

Methodik und Anwendung von DNA-Analysen in der Pilz-Taxonomie

Geert Schmidt-Stohn* & Bernhard Oertel

SCHMIDT-STOHN, G. & B. OERTEL (2010): DNA analyses in fungal taxonomy. *Z. Mykol.* 76/1: 101-120

Key words: taxonomy, fungi, DNA, ITS, alignment, molecular-phylogenetic tree, drying, exsiccata, DNA-barcoding, bootstrap values

Abstract: An introduction into the methods, evaluation procedures, applications and future perspectives of DNA analysis in fungal taxonomy is given. The correct drying process of fresh fungi, the appropriate storage of exsiccata, the recovery of DNA from the samples and its multiplication by PCR are described. ITS sequences, the alignment, and the construction and interpretation of molecular phylogenetic trees are explained and discussed. The difference between variable and conservative regions in the DNA, and the criteria for choosing of certain sections of it are commented. The sequencing of DNA is described shortly and indication of availability of sequences in internet databases is given. Alignment procedures are explained and the processing of the data to molecular phylogenetic trees and the different statistical calculating procedures are treated. Some examples for applications leading to surprising and remarkable results with macromycetes are given. Prospective possibilities of barcoding are commented and finally the relation of the classical to a new taxonomy is considered: a fungal taxonomy which includes also DNA data.

Zusammenfassung: Es wird eine Einführung in die Methoden, Auswertungsverfahren, Anwendungen und Zukunfts-Perspektiven von DNA-Analysen in der Pilz-Taxonomie gegeben. Die richtige Trocknung der Frischpilze, die sachgerechte Aufbewahrung der Exsikkate, die Gewinnung der DNA aus den Proben und ihre Vermehrung durch die PCR werden beschrieben. ITS-Sequenzen, das Alignment und der Aufbau sowie die Deutung molekular-phylogenetischer Bäume werden erklärt und besprochen. Der Unterschied zwischen variablen und konservativen Bereichen der DNA und die Kriterien der Auswahl bestimmter Abschnitte für eine Untersuchung werden erläutert. Die Sequenzierung einer DNA wird kurz beschrieben und Hinweise auf die Verfügbarkeit der Sequenzen über Datenbanken im Internet werden gegeben. Das Alignment-Verfahren wird an Beispielen erklärt und die Verrechnung der Daten zu „Molekular-phylogenetischen Bäumen“ einschließlich der dafür eingesetzten statistischen Rechenmethoden werden behandelt. Einige Beispiele für Anwendungen mit überraschenden und bemerkenswerten Ergebnissen bei Makromyceten werden gegeben. In einem Ausblick auf die Zukunft werden die Möglichkeiten des Barcoding erläutert und schließlich Betrachtungen über das Verhältnis der klassischen zu einer neuen, die DNA-Daten einbeziehenden Taxonomie angestellt.

Anschrift der Autoren: Dr. Geert Schmidt-Stohn, Burgstr. 25, D-29553 Bienenbüttel; E-mail: geert.schmidt-stohn@t-online.de; Dr. Bernhard Oertel, INRES, Universität Bonn, Auf dem Hügel 6, D-53121 Bonn

Einleitung

Ein Blick in einschlägige Fachzeitschriften zeigt sofort den hohen Anteil und Stellenwert der molekularbiologischen Analyse von DNA-Sequenzen in der taxonomischen Forschung. Die Methoden wurden zwar meist nicht eigens für die Untersuchung von Pilzen entwickelt, lassen sich aber hier anwenden. So hat auch die Mykologie von den Methoden der DNA-Analyse profitiert. Viele taxonomische Problemfälle, die jahrelang kontrovers diskutiert wurden, sind inzwischen mit Hilfe der DNA-Analyse geklärt worden.

Von dieser Entwicklung ist natürlich auch die klassische, auf morphologischen und anatomischen Merkmalen beruhende Taxonomie mit ihrer binären Nomenklatur betroffen. Kann eine „DNA-Taxonomie“ möglicherweise die bisherige Systematik ergänzen oder gar ersetzen?

In der taxonomischen Forschung leisten traditionsgemäß viele „Nichtprofis“ wichtige Beiträge, Berufsmykologen sind in vielen Fällen auf ihre Mitarbeit angewiesen. Darauf hat unlängst GAMS (2009) in dieser Zeitschrift hingewiesen. Unverzichtbar scheint eine solche Zusammenarbeit gerade bei DNA-Analysen zu sein. Die molekularbiologischen Untersuchungen im Labor können nur Spezialisten in einer dafür ausgerüsteten Forschungseinrichtung durchführen, während das Sammeln von Untersuchungsmaterial, d.h. von gut dokumentierten und richtig konservierten Pilzkollektionen, am besten von Mykologen mit Erfahrung in der Geländearbeit geleistet werden kann.

W. Gams hat in seinem Artikel (loc. cit.) einige dieser und viele weitere Aspekte moderner mykologischer Systematik angesprochen. Für viele Mykologen ist es heute schwierig, die mit molekularbiologischen Methoden erhaltenen Forschungsergebnisse zu verstehen, geschweige denn richtig zu bewerten. Dieser Beitrag will durch die Erläuterung einiger grundlegender Methoden und Zusammenhänge dazu beitragen, beim Leser Interesse zu wecken und Verständnis für die Ergebnisse, Möglichkeiten und Ziele der DNA-Analysen in der Taxonomie zu vermitteln, ihn aber auch in die Lage versetzen, Ergebnisse bewerten und ggf. auch kritisch hinterfragen zu können.

1. Was ist eine Spezies – eine Art?

Beim Ansprechen von Pilzen im Gelände geht einer Artdiagnose meist keine genaue Analyse vieler Merkmale voraus. Bei Arten, die wir kennen, erfassen wir zunächst bestimmte Merkmalskombinationen und zusätzlich bestimmte Einzelmerkmale, die für eine Art charakteristisch sind. Können wir eine Aufsammlung nicht benennen, werden für eine Diagnose zusätzlich mikroskopische Merkmale herangezogen. Alle diese Merkmale beziehen sich auf das Erscheinungsbild – es sind morphologische bzw. anatomische Merkmale. In der Geländearbeit ist nur diese morphologische Definition einer Pilzart praktikabel (morphologisches Artkonzept). Eine Unterscheidung zwischen einer Art, Unterart, Varietät etc. ist so aber kaum möglich, da die Gewichtung der Merkmale sehr schwierig zu objektivieren ist. Es ist deshalb auch müßig darüber zu streiten, ob für die Trennung von zwei Arten 1, 2 oder sogar 3 Merkmale herangezogen werden müssen – es kommt auf die Qualität der Merkmale an.

Präziser lassen sich Arten als Fortpflanzungsgemeinschaft definieren: Individuen einer Art sind untereinander kreuzbar und produzieren dabei fertile Nachkommen (biologisches Artkonzept). Leider ist der Umkehrschluss nicht erlaubt, da nicht kreuzbare Individuen nicht notwendigerweise zu verschiedenen Arten gehören. Die Kreuzungsanalyse wird im Labor meist

mit Einspormycelien durchgeführt. Da viele Pilze (z.B. *Laccaria*-Arten als obligate Mykorrhizapilze) bisher nicht oder nur mit sehr großem Aufwand auf Nährmedien im Labor kultivierbar sind, braucht auf die Kreuzungsanalyse hier nicht ausführlicher eingegangen zu werden.

Die Diskussion weiterer Artkonzepte wie des „Evolutionären“, des „Phylogenetischen Artkonzepts“ u. a. würde den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen.

Können molekularbiologische Untersuchungen einen Nutzen für die Klärung der hier diskutierten Probleme bei der Artdefinition haben und liefern sie möglicherweise objektive Kriterien zur Unterscheidung von Arten? Bevor diese Fragen beantwortet werden können, ist es nötig, die Methode der DNA-Analyse kennenzulernen und zu verstehen.

2. Wie werden Pilze für die Analyse konserviert?

Das gebräuchlichste Verfahren zur Konservierung von Pilzen ist die Trocknung. Die gesammelten Pilze müssen sofort nach der Rückkehr von einer Exkursion mit einem Trockengerät (Dörrex, Stöckli) getrocknet werden. Es bietet sich an, halbierte Pilze zu nehmen, um mit dem verbleibenden Material eine Beschreibung anfertigen und mikroskopische Untersuchungen am Frischpilz machen zu können. Folgende Bedingungen sind für eine sachgemäße Trocknung entscheidend:

1. Nur einwandfreie, nicht verfaulte Fruchtkörper mit Hut, Stiel und Stielbasis verwenden (das Exsikkat ist DNA-Probe und Herbar-Beleg in einem!).
2. Nicht im Kühlschrank aufbewahren, sondern innerhalb 24 Stunden nach dem Sammeln mit der Trocknung beginnen.
3. Zügig in 12-24 Stunden trocknen bei ca. 60 °C (z. B. Dörrex) oder 40 °C mit Umluft (z. B. Stöckli). Nach unserer Erfahrung führen zu langsame Behelfsmethoden ohne Dörngerät („Urlaubstrocknung“) zu Fehlschlägen.
4. Bei dickfleischigen Pilzen Nachtrocknung durch Liegenlassen in einem beheizten, trockenen Zimmer über 1 Woche hinweg.
5. Aufbewahrung der Exsikkate in verschließbaren Polyethylen-Tüten, Papiertüten oder Kartonkonvoluten (jeweils mit ausführlich beschriftetem Herbaretikett).
6. Lagerung in beheizten, trockenen Räumen, nicht im Keller oder auf Dachböden. Empfehlenswert ist auch die Zugabe eines Trocknungsmittels (Silicagel).
7. Als Prävention gegen Schädlingsbefall ggf. 1 Woche bei -18 °C aufbewahren; Exsikkate dazu vorher in dicht schließender Kunststofftüte unterbringen und darin nach dem Herausnehmen aus dem Kühlgerät noch einige Tage ungeöffnet belassen (Vermeidung von Kondenswasser an den Proben).

Diese Bedingungen müssen eingehalten werden, da sonst die Gefahr besteht, dass eine Probe mit hohen Kosten analysiert wird und dann keine brauchbaren Ergebnisse liefert. Nur aus richtig getrockneten und aufbewahrten Proben kann noch viele Jahre später die DNA gewonnen und für die Analyse verwendet werden.

3. Wie wird die DNA aus dem Pilzmaterial gewonnen?

Für das Herauslösen der DNA aus den Zellen (Extraktion) wird das trockene Material sehr fein zerkleinert und dann mit einem bestimmten Volumen einer Extraktionsflüssigkeit versetzt. Diese Lösung ist auf einen definierten pH-Wert eingestellt und enthält Detergenzien, die die

Zellmembranen auflösen, die Struktur der Proteine zerstören und so die DNA aus den Zellen freisetzen. Der Zellextrakt wird noch gereinigt, bis eine reine DNA-Lösung vorliegt. Diese Lösung oder die getrocknete DNA kann tiefgefroren aufbewahrt und später für weitere Untersuchungen eingesetzt werden.

4. Wie ist die DNA aufgebaut?

Die DNA (**D**eoxyribo**N**ucleic **A**cid) ist die Erbsubstanz einer Zelle und ist wie eine Doppelschraube (Helix) aufgebaut, deren durchlaufende Stränge aus sich abwechselnden Zuckermolekülen (Z) und Phosphatresten (P) bestehen. Jedes Zuckermolekül trägt als Seitenkette eine stickstoffhaltige Base. Ein Molekül aus jeweils einer Base, einem Zucker und einem

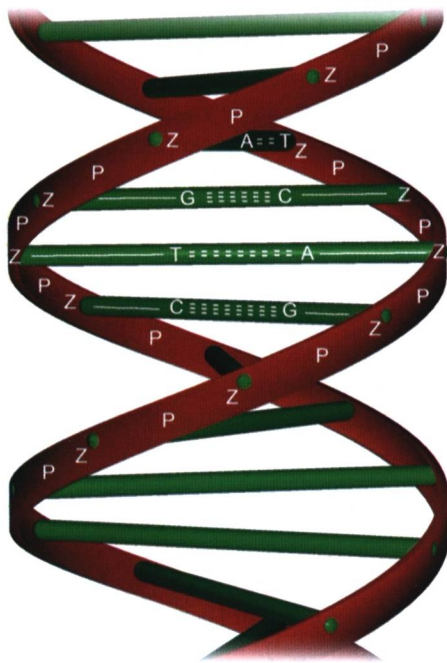


Abb. 1: Schema der DNA-Doppelhelix, A = Adenin, T = Thymin, G = Guanin, C = Cytosin, Z = Zucker Desoxyribose, P = Phosphatrest, - - - - - = Wasserstoffbrücke.

Phosphatrest wird Nucleotid genannt. Es gibt in der DNA vier verschiedene Basen: Guanin und Cytosin sowie Adenin und Thymin, also auch vier verschiedene DNA-Nucleotide. Die Basen schließen sich jeweils nur in den Kombinationen G—C und A—T über chemische Bindungen (Wasserstoffbrücken) zusammen und verbinden so die beiden Stränge zur DNA-Doppelhelix (s. Abb. 1).

Bei den meisten Lebewesen liegt die DNA in Form mehrerer getrennter Doppelstränge vor, die während einer Zellteilung als Chromosomen mikroskopisch sichtbar werden. Im «Human Genom Project» wurde die gesamte Abfolge der Basen – die Basensequenz – einer menschlichen DNA bestimmt. Danach umfasst das nucleäre Genom des Menschen, d.h. die in jedem Zellkern enthaltene DNA, ca. 3 Milliarden Nucleotid-Paare, die ein Molekül von ca. 1,2 m Länge ergeben würden (aufgeteilt auf 46 Chromosomen). Die Genome von Pilzen sind sehr ähnlich wie die menschliche DNA aufgebaut, die Anzahl und Länge der Chromosomen können aber sehr verschieden sein.

5. Was versteht man unter variablen und konservativen Bereichen der DNA?

Die nach dem NCBI (National Center for Biotechnology Information, Stand 31.03.2009) bisher einzigen vollständig erfassten *Agaricales*-Arten sind die Genome von *Coprinopsis cinerea* (= *Coprinus cinereus*) mit ca. 37,5 und *Laccaria bicolor* mit 65 Millionen Basenpaaren (1 Million Basenpaare = 1 Megabasenpaar = MBp). Für taxonomische Fragestellungen sind jedoch Untersuchungen der gesamten DNA zu zeitaufwändig und kostspielig. Es müssen deshalb Teilabschnitte der DNA gefunden werden, die besonders geeignet sind. Beim Menschen stellt nur

etwa 1 % der DNA Erbanlagen (Gene) in dem Sinne dar, dass sie den Aufbau und die Funktionen des Organismus steuern. Deren Basen-Sequenzen sind bei Tieren und beim Menschen meist recht konservativ, haben sich also auch in langen erdgeschichtlichen Zeiträumen nur relativ wenig verändert. Die restlichen 99 % sind quasi Gen-leer, ihre Funktion ist heute noch weitgehend unbekannt. Diese Regionen sind in ihrer Basen-Sequenz meist hoch variabel. Ähnlich, wenn auch nicht ganz so extrem, dürften die Verhältnisse bei Pilzen sein.

Diese Befunde sind bei näherer Betrachtung nicht verwunderlich. Mutationen sind Änderungen der Basensequenz, die durch Fehler bei der Vervielfältigung der DNA während der Zellteilung, durch Einwirkung von radioaktiven Strahlen, durch mutagene Chemikalien etc. ausgelöst werden können. Finden solche Mutationen direkt innerhalb eines Gens statt, hat das meist negative Auswirkungen: Wenn eine wichtige Funktion davon betroffen ist, stirbt die Zelle oft ab. Eine solche Mutation wird dadurch nicht an die Nachkommen weitergegeben und verschwindet sofort wieder. Nicht so in den Gen-leeren DNA-Abschnitten. Da Mutationen hier keine Störung einer Funktion nach sich ziehen, sterben die betroffenen Zellen nicht ab, die Änderungen der Basensequenz werden an die Nachkommen weitergegeben und können so erhalten bleiben.

6. Welche Abschnitte der DNA werden untersucht?

Welche Abschnitte auf der DNA man untersucht, hängt davon ab, auf welcher taxonomischen Ebene man arbeitet. Will man Taxa höherer Rangordnung wie Familien, Ordnungen, Klassen etc. vergleichen, dann wählt man eher konservative Regionen der DNA (s. 5.), die aber noch eine gewisse Variation besitzen müssen. Auf der Ebene der Unterscheidung von Arten und Gattungen hingegen wählt man hoch variable Abschnitte. Würde man hier konservative DNA-Bereiche untersuchen, fände man kaum Unterschiede, da die Zeiträume seit der Entstehung von zwei Arten aus einem gemeinsamen Vorfahren zu kurz sind, um in den konservativen Bereichen Variationen entstehen zu lassen. Würde man die hochvariablen Bereiche für die Analyse übergeordneter Taxa verwenden, dann käme man kaum zu den gewünschten Ergebnissen, da die Sequenzen zu verschieden für die Alinierung sind (s. 9.) und nicht mehr verrechnet werden können.

Für die Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der *Agaricales* wurden von MATHENY et al. (2006) die Sequenzen der Gene *rpb1*, *rpb1*-intron2, *rpb2* und die 18S-, 5,8S- und 28S-Regionen der ribosomalen DNA (rDNA, s.u.) verwendet. *rpb1* und *rpb2* sind Proteincodierende Sequenzen, die für die Bildung der größten (*rpb1*) und der zweitgrößten (*rpb2*) Untereinheit des Enzyms RNA-Polymerase II verantwortlich sind. Diese DNA-Sequenzen sind eher konservativ und auf keinen Fall hoch-variabel.

Für die Klassifizierung innerhalb der Gattung *Cortinarius* haben GARNICA et al. (2005) die Sequenzen der ITS1-5,8S-ITS2-rDNA und der D1-D2-Region der 28S-rDNA (LSU; large subunit der ribosomalen DNA) untersucht. Die Funktion der rDNA ist die Herstellung von „ribosomaler Ribonucleinsäure“ (rRNA). RNAs sind ähnlich aufgebaut wie die DNA, die als Matrize für ihre Synthese dient. rRNA-Moleküle sind Bestandteil der Ribosomen, die für die Eiweißsynthese in der Zelle sorgen. rRNA wird in großen Mengen benötigt, deshalb gibt es bis zu 1000 Kopien der rDNA im Zellkern – ein gewisser Vorteil für DNA-Analysen der ITS-Region und der anderen DNA-Abschnitte der rDNA. Die meisten anderen Gene sind nur in 2 Kopien in einem diploiden Zellkern enthalten und deshalb teilweise schwerer zu untersuchen.



Abb. 2: Aufbau der ribosomalen DNA (vereinfachtes Schema), SSU = Small SubUnit, LSU = Large SubUnit, ITS = Internal Transcribed Spacer.

Abb. 2 zeigt einen schematisierten Ausschnitt aus der rDNA, es ist hier nur einer der beiden Stränge der Doppelhelix und auch nur eine einzige Kopie der sich vielfach wiederholenden Sequenz dargestellt. Mit 18S, 5,8S und 28S werden diejenigen Abschnitte bezeichnet, die für die Herstellung von 3 unterschiedlich großen rRNAs zuständig sind. Sie enthalten sowohl variable als auch konservative Bereiche.

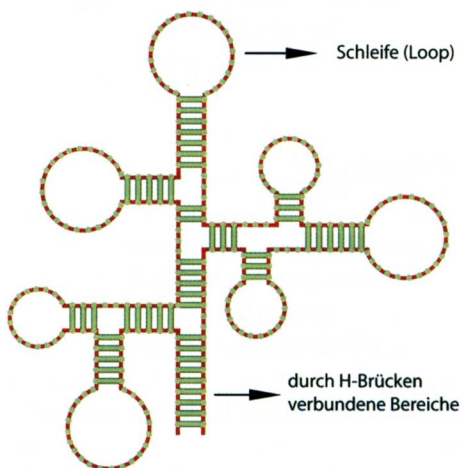


Abb. 3: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur einer rRNA mit doppelsträngigen und einsträngigen Bereichen. H-Brücken = Wasserstoffbrücken. (vgl. Kap. 6).

Wie kommt das zustande? In Abb. 3 ist eine rRNA schematisch als Sekundärstruktur dargestellt (unter der Primärstruktur versteht man den nicht gefalteten, einsträngigen RNA-Faden). In den doppelsträngigen Bereichen dieser Struktur sind die Basen der benachbarten Stränge durch komplementäre Basenpaarung über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden. Dadurch bildet sich die Raumstruktur der rRNA heraus, die für ihre ordnungsgemäße Funktion wichtig ist. Treten hier durch Mutationen der rDNA andere Basen auf, dann kann die Basenpaarung gestört sein und die Struktur der rRNA kann sich ändern. Dadurch wiederum kann es bei den Ribosomen zu Funktionsstörungen kommen. Solche Mutationen eliminieren sich also selbst, d.h. diese Bereiche sind konservativ. Anders in den Schleifen (loops): Änderungen haben hier nur einen geringen Einfluss auf die Raumstruktur und die Funktionstüchtigkeit der

rRNA. Hier können sich Mutationen in Form einer Variation der Basensequenz erhalten, diese Bereiche sind also variabel. Die Regionen D1-D4 innerhalb der LSU auf der rDNA entsprechen bestimmten Schleifen der rRNA.

Die hoch variablen ITS-Sequenzen (Internal Transcribed Spacer) der rDNA (vgl. Abb. 2) sind quasi nur Abstandhalter zwischen den 3 Genen 18S, 5,8S und 28S und haben keine bekannte nachhaltige Funktion für die Zelle, so dass Mutationen erhalten bleiben. Es entsteht hier eine große genetische Variation, die man für taxonomische Zwecke auf Artebene ausnutzt. Darüber hinaus werden heute zusätzlich Protein-codierende DNA-Abschnitte verwendet, wie z. B. β -Tubulin, Elongation factor 1 α und andere. Die Gene der Cytochrom-Oxidase (COX) codieren Proteine, die bei allen Organismen mit Zellkern eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel der Mitochondrien spielen. Ihre DNA ist mitochondrial, recht variabel und erlaubt die Differenzierung nah verwandter Taxa.

7. Wie gewinnt man ausreichende Mengen DNA für die Analyse?

Man benötigt für die Sequenzanalyse größere Mengen DNA – viel mehr, als in einem DNA-Extrakt (s. 3.) enthalten ist. Hier war die Technik der DNA-Vermehrung (Amplifikation) durch die **Polymerase Chain Reaction (PCR)** ein Meilenstein der Molekulargenetik. Kary Banks Mullis erhielt dafür 1993 den Nobelpreis. Mit dieser Technik können kleinste Mengen DNA praktisch beliebig im Reagenzglas vervielfältigt werden. Ohne die PCR wäre die Verwendung des «Genetischen Fingerabdrucks» in der Verbrechensbekämpfung zur Ermittlung von Tätern anhand kleinster DNA-Spuren und auch die Analyse von DNA-Sequenzen in der Taxonomie nicht möglich. Für die Vervielfältigung der DNA im Reagenzglas wird das Enzym DNA-Polymerase eingesetzt, das auch in lebenden Zellen vor jeder Zellteilung die DNA verdoppelt.

Die Methode ist in Abb. 4 schematisch dargestellt. In einem ersten Schritt wird die zu vermehrende doppelsträngige DNA denaturiert, d.h. durch Hitzebehandlung bei ca. 95 °C in ihre beiden Einzelstränge zerlegt. Um der Polymerase einen Ansatzpunkt zu bieten, müssen nun kleine Bereiche der Einzelstrang-DNA wieder doppelsträngig gemacht werden. Als Startermolekül (primer) dient kurze, etwa 20 Basen lange Einzelstrang-DNA, die synthetisch her-

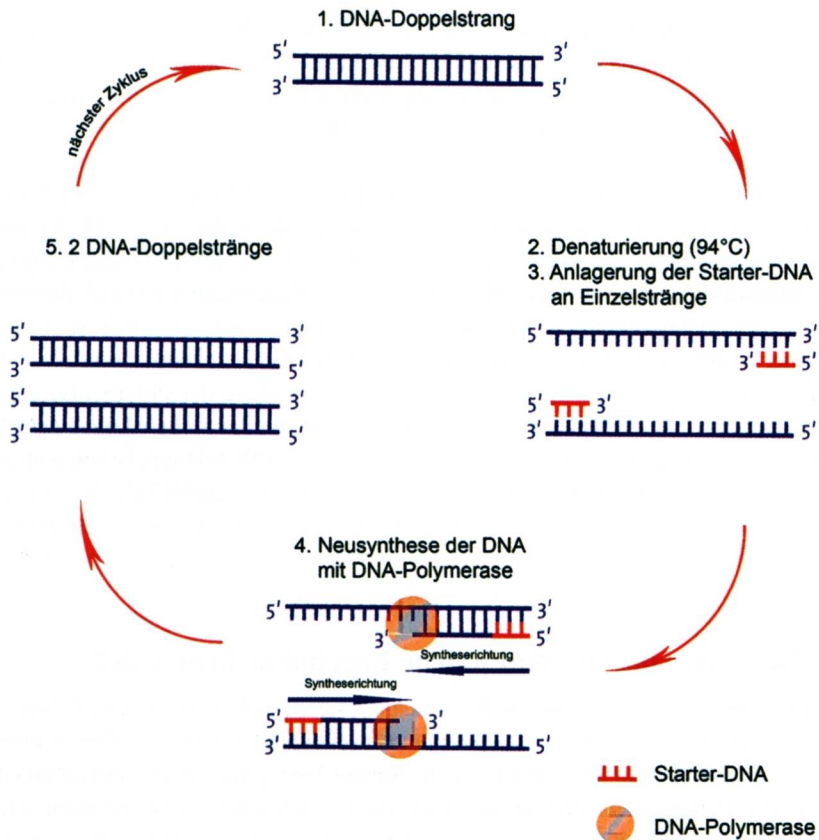


Abb. 4: Schema der Polymerase-Kettenreaktion zur Vermehrung spezieller DNA-Abschnitte (vgl. Kap.7).

gestellt wird und die sich bei 50-55 °C in bestimmten Bereichen an die zu vermehrende DNA anlagert. Die Anlagerung läuft nach dem Prinzip der „komplementären Basenpaarung“ ab, bei der sich nur die Basen A und T sowie G und C paaren können. Die Starter-DNA findet ihre Anlagerungsstelle dort an der Proben-DNA, wo diese genau dieselbe Basensequenz hat. Für eine spezifische Anlagerung sollte die Starter-DNA eine Länge von ca. 20 Nukleotiden haben. Der Ort der Anlagerung hängt also davon ab, welche Basensequenz man für die Starter-DNA gewählt hat. Will man die ITS-Sequenzen vermehren, braucht man eine Starter-DNA, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft dieser Sequenzen an die Einzelstränge der Proben-DNA anlagert. Diese flankierenden Bereiche müssen natürlich konservativ sein, damit die Starter-DNA dort auch sicher binden kann.

Für die Synthese eines ca. 500-600 Basen umfassenden ITS-Abschnitts benötigt die DNA-Polymerase 1-2 Minuten. Das Endprodukt der Synthese wird Amplifikat oder Amplikon genannt. Kettenreaktion wird die Technik genannt, weil gleich im Anschluss an diesen ersten Vermehrungsschritt das Reaktionsgemisch wieder auf 95 °C erhitzt wird, wobei sich die eben neu gebildeten Doppelstränge wieder zu Einzelsträngen zerlegen; nach erneuter Abkühlung auf 50-55 °C lagert sich wieder die Starter-DNA an und ein neuer Syntheszyklus kann beginnen. Nach 25-40 solcher Zyklen ist der ITS-Abschnitt einer zu untersuchenden Proben-DNA aus geringsten Ausgangsmengen mehr als millionenfach vermehrt worden. Ein großer Fortschritt war die Entdeckung hitzestabiler Polymerase-Enzyme in Mikroorganismen aus heißen Quellen. Seitdem muss nur einmal am Anfang der Kettenreaktion das kostspielige Enzym zugegeben werden. Der ganze Prozess einer DNA-Vermehrung läuft für viele Proben gleichzeitig in einem sog. Thermocycler automatisch ab und dauert 1-2 Stunden.

Dem aufmerksamen Leser wird auffallen, dass bei dieser Methode die DNA-Polymerase zu Beginn zwar einen definierten Startpunkt (die Ansatzstelle der Starter-DNA) auf jedem der beiden Einzelstränge, aber keinen Endpunkt der Synthese vorfindet. Dadurch entstehen im ersten Syntheszyklus überlange Amplifikate, die auch Sequenzen außerhalb des eigentlich gewünschten Bereiches enthalten. Aber schon im 2. Zyklus relativiert sich dieses Problem, da der 2. Primer direkt am anderen Ende des zu amplifizierenden Bereiches ansetzt; das im ersten Zyklus überschüssige Stück wird jetzt wegen der Laufrichtung der Polymerase nicht mehr vermehrt. Ab dem 2. Zyklus entstehen dann also Amplifikate, die in ihrer Länge dem Abstand der beiden Primer-Bindungsstellen auf dem ursprünglichen DNA-Doppelstrang entsprechen. In den folgenden Zyklen bilden sich in exponentieller Weise Amplifikate der gewünschten Länge. Die überlangen Amplifikate, die während des gesamten Prozesses weiterhin in geringer Menge gebildet werden, spielen am Ende keine Rolle, weil die Amplifikate mit der richtigen Länge in einem enormen Überschuss vorliegen.

8. Was ist Sequenzierung und welche Ergebnisse bringt sie?

Sequenzieren heißt, die DNA Base für Base zu analysieren und so die Basenabfolge – die Sequenz – eines DNA-Abschnittes zu bestimmen. Entscheidend war hier die Entwicklung einer Methode durch Sanger und Mitarbeiter, für die Sanger 1980 (zusammen mit Gilbert) den Nobelpreis erhielt. Dieses Verfahren hier im Einzelnen zu beschreiben und zu erklären, würde den Rahmen des Artikels sprengen. Weiterentwicklungen haben dazu geführt, dass eine Sequenzierung heute automatisiert ablaufen kann. Vom Analysengerät wird die Basensequenz eines DNA-Abschnittes direkt auf einem Computer gespeichert. Die Sequenzen werden über das In-

ternet in speziellen Datenbanken hinterlegt, um sie allgemein verfügbar zu machen. Für Mykologen wichtige Datenbanken sind die «GenBank» des NCBI (National Center for Biotechnology Information) und «UNITE, A molecular database for the identification of fungi», deren Internetadressen mit den genannten Datenbanknamen leicht mit einer Suchmaschine ermittelt werden können. UNITE ist eine Datenbank, die auf Ektomykorrhiza bildende Asco- und Basidiomyceten spezialisiert ist. Neue DNA-Sequenzen sollten von den Autoren spätestens dann ins Internet gestellt werden, wenn die Daten für eine Publikation verwendet wurden. Abb. 5 zeigt zwei Sequenzen von *Cortinarius rapaceotomentosus* Delaporte & Eyssart., wenn man diesen Pilznamen bei UNITE aufruft.

Cortinarius rapaceotomentosus Delaporte & Eyssart.

* there may be multiple determinations for specimen, please click UNITE accession number for more info!

UDB002026 | GenBank: [DQ563406](#) | TF629

Submitted by [Tobias G. Frøslev](#)

```
GGGGGGGGGGGACCTGCGGAAGGATCATTATTGAAATAAACCTGATAAGTTGTTGCTGCTCTAGAGAGCATGTGCACGCTTGTGCAT
CTTTATATCTTCACCTGTGCACCTTTTGTAGACCTGAGTATCTTTTGAATGCTTTATTTANNAGCATTGAGGATTGAGGATTGACTTTG
TTGTCTCTCCTTGATTTCTCAGGCTCTATGTTTCTCATATACCCTAATGTATGCTATAGAAATGATAAATTAATGGGCCTTTGTGCCTA
TAAACCTATAACAATTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGTAATGAAATGTCAGAA
TTCAGTGAATCATGAATCTTTGAACGACCTTGGCTCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATTAATATCAACC
TCTTTTGGTTGGATGTGGTTTGTGCTCTCTGAGATCAGCTCTCTTAAATGCAATTAGCGGACAAATTTTGCACCACTGTTTATTGG
TGTGATAAATTACTACGCCATTGACTGTGAAGCAAGGTTCTGCTTCTAATAGTCCATTGACTGGACAAATTTCTTTTATTAATGTGG
CCTCAA
```

DNA source:	Fungus: Fruitbody
Specimen id:	G.Eyssartier 99715
Deposited in:	PC, Muséum National d'Histoire Naturelle Herbar Cryptogamique
Country:	France
Habitat description:	Quercus
Collected by/date:	M. Cerutti, 1997-10-13
Determined by:	André Bidaud

UDB002027 | GenBank: [DQ563408](#) | TF338

Submitted by [Tobias G. Frøslev](#)

```
AGGATCATTATTGAAATAAACCTGATAAGTTGTTGCTGGCTCTAGAGAGCATGTGCACGCTTGTGCATCTTTATATCTTCACCTGTGCA
CCITTTGTAGACCTGAGTATCTTTGAAATGCTTTATTTAGCATTGAGGATTGAGGATTGACTTTGTTGCTCTCCTTGATTTCTCAGG
TCTATGTTTCTTCATATACCCTAATGTATGCTATAGAAATGATAAATTAATGGGCCTTTGTGCCTATAAACCTATAACAATTTTCAGCAAC
GGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGTAATGTAATGAAATGTCAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGA
ACGACCTTGGCTCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCTCTTGGTATTGAGTGTCAATTAATATCAACCTCTTTTGGTTGGATGTGGGTTTG
CTGGTCTCTGAGATCAGCTCTCTTAAATGCAATTAGCGGACAAATTTGCCAAGTATTGTTGATGATAAATATCTACGCCAATTTGA
CTGTGAAGCAAGGTTCTGCTCTAATAGTCCATTGACTTGGACAAATTTCTTTTATTAATGTGGCCTCAAATCAGG
```

DNA source:	Fungus: Fruitbody
Specimen id:	TSJ2004-040
Deposited in:	C, University of Copenhagen
Country:	Sweden
Habitat description:	Corylus on very calcareous soil
Collected by/date:	Tobias G. Frøslev, T.S. Jeppesen, 2000-09-23
Determined by:	Tobias G. Frøslev, T.S. Jeppesen

Abb. 5: Screenshot der UNITE-Website bei Aufruf von *Cortinarius rapaceotomentosus* aus der Datenbank; rot markiert: Nicht übereinstimmende Teile der beiden Rohsequenzen.

9. Was ist ein Alignment?

Gibt es für eine Art Sequenzen verschiedener Kollektionen, dann erscheinen diese bei UNITE untereinander. Dabei fällt auf, dass man z. T. auf den ersten Blick kaum eine Übereinstimmung sieht, obwohl man doch erwarten würde, dass sich die Sequenzen gleichen oder stark ähneln sollten. Ein direkter Vergleich dieser «Rohsequenzen» auf Übereinstimmung bzw. Unterschiede ist also visuell nicht möglich. Vor allem Anfang und/oder Ende von Sequenzen sowie auch deren Längen können sich deutlich unterscheiden. Diese Differenzen können methodisch (verschiedene Laboratorien, veränderte Methoden) oder biologisch bedingt sein. Neben Mutationen, bei denen einzelne Nukleotide ausgetauscht wurden (Substitutionen), können nämlich

auch mehrere Nukleotide umfassende Stücke eingefügt worden (Insertionen) oder verloren gegangen sein (Deletionen). Für diese eingefügten oder verlorenen Stücke der DNA wurde der übergreifende Begriff «Indel» geprägt (eine Kurzform von «Insertion/deletion»). Durch das «Alignment-Verfahren» (deutsch: Alinierung = Angleichung) werden die Längenunterschiede durch Abschneiden überhängender Enden oder durch Entfernen bzw. Auffüllen von Lücken ausgeglichen. Man kann für das Verfahren spezielle Computer-Programme einsetzen, dies aber auch «per Hand» visuell am Computerbildschirm durchführen oder üblicherweise beide Methoden kombinieren. Das Ergebnis der Alinierung nennt man «Alignment».

Für Abb. 6 wurde das kostenlose Programm MEGA4 eingesetzt, mit dem man nach kurzer Einarbeitung von ca. 3-4 Stunden sehr leicht umgehen kann (zum Download möge man die Homepage des Anbieters dieses Freeware-Programms mit der Suchmaschinen-Eingabe «MEGA4» aufsuchen). Zunächst werden alle zu vergleichenden Sequenzen in je einer Zeile linksbündig horizontal untereinander angeordnet (Abb. 6A, zur Vereinfachung hier nur 2 Sequenzen). Man sieht, dass die beiden Sequenzen wegen der fehlenden Alinierung kaum Übereinstimmungen zeigen. Ganz rechts könnte man nun die unterschiedlichen Längen der Sequenzen ablesen (in Abb. 6 nicht dargestellt). Die Funktionsweise der Alinierung kann man sich so vorstellen, dass durch schrittweises Verschieben aller Sequenzen gegeneinander in der Horizontalen diejenige Position aller Stränge gefunden wird, bei der die Summe aller Basen-Unterschiede zwischen den Sequenzen ein Minimum erreicht.

Am Ergebnis in Abb. 6B sieht man, dass es bei *Cortinarius catharinae* Consiglio (1) einen links überhängenden Bereich gibt (rechte Seite nicht dargestellt). Die überhängenden Bereiche werden im letzten Schritt der Alinierung links (Abb. 6C) und rechts abgeschnitten, so dass jetzt wieder alle Sequenzen linksbündig beginnen und beide die gleiche Länge haben. Im Beispiel von Abb. 6 stimmen nun im dargestellten Ausschnitt alle Basen der beiden Kollektionen überein; der gesamte verglichene Abschnitt ist hier 606 Basen lang (in dieser Länge also nicht dargestellt), mit einer Differenz an nur einer Position im nicht dargestellten Teil der Sequenzen. Größere Differenzen ergeben sich in den meisten Fällen, wenn man die Sequenzen verschiedener Arten

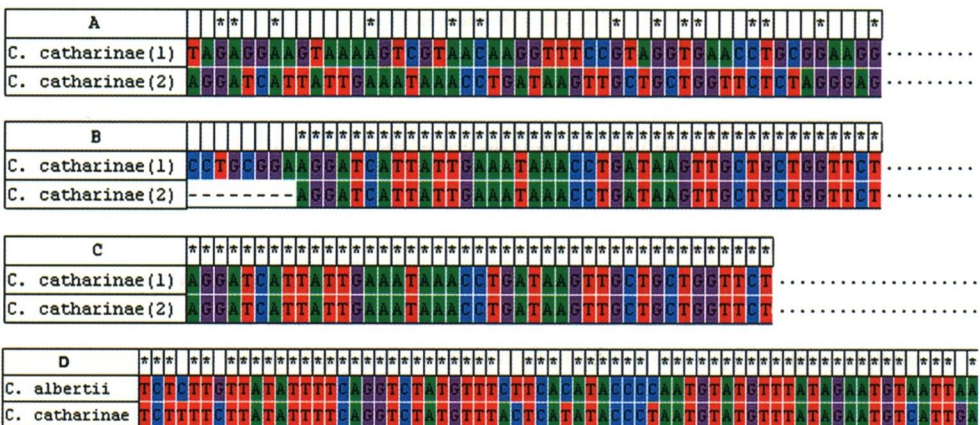


Abb. 6: **A** – Rohsequenzen von 2 Kollektionen von *Cortinarius catharinae*; **B, C** – Sequenzen nach Alinierung, vgl. Text; **D** – Alignment zwischen *C. albertii* und *C. catharinae* (vgl. Kap. 9).
 * = übereinstimmende Basenpaare.

miteinander vergleicht. Abb. 6D zeigt einen Vergleich zwischen *Cortinarius albertii* Dima, Frøsløv & T.S. Jeppesen und *C. catharinae* Consiglio. Hier sind in dem dargestellten kleinen Ausschnitt der beiden Sequenzen schon 8 unterschiedliche Basenpaare zu sehen. In den gesamten Sequenzen dieser beiden Arten findet man 43 unterschiedliche Basenpaare.

Nach heutigem Stand kann man die Alignment-Verfahren noch nicht als standardisierte Methode betrachten. Mit der entsprechenden Vorsicht sind daher die nach der Alinierung berechneten Bäume (s. 11.) zu interpretieren. Eine gute Einführung in die Alignment-Methoden findet sich in KNOOP & MÜLLER (2009).

10. Wie entsteht ein „Molekular-phylogenetischer Baum“?

Ein „Phylogenetischer Baum“ ist eine mathematische Konstruktion, welche die stammesgeschichtlichen Verwandtschaftsverhältnisse (Phylogenie) von Lebewesen widerspiegelt (HAESELER & LIEBERS 2003). Ein solcher Baum kann aus verschiedensten Daten konstruiert werden: Morphologische und/oder ökologische Daten, Aminosäure-Sequenzen von Proteinen oder DNA-Sequenzen. Im letzteren Fall sind alinierte Sequenzen das Ausgangsmaterial für die Konstruktion des Baumes. Die theoretischen Grundlagen behandelt die von W. Hennig begründete «Phylogenetische Systematik», – heute Kladistik genannt (HENNIG 1982).

Um aus den festgestellten Merkmalszuständen – hier DNA-Sequenzen – mehrerer bis vieler Taxa die evolutionären Prozesse in der erdgeschichtlichen Vergangenheit mit Computer-Programmen zu rekonstruieren, stehen dem Bioinformatiker folgende vier häufig angewendete Verfahren zur Verfügung, die beispielsweise in den leicht zugänglichen Programmpaketen MEGA4, PAUP* und MrBayes enthalten sind: Parsimonie-Analyse, Distanz-Analyse, Maximum-Likelihood-Analyse und bayesische (bayesianische) Analyse.

Nähere Erläuterungen zu diesen vier Verfahren findet man in der deutschsprachigen Literatur bei KNOOP & MÜLLER (2009), die den vier Verfahren jeweils ein umfangreiches Kapitel widmen. Eine gute, auch für den mathematischen Laien einigermaßen verständliche kürzere Übersicht geben HAESELER & LIEBERS (2003). Hier kann nur eine kurze Charakterisierung der vier Verfahren gegeben werden.

1. **Parsimonie-Analyse** (oder „Maximum-Parsimonie“, MP): Das „Parsimonie-Prinzip“ besagt, dass die sparsamste, einfachste Lösung als beste Erklärung allen anderen vorzuziehen ist. Bei einem Baum, der auf DNA-Sequenzen basiert, ist nach MP derjenige der plausibelste, bei dem die Taxa so im Baum platziert sind, dass die Variabilität eines Alignments durch die geringste Anzahl von Basenänderungen (Substitutionen) erklärt werden kann. Da für jede Position im Alignment alle möglichen Bäume berechnet werden, ist diese Methode bei vielen zu vergleichenden Sequenzen sehr aufwändig und erfordert eine sehr hohe Rechnerleistung. Schon bei 10 Taxa sind mehr als 1 Million verschiedene Bäume möglich. Wie viele Sequenzen in einem Arbeitsgang verrechnet werden können, hängt also von der Leistungsfähigkeit des Computers ab.
2. **Distanz-Analyse**: Hier wird ein molekular-phylogenetischer Baum aus der Distanz aller möglichen Sequenzpaare eines Alignments berechnet. Die Distanz ist ein Maß für die Verschiedenheit von homologen Sequenzen – im einfachsten Fall gemessen an der Zahl unterschiedlicher Basen. Meist werden aber aus diesen realen Werten auf der Basis von Modellannahmen zur Evolution abgeleitete Distanzmaße berechnet, um Lücken im Alignment, Rückmutationen oder die Mutationsrate einzelner Nukleotide zu berücksichtigen. Bei einer

größeren Anzahl zu vergleichender Sequenzen ist es jedoch unmöglich, alle nur möglichen Bäume zu berechnen. Hier wird z.B. das „Neighbour Joining“ (NJ) angewendet, bei dem man ähnliche Sequenzen zu Gruppen (Cluster) zusammenfasst und diese Cluster wie Taxa verrechnet.

3. **Maximum-Likelihood (ML):** Mit „likelihood“ wird die Wahrscheinlichkeit bezeichnet, mit der ein bestimmtes Ergebnis zu beobachten ist. In der Phylogenetik wird unter bestimmten Annahmen und Modellen der Evolution der Baum mit der höchsten Wahrscheinlichkeit ermittelt. Der Vorteil besteht hier darin, dass die unter verschiedenen Annahmen und Modellen erhaltenen Bäume mit ihren Likelihood-Werten einen Vergleich und eine Bewertung dieser Annahmen und Modelle selbst ermöglichen. Der Baum mit dem höchsten Likelihood-Wert spiegelt am ehesten den tatsächlichen Evolutionsverlauf wider. Allerdings sind die dafür notwendigen Berechnungen äußerst umfangreich und schränken die Anwendbarkeit ein.
4. **Bayesianische (bayessche) Analyse:** Diese Methode geht auf den englischen Theologen und Mathematiker Thomas Bayes zurück, nach dem auch das zugehörige Computer-Programm „MrBayes“ benannt ist. Die bayesianische Methode beruht auf der sog. „posterior probability“, einem Prinzip, bei dem die Wahrscheinlichkeit eines Ergebnisses durch schrittweise Hinzunahme neuer Informationen abgeschätzt und verbessert wird. Die Zahlen an den Knoten des resultierenden Baumes stehen für die Häufigkeit, mit der ein bestimmter Clade in den verglichenen Bäumen aufgetreten ist. So bedeutet z.B. die Häufigkeitsangabe 0,95, dass der betreffende Clade in 95 % der Bäume auftrat (zum Begriff Clade s. 11.).

11. In welcher Form werden Bäume dargestellt?

Die statistische Auswertung der Daten wird als baumartige Grafik dargestellt, die der besseren Lesbarkeit halber meist um 90° nach rechts gedreht dargestellt wird. Ein solcher Baum besteht aus Ästen (horizontale Linien) und Verzweigungspunkten (Knoten). An den „äußeren Knoten“ – den Enden der Äste – stehen die untersuchten, lebenden Taxa, deren Morphologie und/oder ggf. DNA-Sequenz bekannt sind. An den inneren Knoten stellt man sich hypothetische Vorfahren der rezenten Taxa vor. Diese Vorfahren sind durch die Aufspaltung in ihren Nachkommen aufgegangen. Alle Nachkommen, die an einem Knoten sitzen nennt man „Cluster“, für den Spezialfall der an einem äußeren Knoten sitzenden Taxa verwendet man den Begriff „Clade“. Clades und Cluster sind monophyletisch, d.h. alle darin enthaltenen Taxa lassen sich auf einen unmittelbaren gemeinsamen Vorfahren zurückführen und beide enthalten jeweils alle Nachfahren des gemeinsamen Vorfahren.

Einen Baum kann man als „Kladogramm“ oder „Phylogramm“ darstellen. Ein Kladogramm hat nicht-skalierte, dh. gleichlange Äste, sodass hier keine Rückschlüsse auf den Grad der Verwandtschaft gezogen werden können. Es sind hier nur Aussagen über die Reihenfolge der evolutionären Ereignisse bei der Entstehung der Taxa ableitbar.

Beim Phylogramm hingegen kommt durch die Astlängen die genetische Distanz – z. B. als Anzahl der Basen-Unterschiede in der Sequenz – zum Ausdruck: je länger die Äste, desto größer die Unterschiede und desto geringer die Verwandtschaft der Taxa (Abb.7). Als quantitatives Maß für die Astlängen befindet sich meist ein Maßstabsbalken am Phylogramm.

Eine weitere Darstellungsform ist das Dendrogramm, auch als ultrametrischer Stammbaum bezeichnet. Hier muss aber die Voraussetzung erfüllt sein, dass die Veränderungsraten der be-

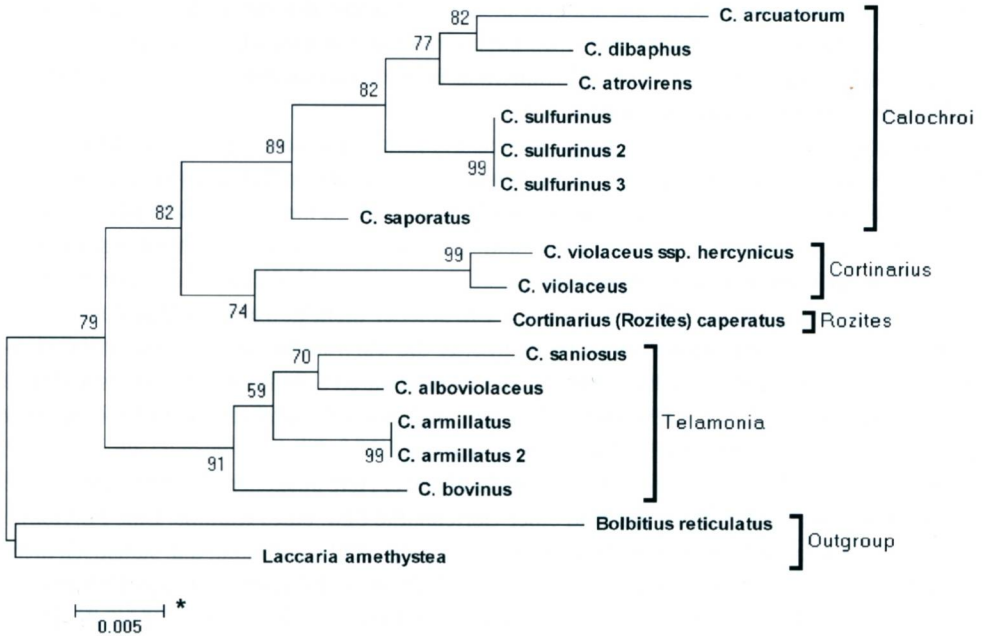


Abb. 7: Molekular-phylogenetischer Baum aus LSU-Sequenzen berechnet (Quelle: NCBI; s. Kap. 6 und Abb. 2). *Bolbitius reticulatus* und *Laccaria amethystea* wurden als Outgroup-Arten ausgewählt. Bootstrap-Werte (vgl. Kap. 13) ab 50 % deuten hier auf statistisch gesicherte (unterstützte, engl. supported) Verzweigungen. Verschiedene Kollektionen derselben Art (hier *Cortinarius sulfurinus* und *Cortinarius armillatus*) fallen erwartungsgemäß zusammen. *Rozites* ist in die Gattung *Cortinarius* eingebettet (vgl. Kap. 14). * = Strecke, die auf den waagerechten Linien 5 unterschiedlichen Basen entspricht (auf 1000 Basen bezogen).

trachteten Merkmale bei allen Taxa über längere Zeiträume gleich und konstant sind. Bei morphologischen Merkmalsänderungen und auch bei den meisten DNA-Sequenzen ist diese Voraussetzung kaum gegeben, bei bestimmten Protein-Sequenzen hingegen schon. Die horizontalen Achsen eines Dendrogramms stellen damit auch eine Zeitachse dar, an der man nach dem bekannten Prinzip der „Molekularen Uhr“ das Alter der jeweiligen Taxa ermitteln kann.

Normalerweise sollte jeder Baum einen Ursprung – eine Wurzel – besitzen. Dafür wählt man eine Art oder Artengruppe aus, die stammesgeschichtlich außerhalb der Gesamtheit der analysierten Taxa („ingroup“ = Innengruppe) steht. Die Art(en) an der Wurzel eines Baumes bezeichnet man als „Außengruppe“ (outgroup). Ein Outgroup-Taxon ist so definiert, dass es sich von den Ingroup-Taxa abspaltete, bevor diese sich voneinander differenzierten. Es sollte also eindeutig nicht zur Ingroup gehören, jedoch verwandtschaftlich nicht allzu weit von ihr entfernt sein. Das liegt daran, dass für das Alinieren eine gewisse Übereinstimmung der Basensequenzen erforderlich ist.

Ist die Innengruppe eine einzelne Gattung mit ihren verschiedenen Taxa, dann findet man relativ leicht eine geeignete Außengruppe. Arbeitet man hingegen auf höheren hierarchischen Ebenen, dann gestaltet sich die Suche nach einer Außengruppe viel schwieriger, setzt es doch

erhebliche Vorkenntnisse über die mögliche Verwandtschaft der zur Wahl stehenden Taxa voraus. Will man z.B. die früheste Verzweigung einer Innengruppe identifizieren, muss man zunächst alle bekannten bzw. zugänglichen Taxa in die Untersuchung einbeziehen und zusätzlich eine geeignete Außengruppe finden.

Auf einen gewurzelten Baum (engl. rooted tree) muss man hingegen verzichten, wenn sich keine Art findet, die (a) näher mit den untersuchten Taxa verwandt ist und (b) deren Sequenz mit den übrigen Sequenzen alinierbar ist. Bei ITS-Sequenzen kann dies leicht passieren, da die Sequenz von Outgroup-Arten oft so verschieden von der der analysierten Artengruppe ist, dass die Sequenzen nicht alinierbar sind. Denn eine gewisse Ähnlichkeit der Sequenzen ist eine Voraussetzung für die Alinierung (s. o.). Ein solcher nicht gewurzelter Baum (engl. unrooted tree) gibt zwar genauso wie ein gewurzelter die Verwandtschaft der Taxa untereinander wieder, er zeigt jedoch nicht die Abfolge der evolutionären Schritte. Um Missverständnisse zu vermeiden und falschen Interpretationen vorzubeugen, sollte sich jeder Betrachter zunächst darüber klar werden, um welchen Baumtyp es sich handelt.

In Fällen, bei denen von einem Knoten mehr als zwei Äste ausgehen, liegt eine Polytomie vor. Im Baum entsteht dadurch das Bild einer Gartenharke bzw. eines Kamms. Eine Polytomie kann einerseits dadurch entstehen, dass eine Verzweigung nicht signifikant, d.h. statistisch nicht gesichert ist (weiche Polytomie). In einem solchen Fall ist es ehrlicher, statt einer Dichotomie eine Polytomie darzustellen und zu versuchen, durch Einbeziehung weiterer Taxa die Polytomie aufzulösen. Andererseits kann eine Polytomie auch dadurch entstehen, dass aus einer Stammart tatsächlich mehr als zwei Taxa hervorgegangen sein könnten, obwohl dies biologisch eher unwahrscheinlich ist (harte Polytomie).

12. Was sagt ein phylogenetischer Baum aus?

Allgemein wird davon ausgegangen, dass Taxa, die in einem Baum dicht beieinander stehen, in den ausgewerteten Merkmalen einander mehr ähneln als solche, die weit voneinander entfernt stehen. Nicht mehr aber auch nicht weniger sagt ein Baum zunächst aus. Weitergehende Interpretationen und Rückschlüsse auf Verwandtschaftsverhältnisse hängen in erster Linie von der Qualität der verrechneten Merkmale ab. Werden z. B. nur Größen, Volumina, Massen etc. verrechnet, kann man nicht erwarten, dass der resultierende Baum ein phylogenetischer ist, der die stammesgeschichtlichen Verwandtschaftsbeziehungen widerspiegelt.

KUYPER (1986) hingegen wertete bei 13 *Inocybe*-Arten 14 morphologische Merkmale aus, von denen er einige als ursprünglich (primitiv), andere als abgeleitet (höher entwickelt) einstuft. Mit diesem Ansatz konnte er trotz eines durch die damalige Computerleistung sehr begrenzten Versuchsumfangs zu Aussagen über die natürlichen Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Gattung kommen, die einige frühere Auffassungen bestätigten, andere aber widerlegten.

Werden DNA-Sequenzen verrechnet, so wird heute oft a priori angenommen, dass die erhaltenen Bäume „Phylogenetische Bäume“ sind. Diese Annahme leitet sich aus der biologischen Rolle der DNA als Träger der Erbinformation her. In der Evolution der Lebewesen haben sich nach heute allgemein akzeptierter Vorstellung durch Mutation des Erbgutes und anschließende Selektion die jeweils bestangepassten Lebewesen durchgesetzt. Dadurch ist es zu einer schrittweisen Weiterentwicklung der Organismen gekommen. Diese Schritte sind

meist klein, manchmal aber auch groß gewesen, genauso wie die zugrunde liegenden Änderungen der Basensequenz der DNA recht unterschiedlich sein können.

Der Austausch einzelner Nucleotide/Basen (Substitution) und noch mehr Deletionen und Insertionen manchmal recht großer DNA-Abschnitte können besonders bei variablen DNA-Regionen (z. B. r-DNA) dazu führen, dass eine Alinierung nicht mehr ohne weiteres möglich ist. Das führt dann dazu, dass die Verwandtschaft an den vorliegenden Basensequenzen nicht oder kaum mehr nachweisbar ist, obwohl die miteinander verglichenen DNA-Sequenzen sich möglicherweise recht nahe stehen.

Unterscheiden sich zwei Sequenzen nur um eine Base, dann muss das nicht heißen, dass nur eine einzige Substitution stattgefunden hat. Es kann auch bedeuten, dass an dieser Stelle nach mehrfacher Substitution und durch Rückmutationen am Ende nur der eine beobachtete Unterschied resultiert. Würde man einfach nur die beobachteten Unterschiede zählen, dann unterschätzte man systematisch die Zahl der tatsächlich stattgefundenen Änderungen. Dieser Umstand erschwert die Abschätzung der Ähnlichkeit zwischen DNA-Sequenzen und den Rückschluss auf die Zeit, die für diesen evolutiven Prozesses notwendig war. Denn auf der linearen Beziehung zwischen der Anzahl unterschiedlicher Basen und der Zeit, die für die Herausbildung dieser Differenz erforderlich war, beruhen letztlich alle Rechenmodelle für Stammbäume.

Die oben beschriebenen Programme versuchen zwar diese Mängel zu berücksichtigen, ihr Erfolg ist aber stark von der Art der zur Verfügung stehenden Daten abhängig. Irgendein Baum wird am Ende immer herauskommen, es fragt sich nur, ob er der Wirklichkeit entspricht. Hier hat das kritische Hinterfragen durch den Forscher anzusetzen. Zur Stützung seiner Ergebnisse sollte er deshalb stets auch Befunde der klassischen Taxonomie heranziehen.

13. Konsensus-Bäume und Bootstrapwerte – welcher Baum wird publiziert?

Meist ist es so, dass nach der Verrechnung eines Datensatzes nicht nur ein Baum, sondern mehrere mögliche Bäume mit unterschiedlicher Verzweigung vorliegen. Für welchen soll man sich entscheiden? In solchen Fällen wird ein Konsensusbaum berechnet. Beim strict consensus werden in dem daraus resultierenden Baum nur noch diejenigen Knoten vorkommen, die bei allen Einzelbäumen vorhanden waren. Die übrigen werden als Polytomie wiedergegeben, wobei ein polytomer Knoten nicht mehr die phylogenetisch-zeitliche Abfolge darstellt und einem Kladogramm entspricht.

Eine Information über die statistische Sicherheit der einzelnen Clades eines Baumes geben die Bootstrap-Werte. Diese Werte werden an die betreffenden Knoten geschrieben. Das Verfahren wurde von FELSENSTEIN (1985) erstmals für phylogenetische Berechnungen angewendet. Es beruht darauf, dass aus einem vorhandenen Datensatz viele zufällige Stichproben gezogen werden (Spalten des Alignments), die jeweils zu einem Baum verrechnet werden. 1000 Wiederholungen sind hier ein üblicher Wert. Kommt eine bestimmte Verzweigung (Clade/Cluster) in allen Wiederholungen vor, hat sie einen Bootstrapwert von 100%. Eine solche Verzweigung ist also in hohem Maße vertrauenswürdig. Der Wert ist eine prozentuale Angabe, wie gut einzelne Verzweigungen des Baumes statistisch abgesichert (= unterstützt, engl. supported) sind. Die Aussagekraft von Bootstrapwerten ist aber noch umstritten. Je höher der Bootstrapwert, desto höher ist die statistische Sicherheit dieses Knotens. Schwierig wird es bei niedrigeren Werten. Würde man hier die bei statistischen Berechnungen üblichen Vertrauensgrenzen anwenden, dann dürfte man nur solche Verzweigungen als ausreichend abgesichert betrachten,

die Bootstrapwerte von 95-100 % haben. In bestimmten Fällen kann man aber Werte von über 65% oder sogar solche, die nur knapp über 50 % liegen, noch als signifikant ansehen. Treten niedrigere Werte von 50 % oder darunter auf, dann besitzt diese Konstellation eher zufälligen Charakter und man hätte genauso gut eine andere auswählen können. Bedauerlicherweise werden in den graphischen Darstellungen von molekular-phylogenetischen Bäumen häufig solche Knoten trotzdem dargestellt, obwohl davon auszugehen ist, dass solche nicht unterstützten Bereiche eine Folge der fehlenden Möglichkeiten sind, mit Hilfe der jeweils verwendeten DNA-Analysemethoden ein schlüssiges Schema der Artendifferenzierungsprozesse aufzustellen. Auf die Wiedergabe solcher Verzweigungen sollte man deshalb verzichten und sie als Polytomie darstellen (vgl. 10.). Bei Werten zwischen 50 % und 95 % sollte man sich dessen bewusst sein, dass der dargestellte Baum an diesen Stellen mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit durchaus auch eine andere Topologie haben könnte. Wünschenswert wäre eine Baumkonstruktion, die nur unterstützte Verzweigungen zeigt. Ein Blick in die Literatur zeigt aber, dass eine solche Praxis leider nicht durchgängig eingehalten wird.

Nach wie vor zeigt die moderne DNA-Analyse erhebliche Schwächen auf dem Niveau der Varietäten, Formen und Rassen. Schließlich gibt es kritische Stimmen, die generell in Zweifel ziehen, ob molekular-phylogenetische Bäume die tatsächliche Reihenfolge der früheren Artbildungsprozesse überhaupt darstellen können. Dies mindert aber nicht den Wert einer jeden kladistischen Methodik für die Taxonomie. Es sollte aber generell mehr auf gewisse Fehlerquellen in der DNA-Analytik geachtet werden.

14. Welche wichtigen Anwendungen und Ergebnisse gibt es?

Von den vielen möglichen Anwendungen, die hier genannt werden könnten, soll hier nur eine kleine Auswahl besprochen werden. Die Beispiele wurden so ausgewählt, dass sie für Mykologen, die sich mit Makromyceten beschäftigen, interessant sind.

Sehr bekannt ist der Fall der Aufspaltung der Gattung *Coprinus* durch REDHEAD et al. (2001). In der Zeit vor diesen molekularbiologischen Untersuchungen galt diese Gattung als sehr einheitlich. Sie wurde zusammen mit *Psathyrella* und einigen anderen Gattungen in die Familie der *Coprinaceae* gestellt. Dass sich daran etwas ändern könnte, hat jahrzehntelang kein Taxonom angenommen.

Überraschenderweise stellte sich jedoch heraus, dass die Kernarten der Gattung *C. comatus* und *C. sterquilinus* in die Nähe von *Lepiota* und *Agaricus* zu stellen sind, die zu den *Agaricaceae* gehören. Jetzt erinnerte man sich auch wieder, dass diese beiden Arten sich auch morphologisch von den übrigen Tintlingen unterscheiden. So haben sie einen Zentralstrang im Inneren des Stiels, ihnen fehlen Pleurocystiden, und sie zeigen das von den Champignons bekannte Röten des Hutfleisches und der Lamellen (CLÉMENÇON 2003).

Da aber *Coprinus comatus* die Typusart der Gattung ist, mussten alle übrigen Tintlingsarten neu benannt werden. Sie wurden entsprechend den Ergebnissen der DNA-Analysen auf die drei Gattungen *Coprinellus*, *Coprinopsis* und *Parasola* aufgeteilt, die aus nomenklatorischen Gründen jetzt zur Familie Psathyrellaceae gehören.

In Heft 6, Band 98 (2006) der Zeitschrift *Mycologia* findet sich eine Reihe von grundlegenden Arbeiten zur Phylogenie zahlreicher Pilzgruppen. Es handelt sich hierbei um die Darstellung der Ergebnisse der internationalen Forschungs-Initiative „Assembling the Fungal Tree of Life“ (<http://aftol.org>). Die zahlreichen Publikationen zu diesem Projekt finden sich

unter <http://aftol.org/publications.php>. Von den vorgeschlagenen Umgruppierungen können hier nur einige wenige Beispiele erwähnt werden.

So war der Befund, dass *Rozites caperatus* in molekular-phylogenetischen Bäumen in die Gattung *Cortinarius* eingebettet ist, mindestens so überraschend wie die Ergebnisse bei *Coprinus*. Dieses Ergebnis führte dazu, dass *Rozites*-Arten in *Cortinarius* umkombiniert wurden (PEINTNER et al. 2004), obwohl es durch morphologisch-anatomische Merkmale kaum gestützt wird. AGERER (2006) weist auf eine Vielzahl von Merkmalen hin, die wiederum für ein Belassen von *Rozites* in einer separaten Gattung sprechen.

Eine neue natürliche Klassifizierung innerhalb der Gattung *Cortinarius* schlagen GARNICA et al. (2005) vor. Diese Untersuchungen haben auch zu einer Neubewertung von morphologischen, anatomischen und biochemischen Merkmalen geführt.

Wesentliche Beiträge für DNA-basierte Artbeschreibungen in der Gattung *Cortinarius* Sektion *Calochroi* haben auch FRØSLEV et al. (2006a, b) geliefert. Hier wurde das Merkmal der KOH-Reaktion auf der Huthaut, dem Knollenrand und der Knollenunterseite als Schlüsselmerkmal verwendet (siehe auch OERTEL et al. 2009). Durch die DNA-Analysen wurde auch die Konstanz des Merkmals „KOH-Reaktion“ unterstützt.

Ein zentrales Anliegen mykologischer Forschung liegt in einer Zuordnung bestimmter Fruchtkörperformen (agaricoid, gasteroid, poroid, hydroid, clavarioid, stereoid, corticioid etc.) zu den verschiedenen Verwandtschaftsgruppen der Basidiomyceten. Ein Beispiel ist die Einordnung des stereoiden *Chondrostereum purpureum* in die Ordnung der *Agaricales*, während die Arten der Gattung *Stereum* auch weiterhin bei den *Russulales* anzuschließen sind (BINDER et al. 2005).

15. DNA-Barcoding bei Pilzen – Utopie oder realistische Aussicht?

Die Biodiversität auf der Erde nimmt z. Z. schneller ab, als Taxonomen in der Lage sind sie zu erfassen. Für die meisten Gruppen von Lebensformen gibt es viel zu wenig Spezialisten. Einen Ausweg aus diesem Dilemma könnte die Methode des DNA-Barcoding bieten.

Hier handelt es sich um eine Methode zur Schnellerfassung und Identifizierung von Arten an Hand ihrer spezifischen DNA. Eine solche Technik könnte es irgendwann ermöglichen, beliebige Entwicklungsstadien (z.B. Haupt- und Nebenfruchtformen) und Erscheinungsformen (z.B. Fruchtkörper, Mycelien, Mykorrhizen u.a.) von Pilzen zu identifizieren. Einen guten allgemeinen Überblick über die Methoden und Ziele des DNA-Barcoding geben STEINKE & BREDE (2006). Die industriellen Strichcodes kennt heute jeder bei seinem täglichen Einkauf. Jede Ware trägt mit dem Code ihren individuellen Fingerabdruck, der die schnelle Identifizierung mit einem handlichen Scanner ermöglicht. Bei einem Pilz würde aus seiner charakteristischen DNA-Sequenz quasi ein Strichcode gebildet, der in eine Datenbank eingelesen schnell den dort hinterlegten Namen des Taxons anzeigt.

Die Vorstellung allerdings, der Taxonom brauche nur mit einem Scanner und einem verbundenen Miniaturrechner durch den Wald zu gehen, ist völlig utopisch. Eine DNA-Extraktion mit nachfolgender Vervielfältigung durch PCR und die anschließende Sequenzierung sind nach wie vor nötig und Stand der Technik.

Um das DNA-Barcoding für alle Pilze verfügbar zu machen, sollte eine universell verwendbare DNA-Region eingesetzt werden. Die ITS-Region, die bei den bisherigen Bemü-

hungen um ein Barcoding der Pilze propagiert wurde, eignet sich dafür nicht durchgängig und bisher konnte auch keine universell geeignete Region gefunden werden. Sollte das gelingen, dann ist ein DNA-Barcoding bei Pilzen eine realistische Aussicht. Dafür müssten aber für möglichst viele Sequenzen korrekte Artnamen hinterlegt sein – ein Problem angesichts des Mangels an Spezialisten.

Viel einfachere Techniken sind schon bei der Gendiagnostik beim Menschen entwickelt worden, um bestimmte Erbkrankheiten diagnostisch schnell und eindeutig erfassen zu können. Bei der „Microarray-Technik“ wird eine DNA-Probe (möglicherweise reicht später einmal ein Zellextrakt) auf einen speziell präparierten Chip (auch Gen- oder Biochip genannt) aufgetragen. Gesuchte DNA-Abschnitte reagieren spezifisch mit der präparierten Oberfläche des Chips, der anschließend an den Stellen, die reagiert haben, als Signal ein Fluoreszenzlicht abgibt. Diese Fluoreszenz wird gemessen, das sich daraus ergebende Muster wird erfasst und verrechnet und damit ggf. vorhandene Gendefekte entdeckt.

Übertragen auf die Taxonomie würde eine solche Technik es jedem Anwender ohne molekularbiologische Kenntnisse und ohne besonders ausgestattete Laboratorien ermöglichen, Pilztaxa schnell und eindeutig zu bestimmen. Wegen des hohen Aufwands für die Entwicklung werden solche Methoden wohl kaum in absehbarer Zeit für die Pilztaxonomie zur Verfügung stehen.

16. Ersetzen DNA-Analysen den Taxonomen?

Ein entscheidender Vorteil molekularer gegenüber klassischen morphologisch-anatomischen Merkmalen ist, dass auf der molekularen Ebene wesentlich mehr Einzelmerkmale eines Merkmalskomplexes, z.B. der ITS-Region, zur Verfügung stehen, die die statistische Auswertung sehr viel zuverlässiger werden lassen. Die molekularen Merkmale stehen darüber hinaus auch dort zur Verfügung, wo morphologisch-anatomische Merkmale ganz oder fast ganz fehlen.

Die eingangs aufgeworfene Frage, ob DNA-Analysen objektive Kriterien für eine Art-Definition liefern können, ist damit aber nicht beantwortet. Morphologisch-anatomische Unterschiede sind kaum objektivierbar, da in nicht wenigen Fällen die Umwelt einen erheblichen Einfluss auf die Ausprägung der Merkmale ausübt. Genetisch identische Individuen können evtl. auch ganz unterschiedlich aussehen. Im Gegensatz dazu sind Unterschiede in der Basensequenz der DNA zwischen zwei Taxa ein objektives Kriterium dafür, dass diese Taxa nicht identisch sind. Sollte dementsprechend dem morphologischen und biologischen (s.o. 2.) ein DNA-basiertes Artkonzept zur Seite gestellt werden? Das Problem liegt hier in der Bewertung der Differenzen. Unterscheiden sich zwei Taxa durch 1, 2, 3 oder mehr Basen in der ITS-Region, sind aber makro- und mikroskopisch sowie auch ökologisch nicht zu unterscheiden, dann kann man schwerlich von zwei Arten sprechen – es sei denn, man würde die Art lediglich formal an Hand der Basenunterschiede definieren. Und wo soll dann eine Grenze festgelegt werden? Dabei könnte es leicht passieren, dass einzelne Individuen morphologisch-anatomisch definierter Arten als eigene Spezies betrachtet werden müssten. Diese Überlegungen zeigen, dass ein nur an Unterschieden der Basensequenz definiertes Artkonzept nicht praktikabel ist.

Andererseits gibt es durchaus Taxa, deren untersuchte Basensequenzen völlig identisch sind, die sich aber morphologisch und ökologisch deutlich unterscheiden; das ist z.B. bei *Cor-*

tinarius atrovirens Kalchbr. und *C. ionochlorus* Maire der Fall (GARNICA et al. 2005). Man kann zwar nicht ausschließen, dass es sich bei diesen beiden Taxa womöglich nur um eine Art handelt. Diese Schlussfolgerung ist aber nur gerechtfertigt, wenn die beobachteten Unterschiede nicht genetisch, sondern umweltbedingt sind. Wären die abweichenden Merkmale aber genetisch bedingt, dann würde man unterschiedliche Sequenzen finden, wenn man das gesamte Genom nach Sequenz-Unterschieden durchsuchte. Die Übereinstimmung in den zunächst untersuchten Sequenzen wäre dann möglicherweise zufällig gewesen.

Daraus ist die Schlussfolgerung zu ziehen, dass DNA-Analysen zwar objektive Ergebnisse, jedoch allein kein eindeutiges Kriterium für eine Art liefern können. Ob ein Taxon als Art zu betrachten ist, wird also auch in Zukunft der Taxonom an Hand morphologischer, anatomischer, chemischer, ökologischer und ggf. an Hand von DNA-Daten zu entscheiden haben.

Mit ihrem Plädoyer für eine „DNA-Taxonomie“ verfolgen TAUTZ et al. (2003) einen etwas anderen Ansatz, der besonders dem schon erwähnten Mangel an Spezialisten und Forschungskapazitäten Rechnung trägt. Nach diesem Konzept sollen die in einer Datenbank hinterlegten Taxa zunächst nicht zwingend nach der herkömmlichen binären Nomenklatur als Species, sondern nach einem Nummernsystem benannt werden. Da die DNA-Sequenz die Hauptreferenz für ein Taxon ist, entfällt auch das bisherige Problem der ständig wechselnden Namen. Der Autor, die Beschreibung des Taxons, ökologische Daten etc. sollen gleichfalls in die Datenbank aufgenommen werden, auch ein schon bekannter oder später festgelegter binärer Artname. Als Referenz ist eine DNA-Probe zu hinterlegen, die im Falle bereits beschriebener Arten möglichst vom Typusbeleg stammen sollte. Es bleibt abzuwarten, ob dieses schlüssige Konzept sich durchsetzen kann.

Die neuen Methoden der DNA-Analyse eröffnen die Möglichkeit, viele bisher ungelöste Probleme der Taxonomie zu klären. Wenn Profi- und Amateur-Mykologen / -Taxonomen mit Molekulargenetikern und Biologen sowie Bioinformatikern zusammenarbeiten, dann könnte es gelingen, die heute noch vorhandene Biodiversität der Lebensräume unserer Erde schneller als bisher zu erfassen, sie zu erhalten und für spätere Generationen nutzbar zu machen.

Dank

Herrn Dr. Martin Kirchmair und Frau Dr. Sigrid Neuhauser, Innsbruck, danken wir sehr für ein anregendes Gespräch und die kritische Durchsicht unseres Manuskripts. Wir verdanken ihnen wertvolle Hinweise und Ergänzungen, die wir mit ihrer großzügigen Erlaubnis größtenteils in unseren Text eingearbeitet haben. Auch Herrn Prof. Langer, Kassel, und Herrn Prof. Agerer, München, danken wir für eine Durchsicht des Manuskripts und wichtige Hinweise.

Für die zeitaufwändige Unterstützung bei der Erstellung der Abbildungen danken wir Michael Blum, Westerweyhe, sehr herzlich. Die Betreiber der Internet-Datenbank UNITE erlaubten uns die Wiedergabe eines Screenshots ihrer Website.

Wir danken auch Dr. Sigisfredo Garnica, Tübingen, für zahlreiche fruchtbare Diskussionen während der vergangenen Jahre und Dr. Roland Kirschner, Frankfurt, für wertvolle Anregungen im Zusammenhang mit Computerprogrammen zur DNA-Analyse. Und ohne den intensiven Gedankenaustausch mit Günter Saar, Lahr, und Dr. Thomas Münzmay, Dormagen (leider im Jahr 2008 verstorben), hätte sich unser Verständnis für die Bedeutung der DNA-Analyse für die Taxonomie der Pilze nicht so weit entwickelt, wie dies jetzt der Fall ist.

Literatur

- AGERER, R. (2006): Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. – *Mycol. Progress* **5**: 67-107.
- BINDER, M., D.S. HIBBETT, K.-H. LARSSON, E. LARSSON, E. LANGER & G. LANGER (2005): The phylogenetic distribution of resupinate forms across the major clades of mushroom-forming fungi (Homobasidiomycetes). – *Systematics and Biodiversity* **3**: 113-157.
- CLÉMENÇON, H. (2003): Das vergessene Merkmal. – *Schweiz. Z. Pilzk.* **81**(1): 18-22.
- FELSENSTEIN, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. – *Evolution* **39**: 783-791.
- FROSLEV, T.G., T.S. JEPPESEN & T. LÆSSØE (2006a): Seven new calochroid and fulvoid species of *Cortinarius*. – *Mycological Research* **110**: 1046-1058.
- FROSLEV, T.G., T.E. BRANDRUD & T.S. JEPPESEN (2006b): New species and combinations in *Cortinarius* subgenus *Phlegmacium* section *Calochroi*. – *Mycotaxon* **97**: 367-377.
- GAMS, W. (2009): Die mykologische Systematik am Scheideweg. – *Z. Mykol.* **75**(1): 3-11.
- GARNICA, S., M. WEISS, B. OERTEL & F. OBERWINKLER (2005): A framework for a phylogenetic classification in the genus *Cortinarius* (Basidiomycota, Agaricales) derived from morphological and molecular data. – *Can. J. Bot.* **83**: 1457-1477.
- HAESELER, A. V. & D. LIEBERS (2003): *Molekulare Evolution*. S. Fischer, Frankfurt a.M.
- HENNIG, W. (1982): *Phylogenetische Systematik*. Parey, Berlin, Hamburg.
- KNOOP, V. & K. MÜLLER (2009): *Gene und Stammbäume. Ein Handbuch zur molekularen Phylogenetik*, 2. Aufl.. Spektrum, Heidelberg.
- KUYPER, T. W. (1986): A revision of the Genus *Inocybe* in Europe, I. Subgenus *Inosperma* and the smooth-spored species of subgenus *Inocybe*. – *Persoonia Suppl.* Vol. **3**.
- MATHENY, P. B. et al. (2006): Major clades of Agaricales: a multilocus phylogenetic overview. – *Mycologia* **98**(6): 982-995.
- OERTEL, B., G. SCHMIDT-STOHN & G. SAAR (2009): Die Laugenreaktion am Stielbasisfilz bei Fruchtkörpern von *Cortinarius*, Subgen. *Phlegmacium*. Eine Bestandsaufnahme 23 Jahre nach Entdeckung dieser neuartigen Reaktion. – *Journal des J.E.C.* **11**: 20-31.
- PEINTNER, U., J.M. MONCALVO & R. VILGALYS (2004): Toward a better understanding of the infrageneric relationships in *Cortinarius* (Agaricales, Basidiomycota). – *Mycologia* **96**(5): 1042-1058.
- REDHEAD, S.A., R. VIGALYS, J.M. MONCALVO, J. JOHNSON & J.S. HOPPLE (2001): *Coprinus* Persoon and the disposition of *Coprinus* species sensu lato. – *Taxon* **50**: 203-241.
- STEINKE, D. & N. BREDE (2006): Taxonomie des 21. Jahrhunderts, DNA-Barcoding. – *Biol. Unserer Zeit* **31**(1): 40-46.
- TAUTZ, D., P. ARCTANDER, A. MINELLI, R. H. THOMAS & A. P. VOGLER (2003): A plea for DNA taxonomy. – *Trends in Ecology and Evolution* **18**(2): 70-74.

Anmerkung der Schriftleitung: Die Kapitel 1-12 und Kapitel 16 wurden 2009 in *Journal des J.E.C.* **11**: 10-19 bereits publiziert. Die Kapitel 6-12 und Kapitel 16 wurden für diesen Beitrag überarbeitet und erweitert. Die Kapitel 13-15 sind neu.



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: 2010

Band/Volume: [76_2010](#)

Autor(en)/Author(s): Schmidt-Stohn Geert, Oertel Bernhard

Artikel/Article: [Methodik und Anwendung von DNA-Analysen in der Pilz-Taxonomie 101-120](#)