit, Bresinsky Andreas

Artikel/Article: [Identifizierung von Trockenpilzen durch DNA-Analytik 193-200](#)