

Molekulare Untersuchungen an Hausfäulepilzen

OLAF SCHMIDT & UTE MORETH

SCHMIDT, O. & U. MORETH (2006): Molecular investigations on indoor wood rot fungi. Z. Mykol. 72/2: 137-152

Key words: Indoor wood rot fungi, Molecular methods, Proteins, DNA

Summary: There are over 65 basidiomycetous species, which occur as indoor wood decay fungi in buildings. Traditional methods like macro- and microscopic investigation had been performed to characterize and identify these scientifically interesting and economically important fungi. Molecular methods do not depend on the subjective judgment of a human being as it might occur using classical methods, but are based on the objective information (molecules) deriving from the target organism. Thus, molecular techniques are increasingly used to identify organisms and for taxonomic research. In the 1980s, molecular methods were established for wood-inhabiting fungi. Mainly, the fungal proteins and nucleic acids are used. The overview comprises methods and results that are related to the house-rot fungi. Among the protein-based techniques, particularly SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was applied to house-rot fungi. Several DNA-based techniques initially duplicate a part of the fungal DNA by the procedure of polymerase chain reaction (PCR). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-analysis was applied to the Dry rot and the Cellar fungus. The investigation of the ribosomal DNA (rDNA) has become very popular, because the conserved genes can be used for phylogenetic analyses of genera, families, and orders, and the rapidly evolving ITS spacers have become a popular choice for closely related species. After amplification by PCR, the amplicons are either restricted by endonucleases providing restriction fragments (RFLPs), which are subsequently separated according to size using gel electrophoresis, or the DNA sequence is determined („sequencing“). The sequences may be also used to design species-specific primers for PCR. A data set of rDNA-ITS sequences of 18 house-rot fungi was obtained to be used for diagnosis through sequence comparison and is completed by the 18S, 28S rDNA, and the intergenic spacer (IGS) of some important species. For diagnosis of house-rot fungi, ITS sequencing is considered to be the most powerful molecular tool. Finally, the first MALDI-TOF mass spectrometry „fingerprints“ of Basidiomycetes (*Serpula* spp., *Coniophora* spp.) are shown.

Zusammenfassung: In Gebäuden sind über 65 verschiedene Basidiomyceten nachgewiesen. Zur Charakterisierung und Diagnose dieser wissenschaftlich interessanten und ökonomisch wichtigen Gruppe von Pilzen dienten bisher die klassischen Methoden der makro- und mikroskopischen Pilzbestimmung, die jedoch die Gefahr subjektiver Irrtümer haben. Seit den 80er Jahren werden daher für die Gebäudepilze objektive, molekulare Techniken erprobt. Beschrieben, mit Beispielen erläutert und hinsichtlich Anwendbarkeit bewertet werden verschiedene Techniken, die auf den Proteinen und Nukleinsäuren der Pilze beruhen, wie SDS-PAGE, RAPD-Analyse, RFPL's, DNS-Sequenzierung und MALDI-TOF-Massenspektrometrie.

Einleitung

Hausfäulepilze sind in wissenschaftlicher Hinsicht eine interessante Pilzgruppe, da diese etwa 65 verschiedenen Basidiomyceten (HUCKFELDT & SCHMIDT 2006) systematisch breit streuen (Dacrymycetales, Aphyllophorales, Agaricales, Boletales), die Arten sich in ihrer Physiologie, wie dem wichtigen Merkmal von Braun- oder Weißfäulepilze, beträchtlich unterscheiden und sich die Pilze dennoch an den speziellen Biotop Gebäude angepaßt haben, wie besonders der Echte Hauschwamm, *Serpula lacrymans* (Wulfen: Fr.) Schroeter, oder ihn tolerieren, wie die auch im Freien häufig vorkommenden *Antrodia*- und *Coniophora*-Arten. Ökonomisch betrachtet bilden Hausfäulepilze die wichtigste Gruppe der holzbewohnenden Pilze, da sie das Holz am Ende der Verarbeitungsfolge 'Forstwirtschaft, Holzernte und Lagerung, Holzverarbeitung, Lagerung von Schnittware, gegebenenfalls Holzimprägnierung, Holzverwendung innerhalb von Gebäuden' schädigen (SCHMIDT 2006). Für die Einschätzung des Schadensausmaßes in einem Gebäude ist die Kenntnis ihrer Biologie und für die Sanierung eine exakte Artdiagnose wichtig (DIN 68000), da in Abhängigkeit von der Pilzart unterschiedliche Auflagen an die Sanierung gestellt werden. Methoden zur Beschreibung und Bestimmung von Hausfäulepilzen, wie die makro- und mikroskopische Untersuchung von Fruchtkörpern, Mycelien und Strängen (u.a. BREITENBACH & KRÄNZLIN 1986, HUCKFELDT & SCHMIDT 2006, RYVARDEN & GILBERTSON 1993, 1994, SCHMIDT & HUCKFELDT 2005, STALPERS 1978), haben jedoch als wesentlichen Nachteil, daß sie von Menschen durchgeführt werden, die abschließende Benennung eines Pilzes daher subjektiv ist. Mögliche Fehlerquellen sind das Fehlen detaillierter mykologischer Kenntnisse, besonders über die Artenvielfalt in Gebäuden, das Übersehen wichtiger Pilz- und Befallsmerkmale sowie eine mangelnde apparative Ausrüstung zur Untersuchung.

Dagegen sind molekularbiologische Methoden objektiv, da sie auf den objektiven Informationen eines Pilzes beruhen, nämlich seinen Molekülen. Molekulare Techniken werden daher seit den 80er-Jahren zur Charakterisierung von Holzpilzen erarbeitet. Die meisten Techniken basieren auf den Eiweißen und Nukleinsäuren der Pilze. Einige DNS-Verfahren werden bereits zur kommerziellen Pilzbestimmung eingesetzt. Der folgende Überblick beschreibt den Kenntnis-Stand über die molekularen Untersuchungen an Hausfäulepilzen, erläutert die Grundlagen und nennt Vor- und Nachteile der verschiedenen Techniken.

Methoden auf Grundlage der Proteine

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE wird das zelluläre Eiweiß aus einem beliebigen Pilzgewebe (Mycel, Strang, Fruchtkörper) extrahiert und mit Mercaptoethanol und Natriumdodecylsulphat (SDS) denaturiert und negativ geladen. Die je Pilzart verschiedenen Proteine werden dann in einem Gel aus Polyacrylamid mittels Elektrophorese im elektrischen Feld nach ihrer Größe getrennt und durch Anfärben, z.B. mit Coomassie-Blau, sichtbar gemacht. Das erhaltene Muster der Eiweißbanden unterscheidet verschiedene Pilze, und theoretisch kann eine unbekannte Probe durch Übereinstimmung ihres Musters mit demjenigen eines bereits untersuchten Pilzes bestimmt werden.

Mittels SDS-PAGE wurden einige Hausfäulepilze unterschieden und auch Fehlbestimmungen erkannt (SCHMIDT & KEBERNIK 1989, VIGROW et al. 1989). Die Abbildung 1 zeigt das Banden-Muster verschiedener Pilzkulturen, die alle als *Serpula lacrymans* bestimmt waren, und ein davon

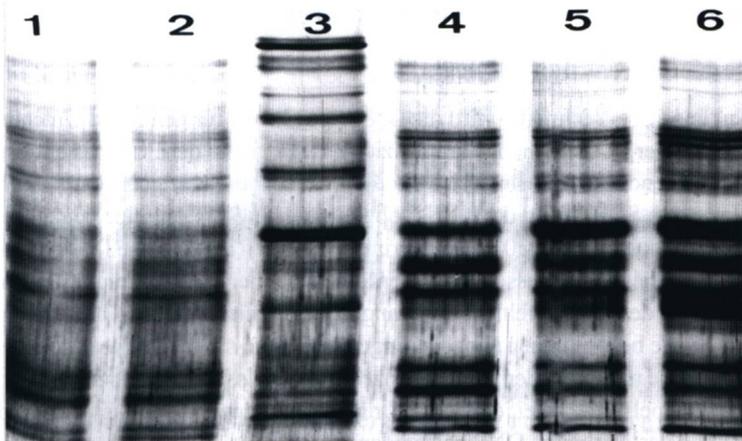


Abb. 1: SDS-PAGE-Gel mit Mustern von *Serpula lacrymans* (1, 2, 4, 5, 6) und *S. himantoides* (3).

abweichendes Muster, das später dem Wilden Hausschwamm, *S. himantoides* (Fr.: Fr.) P. Karsten, zugeordnet werden konnte.

Eine Pilzbestimmung mit SDS-PAGE kann an einem Tag durchgeführt werden, wenn die Probe von einer Reinkultur stammt. Jedoch erfordern selbst hergestellte Gele Sorgfalt, damit vergleichbare Ergebnisse erhalten werden, und Vorsichtsmaßnahmen, da Acrylamid im unpolymerisierten Zustand als krebserregend gilt. Fertig-Gele sind teuer. Die Technik hat sich für die Grundlagenforschung bewährt, jedoch keinen praktischen Einsatz zur Pilzdiagnose erreicht.

Immunologische Methoden

Das biologische Prinzip immunologischer Methoden beruht darauf, daß sich der Organismus eines Individuums gegen fremdes Eiweiß durch die Bildung von Antikörpern in seinem Blut wehrt. Für eine Nutzung des Verfahrens zur Pilzdiagnose werden zunächst Antikörper gewonnen, indem Wirbeltieren, wie Mäusen und Kaninchen, Mycel einer bestimmten Pilzart als Antigen injiziert wird, die daraufhin Antikörper gegen das Eiweiß bilden. Das entnommene Blut mit den darin enthaltenen Antikörpern kann dann mit verschiedenen speziellen Techniken zur Identifizierung einer unbekannt Probe eingesetzt werden. Stammt eine Probe von derselben Pilzart wie das injizierte Antigen, erfolgt als Nachweismöglichkeit beispielsweise eine erkennbare Antigen-Antikörper-Reaktion, die die Probe als Art identifiziert. Für den Bereich der Hausfäulepilze liegen Untersuchungen u.a. an *S. lacrymans* vor (VIGROW et al. 1991, TOFT 1993).

Antikörper reagieren jedoch nicht immer spezifisch, sondern zeigen u.U. auch bei Fremd-Organismen eine Reaktion. Dennoch sind allgemeine Vorteile der immunologischen Verfahren, daß vor einer Pilzbestimmung von befallenen Holz etc. weder eine Isolierung vorgenommen noch eine Reinkultur hergestellt werden müssen und auch der Nachweis von Frühbefall möglich ist, bevor schwerere Schäden auftreten (CLAUSEN & KARTAL 2003).

Weitere, auf den Proteinen basierende Techniken, wie **Isozym-Analysen**, sind nach unserer Kenntnis bisher nicht bei Hausfäulepilzen angewendet worden.

Methoden auf Grundlage der Nukleinsäuren

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei vielen Nukleinsäure-Techniken wird die DNS eines Pilzes für genügend Untersuchungsmaterial zunächst mit der PCR vermehrt (amplifiziert). Das Prinzip der PCR besteht darin, daß ein Teil der DNS des Genoms durch einen sich wiederholenden, dreistufigen Temperaturzyklus vermehrt wird: Im ersten Schritt wird der DNS-Doppelstrang bei 94 °C in seine beiden Einzelstränge gespalten. Dann binden bei etwa 50 °C zwei Primer, künstlich hergestellte DNS-Stücke aus etwa 20 Nukleotiden, jeweils an die passenden Basenfolge eines der beiden Stränge als Startmoleküle für die Neusynthese des jeweils fehlenden Stranges. Schließlich baut eine hitzebeständige Polymerase bei 72 °C die beiden neuen Einzelstränge auf, indem sie die im Reaktionsgemisch vorhandenen Nukleotide nacheinander mit den Einzelsträngen als Matrize aneinanderreihet. Dadurch sind aus einem Doppelstrang zwei identische Stränge geworden. Nach 35 Zyklen sind 10^{10} – 10^{11} identische Kopien der Ausgangs-DNS entstanden.

Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-Analyse

Randomly amplified polymorphic DNA heißt frei übersetzt, daß zufällig (random) mit der PCR vermehrte (amplified) DNS untersucht wird, die beim Vergleich verschiedener Pilz-Proben ein polymorphes Muster unterschiedliche DNS-Abschnitte ergibt. Der Zufall ist gewährleistet, weil im Gegensatz zur klassischen PCR nur ein einziger Primer für beide Einzelstränge verwendet wird, der kurz (10 Nukleotide) und von zufälliger Basenfolge ist. Wegen der Kürze des Primers bindet er an zahlreichen Stellen der Gesamt-DNS, wodurch bei der PCR mehrere DNS-Abschnitte amplifiziert werden. Die PCR-Produkte werden dann, häufig in einem Agarose-Gel, nach ihrer Länge aufgetrennt. Mittels Ethidiumbromid oder einem weniger giftigen Derivat wird die DNS schließlich durch Fluoreszenz im UV-Licht sichtbar gemacht (siehe Abb. 5 und 7). Ein mitgeführter Standard von DNS-Stücken definierter Länge dient zur Längenabschätzung der DNS-Abschnitte.

Meist unterscheiden sich verschiedene Pilze bei RAPD-Untersuchungen dadurch, daß sie auf dem Gel unterschiedlich viele und verschieden lange DNS-Abschnitte zeigen (polymorph). Da die Primer an verschiedene Stellen der DNS einer Probe gebunden haben, ist das erhaltene DNS-Muster oft Individuen-spezifisch, das heißt, mit der RAPD-Technik lassen sich verschiedene Stämme einer Pilzart unterscheiden.

Die Abbildung 2 zeigt, daß die drei Stämme von *S. himantioides* mit beiden gewählten Primern ein unterschiedliches Bandenmuster aufwiesen (polymorph). Dagegen lieferte *S. lacrymans* als selteneres Ergebnis bei RAPD-Untersuchungen ein homogenes Muster, vermutlich bedingt durch die geringe genetische Variabilität dieses Pilzes (s.u.).

Aus dem Bereich der Hausfäulepilze liegen RAPD-Untersuchungen für den Echten und Wilden Hausschwamm sowie den Braunen Kellerschwamm, *Coniophora puteana* (Schum.: Fr.) P. Karsten, vor (THEODORE et al. 1995, SCHMIDT & MORETH 1998). Die Eignung der RAPD-Technik zum Erkennen bestimmter Pilzstämmen zeigten GÖLLER & RUDOLPH (2003) augenfällig mit dem Nachweis, daß es sich bei dem Stamm Eberswalde 15 von *C. puteana*, der obligatorischer Prüfpilz in der europäischen Holzschutzmittelpflichtform EN 113 ist, in einigen Prüflabors in Wirklichkeit um eine Abimpfung des englischen Prüfstammes FPRL 11e handelt. Dies ist eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Versuchsergebnisse mit diesem Prüfpilz in verschiedenen Labors.

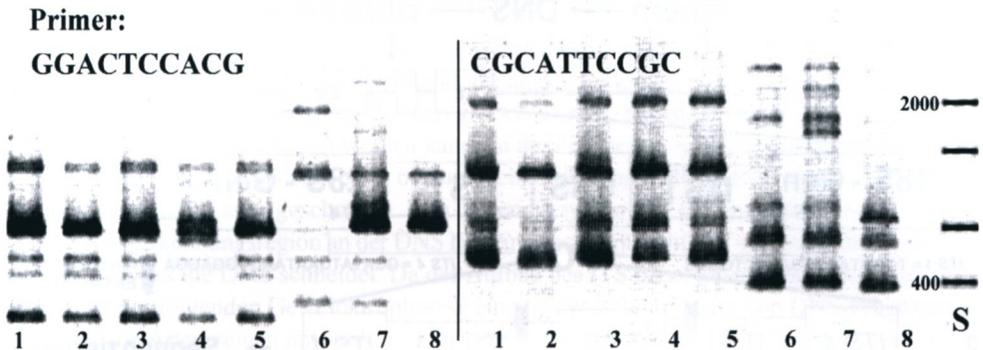


Abb. 2: RAPD-Muster verschiedener Stämme von *Serpula lacrymans* (1-5) und *S. himantioides* (6-8) mit zwei Primern. S = Standard (400–2000 Basenpaare) zur Abschätzung der Längen der einzelnen Banden (nach SCHMIDT & MORETH 1998).

Die RAPD-Technik hat den Vorteil, daß der Experimentator keinerlei Kenntnisse über den Aufbau der zu untersuchenden DNS benötigt. Wegen der Kürze der Primer besteht jedoch Gefahr von Fehlern durch Verunreinigungen mit Schimmelpilzsporen und Bakterien aus der Laborluft etc., da sich derart kurze und zufällig ausgewählte Primer an jede DNS anlagern, die dann per PCR vermehrt wird. Zur Kontrolle sollte daher stets eine Leerprobe ohne Pilz-DNS geprüft werden. Weiterhin ist die Technik wegen ihrer Individuenspezifität, außer z.B. bei *S. lacrymans*, nicht zur Artbestimmung unbekannter Proben geeignet.

Techniken auf Basis der ribosomalen DNS

Die ribosomale DNS (rDNS) ist seit einigen Jahren das wichtigste genetische Werkzeug zur Charakterisierung und Bestimmung von Organismen sowie zur Ermittlung ihrer verwandtschaftlichen Beziehungen (Phylogenie, Molekulare Systematik).

Die rDNS lenkt (kodiert) den Aufbau der Ribosomen, sie ist daher bei vielen Organismen als Untersuchungsobjekt geeignet. Die rDNS kommt weiterhin in zahlreichen Kopien über das Genom verteilt vor, so daß sie experimentell leicht faßbar ist. Sie ist aus verschiedenen Abschnitten aufgebaut (Abb. 3) und besteht aus kodierenden Bereichen (Gene), die bei Pilzen und anderen Eukaryoten als 18S-, 5,8S-, 28S- und 5S-rDNS bezeichnet werden. Wegen des universellen Vorkommens der Ribosomen sind diese Gene bei verschiedenen Lebewesen ähnlich aufgebaut (konservativ). Zwischen den Genen befinden sich „Spacer“, nämlich der Internal transcribed spacer, ITS I zwischen 18S und 5,8S und der ITS II zwischen 5,8S und 28S. Der Intergenic spacer



Abb. 3: rDNS-Einheit mit den Genen 18S, 5,8S, 28S und 5S sowie den Spacern ITS I, ITS II, IGS I und IGS II. Die Angaben in Basenpaaren bp sind die entsprechenden Längen bei *Serpula lacrymans*.

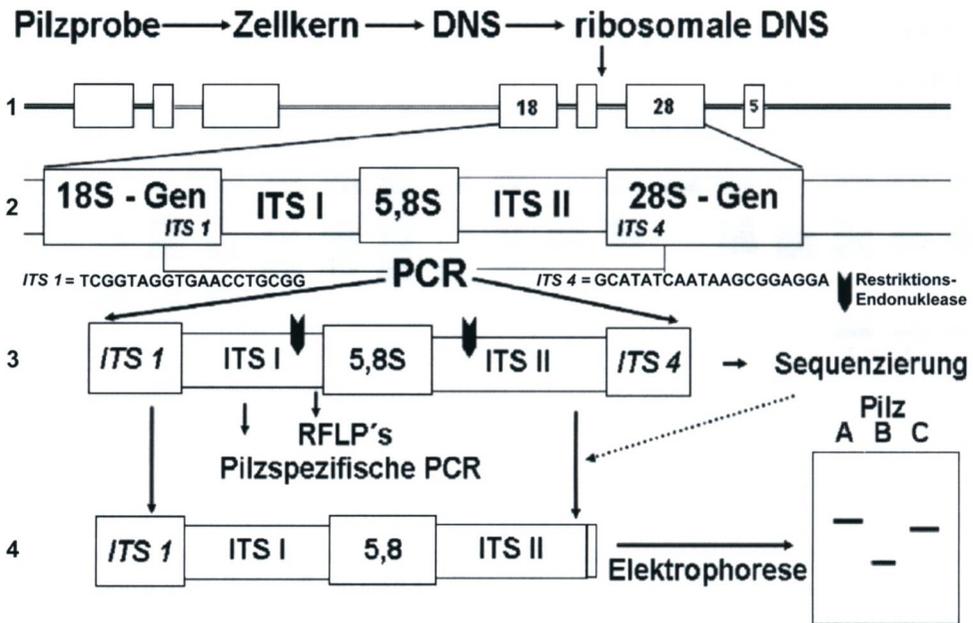


Abb. 4: Molekulare Techniken auf Basis des ITS-rDNS-Bereiches. 1: sich wiederholende rDNS-Einheiten auf dem Genom; 2: Teil einer rDNS-Einheit; 3: mittels PCR vermehrter ITS-Bereich; 4: pilzspezifische PCR und Elektrophorese.

(IGS) liegt zwischen der 28S und der 18S der nächsten rDNS-Einheit und ist oft durch die 5S-rDNS unterbrochen. Da auch nicht-kodierenden Bereiche bei der Mitose verdoppelt werden, traten dort im Laufe der Entwicklungsgeschichte durch Mutationen Basenveränderungen auf, die sich manifestiert haben.

Der Aufbau der rDNS aus konservativen Genen und variablen Spacern wird für verschiedene Versuchsziele genutzt. Teile des 18S- und 28S-Gens werden häufig für phylogenetische Untersuchungen höherer Pilzgruppen verwendet, nämlich für Gattungen, Familien und Ordnungen (BRESINSKY et al. 1999, JAROSCH & BESL 2001). Dagegen ist der ITS in der Regel artspezifisch, somit zur Unterscheidung und damit auch zur Bestimmung von Arten geeignet.

Die Abbildung 3 zeigt eine komplette rDNS-Einheit von *S. lacrymans*. Der Echte Hausschwamm gehört somit zu den sehr wenigen Pilzen, von denen die vollständige Sequenz einer rDNS-Einheit bekannt ist (siehe Tab. 1).

Zur Untersuchung eines Pilzes wird zunächst der für das jeweilige Ziel ausgewählte Abschnitt der rDNS per PCR vermehrt, indem nun Primer eingesetzt werden, deren Andockstelle an der rDNS bekannt ist (Abb. 4). Die amplifizierte rDNS-Abschnitte werden dann entweder mittels Restriktions-Endonukleasen zerschnitten und die entstandenen DNS-Fragmente in einem Agarose-Gel vergleichend untersucht werden (RFLP's). Oder es wird die genaue Abfolge der vier Basen des DNS-Abschnittes aufgeklärt (Sequenzierung). Schließlich lassen sich aus diesen Sequenzdaten spezifische Primer für die Pilz-spezifische PCR ableiten.

Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismen (RFLP's)

Für RFLP-Untersuchungen des ITS-Bereiches wird dieser Abschnitt zunächst per PCR mit den Universal-Primern ITS 1 und ITS 4 vermehrt, die an den Enden des konservativen 18S- und 28S-Gens anlagern (Abb. 4). Letzteres hat den großen Vorteil, daß auch der ITS von bisher nicht untersuchten Pilzen amplifiziert werden kann, da die Primer bei vielen Organismen passen, die spezielle Sequenz des ITS also nicht bekannt sein muß. Das PCR-Produkt wird dann mit Restriktions-Endonukleasen geschnitten. Von diesen Enzymen gibt es Hunderte, von denen jedes seine eigene Erkennungsregion an der DNS hat, eine bestimmte Abfolge von mindestens vier Basen, an denen es die DNS schneidet. Da der Aufbau des ITS meist artspezifisch ist, ergibt jede Pilzart bei der folgenden Gel-Elektrophorese ein eigenes Schnittmuster von DNS-Fragmenten, verschiedene Arten zeigen unterschiedliche Muster (Polymorphismen), und theoretisch können unbekannte Proben durch Mustergleichheit identifiziert werden.

Aus dem Bereich der Hausfäulepilze unterschieden ZAREMSKI et al. (1999) *Coniophora puteana*, *Gloeophyllum trabeum* (Pers.: Fr.) Murr. und *Oligoporus placenta* (Fr.) Gilb. & Ryv. mittels ITS-RFLP's. Ein Schneiden mit dem Enzym *TaqI* unterschied sieben Arten durch spezifische Muster (SCHMIDT & MORETH 1999), das heißt, wichtige Hausfäulepilze lassen sich mittels ITS-RFLP's unterscheiden (Abb. 5).

Derzeit wird die Technik zur Identifizierung bzw. zum beabsichtigten Aufbau einer Datenbank für Fäulnispilze verwendet (ZAREMSKI et al. 1999, ADAIR et al. 2002, DIEHL et al. 2004, RABERG et al. 2004). Die Methode ist zwar mit je einmal PCR, Restriktion und Elektrophorese schnell und relativ billig. Hinsichtlich des Aufbaus einer Datenbank von artspezifischen Fragmentlängen ist jedoch unwahrscheinlich, daß für alle in Gebäuden vorkommenden Pilzarten spezifische Muster gefunden werden, da der ITS-Bereich nur 600–700 bp lang ist (siehe Abb. 6), so daß der nötigen Bandbreite unterschiedlicher Muster Grenzen gesetzt sind. Weiterhin ist die Zahl der möglichen Pilz-Arten in einem Gebäude vermutlich größer als die jemals mögliche Fragmentmuster-Datenbank, so daß ein bisher noch nicht untersuchter Pilz durch sein zufällig gleiches Muster ein falsches Ergebnis liefert.

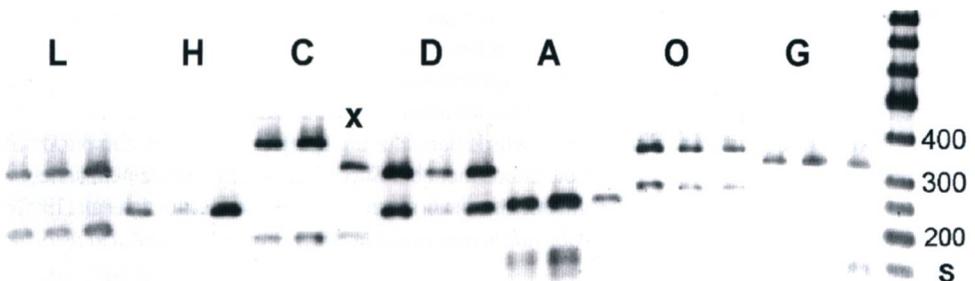


Abb. 5: RFLP-Muster von *Serpula lacrymans* (L), *S. himantioides* (H), *Coniophora puteana* (C), *Donkio-
poria expansa* (Desm.) Kotl. & Pouzar (D), *Antrodia vaillantii* (DC.: Fr.) Ryv. (A), *Oligoporus placenta* (O)
und *Gloeophyllum sepiarium* (Wulfen: Fr.) P. Karsten (G) nach Schneiden mit der Restriktions-Endonuklease
TaqI. Kultur x später durch Sequenzierung als *C. olivacea* (Fr.) P. Karsten nachgewiesen. S = Längen-
standard (nach SCHMIDT & MORETH 1999).

	ITS 1-Primer	70
<i>Serpula lacrymans</i>	tccgtaggtg aacctgcgga AGGATCATTA TCGA-TTC-- AACGARGTGC TTGTGARGTT GT-GCTGGCC	
<i>Serpula himantioides</i>C----- ..G..... ..C..... ..T..... ..T..... ..C.....	
<i>Donkioporia expansa</i>G..TTG ..-.G.- ..T.....	
	ITS I-Bereich	160
L	TCTCTC--GA GGCATGTGCA CGCTTT---- AT-GGG-TCT TCACRCRCCC ACACCTGTGA ACCCACTGTA --GGTCTTTC GGGACCTATG	
H-G ..C----- ..T..... ..T..... ..T..... ..T.....	
D	..-.CG.. ..CGGCTC ..TCCRC.. A..... ..CC..... ..G..... ..T..... ..CT.....	
	ITS I-Bereich	250
L	TCTT-C-TCA T---AAC--- -ACAC--T-- GT-ATG--TC TAGATG--T -C----ATTA TGA-----T- T-A-TCGT-C TGCTTCTCT	
HC..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T.....	
D	..AGA.G.GG .GCG.G.CTT T...GG.TC ..G.A.CG.. ..-.CC. G.GTTT.... C-.AACAC.A .T.AA-. .AT .AGAA.G--.	
	ITS I-Bereich	340
L	GTGGAGTTGG GCTGATARGA TAAAC-A-- ATATCAACT <u>TTCAGCACCG</u> <u>GATCTCTGG</u> <u>CTCTCGCATC</u> <u>GATGARGAC</u> <u>GCAGCGAAT</u>	
HC..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T.....	
D-..... -.....-C.. ..CGC.TTT ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..A.....	
	ITS I-Bereich	430
L	<u>GCGATATGTA</u> <u>ATGTAATTG</u> <u>CAGATTTTCA</u> <u>GTGAATCATC</u> <u>GAACTTTTGA</u> <u>ACGCACCTTG</u> <u>CGCTCCTTGG</u> <u>TATCCGAGG</u> <u>AGCATGCCTG</u>	
HC..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T.....	
DA... ..T..... ..A..... ..T..... ..T..... ..T..... ..C.....	
	ITS I-Bereich	520
L	<u>TTTGAGTGTG</u> <u>ATTAARTTCT</u> <u>CARCCCCATC</u> <u>AATTTGTTTT</u> <u>GAT--T-GTG</u> <u>GGCT-T-GGA</u> <u>TTGTGGGGGC</u> <u>TTGCTGGTGG</u> <u>ACTCTTGTTT</u>	
HC..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T.....	
DG..... ..A..... ..CC.T... T-.A.A... ..A--- ..A--- ..T..... ..T..... ..TG..	
	ITS II-Bereich	610
L	-ATC----- G---GCTCCT CTGAAATGTA TTAGCRAAGG TTGATGTGCG AA-CCAG--T -G--TCTCGG TGTGATAAT- GATCMT-CGT	
H	CG..... ..C..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T.....	
D	GG-.TTTATA .TCG..... .T.....C..... ..C..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..A..C	
	ITS II-Bereich	700
L	-GCTGAC-G TGCAGTGTTT CTGTGC---- TTAC-A---G <u>TCG-TTGTGG</u> <u>CAGACARCA</u> <u>TTT-TTGAC</u> <u>CTTGTACCTC</u> <u>AAATCAGGTA</u>	
H	..C..... ..C..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T.....	
D	C.-.-. <u>ACCG TGAGCGTTT</u> <u>TG-GCGAGC</u> ..-.T.ACC. ..TC..A... ..T..... ..AC..... ..A.C..... ..C-	
	ITS 4-Primer	
L	GG-ATTACCC GCTGAACCTTA Agcatatcaa taagcgagag a	
HC..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T.....	
D	..G.C..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T.....	

Abb. 6: Beispiel von ITS-Sequenzen (*Serpula lacrymans*, *S. himantioides*, *Donkioporia expansa*) zum Auffinden pilzspezifischer Primer. Einfach unterstrichen: 5,8S rDNS; doppelt unterstrichen: spezifische Primer.

Pilz-spezifische PCR (PSP)

Auf Grund der Artspezifität des ITS-Bereiches bei den untersuchten Hausfäulepilzen war naheliegend, zunächst die Basenfolge des ITS aufzuklären (Sequenzieren) und diese Sequenzen zum Auffinden von kurzen DNS-Folgen im ITS zu verwenden, die ausschließlich bei jeweils einer einzigen Pilzart vorkommen. Diese DNS-Folgen könnten dann als Pilzart-spezifische Primer verwendet werden (Abb. 4). Die folgende PCR würde dann nur ein Produkt ergeben, wenn die DNS der Probe zu dem spezifischen Primer paßt, jedoch nicht bei Zugehörigkeit zu irgendeinem anderen Pilz. Die zunächst überzeugende Idee geht auf GARBELLOTO et al. (1996) und SCHULZE et al. (1997) zurück, die spezifische Primer für *Heterobasidion annosum* (Fr.: Fr.) Bref. und *Armillaria ostoyae* (Romagn.) Herink entwickelten.

Für Hausfäulepilze wurden bei sieben Arten aus dem ITS II-Bereich spezifische Primer abgelesen und nach Prüfung auf mögliche Kreuzreaktion mit den anderen sechs Pilzen für die PSP ausgewählt (MORETH & SCHMIDT 2000, SCHMIDT & MORETH 2000). Die Abbildung 6 erläutert die Vorgehensweise zum Auffinden spezifischer Primer. Die Punkte in Abb. 6 bedeuten Basen-Gleichheit mit der darüber stehenden Sequenz, Pausen sind durch einen Gedankenstrich markiert. Innerhalb

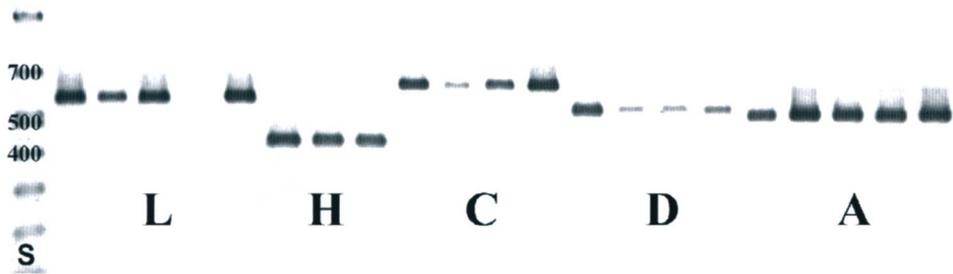


Abb. 7: Positive PCR-Reaktion der pilzspezifischen Primer L (*Serpula lacrymans*), H (*S. himantioides*), C (*Coniophora puteana*), D (*Donkioporia expansa*) und A (*Antrodia vaillantii*) mit ihren dazugehörigen Pilzstämmen (SCHMIDT 2000).

des ITS II-Bereiches wurde dann an Stellen mit größtmöglichen Unterschieden zwischen den Pilzen eine Folge von 20 Basen als jeweils spezifischer Primer gewählt.

Für die pilzspezifische PCR werden die spezifischen Primer jeweils mit dem Universalprimer ITS 1 kombiniert. Jeder Pilz liefert dann ausschließlich mit seinem spezifischen Primer ein PCR-Produkt, mit anderen Primern nicht. Wenn ein unbekannter Pilz mit einem der Primer reagiert, ist er, mit der unten genannten Einschränkung, als Art identifiziert. Die Abbildung 7 zeigt ein Gel zur PSP-Technik. Zur Veranschaulichung sind jedoch nur die PCR-Produkte nach erfolgter Reaktion zwischen spezifischem Primer und der zugehörigen Pilz-DNS aufgetragen und nicht die vielen Leerstellen auf dem Gel der nicht-erhaltenen PCR-Produkte mit den jeweils anderen Pilzen.

Die PSP-Technik ist schnell und theoretisch ein geeignetes molekulares Werkzeug zur Pilzbestimmung. Für eine Anwendung muß der ITS-Bereich nicht mit Enzymen geschnitten (RFLP's) werden. Wegen der spezifischen Primer sind Vorsichtsmaßnahmen bei der Probenentnahme hinsichtlich Schimmelpilzverunreinigungen etc. weniger streng, und vor der PCR müssen keine Reinkulturen hergestellt werden. Die PSP wird in Deutschland bereits zur kommerziellen Diagnostik angeboten. Vergleichbar mit den Nachteilen der ITS-FRLP's besteht die wesentliche Einschränkung zur Nutzung der PSP in der Praxis vor allem darin, daß bisher über 65 verschiedene Gebäudepilze nachgewiesen sind (HUCKFELDT & SCHMIDT 2006), jedoch nur für etwa 10 Pilze spezifische Primer bekannt sind. Für die diesbezüglich noch nicht untersuchten Pilze dürfte eine Primerfindung schwierig sein, da der ITS II-Bereich nur etwa 250 bp umfaßt (Abb. 6) Auch in methodischer Hinsicht wird der PCR-Aufwand groß, da für jeden in Frage kommenden Pilz ein eigener PCR-Primer verwendet werden muß. Ferner ist nicht auszuschließen, daß ein Fremdpilz durch zufällige Basen-Ähnlichkeit im Primerbereich eine falsche Diagnose liefert.

Sequenzierung

Die Aufklärung der Basenfolge eines DNS-Abschnittes (Sequenzierung) vermeidet die Nachteile von RFLP's und PSP, da durch die Sequenzierung die gesamte Information einiger Hundert Basen der Ziel-DNS zur Verfügung steht (siehe Abb. 6). Genutzt werden können rDNS-Sequenzen zur Pilzbestimmung durch Vergleich mit Referenzsequenzen und für phylogenetische Untersuchungen über verwandtschaftliche Beziehungen zwischen Pilzen (Stammbäume). Die Sequen-

Tab. 1: Sequenzierte und in Datenbanken deponierte rDNS-Abschnitte von Hausfäulepilzen (ergänzt nach MORETH & SCHMIDT 2005).

	18S	ITS I	5.8S	ITS II	28S	IGS I	5S	IGS II
<i>Serpula lacrymans</i>	3	7			3	3	3	3
	440945 440946	245948 419908	249268 419909	419907 419910	440939 440940 440941			
	437601 536022 536023							
<i>Serpula himantoides</i>	3	12			3	3	3	2
	440947 440948	245949	419911		440942 440943 440944			
	437602 536024 536025							
<i>Meruliporia incrassata</i>		2				2	2	2
		419912	419913					
<i>Leucogyrophana mollusca</i>		6				2	2	2
		419914	419915					
<i>Leucogyrophana pinastri</i>		4				2	2	2
		419916	419917					
<i>Coniophora puteana</i>	1	28			1	2	2	2
	488581	249502	249503	344109 344110	583426			
<i>Coniophora marmorata</i>	2	4			1	2	2	2
	540306	518879	518880		583427			
<i>Coniophora arida</i>	1	3						
	488582	345007	344113					
<i>Coniophora olivacea</i>	1	5						
	488905	344112	345009					
<i>Antrodia vaillantii</i>	1	12			1	1		1
	488583	249266	344140	421007 421008	583429	842965		
<i>Antrodia sinuosa</i>	1	5						
	488906	345011	416068					
<i>Antrodia serialis</i>		8						
		344139	345010					
<i>Antrodia xantha</i>	1	6			1			
	488584	345012	415569		583430			
<i>Oligoporus placenta</i>		8						
		249267	416069					
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	2	5			1			
	560802	420947	420948		583431			
<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	2	5			1			
	540308	344141	420946		583432			
<i>Gloeophyllum trabeum</i>		6						
		420949	420950					
<i>Donkioporia expansa</i>	2	2			1			
	540307	249500	249501		583428			

Sequenz bekannt – in Arbeit – 1 - 28: Anzahl sequenzierter Stämme – 6-stellige Zahl = Datenbank-Nummer

zierung ist derzeit das wichtigste Werkzeug für die Molekulare Systematik und führt zu taxonomischen Umstellungen und Namensänderungen von Pilzen.

Die vielen weltweit ermittelten DNS-Sequenzen werden heutzutage meist in den elektronischen, internationalen Datenbanken deponiert: European Molecular Biology Laboratory, EMBL (www.ebi.ac.uk/embl), American GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank), DNA Data Bank of Japan, DDBJ (www.ddbj.nig.ac.jp). Die drei Banken tauschen ihre Daten untereinander aus, und die Sequenzen stehen jedermann zur Verfügung.

Für Hausfäulepilze wird seit einigen Jahren eine Datensammlung von ITS-Sequenzen aufgebaut (SCHMIDT 2003, SCHMIDT & MORETH 2002, 2003a,b; SCHMIDT et al. 2002a,b; Tab. 1). Unbekannte Pilzproben lassen sich oft bereits durch einen einfachen Sequenzvergleich per Auge identifizieren. Für einen elektronischen Sequenzvergleich sowie zur Berücksichtigung weiterer, in den Datenbanken enthaltener Sequenzen dient das BLAST-Programm (Basic logical alignment search tool), z.B. bei EMBL (www.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi). Die eingegebene Sequenz wird innerhalb weniger Sekunden hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit mit deponierten Sequenzen verglichen, und die Übereinstimmungen werden mit abnehmender Ähnlichkeit aufgelistet.

Mittels ITS-Sequenzvergleich entdeckten HORISAWA et al. (2004) fälschlich als *S. lacrymans* benannte Stämme, HÖGBERG & LAND (2004) bestimmten Porenschwamm- und Hausschwamm-Arten, die aus Fruchtkörpern und von Holz abgeimpft waren, RÄBERG et al. (2004) bestätigten Stämme von *C. puteana*. Die Tabelle 1 listet die bisher von uns sequenzierten rDNS-Abschnitte von Hausfäulepilzen auf. Die Längen der einzelnen Abschnitte sind für *S. lacrymans* in Abb. 3 eingetragen.

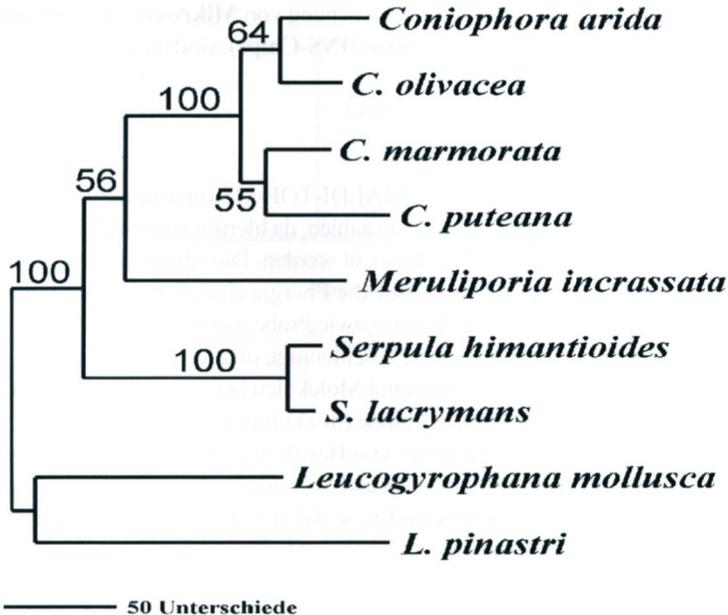


Abb. 8: Stammbaum der Coniophoraceae in Gebäuden auf Grundlage der ITS-Sequenzen (SCHMIDT 2003).

Neben der Pilzbestimmung dienen ITS-Sequenzen zum Aufbau von Stammbäumen. Die Abbildung 8 zeigt ein Beispiel aus dem Bereich der Hausfäulepilze, indem die verschiedenen Arten der Familie der Coniophoraceen nach ihrer Verwandtschaft gruppiert sind.

Die vier Gattungen bilden jeweils voneinander getrennte Äste, und die jeweiligen Arten sind innerhalb ihrer Gattungen gruppiert.

Derartige ITS-Stammbäume können ebenfalls zur Identifizierung verwendet werden, indem die Sequenz des unbekanntes Pilzes mit definierten Sequenzen kombiniert wird. Angenommen, im Beispiel der Abb. 8 ordnet sich eine unbekannte Probe bei *C. puteana* ein, ist sie als dieselbe Pilzart identifiziert. Auf diese Weise haben WHITE et al. (2001) die Gleichheit eines im Freiland (Himalaja) gefundenen Stammes von *S. lacrymans* mit Stämmen aus Gebäuden gezeigt und somit bewiesen, daß der Echte Hausschwamm auch im Freien vorkommt. Bei einer umfangreichen phylogenetischen Analyse gruppierten sich Freiland-Stämme von *S. lacrymans* aus der Tschechoslowakei, Indien, Pakistan und Rußland im Stammbaum zusammen mit Gebäude-Isolaten („Domesticus-Gruppe“), hoben sich aber von Wildstämmen aus Kalifornien („Shastensis-Gruppe“) und von *S. himantioides* ab (KAUSERUD 2004a), woraus ein nordamerikanisches Bindeglied zwischen den anthropogenen Stämmen von *S. lacrymans* und seinem Verwandten im Freiland, *S. himantioides*, vorgeschlagen wurde.

Die **Amplified fragment length polymorphism (AFLP)**-Analyse wurde als relativ neue Technik für eine populationsbiologische Untersuchung von *S. lacrymans* angewendet (KAUSERUD et al. 2004b). Hiernach waren die europäischen Stämme von *S. lacrymans*, die fünf somatischen Inkompatibilitätsgruppen angehören, genetisch sehr homogen. Lediglich fünf von 308 geprüften AFLP-Fragmenten waren polymorph, während *S. himantioides* zu 31 % polymorphe Fragmente aufwies.

Andere jüngere DNS-Techniken, wie die Untersuchung von **Mikrosatelliten (Simple sequence repeats)** und die Herstellung von **DNS-Arrays (DNS-Chips)**, sind unseres Wissens bisher nicht für Hausfäulepilze eingesetzt worden.

MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Zu den molekularen Techniken ist auch die MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) zu zählen, da hiermit Biomoleküle, wie Eiweiße und Nukleinsäuren, aber auch ganze Zellen untersucht werden. Die Moleküle bzw. Zellen (Hyphen) werden in Matrixmoleküle eingebettet, welche die Energie eines Lasers absorbieren. Die Probe wird mit Hilfe der Matrix ionisiert, und Matrix sowie Probe werden in die Gasphase übergeführt. Die Ionen werden dann im elektrischen Feld beschleunigt, und ihre Flugdauer wird in einem Detektor gemessen. Nach Eichung des Gerätes mit Molekülen bekannter Masse wird die Flugdauer der Proben-Ionen in Masse-Ladungsverhältnisse (m/z) umgewandelt. Die Abbildung 9 zeigt die ersten MALDI-TOF-MS-„Fingerabdrücke“ von Basidiomyceten (SCHMIDT & KALLOW 2005). Sogar die nahe verwandten Arten *S. lacrymans* und *S. himantioides* sowie *C. puteana* und *C. marmorata* Desm. ließen sich deutlich unterscheiden, so daß derartige Spektren die Basis für eine Diagnose durch Vergleich werden könnten.

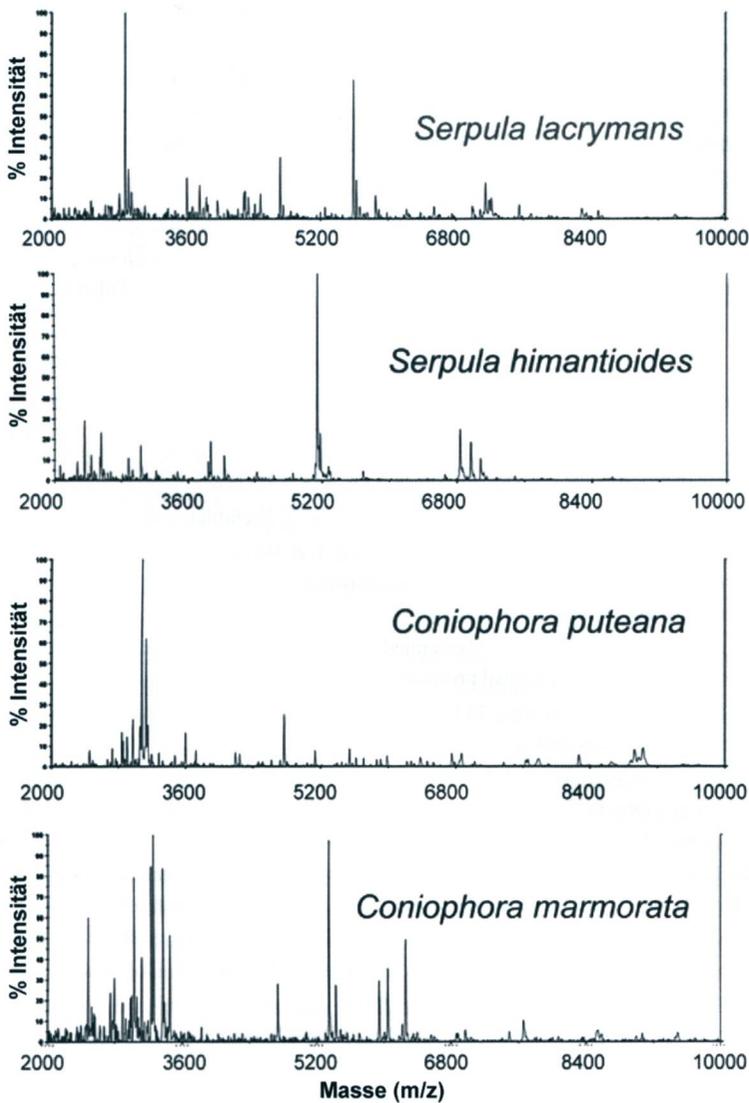


Abb. 9: MALDI-TOF-Massenspektren der Mycelien von jeweils zwei nahe verwandten *Serpula*- und *Coniophora*-Arten (SCHMIDT & KALLOW 2005).

Resümee und Ausblick

Von den bisher etablierten molekularen Techniken zur Bestimmung von Hausfäulepilzen ist die Sequenzierung des rDNA-ITS-Bereiches die sicherste Methode. Sie liefert die exakte Abfolge der vier Basen über eine Länge von 600–750 bp. Damit unterliegt die erhaltene Information nicht den möglichen Fehlerquellen einiger anderer Techniken. Die Methode ist zudem praktikabel, da vor

der Sequenzierung lediglich eine einzige PCR und Gelelektrophorese durchgeführt werden müssen. Zwar sind Sequenzier-Automaten für kleine Labors unerschwinglich, doch gibt es spezialisierte Biotechnologie-Firmen, die einen DNS-Strang von etwa 800 Basen Länge für etwa 10,- Euro sequenzieren. Nachteilig hierbei ist, daß eine kommerzielle Sequenzierung etwa eine Woche dauert. Die ITS-Sequenzierung wird in Deutschland von mindestens einer Firma zur kommerziellen Hausfäulepilz-Diagnose eingesetzt.

In den laufenden Arbeiten wird bei ausgewählten Pilzen der Intergenic spacer untersucht, der bei Basidiomyceten komplett bisher nur von dem Mycorrhizeten *Laccaria bicolor* (Maire) Orton bekannt war (MARTIN et al. 1999). Unser derzeitiger Kenntnis-Stand ist in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Literatur

- ADAIR, S., KIM, S.H. & BREUIL, C. (2002) – A molecular approach for early monitoring of decay basidiomycetes in wood chips. *FEMS Microbiol. Lett.* **211**: 117-122.
- BREITENBACH, J. & KRÄNZLIN, F. (1986) – Pilze der Schweiz. 2. Nichtblätterpilze. Mykologia, Luzern.
- BRESINSKY, A., JAROSCH, M., FISCHER, M., SCHÖNBERGER, I. & WITTMANN-BRESINSKY, B. (1999) – Phylogenetic relationships within *Paxillus* s.l. (Basidiomycetes, Boletales): separation of a southern hemisphere genus. *Plant Biol.* **1**: 327-333.
- CLAUSEN, C.A. & KARTAL, S.N. (2003) – Accelerated detection of brown-rot decay: comparison of soil block test, chemical analysis, mechanical properties, and immunodetection. *Forest Prod. J.* **53**: 90-94.
- DIEHL, S.V., McELROY, T.C. & PREWITT, M.L. (2004) – Development and implementation of a DNA-RFLP database for wood decay and wood associated fungi. *IRG/WP* **10527**: 1-18.
- GARBELOTTO, M., RATCLIFF, A., BRUNS, T.D., COBB, F. W. & OTROSINA, W.J. (1996) – Use of taxon-specific competitive-priming PCR to study host specificity, hybridization, and intergroup gene flow in intersterility groups of *Heterobasidion annosum*. *Phytopathol.* **86**: 543-551.
- GÖLLER, K. & RUDOLPH, D. (2003) – The need for unequivocally defined reference fungi – genomic variation in two strains named as *Coniophora puteana* BAM Ebw. 15. *Holzforschung* **57**: 456-458.
- HÖGBERG, N. & LAND, C.J. (2004) – Identification of *Serpula lacrymans* and other decay fungi in construction timber by sequencing of ribosomal DNA – A practical approach. *Holzforschung* **58**: 199-204.
- HORISAWA, S., SAKUMA, Y., TAKATA, K. & DOI, S. (2004) – Detection of intra- and interspecific variation of the dry rot fungus *Serpula lacrymans* by PCR-RFLP and RAPD analysis. *Japan Wood Res. Soc.* **50**: 427-432.
- HUCKFELDT, T. & SCHMIDT, O. (2006) – Hausfäule- und Bauholzpilze. R. Müller, Köln.
- JAROSCH, M. & BESL, H. (2001) – *Leucogyrophana*, a polyphyletic genus of the order Boletales (Basidiomycetes). *Plant Biol.* **3**: 443-448.
- KAUSERUD, H., HÖGBERG, N., KNUDSEN, H., ELBORNES, S.A. & SCHUMACHER, T. (2004a) – Molecular phylogenetics suggests a North American link between the anthropogenic dry rot fungus *Serpula lacrymans* and its wild relative *S. himantioides*. *Molec. Ecol.* **13**: 3137-3146.
- KAUSERUD, H., SCHMIDT, O., ELFSTRAND, M. & HÖGBERG, N. (2004b) – Extremely low AFLP variation in the European dry rot fungus (*Serpula lacrymans*): implications for self/nonself-recognition. *Mycol. Res.* **108**: 1264-1270.
- MARTIN, F., SELOSSE, M.-A. & LE TACON, F. (1999) – The nuclear rDNA intergenic spacer of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*: structural analysis and allelic polymorphism. *Microbiol.* **145**: 1605-1611.

- MORETH, U. & SCHMIDT, O. (2000) – Identification of indoor rot fungi by taxon-specific priming polymerase chain reaction. *Holzforschung* **54**: 1-8.
- MORETH, U. & SCHMIDT, O. (2005) – Investigations on ribosomal DNA of indoor wood decay fungi for their characterization and identification. *Holzforschung* **59**: 90-93.
- RÄBERG, U., HÖGBERG, N. & LAND, C.J. (2004) – Identification of brown rot fungi on wood in above ground conditions by PCR, T-RFLP and sequencing. *IRG/WP* **10512**: 1-6.
- RYVARDEN, L. & GILBERTSON, R.L. (1993/94) – European polypores. 2 Bände. Fungiflora, Oslo.
- SCHMIDT, O. (2000) – Molecular methods for the characterization and identification of the dry rot fungus *Serpula lacrymans*. *Holzforschung* **54**: 221-228.
- SCHMIDT, O. (2003) – Molekulare und physiologische Charakterisierung von Hausschwamm-Arten. *Z. Mykol.* **69**: 287-298.
- SCHMIDT, O. (2006) – Wood and tree fungi. Biology, damage, protection, and use. Springer, Berlin.
- SCHMIDT, O., GRIMM, K. & MORETH, U. (2002a) – Molecular identity of species and isolates of the *Coniophora* cellar fungi. *Holzforschung* **57**: 563-571.
- SCHMIDT, O., GRIMM, K. & MORETH, U. (2002b) – Molekulare und biologische Charakterisierung von *Gloeophyllum*-Arten in Gebäuden. *Z. Mycol.* **68**: 141-152.
- SCHMIDT, O. & HUCKFELDT, T. (2005) – Gebäudepilze. In *Holzschutz im Hochbau*, Müller, J. (Hrg.), Fraunhofer IRB, 44-72.
- SCHMIDT, O. & KALLOW, W. (2005) – Differentiation of indoor wood decay fungi with MALDI-TOF mass spectrometry. *Holzforschung* **59**: 374-377.
- SCHMIDT, O. & KEBERNIK, U. (1989) – Characterization and identification of the dry rot fungus *Serpula lacrymans* by polyacrylamide gel electrophoresis. *Holzforschung* **43**: 195-198.
- SCHMIDT, O. & MORETH, U. (1998) – Characterization of indoor rot fungi by RAPD analysis. *Holzforschung* **52**: 229-233.
- SCHMIDT, O. & MORETH, U. (1999) – Identification of the dry rot fungus, *Serpula lacrymans*, and the wild merulius, *S. himantoides*, by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *Holzforschung* **53**: 123-128.
- SCHMIDT, O. & MORETH, U. (2000) – Species-specific priming PCR in the rDNA-ITS region as a diagnostic tool for *Serpula lacrymans*. *Mycol. Res.* **104**: 69-72.
- SCHMIDT, O. & MORETH, U. (2002) – Data bank of rDNA-ITS sequences from building rot fungi for their identification. *Wood Sci. Technol.* **36**: 429-433.
- SCHMIDT, O. & MORETH, U. (2003a) – Data bank of rDNA-ITS sequences from building-rot fungi for their identification. *Wood Sci. Technol.* **37**: 161-163.
- SCHMIDT, O. & MORETH, U. (2003b) – Molecular identity of species and isolates of internal pore fungi *Antrodia* spp. and *Oligoporus placenta*. *Holzforschung* **57**: 120-126.
- SCHULZE, S., BAHNWEIG, G., MÖLLER, E.M. & SANDERMANN, H. (1997) – Identification of the genus *Armillaria* by specific amplification of an rDNA-ITS fragment and evaluation of genetic variation within *A. ostoyae* by rDNA-RFLP and RAPD analysis. *Eur. J. Forest. Pathol.* **27**: 225-239.
- STALPERS, J.A. (1978) – Identification of wood-inhabiting Aphylophorales in pure culture. Centraalbureau Schimmelcultures, Baarn.
- THEODORE, M.L., STEVENSON, T.W., JOHNSON, G.C., THORNTON, J.D. & LAWRIE, A.C. (1995) – Comparison of *Serpula lacrymans* isolates using RAPD PCR. *Mycol. Res.* **99**: 447-450.
- TOFT, L. (1993) – Immunological identification in vitro of the dry rot fungus *Serpula lacrymans*. *Mycol. Res.* **97**: 290-292.
- VIGROW, A., BUTTON, D., PALFREYMAN, J.W., KING, B. & HEGARTY, B. (1989) – Molecular studies on isolates of *Serpula lacrymans*. *IRG/WP* **1421**: 1-11.

- VIGROW, A., KING, B. & PALFREYMAN, J.W. (1991) – Studies of *Serpula lacrymans* mycelial antigens by Western blotting techniques. *Mycol. Res.* **95**: 1423-1428.
- WHITE, N.A., DEHAL, P.K., DUNCAN, J.M., WILLIAMS, N.A., GARTLAND, J.S., PALFREYMAN, J.W. & COOKE, D.E.L. (2001) – Molecular analysis of intraspecific variation between building and 'wild' isolates of *Serpula lacrymans* and their relatedness to *S. himantioides*. *Mycol. Res.* **105**: 447-452.
- ZAREMSKI, A., DUCOUSSO, M., PRIN, Y. & FOUQUET, D. (1999) – Molecular characterization of wood-decaying fungi. *Bois Forêts Tropiques* **1999**: 76-81.



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. 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: 2006

Band/Volume: [72_2006](#)

Autor(en)/Author(s): Schmidt Olaf, Moreth Ute

Artikel/Article: [Molekulare Untersuchungen an Hausfäulepilzen 137-152](#)