

Fachgebiet Ökologie
Wintersemester 2022/2023

Praktikumsbericht

Forschungsmodul Ökologie/Mykologie

Name: Jan Rudolph

Prüfer: Dr. Oleksandr Ordynets

Veranstaltungsnummer: FB1018.0715

Abgabedatum: 16.01.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Ordnung <i>Thelephorales</i>	1
1.2. Die Gattung <i>Tomentellopsis</i>	1
1.3. Pilzliche Systematik und DNA-basierte Methoden.....	3
1.4. Zielsetzung	7
2. Material und Methoden.....	8
2.1. Proben	8
2.2. Morphologische Untersuchung.....	8
2.3. Phylogenetische Untersuchung.....	9
2.3.1. DNA-Isolation	9
2.3.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	10
2.3.3. DNA-Sequenzierung.....	10
2.3.4. Sequenz-Editierung	11
2.3.5. Alignment Erstellung.....	11
2.3.6. Stammbaum Berechnung	12
3. Ergebnisse	14
3.1. Morphologische Untersuchung.....	14
3.2. Phylogenetische Untersuchung.....	16
3.2.1. DNA-Isolation und PCR.....	16
3.2.2. Sequenz-Editierung	17
3.2.2. Alignment-Erstellung	17
3.2.3. Stammbaum Berechnung	18
3.2.3.1. <i>Distance-based</i>	18
3.2.3.2. <i>Bayesian inference</i>	19
3.2.3.3. <i>Maximum likelihood</i>	20
4. Diskussion.....	22
4.1. Morphologische Untersuchung.....	22
4.2. Phylogenetische Untersuchung.....	23
5. Zusammenfassung	27
6. Literaturverzeichnis	28
7. Abbildungsverzeichnis.....	30
8. Tabellenverzeichnis.....	30
Anhang:.....	31

1. Einleitung

1.1. Die Ordnung *Thelephorales*

Bei den *Thelephorales* handelt es sich um eine Ordnung innerhalb der Klasse der *Agaricomycetes* in der Abteilung der Basidiomycota (Hibbett *et al.* 2014). Die Ordnung umfasst die zwei Familien *Thelephoraceae* und *Bankeraceae* mit insgesamt 18 Gattungen und 269 beschriebenen Arten. Die Vertreter der Ordnung weisen eine große morphologische Diversität auf, wobei Arten mit corticioiden Fruchtkörpern auftreten, als auch welche mit cantharelloiden, clavarioiden oder pileaten Fruchtkörpern (Hibbett *et al.* 2014). Die Basidiosporen besitzen meist eine dunkle Färbung und sind häufig ornamentiert mit Stacheln. In Aufsicht sind sie oft eckig, können aber auch eine kugelige Form besitzen (Hibbett *et al.* 2014). Die Gattungen *Amaurodon* und *Tomentellopsis* besitzen hyaline und nur schwach ornamentierte Sporen, weshalb ihre Stellung innerhalb der *Thelephorales* angezweifelt wurde, bis ihre Zugehörigkeit anhand molekular-genetischer Daten gesichert wurde (Larsson 2007). Auch in ihrer Lebensweise gibt es bei einigen Arten Unterschiede zu den Übrigen Vertretern der Ordnung. Während es sich bei den meisten Arten um Ektomykorrhiza handelt, weisen die Gattung *Lenzitopsis* und *Amaurodon* eine saprophytische Lebensweise auf (Hibbett *et al.* 2014, Miettinen & Koljalg 2007, Dämmrich & Rödel 2004). Für *Amaurodon* wurde zudem das Auftreten auf lebendigem Holz beobachtet (Hibbett *et al.* 2014). Die Gattung *Amaurodon* wurde anhand phylogenetischer Untersuchungen als Schwestergruppe zu allen anderen Vertretern der *Thelephorales* eingeordnet, während *Lenzitopsis* innerhalb des Stammbaumes nah verwandt zur Gattung *Tomentellopsis* platziert wurde. Obwohl die Verwandtschaftsbeziehung zwischen den *Thelephoraceae* und *Bankeraceae* mehrfach anhand molekularer Daten gefestigt wurde, ist dies für viele Knotenpunkte innerhalb der Familien noch nicht der Fall (Hibbett *et al.* 2014). Daher werden weitere ausführlichere Studien benötigt, um die Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Ordnung *Thelephorales* zu entschlüsseln.

1.2. Die Gattung *Tomentellopsis*

Bei *Tomentellopsis* Hjortstam (1970) handelt es sich um eine relativ kleine Gattung von ektomykorrhiza-bildenden Pilzen innerhalb der Familie der *Thelephoraceae* (Koljalg *et al.* 2009, Kuhar *et al.* 2022). Oberirdisch finden sich die Fruchtkörper auf totem Holz wachsend (Stalpers 1993). Die Fruchtkörper der Gattung besitzen eine filz-ähnliche resupinate Wuchsform (Koljalg 1996). Sowohl die subicularen Hyphen als auch die subhymenialen Hyphen und Basidien sind einfach septiert, dünnwandig und weisen in 3 % KOH (Kaliumhydroxid) eine hyaline Färbung auf (Koljalg 1996). Die beutelförmigen (utriform) Basidien erreichen in der

Regel eine Länge von bis zu 40 µm und besitzen vier Sterigmata. Das Auftreten von Zystiden wurde noch nicht beobachtet. Außerdem besitzen alle Arten nahezu globulär geformte Sporen mit einer stacheligen Oberfläche, welche in 3% KOH eine hyaline Färbung besitzen (Koljalg 1996). Die Unterscheidung der Arten findet hauptsächlich anhand der Färbung des Hymeniums und leichter Variationen in der Sporen- und Basidiengröße statt (Stalpers 1993, Koljalg 1996).

Nach dem Onlineverzeichnis Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/>) wurden für die Gattung bisher neun Arten beschrieben. Die erste beschriebene Art der Gattung war *T. echinospora*, welche ursprünglich durch Ellis (1881) als *Corticium echinosporum* beschrieben und später von Hjortstam (1970) in *Tomentellopsis echinospora* umbenannt wurde (Koljalg *et al.* 2002). Darauf folgend beschrieb Svrcek (1958) die Art *Pseudotomentella submollis* (später *T. submollis*), welche in zwei Formen (f. *immaculata* und f. *submollis*) mit jeweils unterschiedlich gefärbtem Hymenium auftreten sollte (Koljalg *et al.* 2002). In den folgenden Jahren wurden weitere Arten beschrieben, wobei es bei der genauen Klassifizierung der verschiedenen Spezies einige Unstimmigkeiten gab. So erkannte Stalpers (1993) mit den Arten *T. echinospora*, *T. pusilla*, *T. bresadoliana*, *T. zygoesmoides* und *T. submollis* insgesamt fünf Arten für die Gattung an, während Koljalg (1996) lediglich drei Arten (*T. echinospora*, *T. pusilla*, *T. zygoesmoides*) zu diesem Taxon zählte. Dabei beschrieb Koljalg (1996) *T. submollis* fälschlicherweise als Synonym unter *T. echinospora*, da eine Untersuchung der ursprünglichen *T. submollis* f. *immaculata* Akzessionen von Svrcek ergab, dass es sich um *T. echinospora* handelte (Koljalg *et al.* 2002). Eine phylogenetische Untersuchung von Koljalg *et al.* (2002) anhand von ITS (*internal transcribed spacer*) Daten widerlegte diese Einordnung, da *T. echinospora* und *T. submollis* deutlich als eigene Taxa separiert wurden. Die ermittelten *pairwise base difference* der ITS Sequenzen ließen zudem weitere Vermutungen über die Diversität der Gattung zu. Da die Akzessionen von *T. echinospora* eine paraphyletische Gruppe bildeten und zwischen ihren ITS Sequenzen Unterschiede von 0% bis 7% auftraten, könnte es sich dabei um mehrere Taxa gehandelt haben. Eine ähnliche Beobachtung wurde für die *T. bresadoliana* Proben gemacht, welche ebenfalls ein Paraphylum aus zwei Kladen bildeten, die sich um 8-9% unterschieden. Diese Beobachtungen zur größeren Diversität der Gattung wurden einige Jahre später nochmals bestätigt. Koljalg *et al.* (2009) beschrieben eine neue Art als *T. pulchella*, welche anhand von ITS Daten nah verwandt zu *T. bresadoliana* eingeordnet wurde. Zudem wurden ähnlich große Differenzen zwischen den ITS Sequenzen von *T. bresadoliana* und *T. pulchella* gefunden, wodurch erneut auf die Existenz von mehreren Taxa geschlossen wurde (Koljalg *et al.* 2009). Die neuste beschriebene Art ist *T. rosannae*, welche anhand von Akzessionen aus Patagonien beschrieben wurde (Kuhar *et al.* 2022). Morphologisch ähnelt sie *T. echinospora*, unterscheidet sich allerdings durch eine Basidienlänge von bis zu 60 µm von allen anderen

Taxa der Gattung *Tomentellopsis* (Kuhar *et al.* 2022). Zudem zeigte die Art, trotz morphologischer Unterschiede und geographischer Lage, die engste Verwandtschaft zu *T. zygodesmoides*, welche meist in der nördlichen Hemisphäre etwa in Eurasien anzutreffen ist (Koljaljg 1996, Koljaljg *et al.* 2002, Kuhar *et al.* 2022).

1.3. Pilzliche Systematik und DNA-basierte Methoden

Die Bestimmung von Pilz-Taxa erfolgte ursprünglich anhand der Morphologie (Raja *et al.* 2017). Dabei dienten unterschiedliche phänotypische Eigenschaften wie Größe und Form der Sporen oder Sporangien als Unterscheidungsmerkmal zwischen den Arten (Raja *et al.* 2017). Diese Methodik ist allerdings nicht immer zuverlässig anwendbar, da einige Taxa anhand von Morphologie nur schwer unterscheidbar sind oder intraspezifisch eine große Plastizität bezüglich ihres Phänotyps aufweisen (Raja *et al.* 2017, Lücking *et al.* 2020). Des Weiteren wird die Bestimmung anhand der Morphologie durch das Auftreten von Hybriden oder durch konvergente Evolution entstandene ähnliche Taxa weiter verkompliziert (Raja *et al.* 2017). Aufgrund dessen hat sich in den letzten Jahren die Bestimmung mittels genetischer Daten etabliert, wobei zwei Methoden meist Anwendung finden (Raja *et al.* 2017, Lücking *et al.* 2020). Bei der ersten Methode handelt es sich um die Bestimmung mittels DNA-Barcoding. Dabei wird eine Marker-Sequenz mit bekannten Referenz-Sequenzen aus einer Datenbank verglichen und somit das zugehörige Taxon ermittelt. Die zweite Methode, DNA Taxonomie, verwendet Marker-Sequenzen, um aus einem Multiplen Sequenzalignment phylogenetische Stammbäume zu berechnen, an denen anschließend die Verwandtschaftsbeziehungen abgelesen werden können (Raja *et al.* 2017).

Als molekulare Marker haben sich in den letzten Jahren drei Sequenzen durchgesetzt, welche jeweils Teil der nukleären, ribosomalen DNA sind (Raja *et al.* 2017). Die Marker-Regionen variieren dabei in ihren Evolutionsraten, wodurch jeder Marker auf einer anderen taxonomischen Ebene Verwendung findet (Raja *et al.* 2017). Der Marker mit der geringsten Evolutionsrate ist die DNA Sequenz für die kleine ribosomale Untereinheit (nrSSU-18S), wodurch er die geringste Variation aufweist und für Klassifizierungen auf Familien- oder Ordnungsebene verwendet wird. Die nächst größere Variation zeigt die Sequenz für die große ribosomale Untereinheit (nrLSU-26S oder 28S), weshalb sie auch auf Gattungsebene Anwendung findet. Die größte Evolutionsrate wurde bei der Region beobachtet, die sich zwischen den Sequenzen der kleinen und großen ribosomalen Untereinheiten befindet, dem *internal transcribed spacer* (ITS, ITS1-5.8S-ITS2) (Abb. 1) (Raja *et al.* 2017). Auf Grund der größten Variation kann die ITS-Region der Bestimmung auf Art-Ebene dienen und wurde zum offiziellen Marker für Pilzidentifizierung ernannt (Raja *et al.* 2017). Einer der Vorteile der ITS-Region als molekularer Marker ist der angemessen große *Barcode-gap*, welcher den

Unterschied zwischen der interspezifischen und intraspezifischen Variation darstellt (Raja *et al.* 2017). Dabei ist die interspezifische Variation meist größer als die intraspezifische, wodurch Taxa auf Artebene unterschieden werden können (Raja *et al.* 2017).

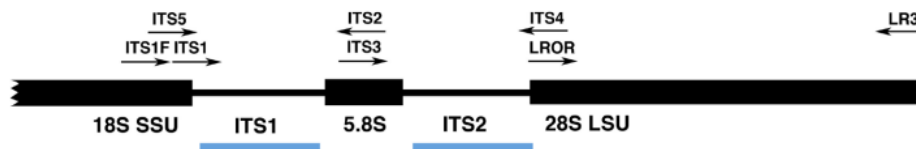


Abbildung 1: Darstellung der ITS-Region. Die ITS-Region bestehend aus den Sequenzabschnitten ITS1, 5.8S und ITS2. Angrenzend daran im vorderen Bereich die Sequenz für die kleine ribosomale Untereinheit (18S SSU) und im hinteren Bereich die große ribosomale Untereinheit (28S LSU). Primer zur Amplifikation der jeweiligen Abschnitte sind durch Pfeile gekennzeichnet. Abbildung entnommen und verändert nach Raja *et al.* 2017.

Ein weiterer Vorzug ist das Vorhandensein einer großen Anzahl Referenzsequenzen in verschiedenen Datenbanken (Raja *et al.* 2017, Lücking *et al.* 2020). Da sich die ITS-Region als Standardmarker etabliert hat, existieren bereits Sequenzdaten von etwa 30 % der bisher beschriebenen Arten (Lücking *et al.* 2020). Sollte die ITS-Region als Marker alleine für eine sichere Bestimmung nicht ausreichend sein, wird diese häufig in Kombination mit sekundären Markern verwendet (Raja *et al.* 2017, Lücking *et al.* 2020). Einige häufig verwendete sekundäre Marker sind protein-codierende Gene wie die größte und zweit größte Untereinheit der RNA Polymerase (*RPB1* und *RPB2*), der *translation elongation factor 1-alpha* (*tef1*) oder β -Tubulin (*tub2/BenA*) (Raja *et al.* 2017, Lücking *et al.* 2020). Diese finden oft in Studien einiger artenreicher und eng verwandter Taxa von Schimmelpilzen (z.B. *Aspergillus* oder *Penicillium*) oder pathogenen Pilzen (z. B. *Cladosporium*, *Fusarium* oder *Phytophthora*) Verwendung, bei denen der *barcode-gap* der ITS-Region zu gering ist (Raja *et al.* 2017, Lücking *et al.* 2020). Neben der geringen interspezifischen Auflösung einiger Taxa stellt das Auftreten von intragenomischer Variation ein weiteres Problem für die Anwendung der ITS-Region dar (Raja *et al.* 2017, Lücking *et al.* 2020). Da die Sequenz in mehreren Kopien im Genom vorhanden ist, können Variationen zwischen verschiedenen Kopien zu problematisch auswertbaren Sequenz-Chromatogrammen im Anschluss an die Sequenzierung führen (Lücking *et al.* 2020, Paoloi *et al.* 2022) (Abb. 2). Während Punktmutationen nur für einige wenige Basenpositionen ein Problem darstellen, kann Hybridisierung oder Introgression große Bereiche beeinflussen, wodurch weitere Techniken zur genaueren Auflösung benötigt werden (Lücking *et al.* 2020). In einigen Taxa kann ebenfalls interspezifische und intergenomische Längenheterogenität ein Problem darstellen (Lücking *et al.* 2020). Bei einigen Taxa können Längenunterschiede von über 600 Basenpaaren auftreten, wodurch es zu Komplikationen bei der Erstellung eines Sequenzalignments kommen kann (Lücking *et al.* 2020).

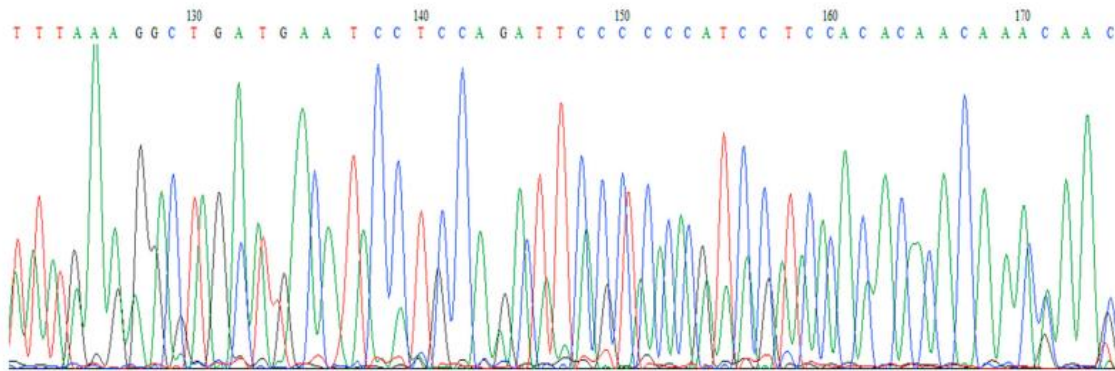


Abbildung 2: Ausschnitt eines Sequenz-Chromatogramms. Das Beispiel eines Sequenz-Chromatogramms im Anschluss an eine Sanger-Sequenzierung der ITS-Region. Die Überlappung der *Peaks* entstand durch vorhanden sein von intraindividuelle Variation. (Abbildung nach Paoloi *et al.* 2022).

Während bei dem DNA-Barcoding Zielsequenzen direkt mit Referenzsequenzen auf Ähnlichkeit verglichen werden, wird in der DNA-Taxonomie aus mehreren Sequenzen ein Alignment generiert, welches zur Berechnung eines phylogenetischen Stammbaumes benutzt wird. Dafür existieren verschiedene Methoden, welche sich basierend darauf wie sie mit den Daten arbeiten in Distanzmethoden und diskrete Methoden einteilen lassen (Yang & Rannala 2012). Bei Distanzmethoden wird anhand des Sequenzalignments zunächst eine Distanzmatrix berechnet, welche anschließend für die Erstellung der Stammbäume verwendet wird (Page 2003, Yang & Rannala 2012). Die am häufigsten verwendete Distanzmethode ist Neighbour-Joining (Page 2003). Dabei wird ein Cluster-Algorithmus verwendet, welcher ausgehend von einem sternförmigen Baum jeweils zwei Taxa mit der geringsten Distanz zueinander gruppiert (Yang & Rannala 2012). Dies wird Schritt für Schritt wiederholt bis der Stammbaum vollständig aufgelöst ist. Bei diskreten Methoden werden hingegen die einzelnen Nukleotide im Alignment direkt betrachtet und für jeden Stammbaum ein *Score* berechnet, anhand dessen der beste Stammbaum ausgewählt wird (Page 2003). Häufig verwendete diskrete Methoden sind *Maximum parsimony* (MP), *Maximum likelihood* (ML) und *Bayesian inference* (Page 2003, Yang & Rannala 2012). Bei *Maximum parsimony* wird der Stammbaum ausgewählt, welcher die geringste Anzahl an Evolutionsschritten benötigt, um die vorliegenden Daten zu erklären (Page 2003). Hingegen wird nach der *Maximum likelihood* Methode der Baum gewählt, der anhand des verwendeten evolutionären Modells die höchste Wahrscheinlichkeit hat (Page 2003). Bei der Verwendung von *Bayesian inference* wird der Baum mit der höchsten A-posteriori-Wahrscheinlichkeit gewählt, welche die Wahrscheinlichkeit wiedergibt, dass der gewählte Baum anhand des gegebenen evolutionären Modells der Realität entspricht (Page 2003). Während die A-posteriori-Wahrscheinlichkeit in der *Bayesian Inference* Methode gleichzeitig als Vertrauenswerte für die verschiedenen Knoten im Baum dienen, fehlen diese Werte bei allen anderen Berechnungsmethoden (Page 2003). Im Falle der anderen Methoden wird daher auf das Berechnen von *Bootstrap*-Werten

zurückgegriffen (Yang & Rannala 2012). Durch zufälliges Ziehen (nach dem Modell: Ziehen mit Zurücklegen) von Spalten aus dem ursprünglichen Alignment entsprechend der Sequenzlänge, wird somit ein Pseudoreplikat des originalen Alignments generiert und für dieses eine Stammbaumberechnung durchgeführt (Page 2003, Abb. 3). Dies wird mehrmals wiederholt. Die Bootstrap-Werte entsprechen anschließend der Frequenz, mit der bestimmte Kladen des originalen Alignments in den Bootstrap-Stammbäumen auftreten (Page 2003, Russo & Selvatti 2018).

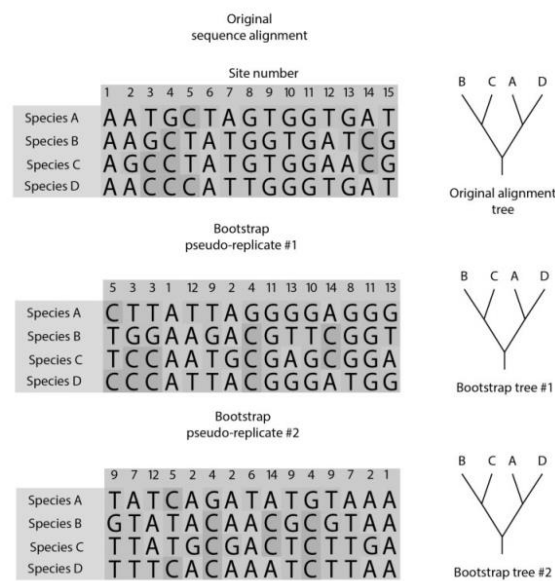


Abbildung 3: Vorgang des Bootstrap-Algorithmus. Aus dem originalen Alignment werden Pseudoreplikate generiert für die ebenfalls Stammbäume berechnet werden. Die Bootstrap-Werte entsprechen der Frequenz mit der bestimmte Klade des originalen Alignments in den Bootstrap-Bäumen vertreten sind. (Abbildung nach Russo & Selvatti 2018).

Jede der Methoden zur Stammbaumberechnung besitzt unterschiedliche Vor- und Nachteile in der Verwendung und welche Methode am besten geeignet ist, ist abhängig von dem Datenset und der zur beantwortenden Fragestellung (Page 2003). Für große Datenmengen eignen sich Distanzmethoden, da sie eine geringere Rechenleistung benötigen (Yang & Rannala 2012). Allerdings sind sie ungeeignet für Datensets aus stark unterschiedlichen Sequenzen oder großen Alignment-Gaps (Yang & Rannala 2012). Diskrete Methoden wie *Maximum likelihood* oder *Bayesian inference* benötigen eine deutlich größere Rechenleistung, ermöglichen allerdings unter anderem das Herleiten von Eigenschaften von bereits ausgestorbenen Vorfahren (Page 2003).

1.4. Zielsetzung

Vorangegangen an diese Arbeit wurden von 2019 bis 2022 in Mitteleuropa fünf Proben von corticioiden Pilzen gesammelt, welche bereits vorbestimmt und der Gattung *Tomentellopsis* zugeordnet wurden. Diese Arbeit hat zum Ziel die zuvor vorgenommene Artbestimmung zu bestätigen oder zu korrigieren. Dazu soll zunächst für jede Probe eine morphologische Untersuchung der Basidien und Basidiosporen durchgeführt werden, deren Größe und Form als Bestimmungsmerkmal dienen können. Anschließend folgt eine molekular genetische Untersuchung der ITS-Region. Aus den daraus erhaltenen Sequenzen sollen phylogenetische Stammbäume generiert werden, welche anschließend der Artidentifizierung dienen.

2. Material und Methoden

2.1. Proben

Für die folgenden Untersuchungen wurde bereits vorliegendes Fungarmaterial von fünf Exemplaren der Gattung *Tomentellopsis* verwendet. Die Proben waren zuvor von Oleksandr Ordynets im Zeitraum von 2019 bis 2022 gesammelt und vorbestimmt worden. Die untersuchten Proben sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Auflistung der in Mitteleuropa im Zeitraum von 2019 bis 2022 gesammelten Proben der Gattung *Tomentellopsis*. Aufgelistet sind Proben-ID, das vorbestimmte Taxon, der Fundort der Probe sowie das Sammeldatum.

Proben-ID	Taxon	Lokalität	Sammeldatum
Ordynets00181	<i>Tomentellopsis</i> sp.	Polen Lat.: 52.80304837 Lon.: 23.75359961	20.09.2019
Ordynets00281	<i>Tomentellopsis</i> <i>echinospora</i>	Deutschland Lat.:48.655777 Lon.: 8.26778	27.10.2021
Ordynets00283A	<i>Tomentellopsis</i> <i>submollis</i>	Deutschland Lat.: 48.655777 Lon.: 8.26778	27.10.2021
Ordynets00284	<i>Tomentellopsis</i> <i>submollis</i>	Deutschland Lat.: 48.655777 Lon.: 8.26778	27.10.2021
Ordynets00405	<i>Tomentellopsis</i> <i>submollis</i>	Deutschland Lat.: 48.47403 Lon.: 8.28774	27.10.2022

2.2. Morphologische Untersuchung

Die morphologische Untersuchung erfolge anhand der Größenmessung der Basidien und Basidiosporen. Dazu wurden Quetschpräparate in einer Lösung aus 5%igem (KOH) Kaliumhydroxid und 1%igem Phloxin B im Verhältnis (3:1) angefertigt. Die Messungen erfolgten unter dem Lichtmikroskop (Leica DM500) bei 1000-facher Vergrößerung anhand des Okular-Mikrometers. Je Probe wurden die Längen und Breiten von 30 Basidiosporen und 10 Basidien gemessen. Dabei wurden nur Sporen gemessen die noch intakt (ohne beschädigte Zellwand) und von den Basidien losgelöst waren. Im Falle der Basidien wurden nur Exemplare vermessen die Sterigmata ausgebildet hatten.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm Smaff (Statistische Messreihen – Auswertung für Fungi, Version 3.1., Wilk 2012). Dazu wurden die Messergebnisse in das

Programm eingelesen und mit Hilfe der Funktion „Ausreißertest“ alle Messwerte mit zu großen Abweichungen entfernt. Anschließend ließen sich die Ergebnisse für Minimal-, Maximal- und Mittel-Werte der Parameter Länge, Breite und Quotient aus Länge und Breite ablesen. Die ermittelten Größen dienten schließlich dem Vergleich mit Daten aus der Literatur.

Zudem wurde mit dem Programm R (Version 4.1.2; R Core Team 2021) (für Skript siehe Anhang) ein Streudiagramm erstellt, um die Verteilung der Sporengrößen zwischen den untersuchten Proben zu visualisieren.

2.3. Phylogenetische Untersuchung

Im Anschluss an die morphologischen Untersuchungen wurde von jeder Probe DNA isoliert, eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt und die generierten Fragmente sequenziert. Anschließend wurden verschiedene Sequenzen der Gattung *Tomentellopsis* aus GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) heruntergeladen und zusammen mit den eigens generierten Daten wurden phylogenetische Stammbäume berechnet. Dadurch sollte anhand von genetischen Daten eine taxonomische Einordnung ermöglicht werden. Ebenfalls wurde dadurch überprüft, ob die Ergebnisse der morphologischen Untersuchung mit denen der genetischen Untersuchung übereinstimmten oder es Unterschiede gab.

2.3.1. DNA-Isolation

Für die DNA-Isolation wurden je Probe ca. 1 cm² Probenmaterial zusammen mit zwei Metallkugel in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 5 Minuten bei 30 Hz gemahlen. Anschließend wurden 600 µl FG1-Puffer und 10 µl Proteinase K hinzugegeben und die Lösungen für 20 Minuten bei 65 °C im Heizblock inkubiert. Dann folgte die Zugabe von 140 µl FG2-Puffer und die Proben wurden für 10 Minuten bei 10000 Umdrehungen pro Minute (rpm, rounds per minute) zentrifugiert. Anschließend wurde die Überstände in neue 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Im Anschluss wurden 300 µl FG3-Puffer und 600 µl 100%iger Ethanol hinzugegeben und gemischt. Dann wurden 750 µl der Lösungen auf *HiBind® DNA Mini Columns* gegeben und diese für 1 Minute bei 10000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dies wurde wiederholt bis das gesamte Volumen über die *HiBind® DNA Mini Columns* gelaufen war. Nun wurde zweimal je 700 µl DNA-Waschpuffer auf die *HiBind® DNA Mini Columns* gegeben, 1 Minute bei 10000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im Anschluss wurden die *HiBind® DNA Mini Columns* nochmals für 2 Minuten bei 10000 rpm trocken zentrifugiert. Die *HiBind® DNA Mini Columns* wurden nun in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 100 µl steriles, deionisiertes, 65 °C warmes Wasser darauf gegeben. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten. Abschließend wurde für 1 Minute bei

10000 rpm zentrifugiert. Die letzten Schritte wurden nochmals mit weiteren 100 µl Wasser in einem zweiten 1,5 ml Reaktionsgefäß wiederholt. Die gewonnene DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR hatte zum Ziel eine *Internal Transcribed Spacer* (ITS)-Sequenz mittels der Primer ITS1f und ITS4 zu amplifizieren. Die Amplifikation wurde durchgeführt in Ansätzen bestehend aus 17,15 µl H₂O, 2,5 µl Puffer, 0,75 µl MgCl₂, 1 µl dNTPs, 0,5 µl jedes Primer, 0,1 µl *Taq* (*Thermus aquaticus*)-Polymerase, 0,1 µl BSA (Bovines Serumalbumin) und 2,5 µl DNA.

Das verwendete PCR-Programm verlief wie folgt: Denaturierung bei 94 °C für 3 Minuten, gefolgt von 29 Zyklen aus Denaturierung bei 94 °C für 30 Sekunden, Annealing bei 55 °C für 45 Sekunden und Elongation bei 72 °C für 59 Sekunden, gefolgt von einer abschließenden Elongation bei 72 °C für 7 Minuten.

Der Erfolg der PCR wurde anschließend auf einem Agarosegel überprüft. Dazu wurden je 3 µl des PCR-Produktes auf das Gel aufgetragen und für ca. 30 Minuten eine Spannung von etwa 90 V angelegt.

2.3.3. DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung mussten die PCR-Produkte zunächst aufgereinigt werden. Dazu wurde zunächst eine Mischung aus 230 µl PB-Puffer und 5 µl Natriumacetat zu 50 µl der PCR-Produkte hinzugegeben. Anschließend wurden Lösungen auf *QIAquick columns* aufgetragen und für 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 700 µl PE-Puffer aufgetragen. Dann wurde zweimal für 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die *QIAquick columns* wurden dann in 1,5 ml Reaktionsgefäße gesteckt und 40 µl EB-Puffer hinzugegeben. Nach 5-minütigem Inkubieren bei Raumtemperatur wurde für 2 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und die *QIAquick columns* verworfen. Im Anschluss an die Aufreinigung der PCR-Produkte wurden für jede Probe zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße bereitgestellt. In ein Reaktionsgefäß wurden 5 µl des PCR-Produktes und 5 µl ITS1f-Primer gegeben und in das zweite 5 µl PCR-Produkt und 5 µl ITS4-Primer. Die Mischungen aus PCR-Produkt und Primer wurden anschließend an Eurofins Genomics (<https://eurofinsgenomics.eu/>) gesendet, welche die Sequenzierung durchführten.

2.3.4. Sequenz-Editierung

Die Bearbeitung der durch die Sequenzierung der PCR-Produkte erhaltenen Sequenzen erfolgte mit dem Programm Geneious (Version 5.6.7; <https://www.geneious.com/>). Für jede Probe lagen zwei Sequenzen vor, wobei es sich um den *forward read* und den *reverse read* des amplifizierten Locus handelte. Zunächst wurden die ungenauen Enden der Sequenzen entfernt. Dies geschah mittels der *Trim Ends*-Funktion und einem eingestellten *Error Probability Limit* von 0,01. Dann wurde für die *reverse reads* jeweils das *reverse complement* gebildet, um die Sequenzen in die richtig Orientierung zu bringen und anschließend ein Alignment der beiden *reads* je Probe zu erstellen. Die Alignments wurden auf Unstimmigkeiten überprüft und falls benötigt entsprechend editiert. Abschließend wurde für jede Probe eine Konsensussequenz erstellt.

Für jede Konsensussequenz wurde zudem eine BLAST-Suche (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastn) durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Sequenzen mit Arten der Gattung *Tomentellopsis* übereinstimmten.

2.3.5. Alignment Erstellung

Zur weiteren Bearbeitung der Daten wurde ein größeres Datenset erstellt. Dazu wurden bereits vorliegende ITS-Sequenzdaten verschiedener Arten der Gattung *Tomentellopsis* aus GenBank herangezogen, welche bereits in vorherigen Arbeiten Verwendung fanden (Koljalg *et al.* 2002, Kuhar *et al.* 2022) (Tab. 2). Anschließend folgte das zusammenfassen der eigenen und der GenBank Sequenzen in einer .fasta Datei und mittels der Online-Software MAFFT (Version 7, <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) wurde ein Alignment erstellt. Dabei erfolgte die Generierung entsprechend der Verwendung der *iterative refinement method* „L-INS-i“ und aller anderen Standardeinstellungen. Über die Website NGPhylogeny.fr (<https://ngphylogeny.fr/>) und das dortige Tool BMGE (Version 1.12_1; Crisuolo & Gribaldo 2010) wurden unter Verwendung der Standardeinstellungen die überstehenden und weniger informativen Bereiche des Alignments entfernt. Die gekürzte Version des Alignment diente in den nächsten Schritten der Berechnung der phylogenetischen Stammbäume.

Tabelle 2: Auflistung der GenBank Akzessionsnummern für die Sequenzen der *Tomentellopsis* Arten, welche für die Erstellung des Alignments der ITS-Region heruntergeladen wurden.

Art	GenBank Akzessionsnummer
<i>Tomentellopsis echinospora</i>	AJ410756
<i>Tomentellopsis echinospora</i>	AJ410757
<i>Tomentellopsis echinospora</i>	AJ410758
<i>Tomentellopsis zygoesmoides</i>	AJ410759
<i>Tomentellopsis zygoesmoides</i>	AJ410760
<i>Tomentellopsis zygoesmoides</i>	AJ410761
<i>Tomentellopsis echinospora</i>	AJ410767
<i>Tomentellopsis bresadoliana</i>	AJ410769
<i>Tomentellopsis submollis</i>	AJ410770
<i>Tomentellopsis submollis</i>	AJ410771
<i>Tomentellopsis submollis</i>	AJ410772
<i>Tomentellopsis submollis</i>	AJ410773
<i>Tomentellopsis submollis</i>	AJ410774
<i>Tomentellopsis echinospora</i>	AJ410775
<i>Tomentellopsis echinospora</i>	AJ410776
<i>Tomentellopsis submollis</i>	AJ410777
<i>Tomentellopsis bresadoliana</i>	AJ410778
<i>Tomentellopsis bresadoliana</i>	AJ410779
<i>Tomentellopsis bresadoliana</i>	AJ410780
<i>Tomentellopsis submollis</i>	AY641459
<i>Tomentellopsis echinospora</i>	MH310781
<i>Tomentellopsis submollis</i>	AM086447
<i>Tomentellopsis pulchella</i>	MK602779

2.3.6. Stammbaum Berechnung

Mit dem generierten Alignment sollten nun die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Arten abgeleitet werden und überprüft werden, ob die Artbestimmung anhand morphologischer Eigenschaften mit denen der genetischen Daten übereinstimmt. Die Erstellung der phylogenetischen Stammbäume erfolgte mittels drei unterschiedlicher Berechnungsmethoden, welche von verschiedenen Tools auf der Website NGPhylogeny.fr durchgeführt wurden. Die Berechnung mittels einer Distanzmatrix (*Distance-based*) erfolgte durch das Tool Fast ME (Version 2.1.6.1_1; Desper & Gascuel 2002, Lefort *et al.* 2015, Lemoine *et al.* 2018). Über das Tool MrBayes (Version 3.2.7_0; Huelsenbeck & Ronquist 2001) wurde ein Stammbaum unter Verwendung der Bayesschen Statistik (*Bayesian inference*) generiert. Abschließend wurde ein Stammbaum mittels des *Maximum likelihood*-Prinzips über

das Tool PhyML+SMS (Version 1.8.1_1; Lefort *et al.* 2017, Lemoine *et al.* 2018, Guindon *et al.* 2010) erstellt. Die genauen Einstellungen zur Berechnung für jeder der drei Methoden sind im Anhang zu finden.

3. Ergebnisse

3.1. Morphologische Untersuchung

Im Zuge der morphologischen Untersuchung wurden die Längen und Breiten der Basidien und Basidiosporen von fünf Exemplaren der Gattung *Tomentellopsis* gemessen. Bei den Proben handelte es sich um Trockenmaterial. Jede Probe besaß einen meist creme-braunen bis braunen, filzartigen, resuspinaten Fruchtkörper. Im Vergleich mit Aufnahmen des Frischmaterials fiel auf, dass sich die Farbe teils sehr stark verändert hatte. Ursprünglich besaßen die Proben meist eine weiße bis creme-farbene Färbung (Abb. 4 und 5).

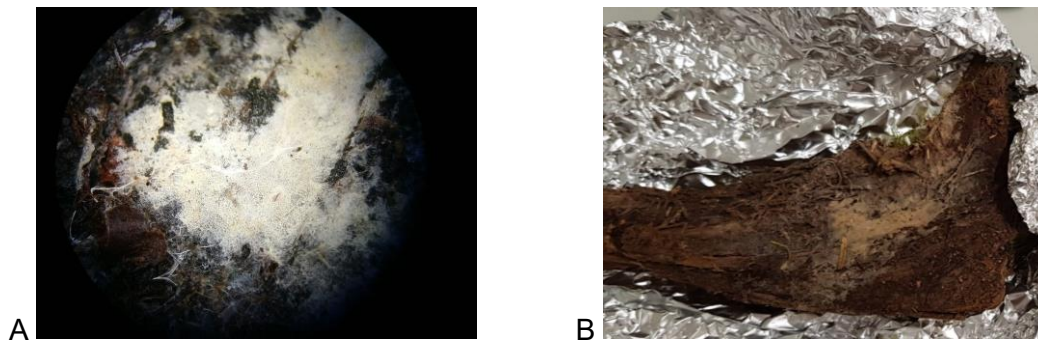


Abbildung 4: Optische Veränderung der Färbung der Probe Ordynets00281 von Frischmaterial (A) zu Trockenmaterial (B).

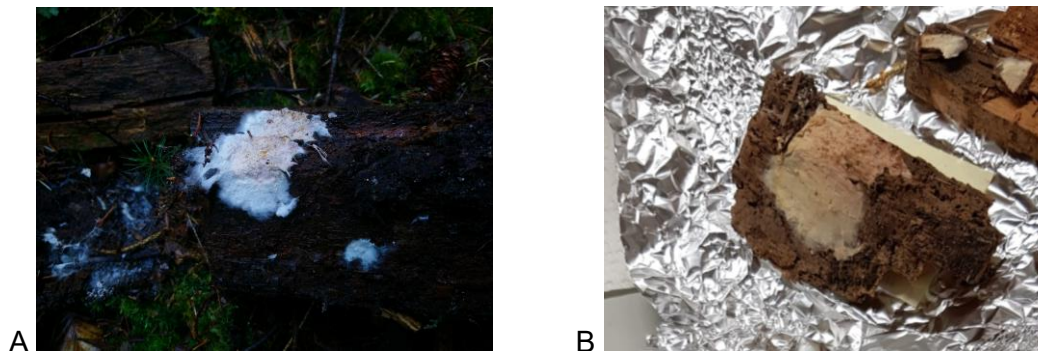


Abbildung 5: Optische Veränderung der Färbung der Probe Ordynets00283A von Frischmaterial (A) zu Trockenmaterial (B).

Die Hyphen waren dünnwandig, hyalin und wiesen keine Schnallenbildung auf. Die Sporen waren ebenfalls hyalin und wiesen eine kugelige bis leicht elliptische Form mit einer stacheligen Oberfläche auf. Bei den Basidien handelte es sich um utrifforme, hyaline Holobasidien mit vier Sterigmen.

Die Betrachtung der mit dem Programm Smaff ermittelten statistischen Kenngrößen ließ erkennen, dass es zwischen den Proben keine eindeutigen Unterschiede in der Sporengröße gab (Tab. 3). Dabei reichte die durchschnittliche Länge von 5,77 μm bis 6,30 μm und die

durchschnittliche Breite von 5,39 μm bis 5,73 μm . Ebenfalls war keine Korrelation zwischen Sporenlänge und -breite innerhalb der Proben zu erkennen. So zeigte die Probe Ordynets00281 die geringste Sporenlänge (5,77 μm) auf, während die geringste Breite (5,39 μm) bei Ordynets00405 zu verzeichnen war.

Das Auftreten von ähnlichen Sporengrößen zwischen den Proben ließ sich ebenfalls anhand des Streudiagramms in Abbildung 6 erkennen, wobei sich die Messergebnisse der verschiedenen Proben größtenteils überlagern.

Tabelle 3: Statistische Kenngrößen der Sporengröße für jeweils 30 vermessene Sporen der untersuchten Proben. Größenangaben in μm . L = Länge, B = Breite, Q = Quotient aus Länge und Breite, min = Minimalwert, mean = Mittelwert, max = Maximalwert.

Proben_ID	L_min	L_mean	L_max	B_min	B_mean	B_max	Q_min	Q_mean	Q_max
Ordynets00181	5,00	6,00	7,00	5,00	5,50	6,00	1,00	1,09	1,20
Ordynets00281	5,00	5,77	6,00	5,00	5,61	6,00	1,00	1,03	1,20
Ordynets00283A	5,50	6,30	7,00	5,00	5,48	6,00	1,00	1,15	1,40
Ordynets00284	5,00	6,15	7,50	5,00	5,73	6,50	1,00	1,07	1,25
Ordynets00405	5,00	6,02	7,00	5,00	5,39	6,00	1,00	1,12	1,40

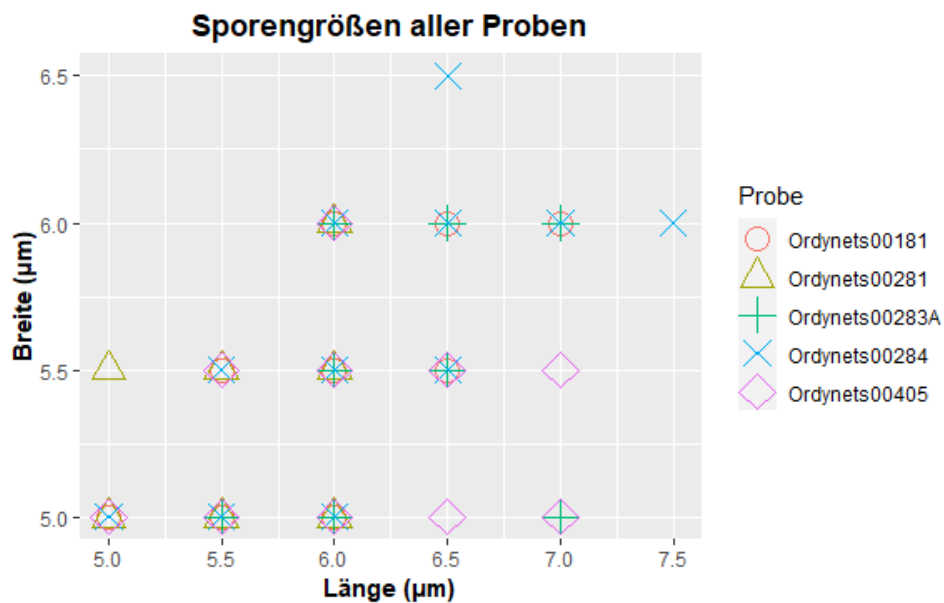


Abbildung 6: Streudiagramm der Sporengrößen. Abgebildet sind alle gemessenen Sporengrößen für jede Probe.

Im Gegensatz zu den Sporengrößen, ließen die Messungen der Basidien zum Teil größere Unterschiede zwischen den Proben erkennen (Tab. 4). Die durchschnittliche Basidienlänge der Proben Ordynets00181, Ordynets00281, Ordynets00283A und Ordynets00284 reichte von 31,56 µm bis 34,80 µm. Auffällig war die Probe Ordynets00405, welche mit 27,70 µm Länge eine deutlich größere Differenz zu den restlichen Proben aufwies als diese untereinander. Eine ähnlich starke Unterscheidung ließ sich anhand der Basidienbreite nicht erkennen. Die durchschnittliche Basidienbreite reichte von 6,00 µm bis 7,40 µm. Ähnlich zu den Messdaten der Sporengrößen ließ sich auch hier keine deutliche Korrelation zwischen Länge und Breite erkennen. Dies wird deutlich bei Betrachtung von Ordynets00281 (34,90 µm x 6,25 µm) und Ordynets00405 (27,70 µm x 6,15 µm), welche sich in ihrer Breite nur geringfügig unterscheiden aber einen großen Längenunterschied besitzen.

Tabelle 4: Statistische Kenngrößen der Basidiengröße für jeweils 10 vermessene Basidien der untersuchten Proben. Größenangaben in µm. L = Länge, B = Breite, Q = Quotient aus Länge und Breite, min = Minimalwert, mean = Mittelwert, max = Maximalwert.

Proben_ID	L_min	L_mean	L_max	B_min	B_mean	B_max	Q_min	Q_mean	Q_max
Ordynets00181	28,00	34,80	40,00	6,00	6,00	7,00	4,00	5,21	6,00
Ordynets00281	30,00	34,90	38,00	5,00	6,25	8,00	4,42	5,70	7,00
Ordynets00283A	29,00	33,35	38,00	7,00	7,40	8,00	4,00	4,51	5,00
Ordynets00284	28,00	31,56	36,00	6,00	7,00	8,00	4,00	4,54	5,34
Ordynets00405	23,00	27,70	34,00	5,00	6,15	7,00	3,83	4,52	5,34

3.2. Phylogenetische Untersuchung

3.2.1. DNA-Isolation und PCR

Für die phylogenetische Untersuchung wurde zunächst von jeder Probe DNA isoliert. Im Anschluss wurde über eine PCR mit den Primern ITSf1 und ITS4 eine ITS-Sequenz amplifiziert, die für die nachfolgende Berechnung der phylogenetischen Stammbäume verwendet wurde. Die erste durchgeführte PCR lediglich bei den Proben Ordynets00283A und Ordynets00284 eine erfolgreiche Amplifikation. Die Messung der DNA-Konzentration der fehlgeschlagenen Proben mittels Spektroskopie ergab folgende Konzentrationen: 133 ng/µl (Ordynets00181); 78,7 ng/µl (Ordynets00281) und 145 ng/µl (Ordynets00405). Da die Konzentrationen sehr hoch waren, wurden Verdünnungen angefertigt und die PCR für diese Proben wiederholt. Die Wiederholung zeigte erfolgreiche Amplifikationen der Proben Ordynets00181 und Ordynets00281. Aufgrund des zeitlichen Rahmens des Forschungsmoduls, wurde für Ordynets00405 keine weitere Optimierung durchgeführt und die Probe für die weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Die restlichen Proben wurden sequenziert.

3.2.2. Sequenz-Editierung

Nach Erhalt der Sequenzdaten mussten diese für die weitere Verwendung zunächst auf ihre Qualität überprüft und editiert werden. Daraus ergab sich, dass die Sequenzdaten der Probe Ordynets00281 eine zu geringe Qualität aufwiesen, um eine eindeutige Auswertung vornehmen zu können (Abb. 7). Daher wurde diese Probe für die weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Die anschließende BLAST-Suche ergab Übereinstimmungen der Probe Ordynets00181 mit *T. submollis* und *T. echinospora*, während für Ordynets00283A und Ordynets00284 Übereinstimmungen mit *T. submollis* gefunden wurden.

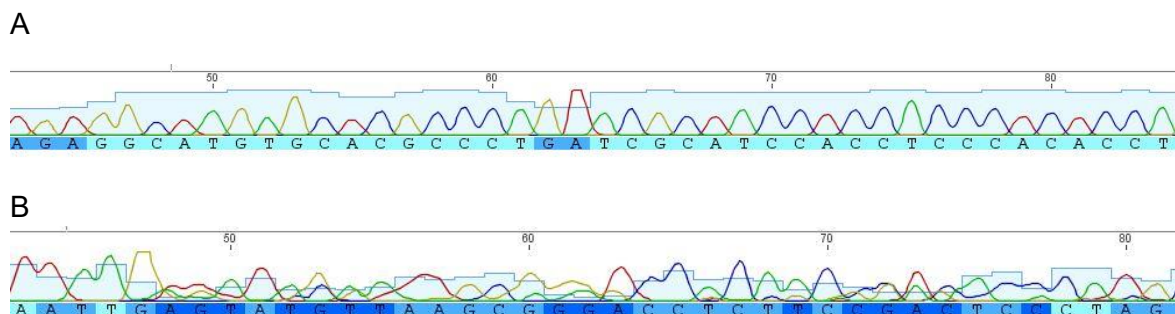


Abbildung 7: Ausschnitte aus den Sequenz-Chromatogrammen für den Primer ITS1f der Proben Ordynets00181 (A) und Ordynets00281 (B). Die geringe Qualität der Daten für Ordynets00281 machte eine deutliche Auswertung unmöglich (Ausschnitt für Primer ITS4 nicht abgebildet).

3.2.2. Alignment-Erstellung

Nach Editierung der Sequenzdaten wurde ein Multiples Sequenz Alignment mit dem Online-Programm MAFFT erstellt. Anhand dessen sollte schließlich die Berechnung der Stammbäume erfolgen. Dazu wurden die eigenen Sequenzdaten mit Sequenzen aus vorherigen Forschungen ergänzt. Das finale Datenset bestand aus 26 Proben, wobei es sich bei 23 um Sequenzdaten von GenBank handelte und die restlichen drei die eigens generierten Sequenzen waren. Das erstellte Alignment wurde anschließend mit dem Programm MEGA X (Version 10.0.5, <https://www.megasoftware.net/>) überprüft und besaß eine Länge von 2140 bp (Basenpaaren). Nach Entfernung der weniger informativen Bereiche mit dem Online Tool BMGE betrug die Gesamtlänge des Alignments 601 bp. Das Alignment ließ in der 5.8S Region der Sequenz nahezu keine Variation erkennen (Abb. 8). In den angrenzenden ITS1 und ITS2 Regionen fielen die Variation größer aus.

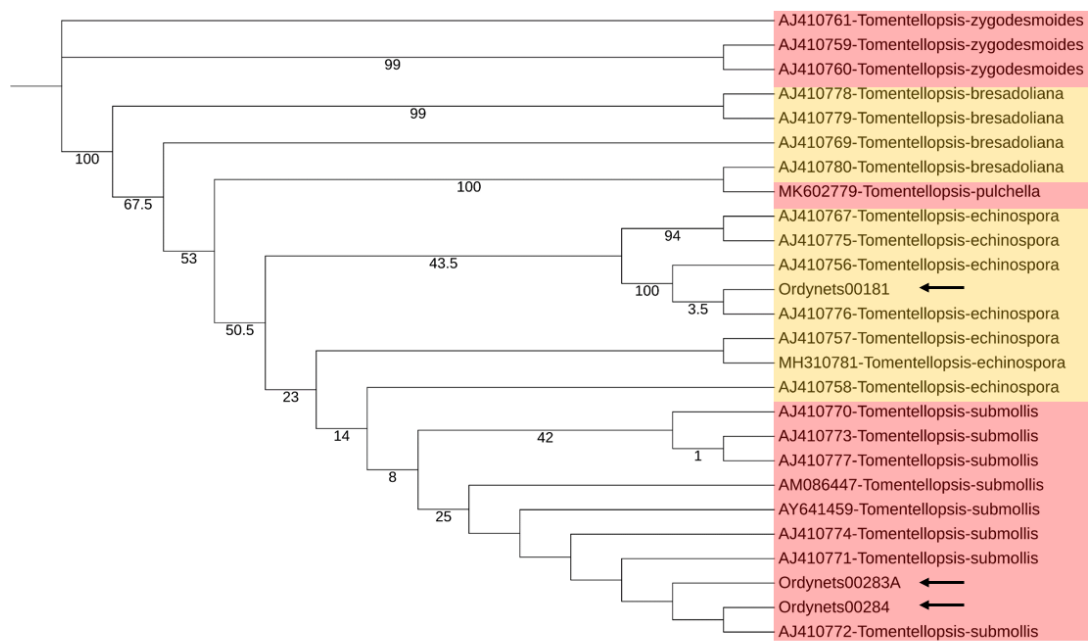


Abbildung 9: Darstellung des phylogenetischen Stammbaumes anhand der *Distance-based* Methode. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des FastME Tools der Website NGPhylogeny.fr. Die zur Berechnung verwendeten Einstellungen sind dem Anhang zu entnehmen. Zahlen = Bootstrap-Werte in Prozent. Pfeile = selbst sequenzierte Proben.

3.2.3.2. *Bayesian inference*

Die Verwendung der *Bayesian inference* Methode (Abb. 10) zur Berechnung der Verwandtschaftsverhältnisse zeigte, dass lediglich die Vertreter von *T. zygodesmoides* ein Monophylum bildeten, während alle anderen Arten paraphyletische Gruppen darstellten. An der Basis des Stammbaumes wurden die Vertreter von *T. submollis* sowie die Proben Ordynets00283A und Ordynets00284 angeordnet. Ein Teil der *T. submollis* Vertreter stellte die Schwestergruppe zum Rest des Stammbaumes da. Im Stammbaum als nächstes angeordnet befanden sich die Proben von *T. echinospora*, welche ein Paraphylum bildeten. Ein Teil der *T. echinospora* Individuen ergaben zusammen mit der Probe Ordynets00181 eine Klade, welche die Schwestergruppe zu *T. zygodesmoides*, *T. bresadoliana* und *T. pulchella* darstellte. Ähnlich zur *Distance-based* Methode, handelte es sich bei den Proben von *T. bresadoliana* um ein Paraphylum, wobei ein Individuum die Schwestergruppe zu *T. pulchella* ausbildete.

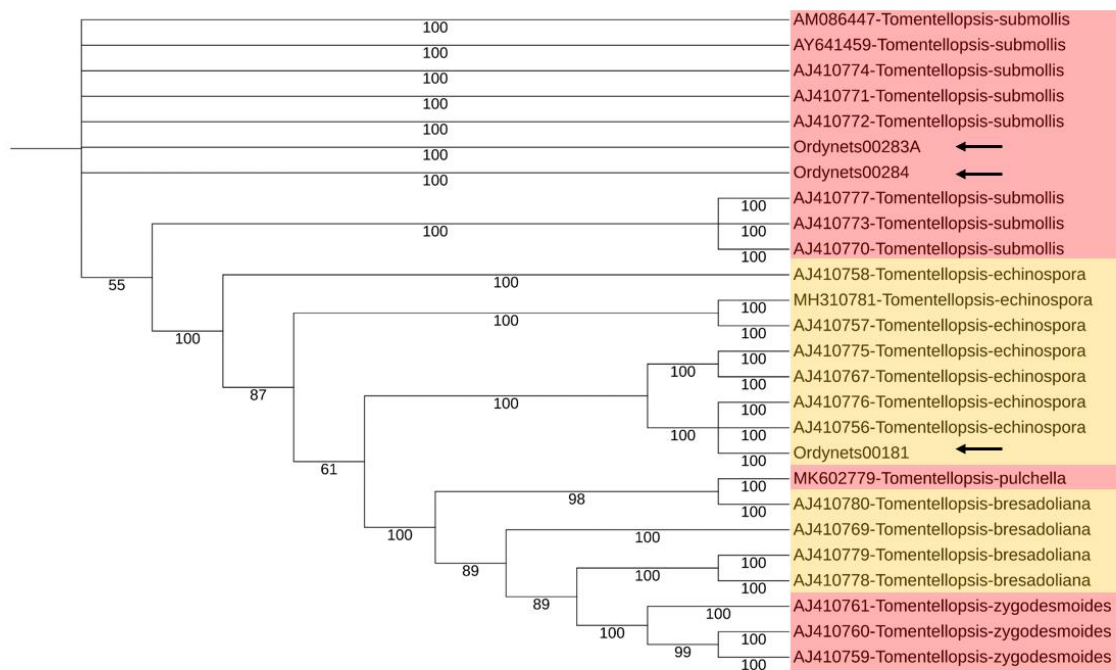


Abbildung 10: Darstellung des phylogenetischen Stammbaumes anhand der *Bayesian inference* Methode. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des MrBayes Tools der Website NGPhylogeny.fr. Die zur Berechnung verwendeten Einstellungen sind dem Anhang zu entnehmen. Zahlen = Bootstrap-Werte in Prozent. Pfeile = selbst sequenzierte Proben.

3.2.3.3. *Maximum likelihood*

Die Berechnung anhand der *Maximum likelihood* Methode (Abb. 11) ergab, dass *T. zygodesmoides* an der Basis des Stammbaumes angeordnet wurden und eine Akzession die Schwestergruppe zu allen restlichen Proben darstellte. Wie bereits zuvor, handelte es sich bei *T. bresadoliana* um ein Paraphylum, wobei eine Akzession die Schwestergruppe zur *T. pulchella* bildete. Auch bei *T. echinospora* handelte es sich erneut um ein Paraphylum, wobei einige Proben zusammen mit Ordynets00181 eine Klade bildeten. Die Akzessionen von *T. submollis* standen als eine Klade zusammen mit den Proben Ordynets00283A und Ordynets00284 an der Spitze des Stammbaumes. Dabei stand Ordynets00284 alleine als Schwestergruppe zu einer Klade aus einem Großteil der *T. submollis* und Ordynets00283A. Die Probe Ordynets00283A bildete an der Spitze des Stammbaumes die Schwestergruppe zu einer anderen Akzession von *T. submollis*.

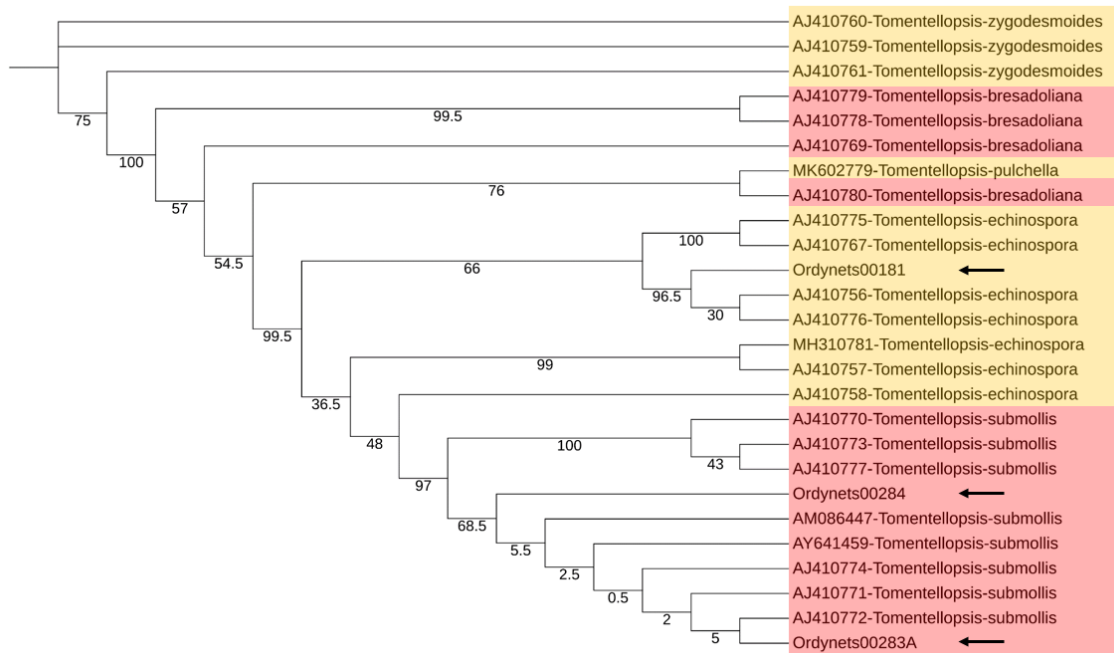


Abbildung 11: Darstellung des phylogenetischen Stammbaumes anhand der *Maximum likelihood* Methode. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des PhyML+SMS Tools der Website NGPhylogeny.fr. Die zur Berechnung verwendeten Einstellungen sind dem Anhang zu entnehmen. Zahlen = Bootstrap-Werte in Prozent. Pfeile = selbst sequenzierte Proben.

4. Diskussion

4.1. Morphologische Untersuchung

Im Zuge der morphologischen Untersuchung wurden für jede Probe die Größen von 30 Sporen und 10 Basidien gemessen. Anhand der Messergebnisse und dem Vergleich dieser mit der Literatur sollte damit die Artzugehörigkeit ermittelt werden. Im Anschluss an die Messungen wurden die statistische Kenngrößen mit dem Programm Smaff (Wilk 2012) berechnet. Daraus ergaben sich durchschnittliche Sporenlängen von 5,77–6,2 μm und Sporenbreiten von 5,39–5,73 μm (Tab. 3). Für die Basidien wurden Längen von 27,7–34,9 μm und Breiten von 6–7,4 μm gemessen (Tab. 4). Zusätzlich ließ sich anhand des Streudiagramms (Abb. 5) erkennen, dass die Messdaten zwischen den Proben sehr ähnlich waren, da es zu häufigen Überlagerungen der Messdaten kam.

Nach Koljalg (1996) weisen die Sporen von *T. echinospora* eine Größe von 5-7 μm auf, während *T. pusilla* 4,5-6,5 μm große Sporen besitzt und bei *T. zygoesmoides* Sporen mit 5-7,5 μm Größe auftreten. Die Größen der Basidien sind dabei 20-40 μm x 5-8 μm für *T. echinospora*, 25-40 μm x 5-6 μm für *T. pusilla* und 25-40 μm x 6-7,5 μm für *T. zygoesmoides* (Koljalg 1996). Anhand dieser Literaturwerte ließ sich keine eindeutige Artidentifizierung nur unter Verwendung der Sporen- und Basidiengrößen vornehmen, da die Unterscheidungen zwischen den Arten auf zu feinem Niveau geschahen. So fielen die Messwerte jeder Probe in fast jedes Größenspektrum jeder Art. Eine mögliche Ursache könnte die alleinige Messung mit dem Okular-Mikrometer gewesen sein. Da die Messungen lediglich anhand der Mikrometer-Markierungen vollzogen werden konnten, wurden die Messwerte in 0,5 μm Schritten notiert, wenn es keine genaue Übereinstimmung mit der Mikrometer-Markierung gab. Die Verwendung eines Aufmaßprogrammes wie Jens Rüdigs Makroaufmaßprogramm (<https://ruedig.de/tmp/messprogramm.htm>) könnte somit zu genaueren Messwerten führen, was eine bessere Artunterscheidung ermöglichen könnte. Des Weiteren ermöglichte die Auswertung mit dem Programm Smaff die Ausgabe der Messwerte als Balkendiagramm mit Vergleich zur Normalverteilung (Ergebnisse nicht abgebildet). Dabei traten lediglich bei den Messungen der Basidien zwei Proben auf, welche nicht von der Normalverteilung abwichen. Auch hierfür könnte die Ursache die zu ungenaue Messung über das Okular-Mikrometer gewesen sein.

Da die Artunterscheidung mittels Sporen- und Basidiengröße nicht möglich war, wurde auf andere morphologische Eigenschaften zurückgegriffen. Somit diente zum Teil die Länge der auf der Sporenoberfläche befindlichen Stacheln als auch die Färbung des Hymenophores als Unterscheidungsmerkmal. So wurde für *T. pusilla* eine Stachellänge von 1 μm und für *T. zygoesmoides* von 1,5-2 μm beschrieben (Koljalg 1996). Des Weiteren weisen beide Arten

eine hauptsächlich braune Färbung des Hymenophores auf, während *T. echinospora* eine gelbe bis weiße Färbung besitzt (Koljalg 1996). Daher wurden alle Proben als *T. echinospora* identifiziert. Dabei ist wichtig anzumerken, dass die Proben in getrocknetem Zustand eine meist braune Farbe angenommen hatten. Die Identifizierung konnte somit nur anhand von Bildern des Frischmaterials geschehen. Dies zeigt auf, dass es zur Nachbestimmung von Fungarienmaterial wichtig ist Aufnahmen der Proben im Frischzustand vorliegen zu haben, da es durch den Trocknungsprozess zu Veränderungen der Morphologie kommen kann. Letztlich ist ebenfalls wichtig anzumerken, dass für die Bestimmung die Artbeschreibungen nach Koljalg (1996) verwendet wurden. Dabei handelte es sich um eine veraltete Version, da etwa *T. submollis* als Synonym unter *T. echinospora* eingeordnet wurde, diese jedoch später als eigenständige Art beschrieben wurde (Koljalg *et al.* 2002). Somit unterschieden sich die Ergebnisse der morphologischen Untersuchung von denen der Vorbestimmung, in welcher Ordynets00283A und Ordynets00284 als *T. submollis* identifiziert wurden. Die Ergebnisse der phylogenetischen Untersuchung (siehe folgendes) unterstützten ebenfalls die Identifizierung als *T. submollis*, wodurch die Verwendung einer veralteten Artbeschreibung vermutlich zu einer anfänglich falschen Identifizierung als *T. echinospora* geführt hat.

4.2. Phylogenetische Untersuchung

Die korrekte Artidentifizierung vieler Taxa ist alleine über morphologische Eigenschaften oft unzuverlässig oder nur sehr schwierig (Raja *et al.* 2017). Daher sollte von jeder Probe DNA isoliert werden, um auch auf molekularer Ebene eine Bestimmung der Art vornehmen zu können. Dabei konnte allerdings nur für drei der fünf Proben Daten generiert werden, mit denen anschließend weiter gearbeitet werden konnte. Die folgende Untersuchung erfolgte anhand der ITS-Region, welche als Standard-Marker in der pilzlichen Taxonomie Anwendung findet (Raja *et al.* 2017). Für jede Probe wurde eine BLAST-Suche durchgeführt, um die eigenen Daten mit Sequenzen aus einer Datenbank zu vergleichen. Daraus ergaben sich für die Probe Ordynets00181 die Arten *T. submollis* und *T. echinospora*, sowie für Ordynets00283A und Ordynets00284 die Art *T. submollis*. Auffällig bei den Ergebnissen der BLAST-Suche war, dass nur ein kleiner Teil der gelisteten Sequenzen eine Artzuordnung besaß, während bei den meisten nur eine Gattung angegeben war oder gar keine Zuordnung zu einem Taxon bestand. Dies ist ein häufiges Problem bei der Nutzung von Datenbank Sequenzen, da viele Einträge unvollständig oder fehlerhaft sind, wodurch die Nutzung dieser Daten erschwert wird (Raja *et al.* 2017, Lücking *et al.* 2020).

Für das Alignments wurden Sequenzen aus Publikationen verwendet, in denen diese bereits erfolgreich verwendet wurden (Koljalg *et al.* 2002, Kuhar *et al.* 2022). Allerdings kam es bei der Betrachtung der Akzessionsinformationen zu Unstimmigkeiten mit den Angaben von Kuhar

et al. (2022). Nach Kuhar *et al.* (2022) handelte es sich bei den Sequenzen der Akzessionsnummern ON832657 und MT366690 um *T. rosannae*, eine in dieser Publikation neubeschriebenen Art, und bei AM747527 um *T. echinospora*. Die Angaben in GenBank klassifizierten die Akzessionsnummern AM747527 und ON832657 als *Coniophora olivacea* (Fr.) P. Karst., einer corticioiden Art der Ordnung *Boletales* (Yurchenko 2020). Für MT366690 war lediglich die Einordnung zur Gattung *Tomentellopsis* vorhanden. Um die Angaben zu überprüfen wurden auch die widersprüchlichen Sequenzen in dem Alignment integriert und damit die Stammbäume berechnet. Ähnlich zur Arbeit von Kuhar *et al.* (2022), bildete die Probe MT366690 in allen drei Bäumen die Schwestergruppe zu *T. zygodesmoides* (Anhang Abb. S4-S6). Allerdings gruppierte sie nicht zusammen mit ON832657. Die Akzessionen ON832657 und AM747527 bildeten zusammen im *Distance-based* Stammbaum die Schwestergruppe zu einer Klade *T. echinospora* und wurden in den anderen beiden Bäumen gemeinsam an der Basis platziert (Anhang Abb. S4-S6). Da ON832657 und AM747527 stets zusammengruppiert wurden, liegt die Vermutung nahe, dass es sich entsprechend der Angaben in GenBank um das gleiche Taxon handelt. Daraus müsste geschlossen werden, dass es sich um fehlerhafte Angaben zu den Akzessionen in Kuhar *et al.* (2022) handelt. Dadurch kommt allerdings die Frage auf, wieso ON832657 (evtl. *Coniophora olivacea*) und MT366690 (evtl. *Tomentellopsis rosannae*) in der Publikation von Kuhar *et al.* (2022) gemeinsam die Schwestergruppe zu *T. zygodesmoides* bildeten. Dies verdeutlicht das zuvor erwähnte Probleme in der Arbeit mit Daten aus Datenbanken wie GenBank (Raja *et al.* 2017, Lücking *et al.* 2020). Aufgrund der mangelnden Vertraulichkeit der Daten, wurden diese drei Akzessionen für das finale Alignment entfernt.

Nach Erstellung und Editierung des Alignments ergab sich eine Länge von 601 bp, womit es in das zu erwartende Längenspektrum von 400-800 bp fiel (Raja *et al.* 2017). Im Anschluss wurden phylogenetische Stammbäume mit drei unterschiedlichen Berechnungsmethoden generiert. Alle drei Bäume wiesen eine ähnliche Gruppierung der Sequenzen zu Kladen auf. In allen Fällen wurde *T. submollis* zusammen mit den Proben Ordynets00283A und Ordynets00284 gruppiert, während *T. echinospora* mit Ordynets00181 immer ein Paraphylum ausbildete (Abb. 9-11). Ebenfalls zeigten die Akzessionen von *T. bresadoliana* zusammen mit *T. pulchella* in jedem Baum eine paraphyletische Anordnung. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen von Koljalg *et al.* (2002), Koljalg *et al.* (2009) und Kuhar *et al.* (2022). Obwohl die Berechnung von Koljalg *et al.* (2002) und Koljalg *et al.* (2009) nach dem *Maximum parsimony* Prinzip geschah war dieses Ergebnis zu erwarten, da die gleichen Sequenzakzession von GenBank verwendet wurden. Ein großer Unterschied besteht allerdings in der Topologie des Stammbaumes nach der *Bayesian inference* Methode. Die Stammbäume nach der *Distance-based* Methode und der *Maximum likelihood* Methode besaßen eine ähnliche Topologie, wobei *T. zygodesmoides* an der Basis des Baumes

angeordnet wurde und *T. submollis*, nah verwandt zu *T. echinospora*, an der Spitze. Im Unterschied dazu, wies der Stammbaum nach der *Bayesian Inference* Methode eine umgekehrte Darstellung auf, wobei *T. submollis* mit Ordynets00283A und Ordynets00284 ungegliedert an der Basis des Baumes positioniert waren und *T. zygoesmoides* an der Spitze. Hierbei ist auffällig, dass lediglich zwei Äste keine signifikante Unterstützung erhielten, da ihre *Bootstrap*-Werte unter 70% lagen (Raja et al. 2017). Im Falle der *Maximum Likelihood* Methode und *Distance-based* Methode war nur die Position der Akzessionen von *T. zygoesmoides*, *T. bresadoliana* und einiger *T. echinospora* stets gut unterstützt. Die geringste Unterstützung erhielten die Akzessionen von *T. submollis*, wobei die *Bootstrap*-Werte meist keine 10% überstiegen.

Trotz der geringen Unterstützung der *T. submollis* Akzessionen in dieser Arbeit, war ihre Positionierung in den Arbeiten von Koljalg et al. (2002), Koljalg et al. (2009) und Kuhar et al. (2022) gut gesichert. Die ungegliederte Positionierung der *T. submollis* Individuen an der Basis des *Bayesian inference* Baum in Kombination mit der geringen Unterstützung in den restlichen Stammbäumen könnte daher auf eine geringe intraspezifische Auflösbarkeit der Art hindeuten. Daher beide Proben stets in der meist monophyletischen Klade aufgetreten sind, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den Proben Ordynets00283A und Ordynets00284 um *T. submollis* Individuen handelt.

Im Unterschied zu *T. submollis* erhielt *T. echinospora* meist für die aufgetretenen Kladen gute Unterstützung über signifikante *Bootstrap*-Werte. Da die Probe Ordynets00181 in allen Stammbäumen mit den gleichen *T. echinospora* Akzessionen gruppiert wurde, liegt auch hier die Vermutung nahe, dass es sich um einen Vertreter von *T. echinospora* handelt. Allerdings trat *T. echinospora* stets als Paraphylum auf und Koljalg et al. (2002) stellten anhand von Daten zur *pairwise base difference* der ITS-Sequenzen die Vermutung auf, dass es sich um mehrere Taxa handelt. Daher könnte sich die genaue Taxon-Zugehörigkeit der Probe nochmals verändern, falls es in einer zukünftigen Studie zur Aufteilung der paraphyletischen Klade von *T. echinospora* kommen sollte.

Da für die Proben Ordynets 00281 und Ordynets00405 eine Klassifizierung der Art über molekular-genetische Daten nicht möglich war, müsste ihre Zugehörigkeit im Zuge einer zukünftigen Arbeit nochmals überprüft werden. Zwar wurden durch die morphologische Analyse beide Proben der Art *T. echinospora* zugeordnet, die Bestimmung anhand morphologischer Eigenschaften erfolgte allerdings mittels einer veralteten Artenauflistung von Koljalg (1996). Somit wurden die Proben Ordynets00283A und Ordynets00284, welche zuvor als *T. echinospora* identifiziert wurden, über die phylogenetische Untersuchung als *T. submollis* klassifiziert werden. Dadurch zeigt sich, dass für eine korrekte Artbestimmung ein Kombination aus morphologischer und phylogenetischer Untersuchungen nötig ist, weil eine

Analyse der Morphologie alleine oft nicht für eine Identifizierung auf Artebene ausreichend ist (Raja *et al.* 2017, Lücking *et al.* 2020).

5. Zusammenfassung

Für die Gattung *Tomentellopsis* hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass sie eine größere Artendiversität besitzt als zuvor gedacht. Im Zuge dieser Arbeit wurden fünf Proben der Gattung *Tomentellopsis* aus Mitteleuropa untersucht und mittels morphologischer und molekular-phylogenetischer Untersuchungen ihre Artzugehörigkeit ermittelt. Die Bestimmung der Proben Ordynets00181 und Ordynets00405 erfolgte nur anhand morphologischer Eigenschaften, wodurch sie als *T. echinospora* identifiziert wurden. Für die restlichen Proben erfolgte eine Analyse über morphologische als auch molekular-genetische Eigenschaften. Dadurch wurde die Probe Ordynets00181 der Art *T. echinospora* und die Proben Ordynets00283A und Ordynets00284 der Art *T. submollis* zugeordnet. Um die Artzugehörigkeit der Proben Ordynets00181 und Ordynets00405 zu bestätigen werden weitere phylogenetische Untersuchungen benötigt, da morphologische Eigenschaften alleine oft nicht für eine genaue Identifizierung auf Artebene ausreichend sind. Zudem muss bei der morphologischen Untersuchung auf die korrekte Literatur geachtet werden, da die Verwendung von veralteten Beschreibungen zu falschen Bestimmungen führen kann. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass bei der Verwendung von Daten aus Datenbanken achtsam vorgegangen werden muss, da diese nicht immer fehlerfrei sind. In dieser Arbeit konnten somit die Arten *T. echinospora* und *T. submollis* für den mitteleuropäischen Raum bestätigt werden. Da für die Gattung *Tomentellopsis* in den letzten Jahren eine zunehmend größere Diversität beobachtet wurde, ist es möglich, dass dies auch für die in Mitteleuropa vertretenen Taxa zutrifft. Um dies zu überprüfen, werden weitere Studien benötigt, welche mit einer größeren Anzahl Proben aus verschiedenen Gebieten Mitteleuropas die Vielfältigkeit dieses Taxon untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

Criscuolo A., 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*, Vol. 10:210.

Dämmrich F., Rödel T. (2004): *Amaurodon viridis* – ein in Deutschland verschollener Rindenpilz, *Boletus*, Vol. 27, S. 53-57.

Desper R., Gascuel O. (2002): Fast and Accurate Phylogeny Reconstruction Algorithms Based on the Minimum-Evolution Principle, *Journal of Computational Biology*, Vol. 9, S. 687–705.

Guindon S., Dufayard J. F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W, Gascuel O. (2010): New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0, *Systematic Biology*, Vol. 59, S. 307–321.

Hibbett D. S., Bauer R., Binder M., Giachini A. J., Thorn R. G. (2014): *Agaricomycetes*, In: *The Mycota VII Part A: Systematics and Evolution*, 2nd Edit., D. J. McLaughlin, J. W. Spatafora, Eds., Springer, Berlin, Heidelberg, S. 373–429.

Huelsenbeck J. P., Ronquist F. (2001): MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees, *Bioinformatics*, Vol. 17, S. 754-755.

Index Fungorum (2022): Online unter <https://www.indexfungorum.org/>, Abgerufen am 27.12.2022.

Jens' Makroaufmaßprogramm (2023): Online unter <https://ruedig.de/tmp/messprogramm.htm>, Abgerufen am 02.01.2023.

Katoh K., Rozewicki J., Yamada K. D. (2019): MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization, *Briefings in Bioinformatics*, Vol. 20, S. 1160–1166.

Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Meintjes P., Drummond A. (2012): Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data, *Bioinformatics*, Vol. 28, S. 1647-1649.

Koljalg U., Tammi H., Timonen S., Agerer R., Sen R. (2002): ITS rDNA sequence-based phylogenetic analysis of *Tomentellopsis* species from boreal and temperate forests, and the identification of pink-type ectomycorrhizas, *Mycological Progress*, Vol. 1, S. 81-92.

Koljalg U., Bernicchia A., Saar I. (2009): *Tomentellopsis pulchella* sp. nov. from St. Vitale Pine Forest (Ravenna, Italy), *Mycotaxon*, Vol. 107, S. 53-60.

Koljalg U. (1996): *Tomentella* (Basidiomycota) and related genera in temperate Eurasia. *Synopsis Fungorum*. Oslo: Fungiflora.

Kuhar F., Nouhra E., Smith M. E., Caiafa M. V., Greslebin A. (2022): *Tomentellopsis rosannae* sp. nov. (Basidiomycota, Thelephorales), first species in the genus described from the Southern Hemisphere, *Lilloa*, Vol. 59, S. 115-123.

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018): MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms, *Molecular Biology and Evolution*, vol. 35, p. 1547-1549.

Kuraku S., Zmasek C. M., Nishimura O., Katoh K. (2013): aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity, *Nucleic Acids Research*, Vol. 41, W22-8.

Larsson K.-H. (2007): Re-thinking the classification of corticioid fungi, *Mycological Research*, Vol. 111, S.1040-1063.

Lefort V., Desper R., Gascuel O. (2015): FastME 2.0: A Comprehensive, Accurate, and Fast Distance-Based Phylogeny Inference Program, *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 32, S. 2798–2800.

Lefort V., Longueville J.-E., Gascuel O. (2017): SMS: Smart Model Selection in PhyML, *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 34, S. 2422–2424.

Lemoine F., Domelevo Entfellner J.-B., Wilkinson E., Correia D., Dávila Felipe M., De Oliveira T., Gascuel O. (2018): Renewing Felsenstein's phylogenetic bootstrap in the era of big data, *Nature*, Vol. 556, S. 452–456.

Lücking R., Aime M. C., Robbertse B., Miller A. N., Ariyawansa H. A., Aoki T., Cardinali G., Crous P. W., Druzhinina I. S., Geiser D. M., Hawksworth D. L., Hyde K. D., Irinyi L., Jeewon R., Johnston P. R., Kirk P. M., Malosso E., May T. W., Meyer W., Öpik M., Robert V., Stadler M., Thines M., Vu D., Yurkov A. M., Zhang N., Schoch C. L. (2020): Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding?, *International Mycological Association*, 11:14, <https://doi.org/10.1186/s43008-020-00033-z>.

Miettinen O., Koljalg U. (2007): *Amaurodon sumatranus* (Thelephorales, Basidiomycota), a new species from Indonesia, *Mycotaxon*, Vol. 100, S. 51-59.

Page R. D. M. (2003): Introduction to inferring evolutionary relationships. *Current protocols in bioinformatics*, 6, Unit 6.1.

Paloi S., Luangsa-Ard J. J., Mhuantong W., Stadler M., Kobmoo N. (2022): Intragenomic variation in nuclear ribosomal markers and its implication in species delimitation, identification and barcoding in fungi, *Fungal Biology Reviews*, Vol. 42, S. 1-33.

Raja H. A., Miller A. N., Pearce C. J., Oberlies N. H. (2017): Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community, *Journal of Natural Products*, Vol. 80, S. 756-770.

Russo C. A. de M., Selvatti A. P. (2018): Bootstrap and Rogue Identification Tests for Phylogenetic Analyses, *Molecular Biological and Evolution*, Vol. 35, S. 2327-2333.

Stalpers J. A. (1993): The Aphylophoraceous fungi I. Keys to the species of the Thelephorales. *Studies in Mycology* Vol. 35.

Wilk J. (2012): Statistische Messreihen-Auswertung für Fungi mit erweiterter Notation: Programmdokumentation V3.1, Germany, Herne.

Yang R., Rannala B. (2012): Molecular phylogenetics: principles and practice, *Nature Reviews, Genetics*, Vol. 13, S. 303-314.

Yurchenko E. (2020): Corticioid Fungi of Belarus: An identification book, Minsk:Kolorgrad.

7. Abbildungsverzeichnis

Nummer	Titel	Seite
Abb. 1	Darstellung der ITS-Region.	4
Abb. 2	Ausschnitt eines Sequenz-Chromatogramms.	5
Abb. 3	Vorgang des Bootstrap-Algorithmus.	6
Abb. 4	Optische Veränderung der Färbung der Probe Ordynets00281 von Frischmaterial (A) zu Trockenmaterial (B).	14
Abb. 5	Optische Veränderung der Färbung der Probe Ordynets00283A von Frischmaterial (A) zu Trockenmaterial (B).	14
Abb. 6	Streudiagramm der Sporengrößen. Abgebildet sind alle gemessenen Sporengrößen für jede Probe.	15
Abb. 7	Ausschnitte aus den Sequenz-Chromatogrammen für den Primer ITS1f der Proben Ordynets00181 (A) und Ordynets00281 (B).	17
Abb. 8	Ausschnitt aus dem Alignment der Sequenzen der ITS-Region.	18
Abb. 9	Darstellung des phylogenetischen Stammbaumes anhand der <i>Distance-based</i> Methode.	19
Abb. 10	Darstellung des phylogenetischen Stammbaumes anhand der <i>Bayesian inference</i> Methode.	20
Abb. 11	Darstellung des phylogenetischen Stammbaumes anhand der <i>Maximum likelihood</i> Methode.	21

8. Tabellenverzeichnis

Nummer	Titel	Seite
Tab. 1	Auflistung der in Mitteleuropa im Zeitraum von 2019 bis 2022 gesammelten Proben der Gattung <i>Tomentellopsis</i> .	8
Tab. 2	Auflistung der GenBank Akzessionsnummern für die Sequenzen der <i>Tomentellopsis</i> Arten, welche für die Erstellung des Alignments der ITS-Region heruntergeladen wurden.	12
Tab. 3	Statistische Kenngrößen der Sporengröße für jeweils 30 vermessene Sporen der untersuchten Proben.	15
Tab. 4	Statistische Kenngrößen der Basidiengröße für jeweils 10 vermessene Basidien der untersuchten Proben.	16

Anhang:

Auflistung der zur Berechnung der phylogenetischen Stammbäume verwendeten Parameter:

Distance-based:

- FastME tool Version 2.1.6.1_1
- Evolutionary model: p-distance
- Equilibrium frequencies: False
- Gamma distributed rates across sites: Yes
- Gamma distribution parameter: 1.0
- Remove gap strategy: Pairwise deletion of gaps
- Starting tree (distance algorithm used): BIONJ
- Tree Refinement: Bal ME SPR
- Bootstrap Branch support: Yes
- Number of replicates: 200
- Decimal precision for branch lengths: 6

Maximum likelihood:

- PhyML+SMS Version 1.8.1_1
- Statistical criterion to select the model: AIC
- Tree topology search: SPR (Subtree Pruning and Regraphing)
- Branch support: Bootstrap (FBP+TBE)
- Number of bootstrap replicates: 200
- Number of random starting trees (no effect when NNI selected): 0

Bayesian inference:

- MrBayes Version 3.2.7_0
- Number of generations: 500.000
- Number of chains: 4
- Number of runs: 2
- Outgroup: 1
- Choose model: GTR
- Choose rates: (gamma) Gamma-distributed rates across sites
- 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

Phylogenetische Stammbäume unter Berücksichtigung der Astlängen:

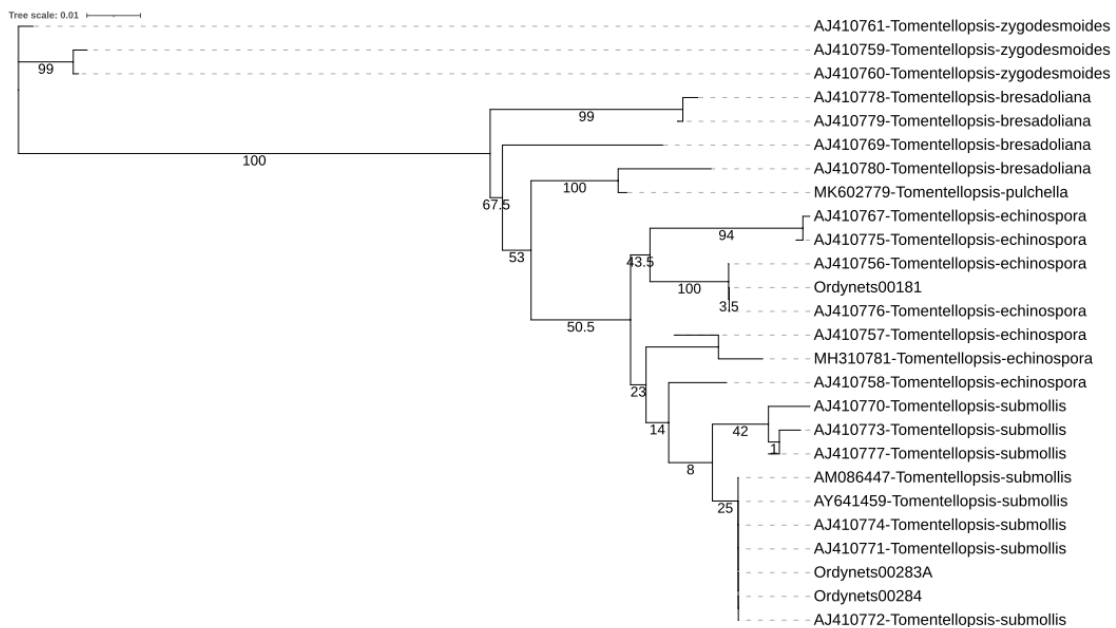


Abbildung S1: Darstellung des phylogenetischen Stammbaumes anhand der *Distance-based Methode* unter Berücksichtigung der Astlängen.

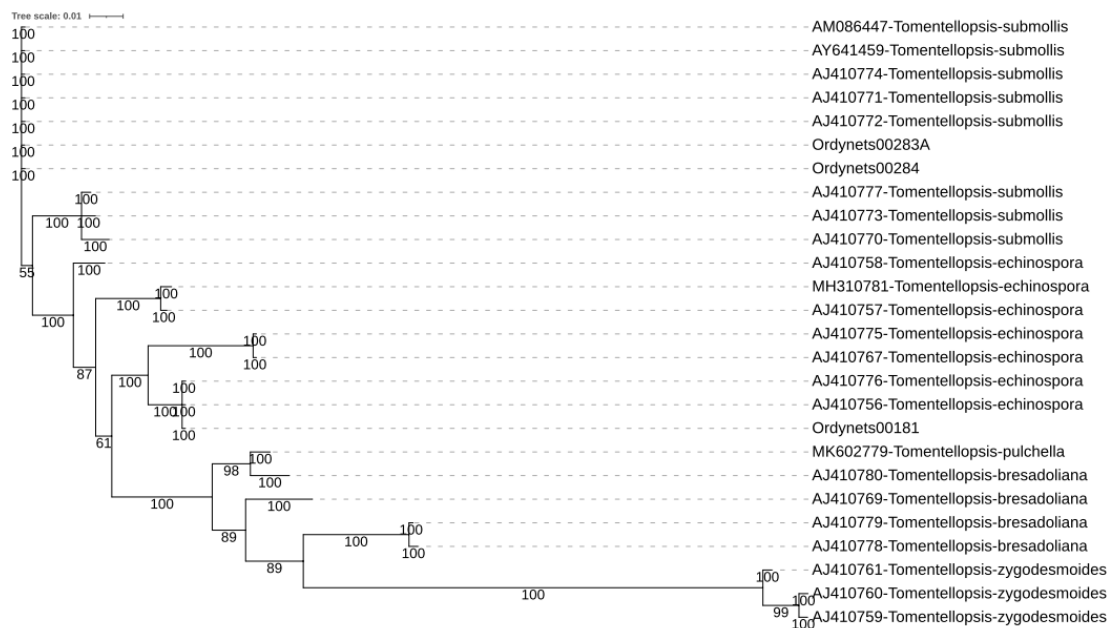


Abbildung S2: Darstellung des phylogenetischen Stammbaumes anhand der *Bayesian inference Methode* unter Berücksichtigung der Astlängen.

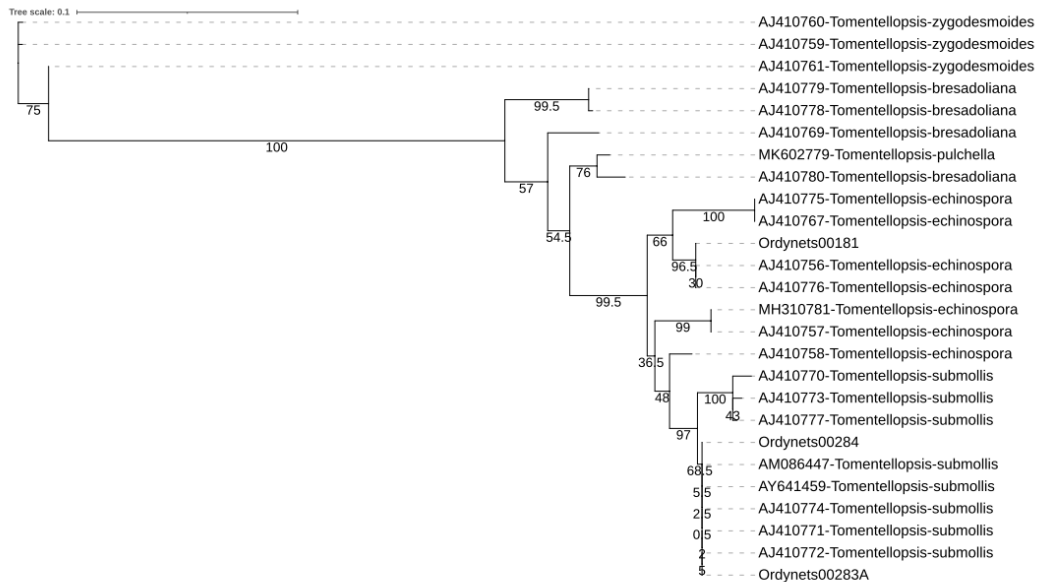


Abbildung S3: Darstellung des phylogenetischen Stammbaumes anhand der *Maximum likelihood* Methode unter Berücksichtigung der Astlängen.

Phylogenetische Stammbäume unter Einbezug der verworfenen Akzessionen:

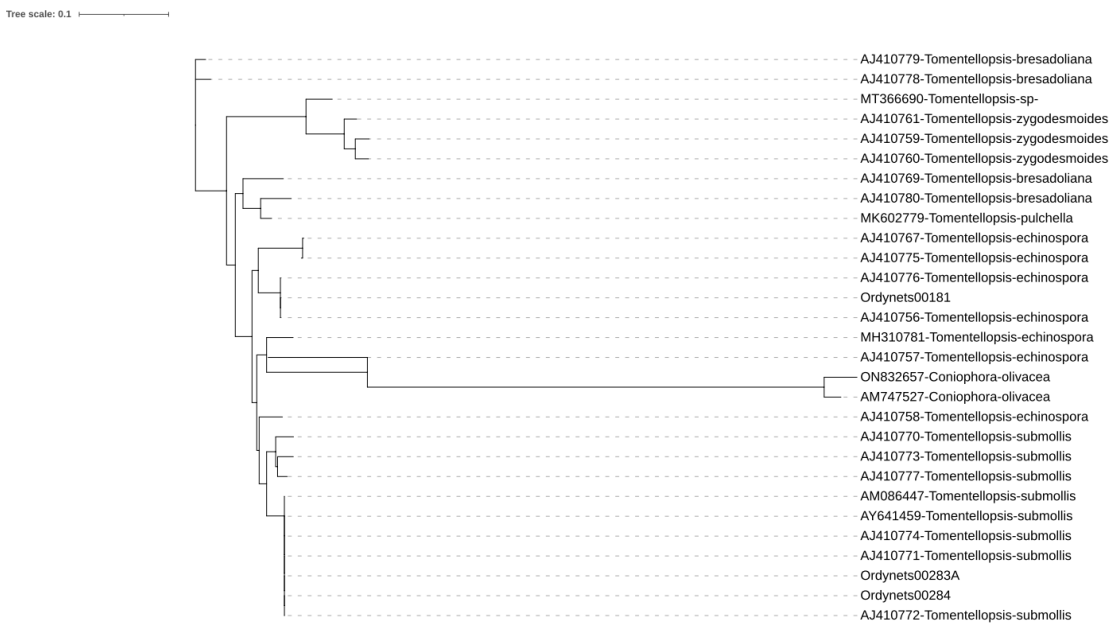


Abbildung S4: Darstellung des phylogenetischen Stammbaumes anhand der *Distance-based* Methode unter Berücksichtigung der Astlängen und verworfener Akzessionen.

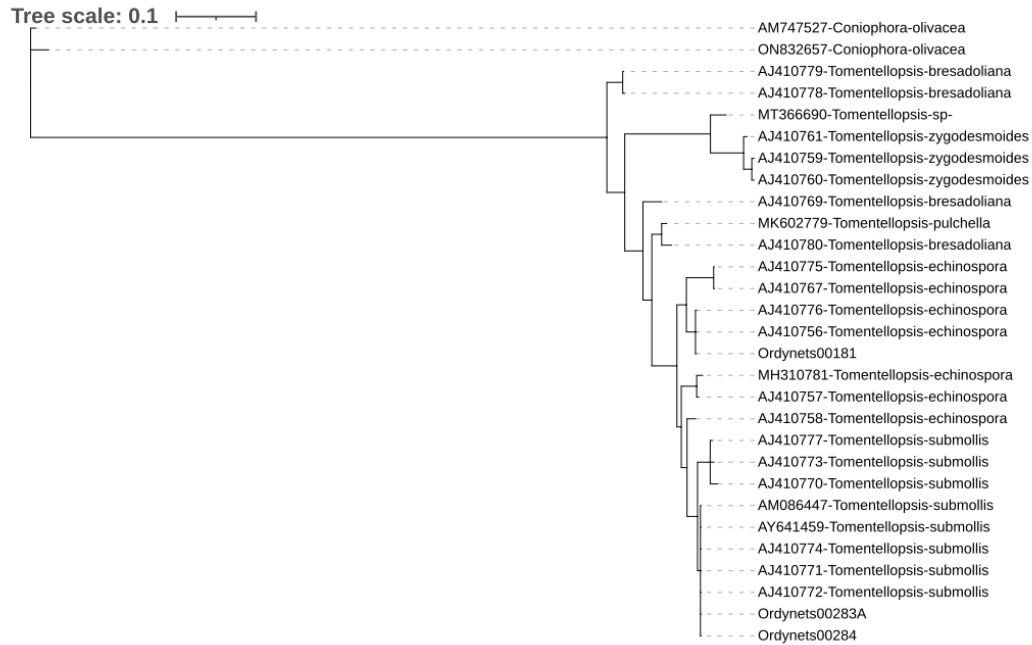


Abbildung S5: Darstellung des phylogenetischen Stammbaumes anhand der *Bayesian inference* Methode unter Berücksichtigung der Astlängen und verworfener Akzessionen.

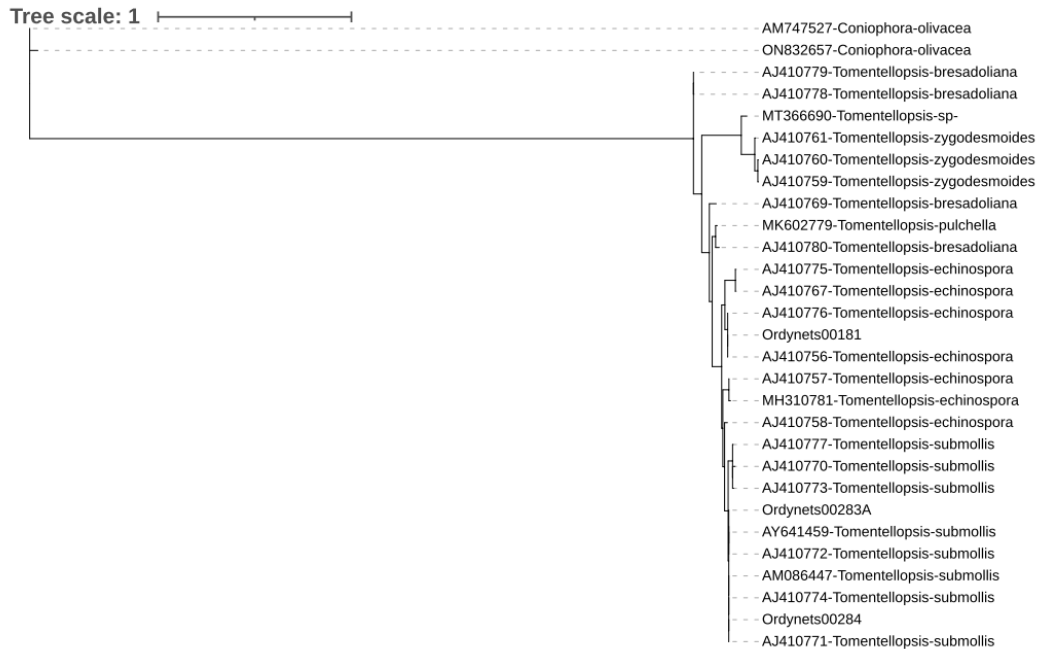


Abbildung S6: Darstellung des phylogenetischen Stammbaumes anhand der *Maximum likelihood* Methode unter Berücksichtigung der Astlängen und verworfener Akzessionen.

Skript zur Erstellung des Streudiagramms in R:

- `Spore_sizes = read.csv2("C:/Users/Jan_Rudolph/Desktop/Öko R Projekt/Tomentellopsis Scatterplot/Tomentellopsis Spore Sizes.csv")`
- `library(ggplot2)`

- `Ordynets00181 = Spore_sizes[c(1:30),]`
- `Ordynets00281 = Spore_sizes[c(31:58),]`
- `Ordynets00283A = Spore_sizes[c(59:88),]`
- `Ordynets00284 = Spore_sizes[c(89:118),]`
- `Ordynets00405 = Spore_sizes[c(119:146),]`

- `ggplot(Spore_sizes) +`
- `geom_point(data=Ordynets00181, aes(x=Laenge, y=Breite, color=Probe, shape=Probe), size=5)+`
- `geom_point(data=Ordynets00281, aes(x=Laenge, y=Breite, color=Probe, shape=Probe), size=5)+`
- `geom_point(data=Ordynets00283A, aes(x=Laenge, y=Breite, color=Probe, shape=Probe),size=5)+`
- `geom_point(data=Ordynets00284, aes(x=Laenge, y=Breite, color=Probe, shape=Probe), size=5)+`
- `geom_point(data=Ordynets00405, aes(x=Laenge, y=Breite, color=Probe, shape=Probe), size=5)+`
- `scale_shape_manual(values=c(1,2,3,4,5))+`
- `xlab("Länge (µm)")+`
- `ylab("Breite (µm)")+`
- `coord_fixed(1.3)+`
- `ggtitle("Sporengößen aller Proben")+`
- `theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5, face="bold"))+`
- `theme(axis.title.x = element_text(face="bold"))+`
- `theme(axis.title.y = element_text(face="bold"))`