

Universität Kassel  
Fachbereich 10 Mathematik und Naturwissenschaften  
Fachgebiet Ökologie

---

# Morphologisch-phylogenetische Analyse der Pilzgattung *Myxarium*

F7 Forschungsmodul Ökologie/Mykologie

---

Studienarbeit  
Verfasser: Thomas Kallnbach (M.Sc. Biologie)

Studienschwerpunkt 2 Biodiversität und Evolutionsbiologie  
Wintersemester 2022/23

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung: Theoretische Hintergründe.....	1
1.1	Systematische Position & morphologische Merkmale .....	1
1.2	Die Gattung <i>Myxarium</i> .....	1
1.3	Systematik der Pilze und DNA-basierte Methoden.....	4
2.	Methoden und Anwendungen.....	6
2.1	Systematische Position und Artenzahl von <i>Myxarium</i> .....	6
2.2	Substratpräparation für Lichtmikroskopie .....	6
2.3	Biometrische Messungen.....	7
2.4	Generierung von DNA-Sequenzdaten .....	7
2.5	Bearbeitung der DNA-Sequenzen & Qualitätskontrolle.....	10
2.6	Erstellen eines DNA-Sequenz-Datensatzes .....	10
2.7	Mehrfacher Sequenzabgleich.....	10
2.8	Phylogenetische Analyse.....	11
3.	Ergebnisse.....	11
1.1	Größe der untersuchten Pilzgattung.....	11
1.2	Statistische Auswertung der biometrischen Messungen.....	11
1.3	Nukleotid-BLAST-Suche/Qualitätskontrolle.....	14
1.4	Gemeinsamer DNA-Sequenz-Datensatz.....	15
1.5	Phylogenetische Stammbäume .....	16
4.	Diskussion und Schlussfolgerungen.....	19
5.	Literaturverzeichnis .....	22
6.	Anhang.....	25

# 1. Einführung: Theoretische Hintergründe

## 1.1 Systematische Position & morphologische Merkmale

Die Pilzgattung *Myxarium* Wallr., Fl. Crypt. Germ. (Norimbergae) 2: 260 (1833) ist der Ordnung *Auriculariales* sowie der Familie *Hyaloriaceae* innerhalb der Klasse der *Agaricomycetes* (Stamm: *Basidiomycota*) zuordenbar (s. Index Fungorum: [www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org)).

Bei den *Auriculariales* handelt es sich ausschließlich um Weißfäule verursachende, holzzersetzende Pilze, welche makromorphologisch unterschiedliche Formen an Basidiokarpe ausbilden können (Abbildung 1), darunter effuse (*Exidiopsis*, *Basidiodendron*), effuso-reflexe (*Eichleriella*), odontoide (*Stypella*), hydnoide (*Pseudohydnum*) und infundibuliforme (*Tremiscus*) Basidiokarpe (HIBBET ET AL. 2014).



Abbildung 1: Beispiele für hydnoide (c; *Pseudohydnum gelatinosum*) und gallertartig-effuse (d; *Exidia truncata*) Basidiokarpe der *Auriculariales* (HIBBET ET AL. 2014).

Zu den mikromorphologischen Hauptmerkmalen der *Auriculariales* werden Doliporen mit durchgehenden Parenthesen und die Fähigkeit zur Bildung von Ballistokonidien gezählt - mit Ausnahme von *Hyaloria pilacre*, sind alle Arten ballistosporisch (HIBBET ET AL. 2014). Der Großteil der bekannten Arten besitzt längs septierte Basidien, welche sich durch das Vorhandensein eines plasmalfreien Stiels (myxarioide, sphaeropedunculate Basidien) und einem vierzelligen (selten zweizelligen) apikalen Segments definieren (HIBBET ET AL. 2014, SPIRIN ET AL. 2019). Innerhalb der mikroskopischen Merkmale zeigen sich des Weiteren Schnallen mit charakteristischen retroreszenten Fortsätzen (sog. Spornschnallen) als auch die Fähigkeit der Basidiosporen zur Bildung von meist halbmondförmigen Mikrokonidien auf kurzen sterigmalen Fortsätzen (HIBBET ET AL. 2014). Die meisten Arten der *Auriculariales* sind sogenannte Gelee-Pilze, die durch ihre gallertartige Konsistenz in der Lage sind, Perioden der Trockenheit in einem Zustand der Kryptobiose zu überdauern, indem der Wassergehalt der Basidiokarpe drastisch reduziert wird und diese wieder wachsen und sporulieren, wenn sie die nötige Feuchtigkeit erhalten (HIBBET ET AL. 2014). Die Ordnung der *Auriculariales* nimmt phylogenetisch in Stammbäumen für Hauptgruppen der *Agaricomycetes* und anderer *Basidiomycota* (Abbildung 2) eine basale Position ein – die Gattungen innerhalb dieser Ordnung können daher als evolutionär älter angesehen werden.

## 1.2 Die Gattung *Myxarium*

### Morphologische Merkmale

Die meisten Arten innerhalb der *Auriculariales* mit gemeinsamem Auftreten der morphologischen Merkmale eines effus-resupinaten Basidiokarps und sphaeropedunculater Basidien sind der Gattung *Myxarium* zugehörig – jene sind verwandt mit dem Gattungstyp *Myxarium nucleatum* Wallr., Fl. crypt. Germ. (Norimbergae) 2: 260 (1833) (SPIRIN ET AL. 2019). Nur eine Minderheit der zugehörigen Arten besitzen cerebriforme, addressed-orbicular oder *Exidia*-ähnliche Basidiokarpe (SPIRIN ET AL. 2019).

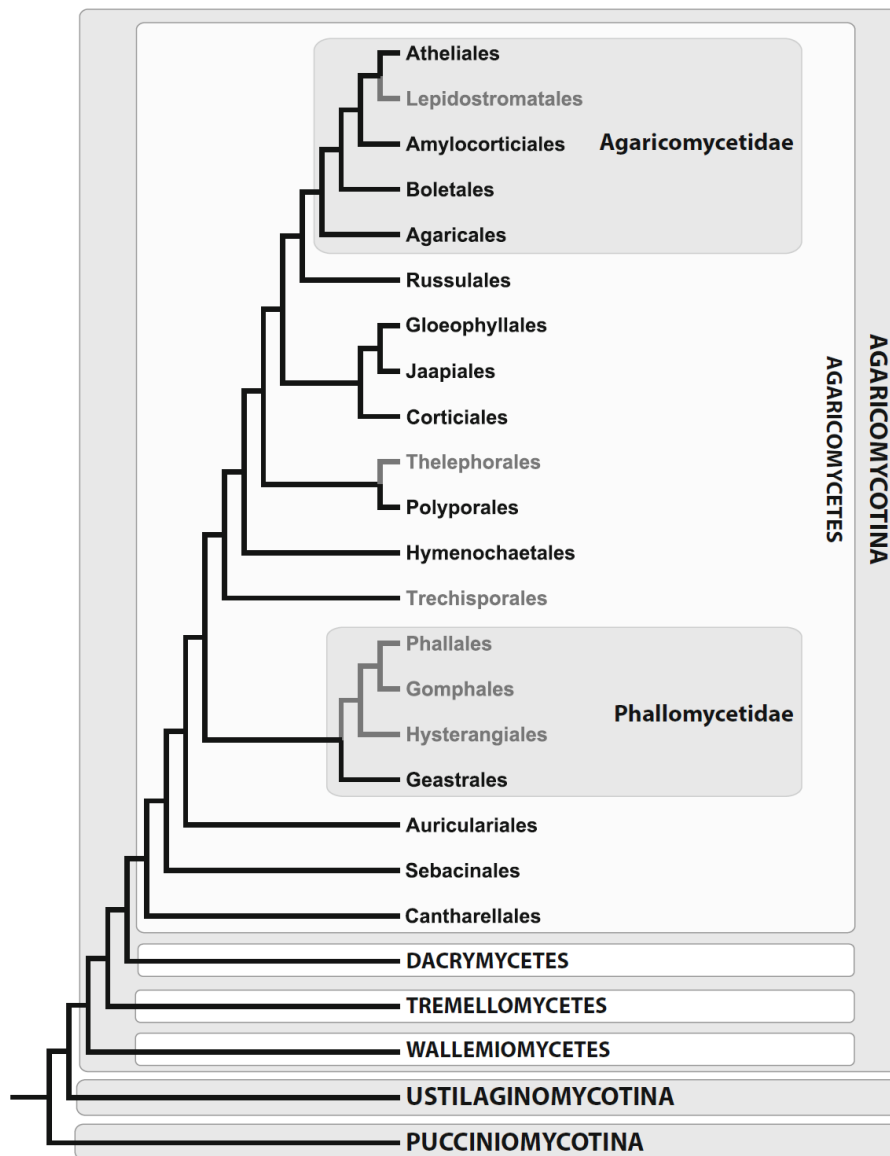


Abbildung 2: Phylogenetische Beziehungen auf höherer Ebene von Hauptgruppen der *Agaricomycetes* und anderer *Basidiomycota* (HIBBET ET AL. 2014).

Entscheidend für die morphologische Identifizierung sind Konsistenz, Form und Hyphenkonfiguration, da diese artspezifisch variieren (SPIRIN ET AL. 2019). Insbesondere die Fruktifikation einiger Arten lässt sich gut als abgrenzendes morphologisches Merkmal definieren, da hier zunächst kleine pustelförmige Ausbuchtungen auf der Oberfläche des Basidiokarps entstehen, die nach einiger Zeit teilweise miteinander verschmelzen (SPIRIN ET AL. 2019).

### Morphologisch-systematische Studien über die letzten Jahrzehnte

Die Gattung *Myxarium* ist erstmals 1833 mit der Art *Myxarium nucleatum* durch den deutschen Mykologen Wallroth etabliert worden (WALLROTH 1833, HAUERSLEV 1993). Eingehender beschrieb Wells 1964 die Morphologie dieser spezifischen Art durch die Anwesenheit sphaeropedunculater Basidien mit einem terminalen globulären Abschnitt, welcher durch ein Septum ohne Schnalle vom stielartigen Basidienende getrennt ist – einige Zeit später ist 1966 dieser Basidienaufbau von Donk als „myxarioid“ deklariert worden (HAUERSLEV 1993). Der erste Bestimmungsschlüssel zu acht in Europa bekannten *Myxarium* Arten wurde 1984 von Jürich veröffentlicht (HAUERSLEV 1993).

Das Vorkommen myxarioider Basidien wird als bedeutender Marker in modernen phylogenetischen Konzepten der *Auriculariales* angesehen (WEISS & OBERWINKLER 2001). Roberts wies dieses Konzept jedoch 1998 zurück und übertrug die Typusart von *Myxarium* (*M. nucleatum*) aufgrund bestimmter Merkmale innerhalb der Fruchtkörper-Morphologie der Gattung *Exidia* (WEISS & OBERWINKLER 2001). Seit 2001 hat sich herausgestellt, dass *Myxarium* einige morphologische Gemeinsamkeiten mit der Gattung *Exidia* teilt, beide jedoch nicht eng miteinander in Verwandtschaft stehen – sie gehören zwei unterschiedlichen Abstammungslinien in der Ordnung der *Auriculariales* an (SPIRIN ET AL. 2017).

Morphologische und auf DNA-Analysen stützende Daten, haben gezeigt, dass repräsentative Vertreter mit effusum Basidiokarp innerhalb der *Auriculariales* mit sphaeropedunculaten Basidien zu insgesamt elf Gattungen gehören (SPIRIN ET AL. 2019). *Myxarium* gilt dabei als die größte Gattung unter ihnen (SPIRIN ET AL. 2019). Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Ergebnissen von WEISS UND OBERWINKLER 2001 überein (SPIRIN ET AL. 2019).

### Vergangene und aktuelle Studien zur molekularen Systematik

Durch molekulare Belege innerhalb von WEISS & OBERWINKLER 2001, sind myxarioide Basidien nicht nur bei *Myxarium*-, sondern unter anderem auch bei *Stypella*-, *Pseudohydnum*- und *Tremiscus*-Arten ein konstant auftretendes Merkmal. Gesammelte Daten aus *Neighbour-Joining*-Analysen mit dem LSU-Marker aus jener wissenschaftlichen Publikation konnten aufzeigen, dass myxarioide Basidien konsequent nur bei Taxa zu finden sind, die entweder konsekutive Zweige basal zur *Exidia/Auricularia*-Gruppe bilden oder innerhalb einer gut unterstützten Gruppe (Bootstrap-Wert von 100 %), bestehend aus der Gattung *Myxarium*, erweitert um *Hyaloria pilacre*, vorkommen (WEISS & OBERWINKLER 2001).

Bis 2017 sind ausnahmslos alle europäischen *Exidia*-ähnlichen Pilze mit sphaeropedunculaten Basidien als zur Art *Myxarium nucleatum* angehörig angesehen worden (SPIRIN ET AL. 2017). Wie aus neueren, mitunter molekularen (*Internal transcribed spacer* (ITS), *nuclear ribosomal large subunit* (nrLSU), *translation elongation factor 1 $\alpha$*  (TEF1)) Sequenznachweisen aus SPIRIN ET AL. 2017 hervorging, sollte das Konzept von *Myxarium nucleatum* stattdessen aufgrund klarer abweichender DNA-Sequenzen, zusätzlicher morphologischer Unterschiede, differenzierter Wirts-Präferenzen sowie geographischer Aufteilungen jedoch die vier Arten *M. cinnamomescens*, *M. hyalinum*, *M. nucleatum* und *M. populinum* in den nordischen Breitengraden umfassen. Erzeugte phylogenetische Bäume ließen erkennen, dass diese vier *Myxarium*-Arten mit den ausschließlich effuscorticoiden, nicht gallertartigen Arten *M. grilletii* und *M. subhyalinum* vermischt sind (SPIRIN ET AL. 2017). Hierdurch ergaben sich erste Hinweise darauf, dass sich exidioide Basidiokarpen evolutionstechnisch unabhängig voneinander innerhalb mehrerer Linien in der Gattung *Myxarium* entwickelt haben (SPIRIN ET AL. 2017). Darüber hinaus haben phylogenetische Studien seit 1999 zeigen können, dass mehrere, eher entfernt verwandte Linien innerhalb der *Auriculariales* vorkommen, welche Taxa mit dem morphologischen Merkmal sphaeropedunculat Basidien miteinbeziehen (SPIRIN ET AL. 2019).

Eine aktuelle Aufklärung über die phylogenetisch-molekularen Zusammenhänge der Arten innerhalb der Gattung *Myxarium* fand in SPIRIN ET AL. 2019 anhand eines 54 Sequenzen großen nrITS-Datensatzes statt. Durch die Vereinigung identischer Gesamttopologien von *Maximum-Likelihood*- und nach Bayes'scher Interferenz aufgelösten Stammbäumen, ergaben sich insgesamt 16 stark unterstützte Kladen (Abbildung 3) (SPIRIN ET AL. 2019).

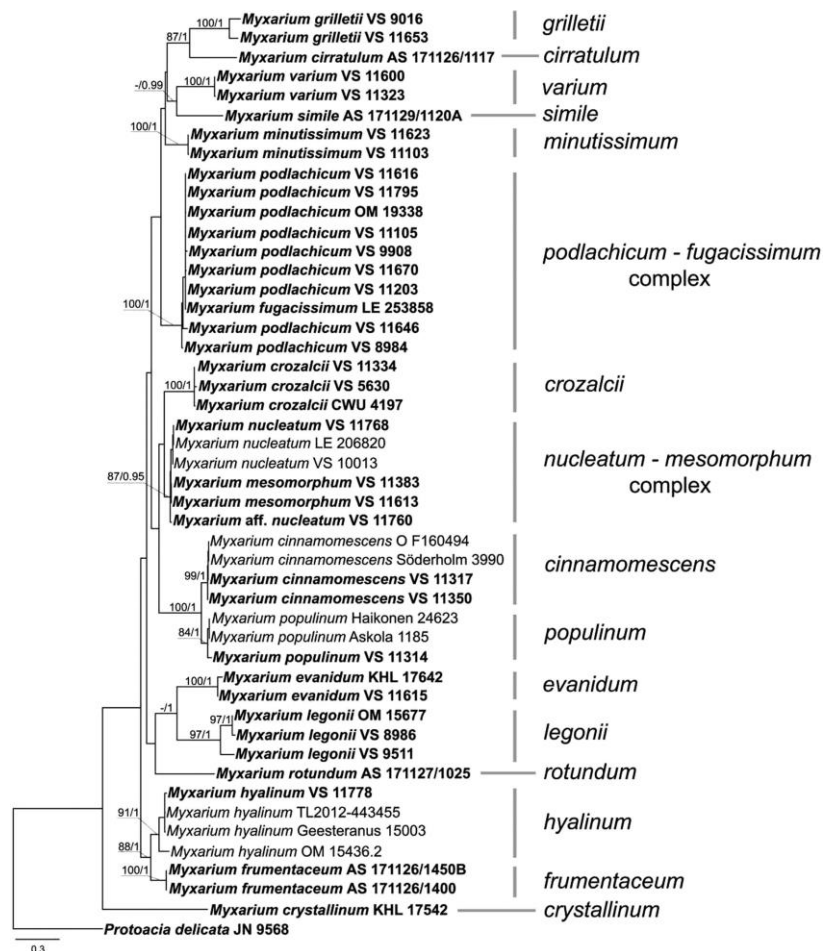


Abbildung 3: Am höchsten aufgelöster Stammbaum aus der *Maximum-Likelihood*-Analyse für den nrITS-Datensatz, der aktuelle phylogenetische Beziehungen von *Myxarium*-Arten zeigt; Unterstützungswerte (*Maximum-Likelihood* / Bayes'sche Interferenz) sind für die Zweige angegeben (SPIRIN ET AL. 2019).

### 1.3 Systematik der Pilze und DNA-basierte Methoden

#### ITS-Region der nrDNA als Barcode

Neben dem Auslesen von phänotypischen Pilzmerkmalen, nimmt vor allem die Identifikation auf molekularer Ebene aufgrund universeller Anwendbarkeit, dem zügigen Erhalt von Ergebnissen und der Annahme, es könne hierdurch taxonomisches Fachwissen ersetzt werden, einen immer größeren Stellenwert ein (LÜCKING ET AL. 2020). Zur Identifikation von Pilzen auf Artenebene, ist die ITS-Region (*Internal-transcribed-spacer*) der nrDNA als Barcode am nützlichsten (RAJA ET AL. 2017). Zum einen, da es sich hierbei um den sich im Laufe der Evolutionsgeschichte am schnellsten entwickelnden Teil des rRNA Cistrons handelt (RAJA ET AL. 2017). Zum anderen kann die pilzliche ITS-Region sehr einfach amplifiziert, sowie sequenziert werden und lässt eine akzeptable Auflösung in der Anwendbarkeit und Bestimmung für einen Großteil aller Pilztaxa zu (LÜCKING ET AL. 2020). Aufgrund der weiten Verbreitung im Umgang mit der ITS-Region unter Mykologen, der einfachen Amplifikation und der angemessen großen Differenz zwischen interspezifischer und infraspezifischer Variation (*barcode gap*), wird diese Region derzeit als offizieller Barcode für Pilze angesehen (RAJA ET AL. 2017). Vorteilhaft ist dahingehend zudem die Tatsache, dass ribosomale Gene oft als Tandemwiederholungen vorliegen, wohingegen Protein-kodierende Gene (z. B. jene für Sekundärmetabolite) oft nicht nur schwierig zu amplifizieren und sequenzieren sind, sondern auch nur als einzige Kopie innerhalb des Genoms vorliegen (RAJA ET AL. 2017).

Es liegen jedoch auch Einschränkungen bei der Verwendung der ITS-Region vor. Die ITS-Region kann möglicherweise nicht für alle untersuchten Pilze amplifiziert werden - ein Problem, welches die Methodik weniger beschränkt (LÜCKING ET AL. 2020). Bei einigen hochspezialisierten, sich vor allem durch die Produktion von für die Naturstoffforschung wichtigen Sekundärmetaboliten auszeichnenden Gattungen (u. a. *Aspergillus* oder *Penicillium*), gestaltet sich die molekulare Bestimmung der Arten über den ITS-Marker oft als schwierig, da diese Taxa enge oder keine Barcode-Lücken aufweisen (RAJA ET AL. 2017). Dennoch ist hierbei der Erfolg zur Sequenzierung im Durchschnitt besser als bei der Verwendung anderer möglicher artbestimmender Marker (LÜCKING ET AL. 2020). Wichtigere Vorbehalte existieren in Bezug auf den Mangel an Auflösung in der amplifizierten ITS-Region und das mögliche Auftreten nicht-homologer ITS-Kopien im Genom (LÜCKING ET AL. 2020). Um jene Unsicherheiten zu relativieren bzw. vollständig zu bereinigen, kann auf sekundäre *Barcoding*-Marker wie z. B. der *Intergenic-spacer* (IGS) oder der *Translational-elongation-factor 1a* (TEF1) zurückgegriffen werden (LÜCKING ET AL. 2020). Pilzlinien, die im Verlauf der Evolution hochspezifische Lebensstrategien wie Parasitismus entwickelt haben, durchlaufen beobachtbaren Mustern zufolge schnelle und komplexe Speziationen, welche sich nicht unmittelbar in der ITS widerspiegeln müssen, auch wenn dieser Teil des rRNA Cistrons im Verlauf der Zeit schnelle Abwandlungen durchläuft (RAJA ET AL. 2017, LÜCKING ET AL. 2020). Wesentlich kritischer als eine mögliche unzureichende Auflösung, sind Hinweise zur intragenomischen Variation der ribosomalen DNA-Cistrons, welche auch die ITS-Region beinhalten – insbesondere die Erzeugung nicht-homologer diskreter ITS-Varianten kann zu widersprüchlichen molekularen Identifizierungen führen (LÜCKING ET AL. 2020).

### Phylogenetische Beziehungen zwischen Organismen

Um auf phylogenetische Beziehungen bzw. Inferenzen unter Verwendung von Sequenzdaten zwischen Organismen zu schließen, werden aktuell im Allgemeinen hauptsächlich die Methoden *Distance-Matrix*, *Maximum-Parsimony*, *Maximum-Likelihood* und *Bayesian-Inference* verwendet (YANG & RANNALA 2012). Um jene Sequenzdaten zu beschreiben, verwenden Berechnungsmodelle für *Distance-Matrix*, *Maximum-Likelihood* und *Bayesian-Inference* ein Substitutionsmodell, stützen sich also daher auf modellbasierte Annahmen, während *Maximum-Parsimony* kein explizites Modell innehat und somit als implizit zu verstehen ist (YANG & RANNALA 2012).

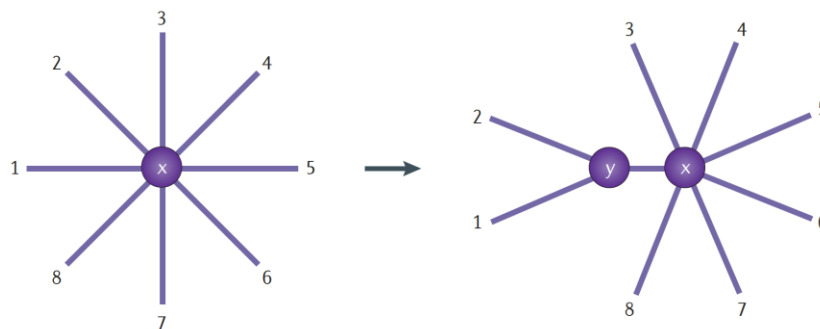


Abbildung 4: Schema des divisiven *Neighbour-Joining*-Cluster-Algorithmus (YANG & RANNALA 2012). Ein sternförmiger Baum wird vorgelegt, anschließend werden zwei Knoten miteinander verbunden (Knoten y). Das Resultat ist die Reduktion der Anzahl von Knoten an der Wurzel (Knoten x). Dieser Ablauf wiederholt sich, bis der Stammbaum vollständig aufgelöst scheint.

Über eine *Distance-Matrix* Methode werden paarweise Sequenzabstände unter Annahme eines Markov-Kettenmodells der Nukleotid-Substitution berechnet (YANG & RANNALA 2012). Das in diesem Zusammenhang am häufigsten genutzte Modell zur Entfernungsberechnung ist der Cluster-Algorithmus *Neighbour-Joining*, welcher zu Beginn einen Sternbaum erstellt und basierend auf den Abständen von Taxa so lange Paare zum Zusammenfügen auswählt, bis ein vollständig aufgelöster Stammbaum entsteht – jedes zu verbindende Taxon-Paar wird dabei jeweils derart ausgewählt, dass die vermutete Baumlänge möglichst minimiert wird (YANG & RANNALA 2012).

Die *Maximum-Parsimony* Methode ist darauf ausgelegt, Merkmalszustände dem inneren Knoten zuzuordnen, um die Anzahl von Abweichungen in einem phylogenetischen Stammbaum zu minimieren, der maximale *Parsimony*-Baum ist somit jener Stammbaum, welcher die Baumbewertung minimiert (YANG & RANNALA 2012). Die Länge eines Merkmals stellt dabei die minimale Anzahl an Abweichungen dar, welche an dieser Stelle erforderlich ist, die *Parsimony*-Baumbewertung ist die Summe der Merkmalslängen über alle berechneten Stellen (YANG & RANNALA 2012). Ursprünglich ist die *Maximum-Parsimony*-Methode entwickelt worden, um diskrete morphologische Merkmale zu analysieren (YANG & RANNALA 2012). Beginnend mit den späten 1970er Jahren ist die *Parsimony*-Methode auch für molekulare Daten verwendet worden und wird seit jeher aufgrund der Vermutung, sie sei frei von Annahmen, vernünftiger Ergebnisse und rechnerische Effizienz üblicherweise verwendet (YANG & RANNALA 2012).

Als Grundlage, ist die *Maximum-Likelihood*-Methode entwickelt worden, um statistisch unbekannte Parameter in einem Modell zu schätzen (YANG & RANNALA 2012). Die *Likelihood*-Funktion ist als Wahrscheinlichkeit der fixierten, beobachteten Daten bei gegebenen Parametern definiert, die *Maximum-Likelihood*-Schätzungen (MLEs) der Parameter sind jene Parameterwerte, die die Wahrscheinlichkeit maximieren (YANG & RANNALA 2012). Um das volle Potential der *Maximum-Likelihood*-Methode ausschöpfen zu können, ist eine hohe Rechenleistung und die Entwicklung realistischer Sequenzmodelle nötig gewesen (YANG & RANNALA 2012). Zwei Optimierungsschritte sind in der *Maximum-Likelihood*-Baumschätzung integriert: die Suche nach dem Stammbaum mit den höchsten *Likelihood*-Werten und die Optimierung der Zweiglängen zur Berechnung der Baumbewertung für jeden möglichen Baum (YANG & RANNALA 2012).

Unter *Bayesian-Inference* versteht man eine allgemeine Methodik der statistischen Inferenz (YANG & RANNALA 2012). Im Gegensatz zur *Maximum-Likelihood*-Methode, sind die Parameter im Modell Zufallsvariablen mit statistischen Verteilungen, während sie bei maximaler Wahrscheinlichkeit unbekannte feste Konstanten darstellen (YANG & RANNALA 2012). Zu Beginn der Daten-Analyse wird den Parametern eine vorherige Verteilung zugewiesen, die mit den Daten (oder der Wahrscheinlichkeit) kombiniert wird, um die *Posterior-Distribution* zu generieren (YANG & RANNALA 2012).

## 2. Methoden und Anwendungen

### 2.1 Systematische Position und Artenzahl von *Myxarium*

Um einen Überblick über die taxonomische Ordnung der Gattung *Myxarium* zu erhalten, ist Index Fungorum verwendet worden. Innerhalb dieser Datenbank war es möglich, die aktuelle Größe der untersuchten Pilzgattung zu definieren bzw. die Arten zu identifizieren, welche als derzeitige Mitglieder der Gattung betrachtet werden.

### 2.2 Substratpräparation für Lichtmikroskopie

Zur Herstellung mikroskopischer Präparate der verschiedenen *Myxarium*-Proben, ist eine sanfte Präparationsnadel, ähnlich einer Insulinspritze, verwendet worden. Mit Hilfe dieser Nadel ist jeweils ein Stück Substrat, d. h. abgestorbenes Pflanzenmaterial, gemeinsam mit einem dünnen corticoiden Fruchtkörper entnommen worden. Jene kleinen Stücke von getrockneten Herbariums-Proben wurden je in einem Volumenverhältnis von 3:1 in einen Tropfen 3%iger, wässriger Kaliumhydroxidlösung (KOH) mit 1%iger, wässriger Phloxinlösung gemischt. Um einzelne Strukturen wie subikuläre/subhymeniale Hyphen, Zystidien (falls vorhanden), Basidien sowie Basidiosporen besser voneinander trennen zu können, ist nach Auflegen des Deckglases durch leichtes Drücken mit einem stumpfen Gegenstand, das Substrat auseinander gequetscht worden.



## 2.3 Biometrische Messungen

Bei 1000facher Vergrößerung sind mit Hilfe eines Okularmikrometers Länge und Breite von Basidiosporen (N = 30) und Basidien (N = 10) gemessen worden (Tabelle 9-Tabelle 13). Dabei wurde stets darauf geachtet, dass reife, optisch gut fokussierte Sporen mit intakter Zellwand sowie reife Basidien mit sichtbaren Sterigmata für die Messung ausgewählt wurden. Da es sich hier um myxarioide Basidien handelt, bei denen der untere, stielförmige Teil von dem oberen Teil durch eine Querwand abgetrennt ist, ergaben sich die Messwerte zu Basidienlängen durch den Abstand von der Basalscheidewand zum Apex, ohne Sterigmata.

Die so erhaltenen Messungen von Sporen und Basidien sind anschließend in dem Programm „Statistische Messreihen-Auswertung für Fungi V.3.1“ (Smaff) zusammengefasst worden (Tabelle 5 & Tabelle 6), um aussagekräftige Daten zur statistischen Auswertung zu erhalten. Durch die innerhalb des Programms standardmäßig verwendeten drei alternativen Tests V (VERMA und QUIROZ-RUIZ), D (DAVID, HARTLEY und PEARSON) und G (GRUBBS) sind zusätzlich Ausreißer, die die Größeneinschätzung für die jeweilige Art wesentlich verzerren können, erkannt und entfernt worden.

Innerhalb von R-Studio, sind zusätzlich die Längen und Breiten aller untersuchten Sporen in einem Streudiagramm dargestellt worden (Abbildung 5), um mögliche Zusammenhänge zwischen zwei stetigen Variablen zu analysieren. Die hierfür verwendeten Packages sind im Literaturverzeichnis einsehbar.

## 2.4 Generierung von DNA-Sequenzdaten

DNA-Isolierung, PCR, Agarose-Gelelektrophorese, Aufreinigung der DNA sowie der Versand zum Sequenzieren erfolgten nach LYSENKO 2020 „Enträtselung der genetischen Variation von *Subulicystidium longisporum*“ (Kapitel 3.2-3.5).

### Probenvorbereitung

Zur vorbereitenden Präparation, sind zunächst etwa 1 cm kleine Gewebeschnitte der jeweiligen Pilzprobe bzw. des Fruchtkörpers mit so wenig Holzkörper wie möglich abgeschichtet in ein Reaktionsgefäß überführt und anschließend nach Zugabe von zwei kleinen, sowie zwei größeren Metallkugeln, in einer Schwingmühle (*Retsch* Typ MM 300) für 5 Minuten bei 30 Hz und 30 000 bpm zermahlen worden, bis ein feines Pulver entstand. Nachfolgend wurden die Proben nochmals bei 13 000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert.

### DNA-Isolation

Die DNA-Isolation erfolgte mit dem E.Z.N.A.® Fungal DNA Mini Kit (OMEGA bio-tek). Die Proben wurden in 600 µl FG1-Puffer aufgeweicht, aufgelöst sowie gevortext, mit 10 µl Proteinase K (20 mg/ml, *Ambion, Thermo Fisher Scientific*) versetzt und sorgfältig gemischt. Unter zweimaligem Invertieren erfolgte durch eine Heizplatte eine Inkubation der Proben bei 65° C für 20 Minuten. Im weiteren Verlauf sind 140 µl FG2-Puffer hinzugefügt und bei 10 000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert worden. Das aufgereinigte Lysat wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, ohne Material von dem Pellet zu entnehmen, welches sich durch Zentrifugation abgesetzt hat. Das Lysat ist im Anschluss mit 300 µl FG3-Puffer, sowie 600 µl 100%igem Ethanol versehen und mehrmals invertiert worden.

### DNA-Gewinnung

Das Binden, Waschen und Gewinnen der DNA erfolgte nach dem weiteren Protokoll, vorgeschlagen in LYSENKO 2020, mit Hilfe der im Kit enthaltenen *Hi-Bind® DNA mini-columns*. Die *Hi-Bind® DNA mini-columns* wurden auf ein 2 ml *collection-tube* aufgesteckt. Anschließend sind 800 µl der Probe (Gemisch aus Lysat, FG3-Puffer, 100%iger Ethanol) überführt sowie bei 10 000 rpm für eine Minute zentrifugiert worden. Das durch das Zentrifugieren sich am Boden der *collection-tubes* gesammelte Filtrat ist verworfen worden. Die verbliebene Menge an Lysat ist erneut überführt und anschließend nochmals zentrifugiert worden.

Die *Hi-Bind® DNA mini-columns* sind im Folgenden jeweils erneut auf ein 2 ml *collection-tube* aufgesteckt und anschließend 750 µl DNA-Waschpuffer hinzu pipettiert und zentrifugiert worden. Das so entstandene Filtrat wurde verworfen. Es erfolgte ein erneutes Waschen der DNA unter gleichen Bedingungen. Das nach dem weiteren Waschschrift gesammelte Filtrat wurde wiederholt verworfen und es wurde nochmals zentrifugiert. Die *Hi-Bind® DNA mini-columns* wurden sodann jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl sterilem, deionisiertem und in der Heizplatte auf 65° C erwärmten Wasser befüllt. Bei Raumtemperatur erfolgte für fünf Minuten eine Inkubation mit anschließendem Zentrifugieren. Dieser Schritt wurde im Anschluss nochmals wiederholt. Die gewonnene DNA wurde bei -20° C aufbewahrt.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Primer für die ITS-Amplifikation.

Leserichtung	Primer	Sequenz
Forward (fwd)	ITS1f	5' - CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A - 3'
Reverse (rev)	ITS4	5' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC- 3'

Tabelle 2: Zusammensetzung des Mastermix (Konzentrationen) zur Amplifikation von pilzlichen DNA-Fragmenten (ITS-Region) in DNA-Isolaten durch PCR.

Reagenz	Konzentration
VE-H <sub>2</sub> O (steril, demineralisiert)	1 ×
MgO-Puffer	1 ×
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
dNTPs	0,2 mM
BSA	80 ng/µl
fwd-Primer	0,4 µM
rev-Primer	0,4 µM
<i>MangoTaq</i> -Polymerase ( <i>Bioline</i> )	1U/50 µl

Tabelle 3: Temperaturabfolgen und Dauer der einzelnen Schritte des verwendeten PCR-Programms (ITS 12-55; Blocktyp Gradient 96).

Temperatur (°C)	Dauer (Minuten)	Wiederholungen
94	03:00	× 1
94	00:30	× 30
55	00:45	× 30
72	01:00	× 30
72	07:00	× 1

### Amplifikation

Die ITS-Region wurde mit dem Primerpaar ITS1f und ITS4 (Tabelle 1) amplifiziert. Jeder Ansatz für den Mastermix bestand dabei aus 17,15 µl VE-H<sub>2</sub>O (steril, demineralisiert), 2,5 µl MgO-Puffer, 0,75 µl MgCl<sub>2</sub>, 1 µl dNTP, jeweils 0,5 µl fwd- sowie rev-Primer, 0,1 µl *MangoTaq*-Polymerase, 0,1 µl BSA und 2,5 µl DNA. Die verwendeten Konzentrationen der eingesetzten Reagenzien für den Mastermix richteten sich nach den Vorgaben aus Tabelle 2. Um die Stabilität der verwendeten Reagenzien, vor allem die der *MangoTaq*-Polymerase, zu gewährleisten, erfolgten alle Arbeitsschritte gekühlt auf Eis. Es ist gleichwohl darauf geachtet worden, dass sämtliche Reagenzien, bis auf die DNA-Probe, vorher sorgfältig gevortext wurden.

Anschließend wurden jeweils 22,5 µl des Mastermixes auf PCR-Reaktionsgefäße verteilt. Zusätzlich ist eine Negativkontrolle angelegt worden. In die PCR-Reaktionsgefäße wurden jeweils 2,5 µl des DNA-Isolates pipettiert (Negativkontrolle stattdessen mit 2,5 µl destilliertem Wasser).

Das Thermocycling erfolgte danach mit einem Biometra T-Gradient Gerät (Biometra GmbH, Göttingen) mit angegebenen Temperaturabfolgen aus Tabelle 3.

### Gelelektrophorese

Mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese ist anschließend die korrekte Amplifikation der ITS-Region verifiziert worden. Von den einzelnen PCR-Produkten sind hierfür jeweils 3 µl zusammen mit 1 µl Längenstandard „*Thermo Scientific Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (0,5µg/µl)*“ (*Thermo Fisher*) aufgetrennt worden.

Tabelle 4: Den Specimen-IDs zugeordnete PCR-Bezeichnungen (Abkürzungen) mit jeweiligen DNA-Konzentrationen (C) (photometrisch gemessen) und Verdünnung der gewaschenen Ausgangs-Isolate.

Specimen_ID	PCR-Bezeichnung	C (DNA) in ng/µl	Verdünnung
Ordynets00376	K1	-	-
Ordynets00340	K2	191,0	1:20
Ordynets00311	K3	110,0	1:5
Ordynets00313	K4	63,4	1:1
Ordynets00334	K5	-	-

Bei dem verwendeten Farbstoff zur Fluoreszenz-Markierung der DNA handelte es sich um *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium)*. Für 30 Minuten ist eine Spannung von ca. 90 Volt angelegt worden. Nach der Agarose-Gelelektrophorese ergab sich nur für die Proben K1 und K5 ein positives Ergebnis (identifizierte ITS-Bande). Für die übrigen Proben (K2 bis K4) erfolgte für die gewaschenen Isolate eine Messung der DNA-Konzentration mit Hilfe eines *NanoPhotometer P-Class® USB P-330 (©2022 IMPLIN GmbH)*. Anhand der ermittelten DNA-Konzentrationen sind die jeweiligen Isolate verdünnt worden, um eine erneute reibungslose Amplifikation zu gewährleisten (Tabelle 4).

### DNA-Aufreinigung

PCR-Produkte, bei denen nach abgeschlossener Agarose-Gelelektrophorese eine gut sichtbare Bande für den ITS-Bereich entstanden war, wurden aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe eines *QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, September 2011)*. Den *collection-tubes* wurden hierfür *QIAquick Spin Columns* aufgesetzt und 120 µl der PB-Puffer-Natriumacetat-Mischung hinzu pipettiert. Anschließend erfolgte das Überführen der gewonnenen DNA-Proben. Ohne den Filter der *QIAquick Spin Columns* zu berühren, ist nachfolgend mit Hilfe der verwendeten Pipette der Inhalt gemischt und anschließend für eine Minute bei 13 000 rpm zentrifugiert worden. Der Durchfluss wurde verworfen. Es wurden sodann 750 µl PE-Puffer hinzugefügt und erneut zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen. Nach einem erneuten Schritt der Trocken-Zentrifugation, sind die *QIAquick Spin Columns* in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 40 µl EB-Puffer hinzu pipettiert worden. Die Proben wurden abschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und wiederholt zentrifugiert.

### Sequenzanalyse

Von den erfolgreich aufgereinigten PCR-Fragment-Eluaten wurden je 2 × 5 µl entnommen und in neue Reaktionsgefäße gegeben. In eines der beiden Reaktionsgefäße wurden 5 µl fwd-Primer, in das zweite 5 µl rev-Primer gegeben und mit den PCR-Eluaten gemischt. Die Tubes sind anschließend etikettiert und für die Sequenzanalyse (Sangermethode nach SANGER ET AL. 1977) zu Eurofins Genomics Germany GmbH versandt worden.

## 2.5 Bearbeitung der DNA-Sequenzen & Qualitätskontrolle

Die Rohdaten der Sanger-Sequenzierung wurden mit dem Programm Geneious (*Geneious Prime*® V. 2022.2.2; Build 2022-08-18; Copyright © 2005-2022 Biomatters Ltd.; <http://www.geneious.com>, KEARSE ET AL. 2012) bearbeitet. In einem ersten Schritt sind die zumeist qualitativ minderwertigen Enden der Sequenzen getrimmt worden. Nachfolgend sind die Sequenzen nach unklaren Basen durchsucht worden. Konnten diese nicht manuell durch die dargestellten Peaks oder durch Vergleich von Vorwärts- und Rückwärtssequenz eindeutig ermittelt werden, sind an jenen Stellen IUPAC *Ambiguity Codes* (International Union of Pure and Applied Chemistry) verwendet worden. Des Weiteren sind von den Rückwärtssequenzen *reverse-reads* durch *reverse-complementing* erstellt worden. Zuletzt erfolgte ein *pairwise-alignment* (8 Iterationen; MUSCLE Algorithmus) mit abschließender Problemanalyse bei Ungereimtheiten der alignierten Basen. Sofern beide Sequenzen vorhanden und lesbar waren (vorwärts und rückwärts), ist eine Konsensus-Sequenz erstellt worden.

Für die Proben Ordynets00311 (K3) & Ordynets00334 (K5) ist im weiteren Verlauf der Analysen ausschließlich mit getrimmten, per *reverse-complementing* bearbeiteten *reverse-reads* der Rückwärtssequenzen gearbeitet worden – die Vorwärtssequenzen waren durch starke Peak-Überlagerungen gekennzeichnet, was ein Alignment nicht möglich machte.

### Qualitätskontrolle

Für die endgültigen Konsensus-Sequenzen bzw. *reverse-reads* der Rückwärtssequenzen ist eine Nukleotid-BLAST-Suche (National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information) durchgeführt worden. Je näher die Parameter *Percent Identity* und *Query Cover* bei 100 lagen, desto ähnlicher waren sich abgefragte sowie übereinstimmende Sequenz und desto sicherer die Bestimmung der Art.

## 2.6 Erstellen eines DNA-Sequenz-Datensatzes

Zur Vorbereitung auf phylogenetische Untersuchungen, sind mit Hilfe von GeneBank-Nummern für den nrITS-Bereich für Arten der Gattung *Myxarium* aus SPIRIN ET AL. 2019, zusammen mit den eigenen, bearbeiteten Sequenzdaten ein insgesamt 30 Positionen großer DNA-Sequenz-Datensatz mit mindestens zwei Sequenzen pro Art erstellt worden.

Die benötigten ITS-Sequenzdaten aus SPIRIN ET AL. 2019, sind aus der GenBank-Datenbank (National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information) abgerufen worden. Um einen reibungsloseren Ablauf der Berechnungen in den verwendeten phylogenetischen Softwares zu ermöglichen, sind die GeneBank-Namen so bearbeitet worden, dass lediglich die ersten acht Symbole übrigblieben, welche die Zugangsnummer darstellen. Jene Zugangsnummern sind in den erstellten phylogenetischen Stammbäumen ersichtlich.

## 2.7 Mehrfacher Sequenzabgleich

Zur erfolgreichen Untersuchung der verwandtschaftlichen Verhältnisse von DNA-Sequenzen, sind die eigenen bearbeiteten Konsensus-Sequenzen mit Hilfe der Online-Version der MAFFT-Software V.7 (*Multiple Sequence Alignment*) zuerst in voller Länge ausgerichtet bzw. die Nukleotide an homologe Positionen platziert worden. Es ist neben den Standard-Einstellungen hierfür die L-INS-I-Methode angewendet worden. Es erfolgte anschließend eine getrimmte Ausrichtung, bei dem weniger informative Positionen aus dem Alignment auf reproduzierbare Weise herausgefiltert worden sind. Zu diesem Zwecke hat hierfür das Tool BMGE V. 1.12.1 (*Block Mapping and Gathering with Entropy*) auf dem Server NGPhylogeny.fr Verwendung gefunden.

## 2.8 Phylogenetische Analyse

Alle verwendeten phylogenetischen Tools wurden über die grafische Oberfläche im Online-Portal NGPhylogeny.fr ausgeführt. Für robuste Ergebnisse und vergleichbare Schätzungen der Beziehungen zwischen DNA-Sequenzen, sind drei phylogenetische Methoden zur Erzeugung von Stammbäumen verwendet worden, darunter eine distanzbasierte, eine Bayes'sche Interferenz- und eine *Maximum-Likelihood*-Methode. Zur Visualisierung und Bearbeitung der Baumästhetik ist der Stammbaumeditor iTOL V. 6.6 (*Interactive Tree Of Life*) verwendet worden.

Zur Konstruktion des distanzbasierten Stammbaumes ist das FastME-Tool V. 2.1.6.1\_1 verwendet worden. Es wurde hierbei als Modell der Nukleotidsubstitution (Evolutionsmodell) *p-distance* ausgewählt, zum Erhalt der Zweigunterstützung sind 200 Bootstrap-Wiederholungen eingestellt worden. Folgende weitere Einstellungen sind verwendet worden: *equilibrium frequencies* = false, *gamma distributes rates across sites* = yes; *gamma distribution parameter* = 1.0, *remove gap strategy* = *pairwise deletion of gaps*, *starting tree* (distance algorithm used) = BIONJ, *tree refinement* = BaIME SPR, *decimal precision for branch lengths* = 6.

Für die Erstellung des Stammbaumes nach Bayes'scher Interferenz ist von der Software MrBayes V. 3.2.7\_0 Gebrauch gemacht worden. Es sind hierfür 500 000 Generationen mit 2 Durchläufen (jeweils 4 Ketten) sowie ein GTR-Evolutionsmodell mit Gamma-Parameter („*Gamma-distributed rates across sites*“) eingestellt worden. Folgende weitere Einstellungen sind verwendet worden: *outgroup* = 1, *sample frequency* = 500, *print frequency* = 500, *burn-in fraction* = 0.25, *stop rule* = no, *summarize parameters* = true, *summarize trees* = true, *include plot?* = true, *checkpoint frequency* = 100.000, *append to last checkpoint?* = false, *seed* = 5; *swap seed* = 5.

Hinsichtlich der Erzeugung eines *Maximum-Likelihood*-Stammbaumes ist die Option PhyML+SMS genutzt worden. Es handelt sich hierbei um eine Pipeline, durch die das SMS-Programm, das am besten passende Evolutions- bzw. Substitutionsmodell des Sequenz-Alignments ermittelt. Durch die hierdurch erhaltenen Informationen, wählt PhyML automatisch den optimalen *Maximum-Likelihood*-Stammbaum aus. Als Nucleotid-Substitutions-Modell ist durch die Pipeline ein *General Time Reversible* (GTR) Modell eingestellt worden. Als Zweigunterstützung ist „Bootstrap (FBP+TBE)“ mit 200 Wiederholungen ausgewählt worden. Folgende weitere Einstellungen sind verwendet worden: *statistical criterion to select the model* = AIC, *tree topology search* = SPR (*Subtree Pruning and Regraphing*), *number of random starting trees* = 0.

## 3. Ergebnisse

### 1.1 Größe der untersuchten Pilzgattung

44 verschiedene Arten werden nach Index Fungorum und derzeitigem Verständnis aktuell in die Gattung *Myxarium* und somit auch in hierfür unternommene phylogenetische Analysen mit einbezogen.

### 1.2 Statistische Auswertung der biometrischen Messungen

Betrachtet man alle untersuchten Arten bzw. untersuchten Herbar-Proben (Specimen\_ID) innerhalb der statistischen Auswertung für biometrische Sporenmesswerte (Tabelle 5), ist zu erkennen, dass die Sporenlänge von 6,00  $\mu\text{m}$  – 13,00  $\mu\text{m}$  und die Sporenbreite von 2,80  $\mu\text{m}$  – 5,00  $\mu\text{m}$  divergieren. Die im Mittel längsten Sporen besitzt den Messdaten zufolge *M. hyalinum* (Ordynets00340) mit  $\bar{X}$  = 10,80  $\mu\text{m}$ , die im Mittel breitesten Sporen dagegen *M. grilletii* (Ordynets00376) mit  $\bar{X}$  = 4,31  $\mu\text{m}$ .

Der Quotient ( $Q$ ) beschreibt das Verhältnis der zwei Größen Länge ( $l$ ) und Breite ( $b$ ) zueinander und lässt eine Einordnung der Werte in einem Gesamtmaßstab über alle untersuchten Proben hinweg zu. In diesem Falle scheinen sowohl die Sporengrößen von *M. hyalinum* und *M. podlachicum* ( $Q$  = 1,83 & 1,81), als auch jene der beiden *M. varium* Proben ( $Q$  = 2,37 & 2,20) im Mittel sehr ähnlich.

Tabelle 5: Durch Smaff erzeugte Werte zur statistischen Auswertung von biometrischen Messungen für Sporen unterschiedlicher Arten der Gattung *Myxarium*. Angegeben sind Minimalwerte (Min), Arithmetische Mittelwerte ( $\bar{X}$ ) und Maximalwerte (Max) für jeweils Länge, Breite und Quotient.

Specimen_ID	Artname	Länge $l$ ( $\mu\text{m}$ )			Breite $b$ ( $\mu\text{m}$ )			Quotient $Q$ ( $l/b$ )		
		Min	$\bar{X}$	Max	Min	$\bar{X}$	Max	Min	$\bar{X}$	Max
Ordynets00311	<i>M. varium</i>	6,00	8,00	10,00	3,00	3,45	4,00	1,50	2,37	3,34
Ordynets00340	<i>M. hyalinum</i>	9,00	10,80	13,00	3,00	4,17	5,00	1,80	2,64	4,00
Ordynets00376	<i>M. grilletii</i>	7,00	7,83	9,00	4,00	4,31	5,00	1,40	1,83	2,25
Ordynets00313	<i>M. podlachicum</i>	6,00	6,61	7,40	3,00	3,67	4,20	1,55	1,81	2,27
Ordynets00334	<i>M. varium</i>	6,00	7,51	8,40	2,80	3,15	4,40	1,70	2,20	2,67

Betrachtet man alle untersuchten Arten bzw. untersuchten Herbar-Proben (Specimen\_ID) innerhalb der statistischen Auswertung für biometrische Basidienmesswerte (Tabelle 6), ist zu erkennen, dass die Basidienlänge von 7,80  $\mu\text{m}$  – 12,00  $\mu\text{m}$  und die Basidienbreite von 6,00  $\mu\text{m}$  – 10,00  $\mu\text{m}$  reichen kann. Die im Mittel längsten und breitesten Basidien besitzt den Messdaten zufolge *M. hyalinum* (Ordynets00340) mit  $\bar{X} = 11,50$   $\mu\text{m}$  und  $\bar{X} = 8,90$   $\mu\text{m}$ . Betrachtet man die mittleren Werte für den Quotienten ( $Q$ ) separat für Basidiengrößen, unterscheiden sich die Zuordnungen zu denen von Sporengrößen. Hier erscheinen sowohl die Basidiengrößen von *M. grilletii* und *M. podlachicum* ( $Q = 1,81$  &  $1,15$ ), als auch jene der *M. varium*- (Ordynets00311) und *M. hyalinum*-Proben ( $Q = 1,34$  &  $1,30$ ) im Mittel sehr ähnlich.

Tabelle 6: Durch Smaff erzeugte Werte zur Statistischen Auswertung von biometrischen Messungen für Basidien unterschiedlicher Arten der Gattung *Myxarium*. Angegeben sind Minimalwerte (Min), Arithmetische Mittelwerte ( $\bar{X}$ ) und Maximalwerte (Max) für jeweils Länge, Breite und Quotient.

Specimen_ID	Artname	Länge $l$ ( $\mu\text{m}$ )			Breite $b$ ( $\mu\text{m}$ )			Quotient $Q$ ( $l/b$ )		
		Min	$\bar{X}$	Max	Min	$\bar{X}$	Max	Min	$\bar{X}$	Max
Ordynets00311	<i>M. varium</i>	8,00	9,40	10,00	6,00	7,10	8,00	1,12	1,34	1,67
Ordynets00340	<i>M. hyalinum</i>	10,00	11,50	12,00	8,00	8,90	10,00	1,10	1,30	1,50
Ordynets00376	<i>M. grilletii</i>	8,00	8,80	10,00	7,00	7,50	8,00	1,00	1,18	1,29
Ordynets00313	<i>M. podlachicum</i>	7,80	8,16	8,80	6,80	7,10	7,40	1,08	1,15	1,23
Ordynets00334	<i>M. varium</i>	8,40	9,16	10,00	6,80	7,34	8,00	1,15	1,25	1,35

Einige zusätzliche Messungen ergaben für Ordynets00376 (*M. grilletii*) Basidien-Stiellängen von bis zu 20  $\mu\text{m}$  und Sterigmenlängen von bis zu 15  $\mu\text{m}$ . Für Ordynets00340 (*M. hyalinum*) konnte eine maximale Basidien-Stiellänge von 30  $\mu\text{m}$  und eine maximale Sterigmenlänge von 36  $\mu\text{m}$  beobachtet werden. Messungen für Ordynets00311 (*M. varium*) zeigten Basidien-Stiellängen von bis zu 11  $\mu\text{m}$  sowie Sterigmenlängen von bis zu 29  $\mu\text{m}$ . Ordynets00313 (*M. podlachicum*) zeigte durch biometrische Messungen mit bis zu 4,8  $\mu\text{m}$  im Vergleich zu den anderen Proben kurze Basidienstiele, die Sterigmen erreichten für die betrachteten Basidien eine Länge von bis zu 12,2  $\mu\text{m}$ . In Bezug auf Ordynets00334 (*M. varium*) ergaben sich Basidien-Stiellängen von bis zu 16,8  $\mu\text{m}$  und Sterigmenlängen von bis zu 21,4  $\mu\text{m}$ .

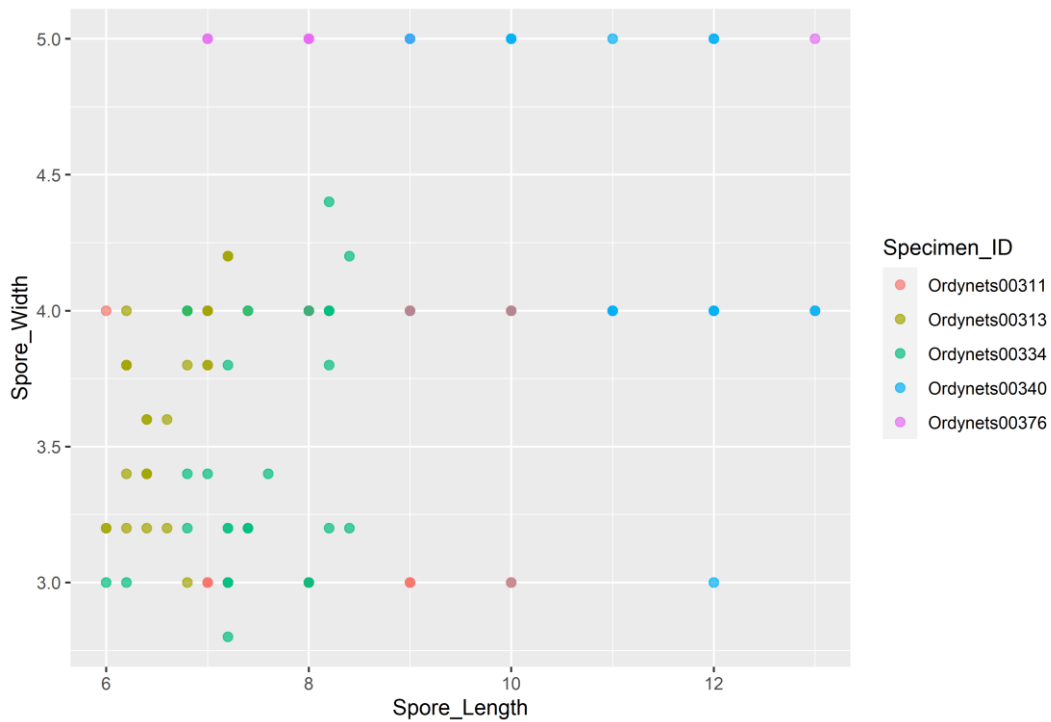


Abbildung 5: Darstellung von Länge und Breite aller untersuchten Sporen aus fünf untersuchten *Myxarium*-Fruchtkörpern verschiedener Proben (Herbarmaterial) in einem Streudiagramm.

Das in R-Studio erstellte Streudiagramm zur graphischen Darstellung der Längen und Breiten aller untersuchten Sporen der fünf untersuchten *Myxarium*-Proben, ist in Abbildung 5 ersichtlich. Zur Beschreibung der Zusammenhänge innerhalb des Streudiagramms werden im Folgenden nur die Daten der Proben Ordynets00313 und Ordynets00334 herangezogen, da hierfür Werte mit Nachkommastellen vorliegen, die eine Vergleichbarkeit erst zulassen.

Insgesamt ist für beide Proben jeweils ein linearer positiver Zusammenhang der Werte zu erkennen. Erhöhte Sporen-Längen gehen mit verbreiterten Sporenkörpern einher. Die Steigungen der linearen Zusammenhänge scheinen ähnlich bis gleich. Einige wenige Ausreißer und damit Unstetigkeiten der Werteabfolgen können für die Werte von Ordynets00334 beobachtet werden. Ebenso sind hier auch kleinere minimale, als auch größere maximale Werte, verglichen mit den Werten von Ordynets00313, ersichtlich.

Beispielhaft für die Sporen-Werte der Probe von Ordynets00334, ist in Abbildung 6 ein Balkendiagramm zur relativen Verteilungsdichte [%] in Abhängigkeit zum Sporen-Volumen [ $\mu\text{m}^3$ ] abgebildet. Es lässt sich erkennen, dass tendenziell mehr Werte mit einem geringeren Volumen in direkter Nähe um den Erwartungswert (Spitze der roten Normalverteilungskurve) im Datensatz existieren, als es für Werte mit einem größeren Volumen der Fall ist. Den Verlauf der Werte überblickend, lässt sich zusammenfassen, dass der Großteil der Werte im Intervall eine bis mehrere Standardabweichungen um den Erwartungswert liegen.

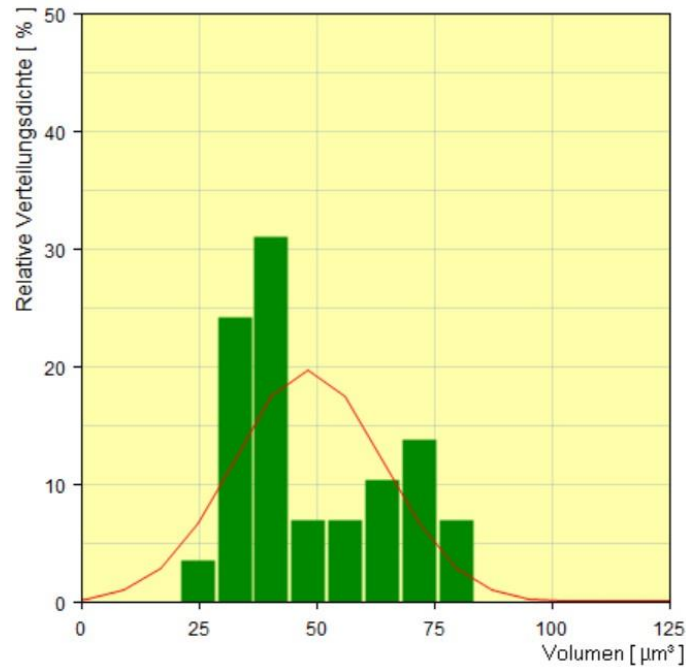


Abbildung 6: Balkendiagramm zur relativen Verteilungsdichte [%] in Abhängigkeit zum Sporen-Volumen [ $\mu\text{m}^3$ ], welches durch Smaff errechnet wurde. Das Heranziehen von Volumina als Indikator von Sporen-Ungereimtheiten, basiert auf Erkenntnissen von GROSS 1972. Die rote Vergleichskurve stellt dabei die zu erwartende Normalverteilungskurve unter Zugrundelegung vom geschätzten Mittelwert und Standardabweichung der Stichprobe dar.

### 1.3 Nukleotid-BLAST-Suche/Qualitätskontrolle

Nach der Nukleotid-BLAST-Suche für die endgültig bearbeiteten Konsensus-Sequenzen, konnten fast alle nach Bestimmungsschlüsseln identifizierten Arten aufgrund der hohen Werte von *Percent Identity* und *Query Cover* (beträchtliche Qualität der Konsensus-Sequenzen) bestätigt werden. Ausschließlich für die Probe Ordynets00376 (K1) ergab sich ein abweichender Artname (Tabelle 7), wodurch insgesamt drei von fünf Proben der Artbezeichnung „*M. varium*“ zuordenbar waren. Die Artbezeichnung für Probe Ordynets00340 konnte keiner Verifizierung bzw. Qualitätskontrolle durch einen BLAST-Abgleich unterzogen werden, da für jene Probe während der Agarose-Gelelektrophorese keine ITS-Bande erzeugt worden war, d. h. die PCR in diesem Fall nicht erfolgreich verlief.

Tabelle 7: Gegenüberstellung, sowie Verifizierung und Falsifizierung der durch Bestimmungsschlüssel (Mikro- und Makromorphologie) identifizierten Arten mit Artnamen, welche durch einen Nukleotid-BLAST-Abgleich erzeugt wurden.

Specimen_ID	PCR-Bezeichnung	Artname (Bestimmungsschlüssel)	Artname (BLAST-Abgleich)	Percent Identity [%]	Query Cover [%]
Ordynets00311	K3	<i>M. varium</i>	<i>M. varium</i>	99.59	100
Ordynets00340	K2	<i>M. hyalinum</i>	-	-	-
Ordynets00376	K1	<i>M. grilletii</i>	<i>M. varium</i>	98.86	86
Ordynets00313	K4	<i>M. podlachicum</i>	<i>M. podlachicum</i>	99.34	98
Ordynets00334	K5	<i>M. varium</i>	<i>M. varium</i>	99.38	100



## 1.4 Gemeinsamer DNA-Sequenz-Datensatz

In Tabelle 8 sind alle für phylogenetische Studien verwendeten Sequenzen des gemeinsamen DNA-Sequenz-Datensatzes, bestehend aus vier von fünf erfolgreich sequenzierten, sowie bearbeiteten Sequenzdaten und 26 weiteren Sequenzdaten der GenBank der Gattung *Myxarium* einsehbar.

Tabelle 8: Verwendete Sequenzen des gemeinsamen DNA-Sequenz-Datensatzes. Zusätzlich sind Herkunftsland der Probe, sowie der pflanzliche Wirt, dem die Pilzprobe entnommen wurde, angegeben.

Species	Specimen_ID/Herbarbeleg	Herkunftsland	Wirt	GenBank Nr. (nrITS)
<i>Myxarium varium</i>	Ordynets00334	DE-HE	<i>Quercus spp.</i>	-
<i>M. varium</i>	Ordynets00311	DE-HE	<i>Fagus sylvatica</i>	-
<i>M. varium</i>	Ordynets00376	DE-BW	<i>Betula pendula</i>	-
<i>M. varium</i>	VS 11600 (O)	NO	<i>Alnus incana</i>	MK098918
<i>M. varium</i>	VS 11323 (H)	RU-NIZ	<i>Betula pubescens</i>	MK098919
<i>M. cinnamomescens</i>	O F160494	NO	<i>Populus tremula</i>	KY801882
<i>M. cinnamomescens</i>	VS 11317 (H)	RU-NIZ	<i>Tilia cordata</i>	MK098887
<i>M. crozalsii</i>	VS 11334 (H)	RU-NIZ	<i>Tilia cordata</i>	MK098890
<i>M. crozalsii</i>	CWU 4197	UA	<i>Betula pendula</i>	MK098891
<i>M. evanidum</i>	KHL 17642 (O)	NO	decayed wood	MK098893
<i>M. evanidum</i>	VS 11615 (O)	NO	<i>Ulmus glabra</i>	MK098894
<i>M. frumentaceum</i>	AS 171126/1450B (H)	KE	hardwood	MK098980
<i>M. frumentaceum</i>	AS 171126/1400 (H)	KE	hardwood	MK098981
<i>M. grilletii</i>	VS 9016 (H)	CA-AB	<i>Populus alba</i>	MK098896
<i>M. grilletii</i>	VS 11653 (O)	NO	<i>Populus tremula</i>	MK098897
<i>M. hyalinum</i>	Geesteranus 15003	NL	<i>Acer sp.</i>	KY801881
<i>M. hyalinum</i>	VS 11778 (O)	NO	<i>Tilia cordata</i>	MK098898
<i>M. legonii</i>	VS 8986 (H)	CA-AB	<i>Populus alba</i>	MK098899
<i>M. legonii</i>	OM 15677 (H)	US-NY	decayed wood	MK098901
<i>M. mesomorphum</i>	VS 11613 (O)	NO	<i>Sorbus sp.</i>	MK098902
<i>M. mesomorphum</i>	VS 11383 (H)	RU-LEN	<i>Tilia cordata</i>	MK098903
<i>M. nucleatum</i>	LE 206820	RU	<i>Tilia cordata</i>	KY801869
<i>M. nucleatum</i>	VS 11768 (O)	NO	<i>Tilia cordata</i>	MK098906
<i>M. podlachicum</i>	Ordynets00313	DE-HE	<i>Fagus sylvatica</i>	-
<i>M. podlachicum</i>	VS 8984 (H)	CA-AB	<i>Populus alba</i>	MK098908
<i>M. podlachicum</i>	OM 19338 (H)	FI	<i>Betula pubescens</i>	MK098909
<i>M. podlachicum</i>	VS 11616 (O)	NO	<i>Ulmus glabra</i>	MK098912
<i>M. podlachicum</i>	VS 9908 (H)	RU-NIZ	<i>Quercus robur</i>	MK098916
<i>M. populinum</i>	Haikonen 24623	FI	<i>Populus tremula</i>	KY801883
<i>M. populinum</i>	VS 11314 (H)	RU-NIZ	<i>Populus tremula</i>	MK098917

## 1.5 Phylogenetische Stammbäume

Innerhalb des distanzbasierten phylogenetischen Stammbaums (Abbildung 7), ist *M. grilletii* evolutionsgeschichtlich am ursprünglichsten eingeordnet. Mit einem *bootstrap*-Support-Wert von 84 % bilden die Arten *M. evanidum* und *M. legonii* zusammen die Schwestergruppe zu allen anderen in dieser Studie aufgenommenen *Myxarium*-Arten (ohne *M. grilletii*). Die eigene *M. podlachicum*-Probe bildet mit den anderen Sequenzen dieser Art aus der GenBank eine eigene, gut unterstützte Klade (*bootstrap*-Support-Wert = 100 %). Auch die eigenen *M. varium*-Proben bilden eine signifikante, stark unterstützte Klade mit den hinzugenommenen Sequenzen dieser Art aus der GenBank. Die *M. varium*-Klade stellt hier die Schwestergruppe des *M. mesomorphum*/*M. nucleatum*-Artkomplex dar und scheint dem hier berechneten Modell zufolge eine evolutionsgeschichtlich neu entstandene Art zu sein.

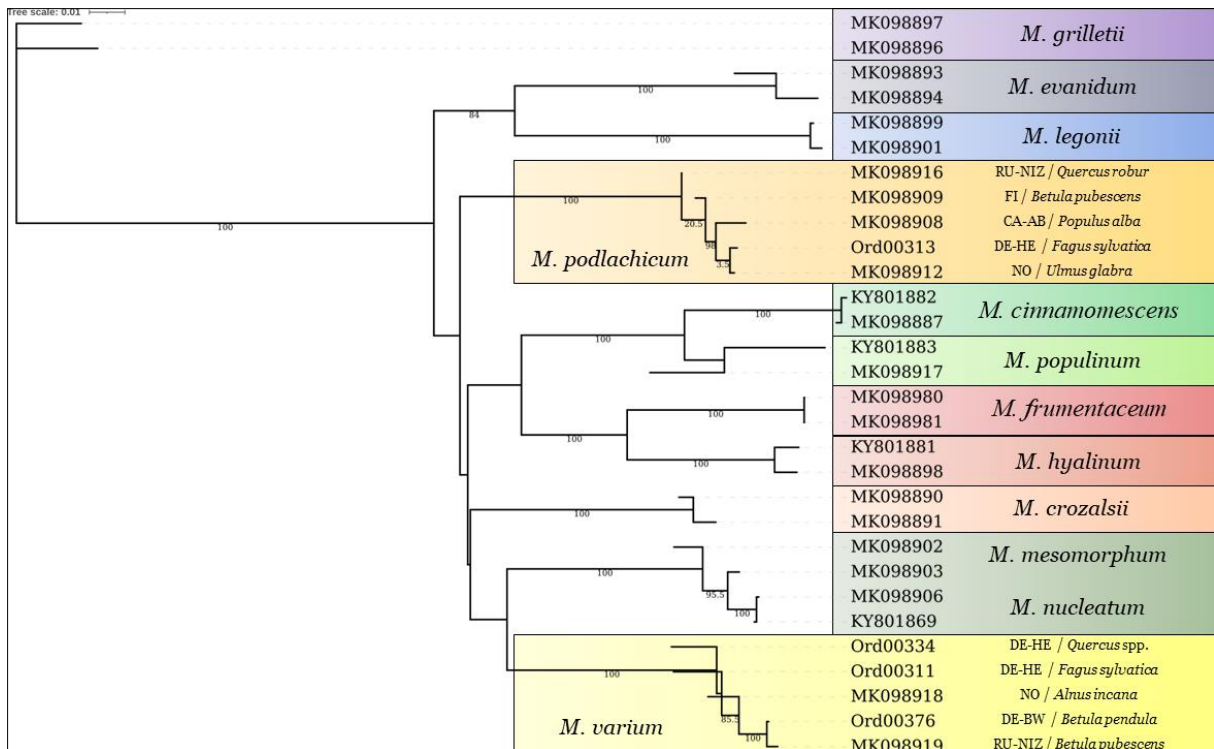


Abbildung 7: Distanzbasierter, mit dem FastME-Tool phylogenetischer Stammbaum; die Bezeichnungen in der rechtsseitig abgebildeten Skala zeigen eigene Specimen-ID's gemeinsam mit GenBank-Nummern der Gattung *Myxarium*, welche zur Erstellung des DNA-Sequenz-Datensatzes verwendet worden sind; für *M. podlachicum* & *M. varium* sind zusätzlich rechtsseitig Herkunftsländer und Wirte definiert; an den Zweigen angezeigte Support-Daten stellen *bootstrap*-Werte in Prozent dar (*Bootstrap*-Unterstützungen als absolute Zahlen (im Bereich 0-200) um Faktor  $\times 0.5$  skaliert); *tree tips aligned*.

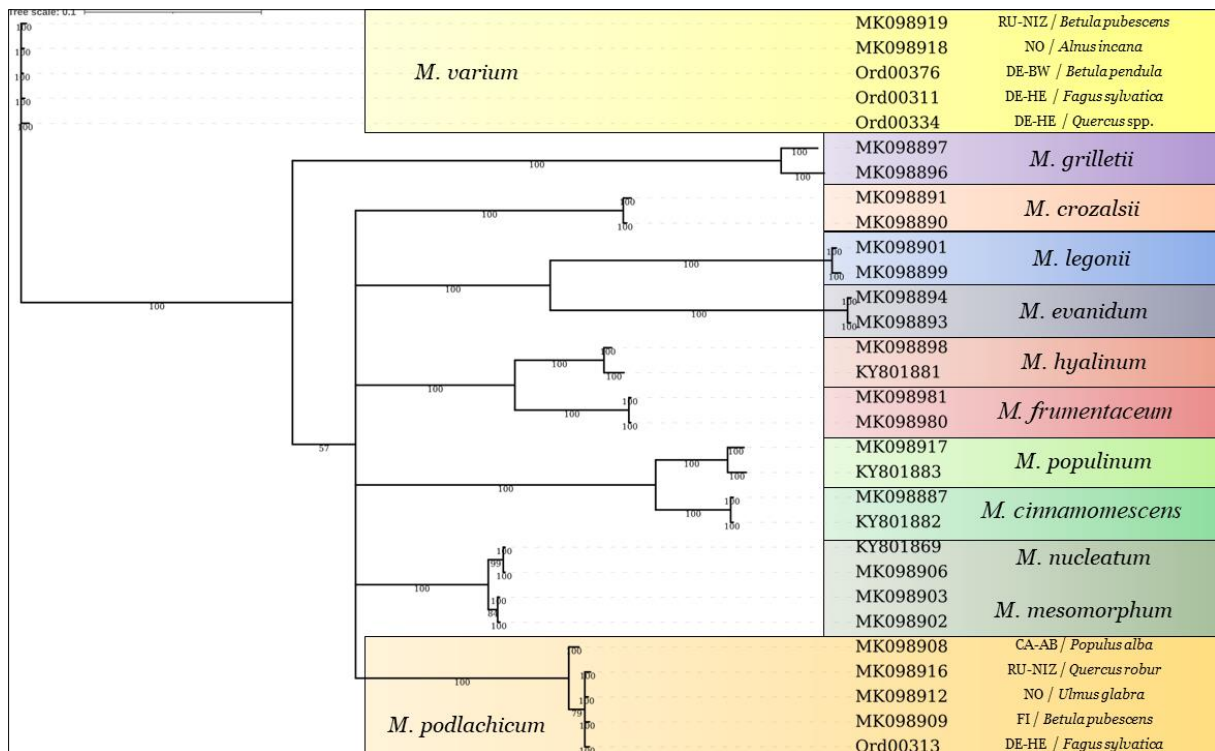


Abbildung 8: Mit dem MrBayes-Tool nach Bayes'scher Interferenz erzeugter phylogenetischer Stammbaum; die Bezeichnungen in der rechtsseitig abgebildeten Skala zeigen eigene Specimen-ID's gemeinsam mit GenBank-Nummern der Gattung *Myxarium*, welche zur Erstellung des DNA-Sequenz-Datensatzes verwendet worden sind; für *M. podlachicum* & *M. varium* sind zusätzlich rechtsseitig Herkunftsländer und Wirte definiert; an den Zweigen angezeigte Support-Daten stellen *posterior probabilities*-Werte in Prozent dar; *tree tips aligned*.

Innerhalb des nach Bayes'scher Interferenz erzeugten phylogenetischen Stammbaums (Abbildung 8) ist *M. varium* evolutionsgeschichtlich am ursprünglichsten eingeordnet. Mit einem *posterior-probabilities*-Wert von 100 % bildet die Art *M. grilletii* die Schwestergruppe zu allen anderen in dieser Studie aufgenommenen *Myxarium*-Arten (ohne *M. varium*). Die eigene *M. podlachicum*-Probe bildet auch nach diesem Berechnungsmodell mit den anderen Sequenzen dieser Art aus der GenBank eine eigene, gut unterstützte Klade (*posterior-probabilities*-Wert = 1 bzw. 100 %).

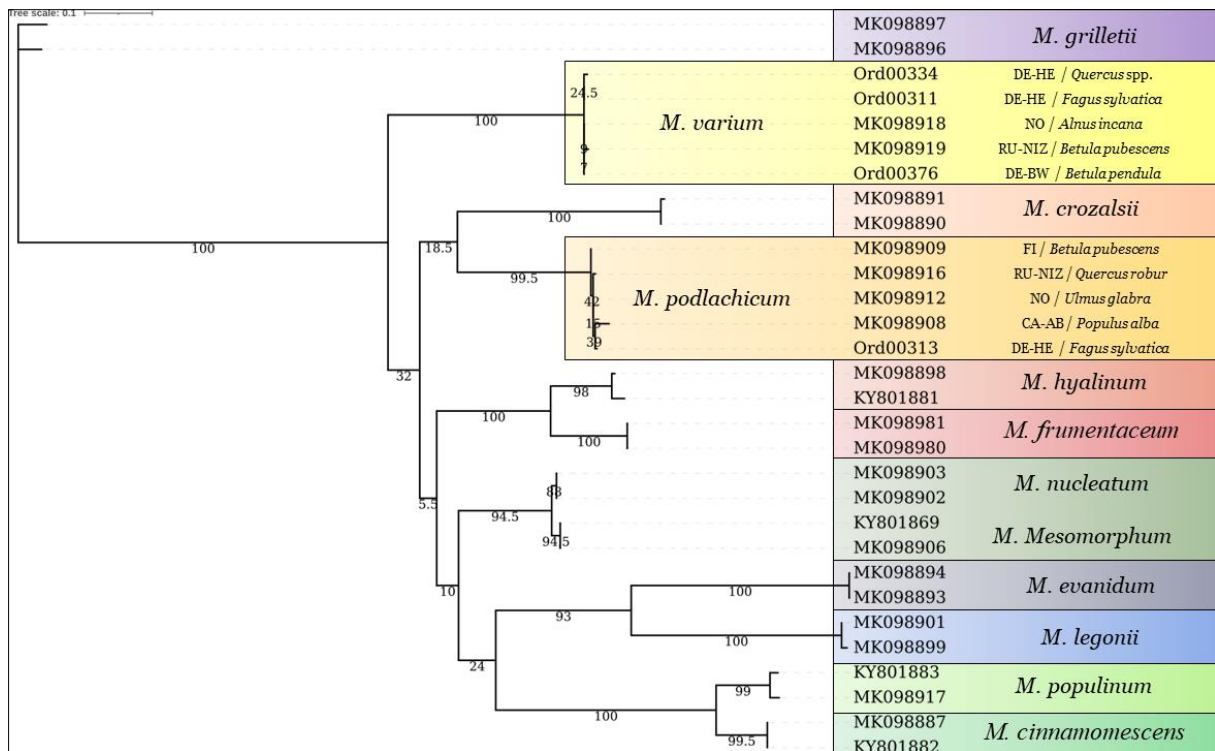


Abbildung 9: Mit dem PhyML+SMS-Tool nach *Maximum-Likelihood* erzeugter phylogenetischer Stammbaum; die Bezeichnungen in der rechtsseitig abgebildeten Skala zeigen eigene Specimen-ID's gemeinsam mit GenBank-Nummern der Gattung *Myxarium*, welche zur Erstellung des DNA-Sequenz-Datensatzes verwendet worden sind; für *M. podlachicum* & *M. varium* sind zusätzlich rechtsseitig Herkunftsländer und Wirte definiert; an den Zweigen angezeigte Support-Daten stellen *bootstrap*-Werte in Prozent dar (*Bootstrap*-Unterstützungen als absolute Zahlen (im Bereich 0-200) um Faktor  $\times 0.5$  skaliert); *tree tips aligned*.

Innerhalb des nach *Maximum-Likelihood* erzeugten phylogenetischen Stammbaums (Abbildung 9) ist auch nach diesem Berechnungsmodell *M. grilletii* evolutionsgeschichtlich am ursprünglichsten eingeordnet. Mit einem *bootstrap*-Wert von 100 % bilden die *M. varium*-Arten eine eigene, stark unterstützte Klade. Die Annahme, alle anderen abzweigenden *Myxarium*-Arten (ohne *M. grilletii*) seien die Schwestergruppe zu *M. varium*, ist mit einem *bootstrap*-Wert von 32 % wenig deutlich unterstützt. Die eigene *M. podlachicum*-Probe bildet ebenfalls erneut nach diesem Berechnungsmodell mit den anderen Sequenzen dieser Art aus der GenBank eine eigene, gut unterstützte Klade (*bootstrap*-Wert = 99,5 %) und sei diesem berechneten Modell zufolge die Schwestergruppe zu *M. crozalsii*, was durch einen *bootstrap*-Wert von 18,5 % jedoch unzureichend unterstützt ist.

## 4. Diskussion und Schlussfolgerungen

Innerhalb der folgenden Diskussion soll abschließend eine kompakte Interpretation, Synthese und Schlussfolgerung der morphologischen und genetischen Daten erfolgen.

### Artenbestimmung der Pilzproben

Die Arten aller Pilzproben konnten durch den in SPIRIN ET AL. 2019 vorliegenden Schlüssel zu europäischen *Myxarien* und ähnlich aussehenden Arten mit Erfolg bestimmt werden. Mit Ausnahme der Probe Ordynets 00376, welcher durch den Bestimmungsschlüssel vorerst statt *M. varium* fälschlicherweise die Art *M. grilletii* zugeordnet worden war (Tabelle 5, Tabelle 6), konnten während des BLAST-Abgleiches alle Artnamen durch hohe Werte für *Percent Identity* und *Query Cover* bestätigt werden (Tabelle 7).

Von allen in SPIRIN ET AL. 2019 beschriebenen, der Ordnung *Auriculariales* zugehörigen Gattungen, sei den Autoren zufolge *Myxarium* die artenreichste und morphologisch am vielfältigsten. Aus diesem Grund könnte es vor allem durch alleinige morphologische Analyse zu Fehlleitungen während des Bestimmungsprozesses kommen. Hierfür spricht, dass auf morphologischer Ebene besonders *M. grilletii* eine große Ähnlichkeit zu *M. varium* besitzt – die Basidiosporen von *M. varium* sind im Durchschnitt schmaler als bei *M. grilletii* und produzieren kontinuierliche Fruchtsände (SPIRIN ET AL. 2019). Mitunter hat sich bei der Betrachtung der Proben ebenfalls gezeigt, dass sich die Erscheinung des Basidiokarps in trockenem und feuchtem Zustand verändern kann. Dies wird durch die Tatsache bestätigt, dass Arten der *Auriculariales* als Gelee-Pilze gelten, die durch ihre gallertartige Konsistenz in der Lage sind, Perioden der Trockenheit zu überdauern (HIBBET ET AL. 2014). Hierdurch könnte es ebenfalls eine Missinterpretation, vor allem bei trockenem, lange gelagerten Herbarmaterial zu Stande kommen.

### Vergleich von Größenbereichen mikroskopischer Strukturen mit Literaturangaben

Für den Vergleich von Größenbereichen sind im Folgenden jene eigenen Arten herangezogen worden, deren initiale morphologische Bestimmung nach einer erfolgreichen Sequenzierung durch einen BLAST verifiziert werden konnten (*M. varium* & *M. podlachicum*).

SPIRIN ET AL. 2019 zufolge können Basidien der Art *M. varium* folgende Größenbereiche einnehmen: (7.8–) 7.9–11.2 (–12.8) × (6.3–) 6.4–9.0 (–9.3) µm. Die in Tabelle 6 erzeugten arithmetischen Mittelwerte der Längen und Breiten von Basidien, sind für alle *M. varium* Proben, darunter Ordynets00311 (9.40 × 7.10 µm), Ordynets 00376 (8.80 × 7.50 µm) und Ordynets00334 (9.16 × 7.34 µm) in vollem Maße mit den Literaturwerten vereinbar. Durch *M. varium* produzierte Basidiosporen können dahingehend Größen von (6.0–) 6.1–9.8 (–10.2) × (2.8–) 2.9–4.5 (–4.8) µm annehmen (SPIRIN ET AL. 2019). Auch hier gibt es keine eigene *M. varium* Probe, welche nicht gut in diese Größenbereiche hineinpassen würde (Ordynets00311: 8.00 × 3.45 µm; Ordynets 00376: 7.83 × 4.31 µm; Ordynets00334: 7.51 × 3.15 µm). Keiner der arithmetischen Mittelwerte (für Basidien & Sporen) reizt die Mindest- und Maximalwerte der zum Vergleich herangezogenen Werte aus.

Nach SPIRIN ET AL. 2019 können Basidien der Art *M. podlachicum* folgende Größenbereiche einnehmen: (8.2–) 8.3–11.0 (–11.8) × (6.4–) 6.8–9.3 (–9.8) µm. Die in Tabelle 6 erzeugten arithmetischen Mittelwerte der Basidienlängen und -breiten sind für die *M. podlachicum* Probe Ordynets00313 (8.16 × 7.10 µm) nur teilweise mit den Literaturwerten vereinbar. Der eigene arithmetische Wert von 8,16 µm als Basidienlänge liegt um 0,04 µm unter den geringstmöglichen Wert aus der Literaturangabe (8,2 µm). Als Fehlerquellen könnten hier mehrere Möglichkeiten in Frage kommen. Zum einen ist es möglich, dass in der Messreihe Basidien enthalten sind, welche noch nicht vollständig ausgereift waren, zum anderen kann eine nicht korrekt angepasste optische Fokussierung durch das Mikroskop zu einer subjektiven Fehleinschätzung der Position der Basidien-Basalscheidewand geführt haben, wodurch die Basidie selbst (ohne stielförmigen Teil) kürzer erschien/gemessen wurde, als sie in Wirklichkeit gewesen ist. Durch *M. podlachicum* produzierte Basidiosporen nehmen den Literaturwerten aus SPIRIN ET AL. 2019 Größen von (5.6–) 5.8–10.1 (–10.2) × (3.0–) 3.1–5.1 (–5.2) µm an.

Der arithmetische Mittelwert der Basidiosporengröße der eigenen *M. podlachicum* Probe (Ordynets00313) lässt sich mit  $6.61 \times 3.67 \mu\text{m}$  passend mit den Literaturwerten vereinbaren.

### Synthese von morphologischen Charakteristika und Sequenz-Daten

Abschließend konnten die Proben nach morphologischer Analyse und Sequenzierung der ITS-Sequenz den beiden *Myxarium* Arten *M. varium* und *M. podlachicum* zugeordnet werden. Verlässt man sich vollständig auf die Bestimmung durch den Schlüssel, wäre als dritte Art *M. hyalinum* für die Probe Ordynets00340 möglich, ein BLAST-Abgleich konnte hier aufgrund qualitativ minderwertig erzeugter Sequenzen nicht stattfinden, weswegen diese Art nicht weiter in die Diskussion miteingebunden werden soll – auch weil sie in den erstellten Stammbäumen nicht mit aufgeführt ist.

### Unterstützung der Kladen in den phylogenetischen Stammbäumen

In RAJA ET AL. 2017 ist beschrieben, dass jene Kladen mit *bootstrap* Werten von  $\geq 70\%$  als signifikant und stark unterstützt gelten – dies gilt für den distanzbasierten und den nach *Maximum-Likelihood* erstellten Stammbäumen, in Bezug auf phylogenetische Stammbäume nach Bayes'scher Interferenz sollen Kladen mit einer *posterior probability* von  $\geq 95\%$  als signifikant und stark unterstützt gelten. Sowohl *M. varium* als auch *M. podlachicum* bilden demnach innerhalb aller drei erzeugten phylogenetischer Stammbäume (Abbildung 7-Abbildung 9) eindeutige, stark unterstützte Kladen.

### Differenzierbarkeit verschiedener phylogenetischer Ansätze

Die mit verschiedenen phylogenetischen Ansätzen abgeleiteten phylogenetischen Stammbäume zeigen unterschiedliche Muster der Artenbeziehung. Sowohl der nach Bayes'scher Interferenz (BI) und der nach *Maximum-Likelihood* (MLE) erzeugte phylogenetische Stammbaum, stimmen dahingehend überein, dass es sich bei *M. varium* um eine sehr ursprüngliche Art handeln muss. Der distanzbasierte phylogenetische Stammbaum hingegen ordnet *M. varium* als die evolutionsgeschichtlich neuste Art ein, welche nach Bayes'scher Interferenz durch *M. podlachicum* dargestellt ist.

Auch in Bezug auf die Zuordnung der Schwestergruppen unterscheiden sich die drei durch verschiedene Rechenmodelle erzeugten phylogenetischen Stammbäume in extremer Weise: innerhalb des MLE-Stammbaumes stellt *M. varium* die Schwestergruppe zu allen anderen aufgeführten *Myxarium*-Arten (ohne *M. grilletii*) dar. Im distanzbasierten Stammbaum hingegen ist *M. varium* als Schwestergruppe zum *M. mesomorphum* / *M. nucleatum*-Komplex angeordnet. Die BI- und MLE-Stammbäume scheinen die Gemeinsamkeit zu besitzen, *M. podlachicum* als Schwestergruppe zu *M. crozalsii* anzuordnen, im distanzbasierten Stammbaum ist *M. podlachicum* hingegen als Schwestergruppe zu allen aufgeführten *Myxarium*-Arten (ohne *M. grilletii*, *M. evanidum* und *M. legonii*) angeordnet.

Bei der Benutzung verschiedener Rechenmodelle zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaumes muss ein Bewusstsein hierfür entstehen, dass es sich um ein Modell handelt, welches sich bestenfalls der Wahrheit nähert und dessen Grenzen durch in den Formeln liegende Faktoren begrenzt wird. Der Benutzer postuliert ein Modell der Evolution und das Softwareprogramm sucht nach dem Stammbaum, welcher am meisten mit dem verwendeten Modell und den Daten bzw. dem vorliegenden Alignment konsistent ist (RAJA ET AL. 2017). Während ein MLE-Modell nach dem Stammbaum sucht, der die Wahrscheinlichkeit der im Baum gegebenen Sequenzdaten maximiert, sucht das BI-Modell nach jenem Stammbaum, der die Wahrscheinlichkeiten des Baums angesichts der Daten und des Modells der Sequenzentwicklung maximiert und implementiert so komplexe Modelle der Nukleotid- oder Aminosäure-Evolution (RAJA ET AL. 2017). Distanzbasierte Methoden lassen sich weniger erfolgreich bei molekularen Sequenzen verwenden, die sich in Bezug auf das Evolutionsgeschehen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit entwickeln und werden daher mit den Jahren von schnelleren modellgestützten Methoden wie BI oder MLE allmählich ersetzt (RAJA ET AL. 2017).

## Geographische Unterschiede und ihre Ausprägung

Besonders auffällig bei Betrachtung der verschiedenen phylogenetischen Bäume (Abbildung 7 - Abbildung 9) ist, dass die ITS-Sequenzen von *M. varium* und *M. podlachicum* anhand des Herkunftslandes und des Wirts der gesammelten Proben nochmals in definierte Kladen zusammengefasst worden sind, welchen ebenso eigene Unterstützungswerte beigemessen wurden. Damit liegen für diese beiden *Myxarium* Arten höchstwahrscheinlich eine intraspezifische genetische Variabilität vor. Eine intragenomische Variation der ribosomalen DNA-Cistrons, welche auch die ITS-Region beinhalten, insbesondere die Erzeugung nicht-homologer diskreter ITS-Varianten, kann hierbei zu widersprüchlichen molekularen Identifizierungen führen (LÜCKING ET AL. 2020).

Beispielweise ist im nach Bayes'scher Interferenz erzeugten phylogenetischer Stammbaum (Abbildung 8) zu erkennen, dass für *M. podlachicum* die Probe „MK098908“ klar von allen anderen Proben abgetrennt wurde, auch wenn diese Abtrennung keine *posterior probability* von  $\geq 95\%$  besitzt und damit nicht als signifikant und stark unterstützt gilt (RAJA ET AL. 2017). In Bezug auf den Faktor der geographischen Lage, mag ein möglicher Grund für diese Abtrennung sein, dass Russland (RU), Norwegen (NO), Finnland (FI) und Deutschland (DE) geografisch einen direkteren Bezug zueinander haben. Jene Länder sind durch Landwege miteinander verbunden und liegen auf ähnlicheren Breitengraden. Kanada (CA) hingegen ist durch den atlantischen und pazifischen Ozean von diesen Ländern abgetrennt und hat somit einen entfernteren geographischen Bezug zu diesen Ländern.

In Bezug auf den Faktor des Wirtes, lässt sich innerhalb des distanzbasierten phylogenetischen Stammbaums (Abbildung 7) für *M. varium* erkennen, dass die Sequenzen der Proben „Ord00376“ und „MK098919“ in einer Klade mit einem *bootstrap*-Support-Wert von 100 % zusammengefasst wurden. Beide Proben stammen zwar aus unterschiedlichen Herkunftsländern, besaßen jedoch den gleichen Wirt. Es läge also nahe, zu vermuten, dass sich die DNA-Sequenzen von *Myxarium*-Proben der gleichen Art genau dann stark ähneln, wenn sie den gleichen Wirt besitzen. Vermutlich begründet sich dies in der Notwendigkeit zu einem ähnlichen Metabolismus, um z. B. Abwehrmechanismen des Wirtes oder gleichzeitig auftretende Pilz-Konkurrenten zu widerstehen sowie den Holzkörper möglichst effizient als Nährstoffquelle benutzbar zu machen.

## 5. Literaturverzeichnis

### Theoretische Grundlagenarbeit

1. Aplin, N. (2021) 'Stypella mirabilis, recollected after 24 years and transferred to the genus Myxarium following DNA barcoding', *Field Mycology*, 22(4), pp. 113–116. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fldmyc.2021.10.004>.
2. Hauerslev, K. 1993, 'The genus Myxarium (Tremellales) from Denmark', *Mycotaxon*, no. 49, pp. 235–256.
3. Hibbett, D.S. *et al.* (2014) '14 Agaricomycetes', in D.J. McLaughlin and J.W. Spatafora (eds) *Systematics and Evolution*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 373–429. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-55318-9\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55318-9_14).
4. Hjortstam, K. *et al.* (1987) *The corticiaceae of North Europe. 1: Introduction and keys*. Oslo: Fungiflora.
5. Hyde, K. (2013) 'Incorporating molecular data in fungal systematics: a guide for aspiring researchers', *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 3(1), pp. 1–32. Available at: <https://doi.org/10.5943/cream/3/1/1>.
6. Lücking, R. *et al.* (2020) 'Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding?', *IMA Fungus*, 11(1), p. 14. Available at: <https://doi.org/10.1186/s43008-020-00033-z>.
7. Nilsson, R.H. *et al.* (2012) 'Five simple guidelines for establishing basic authenticity and reliability of newly generated fungal ITS sequences', *MycoKeys*, 4, pp. 37–63. Available at: <https://doi.org/10.3897/mycokeys.4.3606>.
8. Ordynets, A. *et al.* (2018) 'Short-spored Subulicystidium (Trechisporales, Basidiomycota): high morphological diversity and only partly clear species boundaries', *MycoKeys*, 35, pp. 41–99. Available at: <https://doi.org/10.3897/mycokeys.35.25678>.
9. Ordynets, A., Keßler, S. and Langer, E. (2021) 'Geometric morphometric analysis of spore shapes improves identification of fungi', *PLOS ONE*. Edited by B.T. Šiler, 16(8), p. e0250477. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250477>.
10. Raja, H.A. *et al.* (2017) 'Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community', *Journal of Natural Products*, 80(3), pp. 756–770. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>.
11. Spirin, V. *et al.* (2019) 'A convolute diversity of the Auriculariales (Agaricomycetes, Basidiomycota) with sphaeropedunculate basidia', *Nordic Journal of Botany*, 37(7), p. njb.02394. Available at: <https://doi.org/10.1111/njb.02394>.
12. Spirin, V., Malysheva, V. and Larsson, K.-H. (2018) 'On some forgotten species of *Exidia* and *Myxarium* (Auriculariales, Basidiomycota)', *Nordic Journal of Botany*, 36(3), p. njb-01601. Available at: <https://doi.org/10.1111/njb.01601>.
13. Wallroth, K. F. W. (1833) 'Flora Cryptogamica Germaniae' – J. L. Schrag, *Algas et fungos*.
14. Weiß, M. and Göker, M. (2011) 'Molecular Phylogenetic Reconstruction', in *The Yeasts*. Elsevier, pp. 159–174. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00012-4>.
15. Weiß, M. and Oberwinkler, F. (2001) 'Phylogenetic relationships in Auriculariales and related groups – hypotheses derived from nuclear ribosomal DNA sequences', *Mycological Research*, 105(4), pp. 403 – 415. Available at: <https://doi.org/10.1017/S095375620100363X>.
16. Yang, Z. and Rannala, B. (2012) 'Molecular phylogenetics: principles and practice', *Nature Reviews Genetics*, 13(5), pp. 303–314. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrg3186>.

### Generierung und Verarbeitung von DNA-Sequenzdaten

Lysenko, L. (2020) *Enträtselung der genetischen Variation von Subulicystidium longisporum*. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden (BestMasters). Available at: <https://doi.org/10.1007/978-3-658-29224-9>.



## Systematische Position

[www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org), Date of Access: 14. November 2022, Custodians: The Royal Botanic Gardens Kew represented by the Mycology Section, Landcare Research-NZ, represented by the Mycology Group, and the Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science.

## Ressourcen und Referenzen der verwendeten Programme:

### Smaff (Referenzen und Zitationsstil gemäß Programmausgabe)

Wilk, J. (2012) 'Smaff - Statistische Messreihen-Auswertung für Fungi v3.1', *Südwestdeutsche Pilzrundschau*, 48(2), pp. 49-56.

### RStudio (Streudiagramm)

Analyses were conducted using the R Statistical language (version 4.1.3; R Core Team, 2022) on Windows 10 x64 (build 19045), using the packages here (version 1.0.1; Müller K, 2020), ggplot2 (version 3.3.5; Wickham H, 2016), conflicted (version 1.1.0; Wickham H, 2021) and readr (version 2.1.3; Wickham H et al., 2022).

### References:

1. Müller K (2020). `_here_`: A Simpler Way to Find Your Files\_. R package version 1.0.1, <URL: <https://CRAN.R-project.org/package=here>>.
2. R Core Team (2022). `_R_`: A Language and Environment for Statistical Computing\_. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <URL: <https://www.R-project.org/>>.
3. Wickham H (2016). `_ggplot2_`: Elegant Graphics for Data Analysis\_. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <URL: <https://ggplot2.tidyverse.org>>.
4. Wickham H (2021). `_conflicted_`: An Alternative Conflict Resolution Strategy\_. R package version 1.1.0, <URL: <https://CRAN.R-project.org/package=conflicted>>.
5. Wickham H, Hester J, Bryan J (2022). `_readr_`: Read Rectangular Text Data\_. R package version 2.1.3, <URL: <https://CRAN.R-project.org/package=readr>>.

### MAFFT V.7 (Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences)

### Method:

L-INS-i (Probably most accurate, very slow)

### References:

1. Katoh, K. and Standley, D.M. (2013) 'MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability', *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), pp. 772–780. Available at: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.
2. Katoh, K., Rozewicki, J. and Yamada, K.D. (2019) 'MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization', *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), pp. 1160–1166. Available at: <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>.

### BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy) V. 1.12\_1 - NGPhylogeny.fr (01.12.2022)

1. Criscuolo, A. and Gribaldo, S. (2010) 'BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments', *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), p. 210. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-210>.
2. Lemoine, F. et al. (2019) 'NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for non-specialists', *Nucleic Acids Research*, 47(W1), pp. W260–W265. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz303>.

FastME V. 2.1.6.1\_1 - NGPhylogeny.fr (01.12.2022)

1. Desper, R. and Gascuel, O. (2002) 'Fast and Accurate Phylogeny Reconstruction Algorithms Based on the Minimum-Evolution Principle', *Journal of Computational Biology*, 9(5), pp. 687–705. Available at: <https://doi.org/10.1089/106652702761034136>.
2. Lefort, V., Desper, R. and Gascuel, O. (2015) 'FastME 2.0: A Comprehensive, Accurate, and Fast Distance-Based Phylogeny Inference Program: Table 1.', *Molecular Biology and Evolution*, 32(10), pp. 2798–2800. Available at: <https://doi.org/10.1093/molbev/msv150>.
3. Lemoine, F. *et al.* (2018) 'Renewing Felsenstein's phylogenetic bootstrap in the era of big data', *Nature*, 556(7702), pp. 452–456. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0043-0>.
4. Lemoine, F. *et al.* (2019) 'NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for non-specialists', *Nucleic Acids Research*, 47(W1), pp. W260–W265. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz303>.

iTOL Version 6.6 (Interactive Tree of Life)

Tree of Life: version 1.0 (Ciccarelli FD, *et al.*, *Science.*; 2006 Mar 3. 311(5765): 1283-7)

1. Letunic, I. and Bork, P. (2007) 'Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation', *Bioinformatics*, 23(1), pp. 127–128. Available at: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl529>.
2. Letunic, I. and Bork, P. (2011) 'Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy', *Nucleic Acids Research*, 39(suppl), pp. W475–W478. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkr201>.
3. Letunic, I. and Bork, P. (2016) 'Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees', *Nucleic Acids Research*, 44(W1), pp. W242–W245. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw290>.
4. Letunic, I. and Bork, P. (2019) 'Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments', *Nucleic Acids Research*, 47(W1), pp. W256–W259. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>.
5. Letunic, I. and Bork, P. (2021) 'Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation', *Nucleic Acids Research*, 49(W1), pp. W293–W296. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>.

MrBayes V. 3.2.7\_0

1. Huelsenbeck, J.P. and Ronquist, F. (2001) 'MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees', *Bioinformatics*, 17(8), pp. 754–755. Available at: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>.
2. Lemoine, F. *et al.* (2019) 'NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for non-specialists', *Nucleic Acids Research*, 47(W1), pp. W260–W265. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz303>.

PhyML+SMS V. 1.8.1\_1

1. Guindon, S. *et al.* (2010) 'New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0', *Systematic Biology*, 59(3), pp. 307–321. Available at: <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.
2. Lefort, V., Longueville, J.-E. and Gascuel, O. (2017) 'SMS: Smart Model Selection in PhyML', *Molecular Biology and Evolution*, 34(9), pp. 2422–2424. Available at: <https://doi.org/10.1093/molbev/msx149>.
3. Lemoine, F. *et al.* (2018) 'Renewing Felsenstein's phylogenetic bootstrap in the era of big data', *Nature*, 556(7702), pp. 452–456. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0043-0>.
4. Lemoine, F. *et al.* (2019) 'NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for non-specialists', *Nucleic Acids Research*, 47(W1), pp. W260–W265. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz303>.

Blast

National Library of Medicine – National Center for Biotechnology Information:  
[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastDocs&DOC\\_TYPE=References](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=References)

## 6. Anhang

### Rohgrößenmessungen von Sporen und Basidien

Die im folgenden aufgeführten Rohgrößenmessungen zu Sporen- und Basidiengrößen in Mikrometer sind für Artnamen beschrieben, welche aufgrund von morphologischen Charakteristika über einen Bestimmungsschlüssel festgelegt worden sind. Für durch molekulargenetische Methoden verifizierte Artnamen, siehe Tabelle 7. Zur Ansicht zusammengefasster Messungen pro Exemplar über das Programm „Statistische Messreihen-Auswertung für Fungi V.3.1“ (Smaff), siehe Tabelle 5 & Tabelle 6.

Ordynets00376: *Myxarium grilletii*

Tabelle 9: Rohgrößenmessungen von Sporen und Basidien der Probe „Ordynets00376“.

Sporen			Basidien		
Nummer	Länge	Breite	Nummer	Länge	Breite
1	8	4	1	9	7
2	7	4	2	9	8
3	8	4	3	8	7
4	7	4	4	8	7
5	8	5	5	8	8
6	7	5	6	10	8
7	7	5	7	9	8
8	9	5	8	9	7
9	8	4	9	9	8
10	8	5	10	9	7
11	8	4			
12	13	5			
13	8	4			
14	7	4			
15	8	4			
16	8	5			
17	9	4			
18	8	4			
19	8	4			
20	8	4			
21	8	5			
22	8	5			
23	7	4			
24	7	4			
25	8	4			
26	8	4			
27	9	4			
28	8	4			
29	8	5			
30	7	4			

Tabelle 10: Rohgrößenmessungen von Sporen und Basidien der Probe „Ordynets00340“.

<b>Sporen</b>			<b>Basidien</b>		
<b>Nummer</b>	<b>Länge</b>	<b>Breite</b>	<b>Nummer</b>	<b>Länge</b>	<b>Breite</b>
1	12	5	12	9	12
2	11	4	10	9	10
3	13	4	12	10	12
4	9	4	10	8	10
5	10	5	12	9	12
6	9	4	12	9	12
7	11	4	12	8	12
8	12	4	12	8	12
9	10	4	11	10	11
10	9	4	12	9	12
11	11	4			
12	11	4			
13	11	4			
14	11	4			
15	10	3			
16	10	5			
17	11	4			
18	10	4			
19	10	4			
20	12	4			
21	11	4			
22	12	4			
23	10	4			
24	12	3			
25	11	4			
26	11	5			
27	13	4			
28	9	5			
29	10	5			
30	12	5			

Tabelle 11: Rohgrößenmessungen von Sporen und Basidien der Probe „Ordynets00311“.

<b>Sporen</b>			<b>Basidien</b>		
<b>Nummer</b>	<b>Länge</b>	<b>Breite</b>	<b>Nummer</b>	<b>Länge</b>	<b>Breite</b>
1	8	4	12	8	6
2	9	3	10	9	7
3	8	4	12	10	7
4	8	4	10	10	6
5	7	3	12	9	8
6	8	4	12	9	6
7	8	3	12	10	7
8	8	4	12	10	8
9	6	4	11	9	8
10	8	4	12	10	8
11	9	3			
12	8	3			
13	8	3			
14	7	3			
15	9	4			
16	8	3			
17	9	3			
18	8	4			
19	10	3			
20	8	3			
21	9	3			
22	10	4			
23	8	4			
24	8	4			
25	7	3			
26	7	3			
27	8	4			
28	8	3			
29	7	3			
30	8	4			

Tabelle 12: Rohgrößenmessungen von Sporen und Basidien der Probe „Ordynets00313“.

<b>Sporen</b>			<b>Basidien</b>		
<b>Nummer</b>	<b>Länge</b>	<b>Breite</b>	<b>Nummer</b>	<b>Länge</b>	<b>Breite</b>
1	6,2	3,2	12	8	7
2	7	4	10	7,8	7,2
3	6,2	3,8	12	8,2	7,2
4	6,8	3	10	8	7
5	6,2	3,8	12	8,2	7,2
6	6,4	3,6	12	8,2	7
7	7	3,8	12	8	7
8	6,2	4	12	8,2	7,4
9	6	3,2	11	8,8	7,2
10	6	3,2	12	8,2	6,8
11	7,2	4,2			
12	6,8	3,8			
13	6,2	3,8			
14	6,2	3,8			
15	6,4	3,6			
16	7	4			
17	7	3,8			
18	6,6	3,2			
19	6,4	3,2			
20	6,8	4			
21	6,4	3,4			
22	7,2	4			
23	7	4			
24	6,4	3,4			
25	6,2	3,4			
26	7,2	4			
27	6,6	3,6			
28	6,4	3,4			
29	6,8	4			
30	7,4	4			

Tabelle 13: Rohgrößenmessungen von Sporen und Basidien der Probe „Ordynets00334“.

Sporen			Basidien		
Nummer	Länge	Breite	Nummer	Länge	Breite
1	7,4	3,2	12	9	7
2	8,2	4	10	9	7,8
3	6,8	4	12	8,8	7,2
4	7,2	3	10	9	6,8
5	7,2	3,2	12	8,4	7
6	7,4	3	12	9,8	8
7	8,2	4	12	9	7,6
8	6,8	3,2	12	10	7,8
9	8,2	4	11	9,4	7
10	6	3	12	9,2	7,2
11	8,4	3,2			
12	7,2	3			
13	7,2	3			
14	8	3			
15	7,4	4			
16	8,2	4,4			
17	8,2	3,2			
18	8	4			
19	7,2	3,2			
20	8,4	4,2			
21	7,2	2,8			
22	8	3			
23	8,2	4			
24	6,8	3,4			
25	6,2	3			
26	7	3,4			
27	7,2	3,8			
28	7,6	3,4			
29	7,4	3,2			
30	8,2	3,8			