

Zur verwandtschaftlichen Stellung der Gattung *Melanogaster* (Melanogastraceae, Basidiomycetes)

H. BESL, R. DORSCH und M. FISCHER

Institut für Botanik, Universität Regensburg,
D-93040 Regensburg

Eingegangen am 10. Mai 1996

H. Besl, R. Dorsch & M. Fischer (1996): On the systematic position of the genus *Melanogaster* (Melanogastraceae, Basidiomycetes). Z. Mykol. 62(2): 195-199.

Key Words: *Melanogaster*, *Paxillus*, *Sepedonium*, Boletales, chemotaxonomy, involutin, chamonixin, DNA analysis.

Summary: From fruitbodies of the hypogeous basidiomycete *Melanogaster broomeianus* a yellow pigment and the two cyclopentenones (-)-chamonixin and (-)-involutin have been isolated. These findings, together with the occurrence of the parasitic mould *Sepedonium chrysospermum*, indicate a close relationship of the Melanogastraceae to the Boletales. The laevorotation of the cyclopentenones suggests *Melanogaster* and *Paxillus* to be related. These results are supported also by restriction analyses of an enzymatically amplified region of the ribosomal DNA.

Zusammenfassung: Aus Fruchtkörpern des hypogäischen Basidiomyceten *Melanogaster broomeianus* konnten neben einem gelben Pigment die beiden Cyclopentenone (-)-Chamonixin und (-)-Involutin isoliert werden. Dies spricht, zusammen mit dem Vorkommen von *Sepedonium chrysospermum* als Parasit, für eine enge Verwandtschaft der Melanogastraceae mit den Boletales. Die optische Linksdrehung der Substanzen weist dabei auf eine Beziehung zur Gattung *Paxillus* hin. Auch Restriktionsanalysen eines enzymatisch amplifizierten Abschnitts der ribosomalen DNA stützen diese Ergebnisse.

Einleitung

Für hypogäische, also unterirdisch wachsende Gastromyceten werden oftmals verwandtschaftliche Beziehungen zu nicht gastroiden, meist gestielt-hutförmigen Pilzen diskutiert. Dabei sind in einer Reihe von Fällen secotioide Bindeglieder bekannt, die eine Ableitung der Hypogäen von nicht gastroiden Vorfahren deutlich machen. Fehlen derartige Übergänge, so bleiben oft nur wenige morphologisch-anatomische Merkmalskomplexe zur Argumentation übrig. In derartigen Fällen können chemotaxonomische, molekularbiologische oder ökologische Hinweise weiterhelfen. Als Beispiele hierfür seien die Gattungen *Chamonixia* und *Rhizopogon* genannt, bei denen die enthaltenen Inhaltsstoffe zu einer Bestätigung ihrer Eingliederung in die Ordnung der Boletales führten (STEGELICH et al. 1971, 1977).

Bei der Gattung *Melanogaster* Corda (Schleimtrüffel) existieren bisher noch kaum konkrete Vorstellungen über ihr verwandtschaftliches Umfeld. Besteht hinsichtlich der Familienzuge-

hörigkeit noch überwiegend Übereinstimmung (Fam. Melanogastraceae E.Fisch.), sind die Meinungen über die Ordnung doch recht unterschiedlich. Während PEGLER et al. (1993) die Melanogastraceae bei den Agaricales (nahe *Coprinus*) einordnen (siehe auch THIERS 1984) und viele Autoren (z.B. KREISEL 1969, JÜLICH 1982) die monotypischen Melanogastrales bevorzugen, postuliert TRAPPE (1975) eine „*Rhizopogon-Alpova-Melanogaster*-Linie“ und damit gewisse Beziehungen zu den Boletales. Letztere Ordnung ist gut durch charakteristische Inhaltsstoffe gekennzeichnet (siehe GILL & STEGLICH 1987).

Reichliche Funde der kartoffelähnlichen Fruchtkörper von *Melanogaster broomeianus* Berk. in Tul. in den Jahren 1993 bis 1995 ermöglichten es uns, nun erstmals eine Untersuchung der Inhaltsstoffe durchzuführen.

Material und Methoden

Pilzmaterial:

Fruchtkörper (Belege der Aufsammlungen befinden sich im Herbarium REG): *Hymenogaster olivaceus* Vitt.: 11.10.94, Universitätsgelände Regensburg, unter *Carpinus betulus*, leg. Dorsch, det. Fuchs. *Melanogaster broomeianus* Berk. in Tul.: Mehrere Aufsammlungen von Juni bis Oktober 1994, Campus der Universität Regensburg, unter *Carpinus betulus*, leg. Besl/Dorsch, det. Besl. *Paxillus involutus* (Batsch: Fr.) Fr.: 5.10.94, Botanischer Garten Regensburg, unter *Pinus sylvestris*, leg. & det. Besl; 7.9.94, Universitätsgelände Regensburg, unter *Tilia spec.*, leg. & det. Schmid. *Rhizopogon luteolus* Fr.: 6.10.94, Offenstetten bei Abensberg, Sandkiefernwald, leg. & det. Besl/Dorsch.

Mycelkulturen (aus der Kulturensammlung des Instituts für Botanik, Universität Regensburg): *Alpova olivaceotinctus* (Smith & Zeller) Trappe: Nr. 637, San Bernardino Co., USA, mis. J.M. Trappe. *Melanogaster broomeianus* Berk. in Tul.: Nr. 827, Universitätsgelände Regensburg.

Chemische Untersuchungen:

Das frisch gesammelte Material von *Melanogaster broomeianus* wurde von grobem Schmutz befreit und bis zur Aufarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

Die Pilzfruchtkörper wurden mit schwach angesäuertem Aceton extrahiert, wie in BESL et al. (1980) beschrieben. Die Vortrennung der Inhaltsstoffe erfolgte mittels Säulenchromatographie an acetyliertem Polyamid mit Laufmitteln aufsteigender Polarität und an Sephadex LH-20 mit Aceton. Wir erhielten so ein gelbes Pigment und ein Gemisch farbloser Substanzen, von denen zwei durch präparative Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, Toluol/Ethylformiat/Ameisensäure 5:5:3) rein erhalten werden konnten. Die Identifizierung der beiden letztgenannten Substanzen erfolgte durch chromatographischen und spektroskopischen Vergleich mit authentischen Proben.

DNA-Untersuchungen:

Die Isolierung der DNA erfolgte aus frischen oder lyophilisierten Fruchtkörpern bzw. Mycelkulturen der oben genannten Pilzarten. Mittels der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) wurde jeweils ein etwa 1.9 kb großer Abschnitt der kerncodierten ribosomalen DNA (rDNA) amplifiziert, definiert durch die Primerkombination 5.8SR-LR7 (Primersequenzen siehe VILGALYS & HESTER 1990). DNA-Isolierung und Amplifizierung erfolgten wie in FISCHER (1996) angegeben.



Abb. 1: *Melanogaster broomeianus* (Dia: Thoma)

Der amplifizierte Abschnitt wurde einer Restriktionsanalyse unterzogen. Die verwendeten Enzyme waren *Alu* I, *Cfo* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Hpa* II, *Mbo* I, *Rsa* I und *Taq* I. Die phenetische Auswertung der Restriktionsdaten erfolgte mittels einer Clusteranalyse durch UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages).

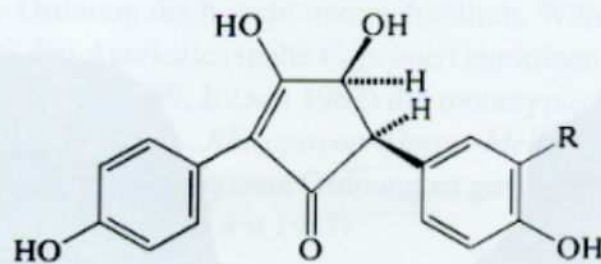
Ergebnisse und Diskussion

Besonders auffällig war schon am Dünnschichtchromatogramm (DC) des Rohextrakts ein relativ unpolares, leuchtend gelbes Pigment, dessen Strukturklärung noch nicht abgeschlossen ist. Es wird deshalb an dieser Stelle nicht weiter behandelt.

Von großer chemotaxonomischer Bedeutung sind dagegen die beiden isolierten farblosen Verbindungen, die sich schon am DC des Rohextrakts durch ihr Farbverhalten als die beiden Cyclopentenone Chamonixin und Involutin zu erkennen gaben. Bestätigt wurde dies durch den Vergleich der UV- und ¹H-NMR-Spektren mit authentischen Proben. Die beiden Substanzen können für das Blauen von *Chamonixia caespitosa* bzw. für das Bräunen von *Paxillus involutus* verantwortlich gemacht werden. Beide gehören dem für die Ordnung der Boletales charakteristischen Atromentin-Stoffwechsel an.

Chamonixin und/oder Involutin wurden bisher nur in folgenden Pilzarten, sämtlich Vertreter der Boletales, gefunden:

- Chamonixia caespitosa* (Roll.) E.Fisch. (STEGLICH et al. 1977)
- Fuscoboletinus serotinus* (Frost) A.H.Smith & Thiers (BESL & BRESINSKY 1996)
- Gyrodon lividus* (Bull.: Fr.) Sacc. (BESL et al. 1980)
- Leucogyrophana pinastri* (Fr.) Ginns & Weresub (BESL et al. 1986)
- Paxillus filamentosus* (Scop.) Fr. (KÄMMERER et al. 1985)
- Paxillus involutus* (Batsch: Fr.) Fr. (EDWARDS et al. 1967)
- Suillus viscidus* (Fr. & Hök) S. Rauschert (BESL & BRESINSKY 1996)



R = H: Chamonixin

R = OH: Involutin

Der Nachweis von Chamonixin und Involutin in *Melanogaster broomeianus* ist somit ein deutlicher Hinweis auf eine enge Beziehung von *Melanogaster* zu den Boletales.

Durch die beiden asymmetrisch substituierten C-Atome im Cyclopenten-Ring ist eine optische Aktivität zu erwarten und in den Fällen von *Chamonixia*, *Gyrodon* und *Paxillus* auch nachgewiesen (EDWARDS & GILL 1973, STEGLICH et al. 1977, BESL et al. 1980). Während bei *Chamonixia* das rechtsdrehende (+)-Chamonixin vorliegt, enthalten *Gyrodon* und *Paxillus* die linksdrehenden Enantiomeren. Aus den CD-Spektren von Chamonixin und Involutin aus *Melanogaster broomeianus* ergibt sich hierfür eine Linksdrehung und damit dieselbe Konfiguration wie bei *Paxillus involutus*. Dies kann als Hinweis auf eine engere Verwandtschaft zwischen *Melanogaster* und *Paxillus* gedeutet werden.

Über Beziehungen zu *Rhizopogon* bzw. *Alpova* können derzeit aus chemotaxonomischer Sicht kaum Aussagen gemacht werden. Chamonixin und/oder Involutin konnten zwar vereinzelt in Vertretern der *Rhizopogon* sehr nahe stehenden Gattung *Suillus* nachgewiesen werden, doch erlauben die fehlenden Kenntnisse über deren optische Drehung keine näheren Rückschlüsse.

Befall durch *Sepedonium chrysospermum* (Bull.: Fr.) Link

Der Goldschimmel *Sepedonium chrysospermum* und seine nächsten Verwandten sind als Pilzparasiten auf Fruchtkörper vieler Gattungen der Boletales spezialisiert. Umgekehrt weist ein Befall durch *Sepedonium* auf eine Zugehörigkeit des Wirtes zu dieser Ordnung hin, wie beispielsweise bei *Rhizopogon* (HEIM 1948), *Gautieria* (PEGLER et al. 1993), sowie bei *Pisolithus* und *Sclerderma* (GILL & WATLING 1986). So darf auch der Fund von *Sepedonium chrysospermum* an *Melanogaster broomeianus* (HAWKER 1955) als zusätzliches Indiz für die Verwandtschaft dieser gastroiden Pilze mit den Boletales gewertet werden.

DNA-Untersuchung

Die PCR-Produkte wiesen eine Größe von 1.92 kb für *Alpova*, *Melanogaster*, *Paxillus* und *Rhizopogon*, eine Größe von 1.83 kb für *Hymenogaster* auf.

Die Restriktionsanalysen ergaben eine Anbindung von *Melanogaster* an *Paxillus*. Nach der Clusteranalyse traten die beiden Gattungen als Schwestertaxa auf (Distanzwert D = 53%) und bildeten gemeinsam mit *Rhizopogon* (D = 56%) ein abgeschlossenes Cluster. *Alpova* und *Hymenogaster* standen mit deutlich höheren Distanzwerten (D = 75% bzw. 80%) außerhalb dieser Gruppe.

Auch die DNA-Analysen stützen demnach die mutmaßliche Zugehörigkeit von *Melanogaster* zu den Boletales.

Dank

Unser Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Bresinsky (Regensburg) für sein Interesse an vorliegender Arbeit, Herrn Prof. Dr. W. Steglich (München) und dessen Mitarbeitern (vor allem Herrn Dr. N. Arnold) für die spektroskopischen Untersuchungen, sowie Herrn M. Binder (Regensburg) für praktische Hilfestellungen. Herrn Prof. Dr. J.M. Trappe (Corvallis, USA) danken wir für die bereitwillige Überlassung der Mycelkultur von *Alpova olivaceotinctus*.

Literatur

- BESL, H. & A. BRESINSKY (1996) - Chemosystematics of Boletales. Part 2: Suillaceae and Gomphidiaceae (suborder Suillineae). Pl. Syst. Evol., im Druck.
- BESL, H., A. BRESINSKY, R. HERRMANN & W. STEGLICH (1980) - Chamonixin und Involutin, zwei chemosystematisch interessante Cyclopentandione aus *Gyrodon lividus* (Boletales). Z. Naturforsch. **35c**: 824-825.
- BESL, H., A. BRESINSKY & A. KÄMMERER (1986) - Chemosystematik der Coniophoraceae. Z. Mykol. **52**: 277-286.
- EDWARDS, R.L., G.C. ELSWORTHY & N. KALE (1967) - Involutin, a diphenylcyclopentenone from *Paxillus involutus* (Oeder ex Fries). J. Chem. Soc. (C), 405-409.
- EDWARDS, R.L. & M. GILL (1973) - Identification of involutin as (-)-cis-5-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-cyclopent-2-enone and synthesis of (+/-)-cis-involutin trimethyl ether from isoxerocomic acid derivatives. J. Chem. Soc., Perkin I: 1529-1537.
- FISCHER, M. (1996) - Molecular and microscopical studies in the *Phellinus pini* group. Mycologia **88**: 230-238.
- GILL, M. & W. STEGLICH (1987) - Pigments of Fungi (Macromycetes). Progr. Chem. Org. Nat. Prod. **51**: 1-317.
- GILL, M. & R. WATLING (1986) - The relationships of *Pisolithus* (Sclerodermataceae) to other fleshy fungi with particular reference to the occurrence and taxonomic significance of hydroxylated pulvinic acids. Pl. Syst. Evol. **154**: 225-236.
- HAWKER, L.E. (1955) - Hypogeous fungi. IV and V. Trans. Br. Mycol. Soc. **38**: 73-77.
- HEIM, R. (1948) - Phylogeny and natural classification of macro-fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. **30**: 161-178.
- JÜLICH, W. (1982, „1981“) - Higher taxa of Basidiomycetes. Bibl. Mycol. **85**: 485 S.
- KÄMMERER, A., H. BESL & A. BRESINSKY (1985) - Omphalotaceae fam. nov. und Paxillaceae, ein chemotaxonomischer Vergleich zweier Pilzfamilien der Boletales. Pl. Syst. Evol. **150**: 101-117.
- KREISEL, H. (1969) - Grundzüge eines natürlichen Systems der Pilze. Lehre, 245 S.
- PEGLER, D.N., B.M. SPOONER & T.W.K. YOUNG (1993) - British truffles. A revision of British hypogeous fungi. Royal Botanic Gardens, Kew, 214 S.
- STEGlich, W., I. PILS & A. BRESINSKY (1971) - Nachweis und chemotaxonomische Bedeutung von Pulvinsäuren in *Rhizopogon* (Gasteromycetes). Z. Naturforsch. **26b**: 376-377.
- STEGlich, W., A. THILMANN, H. BESL & A. BRESINSKY (1977) - 2,5-Diaryl-cyclopentan-1,3-dione aus *Chamonixia caespitosa* (Basidiomycetes). Z. Naturforsch. **32c**: 46-48.
- THIERS, H.D. (1984) - The secotioid syndrome. Mycologia **76**: 1-8.
- TRAPPE, J.M. (1975) - A revision of the genus *Alpova* with notes on *Rhizopogon* and the Melanogastraceae. Beih. Nova Hedwigia **51**: 279-309.
- VILGALYS, R. & M. HESTER (1990) - Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. J. Bacteriol. **172**: 4238-4246.