

GEERT SCHMIDT-STOHN

***Sarcodon imbricatus* und *S. squamosus* – zwei vermischte Arten**

G. SCHMIDT-STOHN (2001): *Sarcodon imbricatus* and *S. squamosus* – two mingled species. *Boletus* 24(1), 48-53.

Abstract: The author reports and discusses a recently published article on species differentiation in *Sarcodon*. By RFLP-analysis an ecological and macromorphological differentiation within *Sarcodon imbricatus* s.l. is confirmed. *Sarcodon squamosus* is established as a species connected with *Pinus*. *Sarcodon imbricatus* is restricted to species in connection with *Picea*.

Key words: fungi, RFLP, *Sarcodon*

Einleitung

In einer Ende 1999 erschienenen Arbeit berichten JOHANNESSEN et al. (1999, hier auch weiterführende Literatur) über vergleichende morphologische und molekularbiologische Untersuchungen an Habichtspilzen, die bei Fichte bzw. Kiefer gesammelt wurden. Die Autoren vermuten, dass hier zwei Arten vorliegen, die zwar schon von J.C. SCHAEFFER unterschieden und abgebildet, in den letzten 50 Jahren aber nicht als verschiedene Arten betrachtet wurden.

Wegen seiner exemplarischen Bedeutung für die moderne taxonomische Forschung soll dieser Beitrag hier referiert, sollen die nicht jedem geläufigen neuen Labormethoden und ihre Grundlagen in sehr vereinfachter Form dargestellt und die Deutung von DNA-Analysen erläutert werden.

Zwei morphologische Sippen des Habichtspilzes

Der Habichtspilz wird in Skandinavien und anderen Ländern zum Färben von Wolle und auch als Speisepilz genutzt. Dabei wurden von Sammlern folgende Beobachtungen gemacht: bei Exemplaren, die bei Kiefer gesammelt wurden, erhält man reichlich blaugüne Farbstoffe aus frischen Fruchtkörpern,

während bei Kollektionen von Fichte allenfalls überständige Exemplare eine minimale Farbstoffausbeute ergeben.

- bei Kiefern gesammelte Exemplare sollen wesentlich schmackhafter sein als solche aus Fichtenwald.

Morphologisch unterscheiden sich Habichtspilze von Kiefern- und Fichtenstandorten durch die in Tab. 1 zusammengestellten Merkmale. Diese Unterschiede führten zu der Hypothese, dass es sich bei *Sarcodon imbricatus* s. l. um zwei verschiedene Arten handeln könnte. Hier hätten die Autoren ihren Vergleich mit der Schlussfolgerung abschließen können, dass es sich ihrer Auffassung nach um zwei Arten handelt, die in neuerer Zeit nicht unterschieden wurden. Inwiefern diese Meinung dann von anderen Mykologen akzeptiert worden wäre, hinge davon ab, wie jeder die einzelnen Trennmerkmale bewertete. Mikroskopische Unterscheidungsmerkmale wurden nicht gefunden.

DNA-Struktur

Der interessantere Teil dieser Arbeit besteht nun darin, dass die Autoren die morphologischen Befunde durch molekulargenetische Untersuchungen untermauern. Es wurde von verschiedenen Kollektionen jeweils eine Art „Genetischer Fingerabdruck“ erstellt.

Diese Technik ist einer breiteren Öffentlichkeit vor allem dadurch bekannt geworden, dass nach Sexualverbrechen der Täter aus einer größeren Anzahl Verdächtiger an Hand einer winzigen, am Tatort, am Opfer etc. aufgefundenen DNA-Probe mit hoher Wahrscheinlichkeit identifiziert werden kann. DNA (früher DNS) bedeutet „desoxyribonucleic acid“, die chemische Bezeichnung für die allen Lebewesen gemeinsame Erbsubstanz, den Träger der genetischen Information. Die DNA besteht aus einer leiterähnlichen Struktur, wobei man sich als „Holme“ die zwei schraubig gewundenen, sich gegenüber stehenden, durchlaufenden Stränge aus wechselweise angeordneten Zucker- und Phosphorsäuremolekülen vorstellen kann (siehe Abb. 1). Jeweils am Zucker sitzen als Seitenketten Basen, von denen es vier verschiedene gibt: Guanin und Cytosin sowie Adenin und Thymin, die sich aufgrund chemischer Wechselwirkungen nur in den Kombinationen GC oder AT über Wasserstoffbrücken zusammenschließen und so die beiden Stränge zur DNA-Doppelhelix verbinden.

Tabelle 1: Morphologische und DNA-Merkmale von *S. squamosus* u. *S. imbricatus*

Merkmale	bei Kiefer <i>Sarcodon squamosus</i>	bei Fichte <i>Sarcodon imbricatus</i>
Hutfarbe	gelbbraun bis weinrötlich	braun, deutlich blasser
Schuppen	schwarzbraun am Rand kleiner in Hutmitte +/- angedrückt	braun größer in Hutmitte aufgerichtet
Hutrand	lange eingerollt bleibend	bald nicht eingerollt
Hutmitte	nicht oder wenig vertieft	meist stark vertieft , z.T. trichterig vertieft u. hohl
Stiel	kurz, zugespitzt, meist höchstens so lang wie Hutbreite , oben heller	lang, zylindrische bis keulige Basis, meist länger als Hutbreite
Stacheln	schwach herablaufend kurz u. gedrängt grau, frisch z.T. graublau	nicht herablaufend ziemlich lang braun
Fleisch	weißlich, z.T. schwärzlich braun in der Stielbasis Geruch aromatisch-würzig	schmutzig weißlich-braun nicht dunkel in der Stielbasis Geruch unangenehm,
alte bzw. trockene Fruchtkörper	intensiv schwarz	heller - mehr dunkelbraun
Länge der ITS-Region der r-DNA	761 Basenpaare (BP)	752 Basenpaare (BP)
RFLP-Analyse der ITS-Region mit Restr.-enzym	5 Fragmente: 303, 221, 121, 59, 57 BP	6 Fragmente: 221, 174, 121, 120, 59, 57 BP
Variation der Basensequenz der ITS-Region	<i>Pinus</i> / <i>Pinus</i> : 0% <i>Pinus</i> / <i>Picea</i> : 3.2%	<i>Picea</i> / <i>Picea</i> : 0% <i>Picea</i> / <i>Pinus</i> : 3.2%

Die in jedem menschlichen Zellkern enthaltene DNA umfasst nach derzeitiger Kenntnisstand ca. 3 Milliarden solcher Basenpaare, die zusammen ein Molekül von ca. 1,2 m Länge ergeben. In der Molekulargenetik dient eher die Anzahl der Basenpaare (BP) als Längenmaß.

Im „Human Genom Project“ wird derzeit die gesamte Abfolge der Basen – die sog. Basensequenz – eines Menschen analysiert. Diese Sequenz wird dann aus einer spezifischen Aneinanderreihung der vier Basen G, C, A und T bestehen und wird zu mehr als 99% bei allen Menschen identisch sein. Die Unterschiede zwischen den Menschen beruhen also auf dem restlichen Anteil, der aber bei 1% 30 Millionen, bei 0,1% immer noch 3 Millionen unterschiedliche Basenpaare ausmachen würde. Die Konsequenz daraus ist, dass von den z.Z. ca. 6 Milliarden Menschen kein einziger – wegen Mutationen auch eineiige Zwillinge nicht – einem anderen in seiner Basensequenz vollkommen gleicht. Diese Unterschiede nutzt man beim „Genetischen

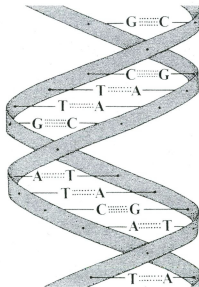


Abb. 1: DNA-Doppelhelix mit den Basen A, T, G u. C und Wasserstoffbrücken (.....)

Fingerabdruck“ aus. Den Test kann man sowohl zum Nachweis der Übereinstimmung als auch der Verschiedenheit benutzen.

Im Übrigen ist die Erbsubstanz weniger hoch entwickelter Lebewesen, wie z. B. die der Pflanze, im Prinzip genauso aufgebaut und muss auch nicht wesentlich kürzer als die des Menschen sein. Auch hier gibt es die beschriebenen Unterschiede in der Basensequenz, die zur Charakterisierung von Individuen, Arten, Gattungen oder auch höherer Taxa dienen können. Natürlich kann man für eine einzelne Fragestellung nicht jeweils die gesamte DNA-Sequenz untersuchen! Zur Untersuchung sucht man sich aus der gesamten DNA eines Individuums je nach Problemstellung bestimmte Sequenzen heraus.

DNA-Analysen

Im vorliegenden „Fall“ der Habichtspilze wurde so verfahren, dass von 9 Kollektionen bei Fichte und 11 Kollektionen bei Kiefer ein ganz bestimmter DNA-Abschnitt näher untersucht wurde. Es handelt sich hier um einen ca. 750 Basenpaare langen Abschnitt der ribosomalen DNA, die sog. „ITS-Region“. Die r-DNA ist für die Struktur und Funktion der Ribosomen verantwortlich, kleine, im Lichtmikroskop nicht sichtbare Partikel, die die Eiweißsynthese in der Zelle ermöglichen. Die ITS-Region zeichnet sich dadurch aus, dass ihre Basensequenz nach bisherigen Untersuchungen an verschiedenen Taxa innerartlich eine recht geringe, zwischenartlich jedoch eine recht hohe Variabilität ihrer Basensequenz besitzt. Diese Tatsache macht diese Region der DNA besonders geeignet für derartige Untersuchungen.

Das erste Ergebnis: bei allen 9 *Picea*-Herkünften war dieser Abschnitt 752 BP, bei allen 11 *Pinus*-Herkünften 761 BP lang, sicher schon ein Indiz für die Verschiedenheit dieser beiden Sippen.

Der nächste Schritt: Die DNA wird mit sog. Restriktionsenzymen behandelt. Das sind Enzyme – meist aus Bakterien gewonnen –, die ganz bestimmte Basensequenzen erkennen und die DNA dann an definierten Stellen spalten können. Lässt man solche En-



Abb. 2: *Sarcodon squamosus* im flechtenreichen Kiefernwald, Lyckeasand auf Öland (Schweden), 11.10.1996, Fung.-Nr. 96/162. Foto: G. SCHMIDT-STOHN



Abb. 3: *Sarcodon imbricatus* im Fichtenwald, Achensee/Schweinau (Österreich), 1.9.1998, Fung.-Nr. 98/142. Foto: G. SCHMIDT-STOHN

zyme auf die DNA der ITS-Region verschiedener Sippen des Habichtspilzes einwirken, dann erhält man bei allen 11 *Pinus*-Herkünten 5 Spaltprodukte bzw. Bruchstücke verschiedener Länge, bei allen 9 *Picea*-Herkünten dagegen ein Muster mit 6 Bruchstücken (vgl. Tab. 1). Diese Fragmente können mit Hilfe der Elektrophorese getrennt werden und stellen, als charakteristisches Muster von Bändern oder Zonen sichtbar gemacht, einen sog. „Genetischen Fingerabdruck“ dar. Diese Ergebnisse lassen zum einen auf eine große Ähnlichkeit der Basensequenzen innerhalb der Herkünfte, zum anderen auf Verschiedenheit zwischen den Herkünften schließen. Diese sog. RFLP's (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen) sind in den letzten Jahren wichtige Werkzeuge der Taxonomie geworden, um damit die genetische Distanz von Lebewesen quantitativ zu erfassen.

Der letzte, methodisch aufwendigste Schritt: es wurde die genaue Basensequenz von 5 der 9 *Picea*-begleitenden und von 7 der 11 *Pinus*-begleitenden Habichtspilze analysiert. Innerhalb der *Pinus*- bzw. *Picea*-Herkünfte zeigten sich dabei nicht die geringsten Unterschiede! Alle 5 *Picea*-Begleiter zeigten also dieselbe Abfolge von G, C, A und T in dem 752 BP umfassenden Abschnitt, ebenso waren die 7 *Pinus*-Begleiter in ihrem 761 BP langen Abschnitt identisch. Dieses Ergebnis war unabhängig vom ursprünglichen Fundort der verglichenen Aufsammlungen! Auch wenn Funde von 400 km auseinander liegenden Orten verglichen wurden, ergaben sich keine Unterschiede – eine glänzende Bestätigung dafür, dass die entsprechenden Sequenzen innerartlich sehr konservativ, d.h. wenig variabel sind. Eine rein zufällige Übereinstimmung ist bei über 700 Basen extrem unwahrscheinlich.

Wurden jedoch die Basensequenzen von *Picea*- und *Pinus*-Herkünten miteinander verglichen, ergaben sich in allen untersuchten Fällen Unterschiede in Höhe von 3,2 %, entsprechend etwa 25 Basen. Dieses Ergebnis war wiederum unabhängig von der Entfernung zwischen den Fundorten, die minimal 300 m, in anderen Fällen viele Kilometer betrug.

Schlussfolgerungen, Diskussion

- die *Picea*- und *Pinus*-Herkünfte unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer morphologischen Merkmale, ihre Verschiedenheit wird durch die DNA-Analysen bestätigt.

- innerhalb desselben Waldgebietes existieren *Picea*- und *Pinus*-Populationen des Habichtspilzes, die sich nicht untereinander kreuzen (ansonsten hätte man mit den DNA-Analysen Zwischenformen finden müssen!).

- die untersuchten DNA-Sequenzen sind innerartlich wenig variabel, da sonst auf eine größere geographische Distanz der Fundorte gewisse Unterschiede in der Basensequenz zu erwarten gewesen wären.

Vergleicht man die morphologischen und die DNA-Merkmale und bewertet ihre Bedeutung, dann ist festzustellen, dass Makromerkmale wie Farbe, Form, Größe etc. Merkmale sind, die innerhalb z.T. weiter Grenzen variieren und deshalb schwer zu objektivieren sind. Weniger variabel und deshalb eher objektivierbar sind die Mikromerkmale, woraus ihre große Bedeutung für die taxonomische Mykologie resultiert.

Demgegenüber erlauben die hier verwendeten DNA-Merkmale klare, objektive Entscheidungen. Einerseits gibt es keine Unterschiede in Länge und Sequenz der DNA-Abschnitte innerhalb verschiedener *Picea*- und *Pinus*-Herkünfte, d.h. jede der beiden Sippen ist in sich hinsichtlich dieses Merkmals vollkommen einheitlich. Andererseits ergeben sich beim Vergleich von *Picea*- und *Pinus*-Herkünten die dargestellten Sequenzunterschiede, d.h. jede untersuchte Kollektion lässt sich auf Grund ihrer DNA-Sequenz eindeutig einer der beiden Sippen zuordnen. Damit ist hier die höchste Objektivität eines Merkmals erreicht.

Ergänzen sich nun – wie in diesem Fall – Makro- und DNA-Merkmale, dann ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich hier um zwei verschiedene Arten handelt. Die Unterschiede zwischen Kollektionen, die mit verschiedenen Bäumen vergesellschaftet sind, aber in demselben Waldgebiet recht nahe beieinander wachsen, sind nämlich ein gewichtiges Indiz dafür, dass ein genetischer Austausch

zwischen diesen Populationen nicht stattfindet.

Zusammenfassung

Zwischen den *Picea*- und *Pinus*-Herkünten des Habichtspilzes scheint es nach den DNA-Analysen in der Natur keine Kreuzungen zu geben, zusammen mit den morphologischen Unterschieden ein gewichtiger Grund, hier zwischen zwei Arten zu unterscheiden:

Sarcodon squamosus (SCHAEFF.) QUÉL. bei Kiefer s. Abb. Frontseite und Abb. 2 S. 51; ausgewählte Abb.: CHRISTENSEN (1999: S.34), PHILLIPS (1982 S. 242) – beide als *S. imbricatus*.

Sarcodon imbricatus (L.: FR.) P.KARST. bei Fichte s. Abb. 3; ausgewählte Abb.: BREITENBACH & KRÄNZLIN (1986 Abb. 275), DÄHNCKE (1993: S. 1045), MAAS GEESTERANUS (1975: T. 26a), MOSER & JÜLICH (1985 – V *Sarcodon* 1 u. 2).

Anmerkung

DANELL et al. (1994) publizieren 2 Farbfotos von Sippen unter Fichte und Kiefer, deren Zuordnung nach morphologischen Merkmalen nach dem hier vorgestellten Konzept nicht möglich ist. Das Foto der Kiefersippe entspricht voll *S. imbricatus* ss. str. von Fichte, das Foto der Fichtensippe eher *S. squamosus* von Kiefer. Eine Verwechslung

der Abb. beim Druck ist wegen der abgebildeten Kiefernadeln auszuschließen. Möglicherweise ist es bei der Aufnahme, die nicht am Standort gemacht sondern später zusammengestellt wurde, zu einer Verwechslung gekommen. Es fällt auf, dass diese Arbeit in dem hier referierten Artikel nicht zitiert wird, obwohl doch zwei Autoren (DANELL u. LUNDMARK) an beiden Publikationen beteiligt sind. Hier wäre eine Überprüfung wünschenswert.

Danksagung

Herrn PETER STEINDL danke ich für die Durchsicht und Korrektur des Manuskriptes und für nützliche Hinweise.

Literatur

- BREITENBACH, J., & F. KRÄNZLIN (1986): Pilze der Schweiz Band 2. – Luzern.
 CHRISTENSEN, M. (1999): Saisonens art. – *Svampe* 40, 34-35.
 DÄHNCKE, R. M. (1993): 1200 Pilze in Farbfotos. – Aarau.
 DANELL, E., Å. STRÖM, H. LUNDMARK, & H. MARKLUND (1994): *Sarcodon imbricatus* – två arter? – *Jordstjärnan* 15(3), 57-59 + 3. Umschlagseite.
 JOHANNESSEN, H., S. RYMAN, H. LUNDMARK, & E. DANELL (1999): *Sarcodon imbricatus* und *S. squamosus* – two confused species. – *Mycol. Res.* 103, 1447-1452.
 MAAS GEESTERANUS, R.A. (1975): Die terrestrischen Stachelpilze Europas. – Amsterdam, London.
 MOSER, M., & W. JÜLICH (1985): Farbatlas der Basidiomyceten. – Stuttgart/Heidelberg.
 PHILLIPS, R. (1982): Das Kosmosbuch der Pilze. – Stuttgart.

Anschrift des Verfassers

Dr. G. SCHMIDT-STOHN, Burgstraße 25/Wichmannsburg, D-29553 Bienenbüttel
 E-Mail: geert.schmidt-stohn@t-online.de