

DNA-Analysen in der Pilz-Taxonomie

GEERT SCHMIDT-STOHN* & BERNHARD OERTEL**

Eingegangen am 26.06.2009

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Einführung in die Durchführung und Verwendung von DNA-Analysen in der Pilz-Taxonomie, speziell der Gattung *Cortinarius*, gegeben. Die richtige Trocknung der Frischpilze und die sachgerechte Aufbewahrung der Exsikkate werden beschrieben. ITS-Sequenzen, das Alignment und der Aufbau sowie die Deutung phylogenetischer Bäume werden erklärt und besprochen.

ABSTRACT

An introduction to the procedures and applications of DNA analyses in mushroom taxonomy, especially in the genus *Cortinarius*, is given. Suitable methods for correct drying of fruit bodies and for conservation of exsiccates are described. ITS-sequences, the alignment as well as the construction and interpretation of phylogenetic trees are explained and discussed.

Keywords: Taxonomie, DNA, ITS, Alignment, phylogenetischer Baum, *Cortinarius*, Trocknung, Exsikkat.

EINLEITUNG

Die molekularbiologische Analyse von DNA-Sequenzen ist seit einigen Jahren eine etablierte Methode der Taxonomie. Ein Blick in einschlägige Fachzeitschriften zeigt sofort den hohen Anteil solcher Publikationen. 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. Besonders erfolgreich waren solche Methoden bisher in der Gattung *Cortinarius* Untergattung *Phlegmacium*, wo z.B. die Arbeitsgruppen um Garnica in Tübingen und Frøslev in Kopenhagen in den letzten Jahren bahnbrechende Arbeiten vorgelegt haben. Eine Klärung vieler Fragen in der Untergattung *Telamonia* scheint sogar ohne den Einsatz von DNA-Analysen kaum möglich zu sein. Hier hat die Gruppe um Niskanen in Helsinki erste Ergebnisse vorgelegt. Die Gesamtheit der Gattung *Cortinarius* (inkl. *Rozites*, *Thaxterogaster* etc.) wurde u.a. von Peintner und Garnica mit ihren jeweiligen Projektpartnern DNA-analytisch untersucht.

Die J.E.C. hat auf ihrer Generalversammlung 2008 in Prénovel eine Arbeitsgruppe eingesetzt (Leitung: Günter Saar, Lahr), deren Mitglieder sich für die Förderung von DNA-Analysen in der Gattung *Cortinarius* einsetzen wollen. In diesem Sinn verfolgt der nachfolgende Artikel das Ziel, beim Leser dieser Zeitschrift Interesse an den modernen Methoden der Taxonomie zu wecken und Verständnis für deren Ergebnisse, Möglichkeiten und Ziele zu vermitteln.

* Geert Schmidt-Stohn, Burgstr. 25, D-29553 Bienenbüttel, geert.schmidt-stohn@t-online.de

** Bernhard Oertel, INRES, Universität Bonn, Auf dem Hügel 6, D-53121 Bonn, b.oertel@uni-bonn.de

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 intuitiv bestimmte Merkmalskombinationen und zusätzlich bestimmte Einzelmerkmale, die für eine Art charakteristisch sind. Können wir eine Aufsammlung nicht benennen, werden für eine Diagnose zusätzlich mikroskopische und chemische Merkmale herangezogen. Alle diese Merkmale beziehen sich auf das Erscheinungsbild – es sind im weitesten Sinne morphologische Merkmale. In der Geländearbeit ist nur diese morphologische Definition einer Pilzart praktikabel (morphologisches Artkonzept). Eine objektive 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 mehr 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. alle *Cortinarius*-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.

Können molekularbiologische Untersuchungen einen Nutzen für die Klärung der hier kurz 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 kennen zu lernen und zu verstehen.

2. Wie werden Pilze für eine Analyse konserviert und die DNA daraus gewonnen?

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 Dörrgerät zu Fehlschlägen.
4. 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.
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 Ergebnisse liefert. Nur aus richtig getrockneten und aufbewahrten Proben kann noch viele Jahre später die DNA gewonnen und für die Analyse verwendet werden.

Für das Herauslösen der DNA aus den Zellen (Extraktion) wird das trockene Material 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.

Statt die DNA aus Exsikkaten zu gewinnen, wird sich in Zukunft vielleicht die folgende Methode durchsetzen: Gleich nach einer Exkursion wird aus einem gut erhaltenen Fruchtkörper mit einem sterilen Präparationsbesteck eine Probe in Form eines kleinen Gewebestückes/Lamellenstückes entnommen und sofort in ein Kunststoffröhrchen gegeben, das ein bestimmtes Volumen der Extraktionslösung (s.o.) enthält. Das Röhrchen wird verschlossen und eingefroren.

3. Wie ist die DNA aufgebaut?

Die DNA (DesoxiriboNucleic Acid) ist die Erbsubstanz einer Zelle und stellt chemisch eine Doppelschraube (Helix) dar, deren durchlaufende Stränge aus sich abwechselnden Zuckermolekülen (Z) und Phosphatresten (P) bestehen. Jedes Zuckermolekül trägt als Seitenkette eine Base. Ein Molekül aus jeweils einer Base, einem Zucker und einem Phosphatrest wird Nucleotid genannt. Es gibt in der DNA vier verschiedene Basen: Guanin und Cytosin sowie Adenin und Thymine, also auch vier verschiedene DNA-Nucleotide. Die Basen schließen sich nur in den Kombinationen G-----C und A-----T über relativ schwache chemische Bindungen (Wasserstoffbrücken) zusammen und verbinden so die beiden Stränge zur DNA-Doppelhelix (vgl. Abb. 1).

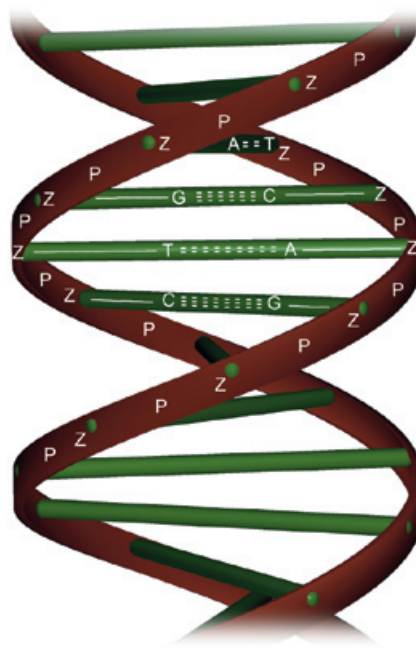


Abb. 1: Schema der DNA-Doppelhelix, A = Adenin, T = Thymin, G = Guanin, C = Cytosin, Z = Zucker Desoxiribose, P = Phosphatrest, ----- = Wasserstoffbrücke

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 Projekt» 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.

4. Welche Abschnitte der DNA werden untersucht?

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 (MB). Für taxonomische Fragestellungen sind jedoch Untersuchungen der gesamten DNA zu zeitaufwändig und kostspielig. Es müssen deshalb Teil-Abschnitte der DNA gefunden werden, die besonders geeignet sind. Beim Menschen stellen nur etwa 1% der DNA Erbanlagen (Gene) in dem Sinne dar, dass sie direkt 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.

Welche Abschnitte auf der DNA man untersucht, hängt davon ab, auf welcher taxonomischen Ebene man arbeitet. Will man höhere Taxa wie Gattungen, Familien, Ordnungen etc. vergleichen, dann wählt man variable, aber eher konservative Regionen der DNA (s.o.). Auf der Ebene der Unterscheidung von Arten innerhalb von Gattungen wählt man dagegen 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 wollen, dann käme man nicht zu den gewünschten Ergebnissen, da die Sequenzen erst gar nicht miteinander aliniert (s.u.) und verrechnet werden können oder da durch Rückmutationen die beobachtete Variation nicht mehr proportional der evolutionären Zeiträume wäre.

Bei der Art-Unterscheidung innerhalb von Gattungen sind die bei Pilzen am häufigsten untersuchten Abschnitte einer DNA die ITS-Sequenzen (Internal Transcribed Spacer). Diese Sequenzen sind Teil der «ribosomalen DNA» (rDNA), deren Funktion die Herstellung von «ribosomaler Ribonucleinsäure» (rRNA) ist. RNA's 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 in der Zelle – ein großer Vorteil für DNA-Analysen der ITS-Region und der anderen DNA-Abschnitte der rDNA. Die meisten anderen Gene sind nur in 2 Kopien in einer Zelle enthalten (diploide Zellen) und deshalb viel schwerer zu untersuchen.

Abb. 2 zeigt einen Ausschnitt aus der rDNA, es ist hier 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 rRNA's zuständig sind. Diese Abschnitte enthalten neben einigen variablen hauptsächlich konservative Bereiche. Treten hier Mutationen auf, dann kann sich die Struktur der rRNA ändern. Es kann dadurch bei den Ribosomen zu Funktionsstörungen kommen, die für die Zelle negativ sind. Solche Mutationen eliminieren sich also selbst.

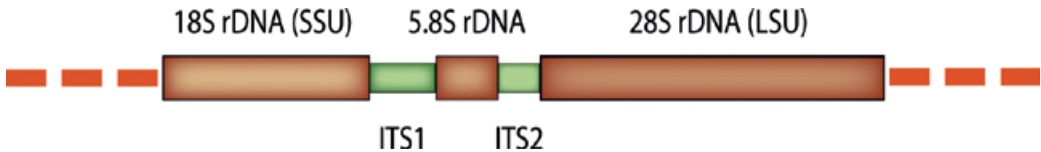


Abb. 2: Aufbau der ribosomalen DNA (vereinfachtes Schema), SSU = Small SubUnit, LSU = Large SubUnit, ITS = Internal Transcribed Spacer

Anders bei den ITS-Sequenzen. Diese Abschnitte der rDNA sind quasi nur Abstandshalter zwischen den 3 Genen 18S, 5.8S und 28S und haben keine bekannte nachhaltige Funktion für die Zelle, so dass Mutationen erhalten bleiben. So entsteht eine große genetische Variation innerhalb der ITS-Sequenzen, die man für taxonomische Zwecke auf Artebene ausnutzt.

In vielen Fällen werden heute neben den ITS-Sequenzen auch bestimmte Bereiche innerhalb der «Large SubUnit» LSU (= 28S; vgl. Abb. 2) herangezogen, um die Ergebnisse auf eine breitere Basis zu stellen. Es gibt nämlich zwischen Arten deutliche Unterschiede in der Aussagekraft der Sequenzen verschiedener DNA-Regionen. Regionen, mit deren Sequenz sich bestimmte Artengruppen gut differenzieren lassen, sind für andere Artengruppen u.U. nicht geeignet.

5. 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. 2.) 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 nicht möglich. In 1-2 Stunden lassen sich in einem automatisierten Prozess gewünschte Abschnitte wie z.B. ITS-Abschnitte einer Proben-DNA millionenfach vermehren und so für den nächsten Schritt der Untersuchung verfügbar machen.

6. 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 Analysegerät wird die Basensequenz eines DNA-Abschnittes direkt auf einem Computer gespeichert. Die Sequenzen werden im WWW 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 Asco- und Basidiomyceten mit Ektomykorrhiza spezialisiert ist. Neue DNA-Sequenzen sollten von den Autoren spätestens dann ins Internet gestellt werden, wenn die Daten für eine Publikation verwendet wurden. Abb. 3 zeigt zwei Sequenzen von *Cortinarius rapaeotomentosus* Delaporte & Eysart., wenn man diesen Pilznamen bei UNITE aufruft.

Cortinarius rapaeotomentosus Delaporte & Eysart.

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

UDB002026 | [GenBank: DQ663406](#) | TF629

Submitted by [Tobias G. Frøslev](#)

```
GGGGGGGGGGGACCTCGGAAGGATCATTATTGAAATAAACCTGATAAGTTGTTGCTGGCTCTAGAGAGCATGTGCACGCTTGCAT
CTTTATATCTTACCTGTGCACCTTTTGTAGACCTGAGTATCTTTCTGAATGCTTTATTANNAGCATTAGGATTGAGGATTGACTTTG
TTGTCTCTCCTTGTATTCTCAGGCTATGTTTTCTCATATACCCTAATGTATGTCTATAGAATGTATAAATTAATGGCCCTTTGTGCCTA
TAAACCTATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATGCGAGAA
TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGACCTTGCCTCTTGGTATCCGAGGAGCATGCGCTTTTGGAGTGCATTAATATTATCAACC
TCTTTTGGTGGATGTGGTTTGTGGTCTCTTGAGATCAGCTCTCTTAAATGCATTAGCGGACAACTTTTGCCAACCTGTTATTGG
TGTGATAATTATCTACGCCATTGACTGTGAAGCAAGGTTCTGCTCTAATAATGTCATTGACTGGACAAATTTCTTTTTTAAATGTGG
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: DQ663408](#) | TF338

Submitted by [Tobias G. Frøslev](#)

```
AGGATCATTATTGAAATAACCTGATAAGTTGTTGCTGGCTCTAGAGAGCATGTGCACGCTTGCATCTTTATATCTTACCTGTGCA
CCTTTGTAGACCTGAGTATCTTTCTGAATGCTTTATTAGCATTAGGATTGAGGATTGACTTTGTTGTCTCTCCTTGTATTCTCAGG
TCTATGTTTCTCATATACCCTAATGTATGTCTATAGAATGATAAATTAATGGCCCTTTGTGCCTATAAACCTATACAACCTTTCAGCAAC
GGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATGCGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA
ACGCACTTGGCTCTTGGTATCCGAGGAGCATGCGCTTGTGAGTGCATTAATATTATCAACCTCTTTTGGTGGATGCGGGTTTG
CTGGTCTTTGAGATCAGCTCTCTTAAATGCATTAGCGGACAACTTTTGCACACTGTTTATTGGTGTGATAATTATCTACGCCATTGA
CTGGAAGCAAGTTCTGCTCTAATAGTCCATTGACTGGACAAATTTCTTTTTTAAATGTGGCTCAAATCAGG
```

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. 3: Screenshot der UNITE-Website bei Aufruf von *Cortinarius rapaeotomentosus* Delaporte & Eysart. aus der Datenbank, rot markiert: nicht übereinstimmende Teile der beiden Rohsequenzen (zur Erklärung s. Text)

7. Was ist ein Alignment?

Gibt es für eine Art mehrere Sequenzen von verschiedenen 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) 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».

8. Wie entsteht ein «Phylogenetischer Baum»?

Ein «Phylogenetischer Baum» ist eine mathematische Konstruktion, welche die stammesgeschichtlichen Verwandtschaftsverhältnisse (Phylogenie) von Lebewesen widerspiegelt (HAESSELER & 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.

Um aus den festgestellten Merkmalszuständen – hier DNA-Sequenzen – mehrerer bis vieler Taxa die evolutionären Prozesse der erdgeschichtlichen Vergangenheit mit Computer-Programmen zu rekonstruieren, stehen dem Bioinformatiker folgende vier häufig angewendete statistische Verfahren zur Verfügung, die beispielsweise in den leicht zugänglichen Programmpaketen MEGA4 u. PAUP* 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 4 Verfahren jeweils ein umfangreiches Kapitel widmen. Eine gute, auch für den mathematischen Laien einigermaßen verständliche kürzere Übersicht geben HAESSELER & LIEBERS (2003).

9. Was sagt ein phylogenetischer Baum aus?

Ein solcher über DNA-Analyse errechneter Stammbaum besteht aus Ästen (horizontale Linien) und Verzweigungspunkten (Knoten). Die senkrechten Linien, die von den Knoten nach oben und unten weggehen, haben keine weitere besondere Bedeutung und dienen nur zur besseren graphischen Darstellung des Baumes. An den «äußeren Knoten» – den Enden der Äste – stehen lebende Taxa bzw. verschiedene einzelne Aufsammlungen von lebenden Taxa, deren Morphologie und deren DNA-Sequenzen bekannt sind. An den inneren Knoten stehen hypothetische Vorfahren der heute lebenden Taxa. Diese Vorfahren sind durch die Aufspaltung in ihren Nachkommen aufgegangen. Alle Nachkommen, die an einem Knoten sitzen, nennt man «Kluster» (cluster), für den Spezialfall der an einem äußeren Knoten sitzenden Taxa verwendet man den Begriff «Klade» (clade). Kladen und Kluster 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, d.h. gleichlange Äste, so dass 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. Dieser Baumtyp wird in der Pilz-Taxonomie nicht sehr häufig verwendet.

Beim Phylogramm (vgl. Abb. 5) hingegen kommt durch die Astlängen (waagerechte Linien) die genetische Distanz – z.B. als Anzahl der Unterschiede in der Sequenz – zum Ausdruck: Je länger die Äste, desto größer die Unterschiede und desto geringer die Verwandtschaft der Taxa (man bewertet dabei nur die waagerechten, nicht aber die senkrechten Linien-Längen!). Als quantitatives Maß für die Astlängen pro Basenunterschied befindet sich meist ein Maßstabsbalken am Phylogramm.

Normalerweise sollte jeder Baum einen Ursprung – eine Wurzel – besitzen (engl. root). 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 alle 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. Auf die Position der Wurzel bezogen werden die Bäume meist um 90° nach rechts gedreht dargestellt, und auf eine solche Baum-Position haben sich auch die Angaben zur Frage der waagerechten und senkrechten Linien in diesem Kapitel bezogen.

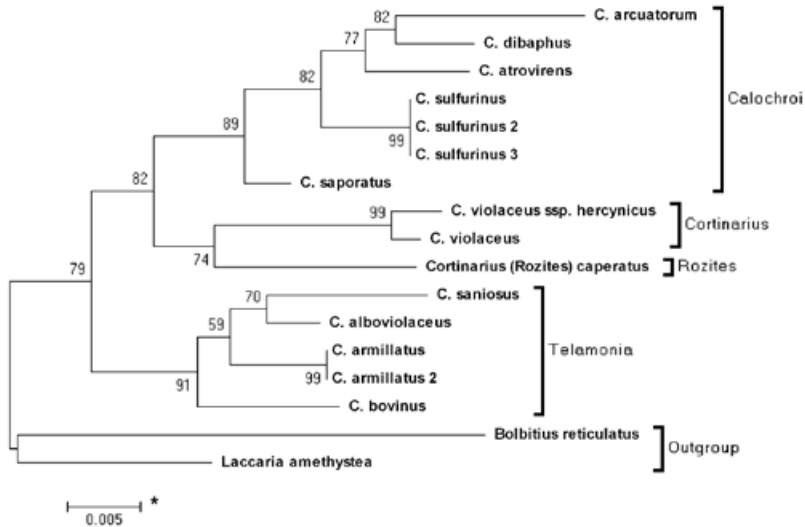


Abb. 5: Phylogenetischer Baum aus LSU-Sequenzen berechnet (s. Kap. 4 u. Abb. 2). *Bolbitius reticulatus* und *Laccaria amethystea* wurden als Outgroup-Arten ausgewählt. Bootstrap-Werte (vgl. Kap. 10) ab 50% deuten hier auf statistisch gesicherte Verzweigungen. Verschiedene Kollektionen einer Art (*C. sulfurinus* u. *C. armillatus*) fallen erwartungsgemäß zusammen. *Rozites* erweist sich als der Gattung *Cortinarius* zugehörig.

* = Strecke, die auf den Waagerechten 5 unterschiedlichen Basen entspricht (auf 1000 Basen bezogen).

Die Position von Arten, die an dem am weitesten links liegenden Knoten gleich nach der Outgroup entspringen, nennt man basal. Diese Taxa haben sich schon in stammesgeschichtlich sehr alter Zeit vom Rest abgesondert. Entsprechend sind Arten, die an den sehr weit rechts gelegenen Knoten entspringen, als stark abgeleitet anzusprechen. Ihre Art-Differenzierung hat erst in neuerer Zeit stattgefunden.

Die Astgruppen der Phylobäume dürfen frei gedreht werden, daher darf bei der visuellen Auswertung eines Baumes nur die Topologie (Verzweigungsaufbau), nicht aber die Reihenfolge der Taxa von oben nach unten ins Kalkül gezogen werden.

10. Wie bestimmt man die statistische Sicherheit eines Baumes?

Eine Information über die statistische Sicherheit der einzelnen Klade eines Baumes geben die Bootstrap-Werte. Diese Werte werden an die betreffenden Knoten geschrieben (s. Abb. 5). Das Verfahren wurde von FELSENSTEIN (1985) erstmals für phylogenetische Berechnungen angewendet. Es beruht darauf, dass aus einem vorhandenen Datensatz viele zufällige Stichproben gezogen werden, die jeweils zu einem Baum verrechnet werden. 1000 Wiederholungen sind hier ein üblicher Wert. Kommt eine bestimmte Verzweigung (Klade/Kluster) in allen Wiederholungen vor, hat sie einen Bootstrapwert von 100% und damit eine hohe Sicherheit. Die Bewertung niedrigerer Bootstrap-Werte ist leider nicht einheitlich, hängt aber auch von der untersuchten DNA-Region ab.

11. Ersetzen DNA-Analysen den Taxonomen?

Eingangs wurde die Frage aufgeworfen, ob DNA-Analysen objektive Kriterien für eine Art-Definition liefern können. Sollte dementsprechend ein DNA-basiertes Artkonzept entwickelt werden?

Morphologische Unterschiede sind nicht immer objektivierbar, da die Umwelt einen erheblichen Einfluss auf die Ausprägung der Merkmale ausübt, so dass auch genetisch identische Individuen evtl. ganz unterschiedlich aussehen können. Dagegen sind Unterschiede in der Basensequenz der DNA zwischen 2 Taxa ein objektives Kriterium dafür, dass diese Taxa nicht identisch sind. Das Problem liegt hier in der Bewertung der Differenzen. Unterscheiden sich 2 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 2 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 man einzelne Individuen morphologischer Arten als eigene Arten betrachten müsste. 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 z.T. ökologisch deutlich unterscheiden; das ist z.B. bei *Cortinarius atrovirens* Kalchbr. und *C. ionochlorus* Maire sowie bei *Cortinarius xanthophyllus* (Cooke) Rob. Henry und *C. claroflavus* Rob. Henry der Fall. Man kann zwar nicht ausschließen, dass es sich bei diesen beiden Taxa-Gruppen womöglich nur jeweils 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, chemischer, ökologischer und ggf. von DNA-Daten zu entscheiden haben.

DANK

Für die Unterstützung bei der Erstellung der Abbildungen danken wir Michael Blum, Westerweyhe, sehr herzlich, gleichfalls Herrn Thomas Isarno, Niffer, für die Übersetzung des Textes ins Französische und Günter Saar, Lahr, für die Durchsicht des Manuskripts und wertvolle Hinweise. Die Internet-Datenbank UNITE erlaubte uns die Wiedergabe eines Screenshots ihrer Website.

Der Zweitautor dankt 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 Thomas Münzmay, Dormagen (leider im Jahr 2008 verstorben), hätte sich unser Verständnis für die Bedeutung der DNA-Analyse für die Taxonomie der Cortinarien nicht so weit entwickelt, wie dies jetzt der Fall ist.

LITERATUR

- HAESELER, A. V. & D. LIEBERS (2003), *Molekulare Evolution*, S. Fischer Verlag, Frankfurt a.M. (128 S.).
KNOOP, V. & K. MÜLLER (2009), *Gene und Stammbäume*, Ein Handbuch zur molekularen Phylogenetik, 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (386 S.).